



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Oxidación aerobia de metano en arrozales bajo sistemas de rotación de intensidad variable

Sofia Croci Bentura

Programa de Posgrado en Química

Facultad de Química

Universidad de la República

Montevideo – Uruguay

Noviembre de 2023



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Oxidación aerobia de metano en arrozales bajo sistemas de rotación de intensidad variable

Sofia Croci Bentura

Tesis de Maestría presentada al Programa de Posgrado en Química, Facultad de Química de la Universidad de la República, como parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de Magíster en Química.

Director de tesis:

Prof. Adj. Dra. Lucía Ferrando Magnabosco

Montevideo – Uruguay
Noviembre de 2023

INTEGRANTES DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

Prof. Agr. Dr. Javier Menes

Prof. Asociado Dra. Ángela Cabezas

Dra. Celina Zabaloy

Agradecimientos

Apoyo financiero

Quiero agradecer a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por la financiación del proyecto “Ciclo del carbono en sistemas de producción de arroz” (FSA_PI_2018_1_148579) en el cual se enmarca esta tesis de maestría y por el que recibí una beca de apoyo a estudios de maestría lo que me permitió llevar adelante este proceso.

Apoyo académico

Agradezco a mi tutora Lucia Ferrando por brindarme la oportunidad de realizar esta maestría e introducirme en el mundo de la microbiología. Gracias por todo el conocimiento compartido, por el apoyo y dedicación incluso en tiempos de pandemia vía zoom. Pero sobre todo por la paciencia.

A Pilar Irisarri por darme la oportunidad también de participar en este proyecto y por abrirme las puertas de su laboratorio.

Al Prof. Agr. Dr. Javier Menes y las Prof. Asociado Dra. Ángela Cabezas y Dra. Celina Zabaloy por su disposición a formar parte del Tribunal y por la dedicación y el tiempo destinados a la lectura de esta tesis.

Gracias a los compañeros de la Cátedra de Microbiología por contribuir a mi formación académica y personal. En particular, a todo el Laboratorio de Ecología Microbiana y Medioambiental por recibirme cálidamente desde el día uno y enseñarme todo lo que sé del mundo académico. A Ana y Javier por los consejos y enseñanzas. A Andrea, Cecilia, Luciana, Valentina y Diego, por contagiarme su amor por la investigación, por compartir desinteresadamente su conocimiento y enseñarme desde hacer una PCR a un análisis de datos de secuenciación.

Apoyo técnico

A la cátedra de microbiología de Facultad de Agronomía y especialmente a Gabriela Illarze por instruirme y ayudarme con las determinaciones de amonio y nitrato.

Al INIA Treinta y Tres y los técnicos de la Unidad Experimental Paso de la Laguna por su colaboración con los muestreos realizados y por su entera disposición a responder consultas y conceder la información solicitada.

A Jorge Castiglioni por el solidario préstamo del Refractómetro de ABBE y a Bioquímica por el préstamo de la bomba peristáltica lo que nos permitió poner a punto la técnica SIP.

Apoyo personal

Gracias nuevamente a Andrea, Cecilia, Luciana y Valentina por su amistad y por las “ganas de vivir” de las tardes. Son el mejor equipo para pasar largas horas de laboratorio y compartir lo dulce y lo amargo de la vida estudiantil, no me imagino haber transitado este camino sin ustedes.

A mis amigas por su amistad incondicional, por entender mis ausencias y momentos de estrés, por ayudarme a desconectar cuando lo necesito, por acompañarme en todas las etapas de mi vida y estar siempre en los momentos buenos y en los malos, por creer en mí a veces más de lo que yo lo hago.

A mi familia, mamá, papá, Maru y Marti por bancarme que siga en este camino, aunque no entiendan por qué sigo en él. Gracias por soportarme cuando me pongo difícil, por ponerse felices con mis logros y acompañarme siempre. Agradecimiento especial a mi madre por ser mi correctora de estilo personal, por leer todos mis resúmenes, informes, borradores y tesis, aunque no esté familiarizada con el tema.

A Guille, gracias por socorrerme todas las veces que la computadora me dio problemas, por contestarme y ayudarme en cualquier momento del día.

A Gastón, que llegó en medio de esta locura y decidió quedarse. Gracias por la compañía en las noches eternas de computadora, por los consejos sabios, las palabras de aliento y el apoyo incondicional.

Gracias a los que me acompañaron en este camino, pero no llegaron a ver el resultado.

A todos los que de una forma u otra hicieron esto posible... ¡Muchas gracias!

Resumen

El cultivo de arroz en Uruguay tradicionalmente se ha caracterizado por su baja intensidad en el uso del suelo, lo que se logra rotando el cultivo con varios años de pasturas destinadas a la ganadería. Actualmente la tendencia es a la intensificación de los cultivos, ya sea aumentando la frecuencia del cultivo de arroz en el sistema, acortando el ciclo de pasturas o introduciendo nuevos cultivos de verano, lo que plantea desafíos respecto al mantenimiento de la sustentabilidad del cultivo. Diversos autores han estudiado el impacto del uso de distintas rotaciones arroceras sobre el microbioma del suelo, pero aún es necesario profundizar sobre su efecto sobre las comunidades microbianas implicadas en la producción y consumo de metano, potente gas de efecto invernadero, en estos sistemas productivos. Las bacterias metanótrofas son las responsables de la oxidación aerobia del metano por lo que poseen un papel clave en la regulación del flujo de este gas entre el suelo y la atmósfera. El objetivo de este trabajo fue contribuir a una mejor comprensión de la actividad, abundancia y estructura de la comunidad metanótrofa asociada al cultivo de arroz (suelo y rizósfera) bajo sistemas de rotación con diferente intensidad en el uso del suelo.

Para esto se seleccionaron tres rotaciones arroceras contrastantes (arroz-pasturas, arroz continuo y arroz-soja) de un ensayo de campo a largo plazo instalado en INIA Treinta y Tres, Uruguay. Se evaluó la dinámica de la abundancia de metanótrofos (qPCR dirigida al gen marcador funcional *pmoA*) y el potencial de oxidación de metano (POM) en suelo y suelo rizosférico de arroz a lo largo del ciclo de cultivo. Además, se evaluó el efecto de la concentración de amonio del suelo sobre la abundancia de la población metanótrofa y su potencial de oxidación de metano. Los resultados obtenidos mostraron un efecto de la intensificación del uso del suelo en el POM y en la abundancia de metanótrofos aerobios en suelo y rizósfera de arroz en este sistema. La rotación de arroz continuo presentó la mayor abundancia de bacterias oxidantes de metano sin distinción del momento del ciclo de cultivo. Asimismo, al inicio del ciclo de cultivo, en la etapa de macollaje, esta rotación arroceras presentó los mayores potenciales de oxidación de metano en suelo y rizósfera de arroz. En el caso del POM se observó un efecto importante de la etapa del cultivo, obteniéndose valores significativamente mayores en la etapa de macollaje. Se observó también una correlación positiva significativa entre el contenido de amonio del suelo y su POM.

Por otra parte, mediante secuenciación masiva de genes 16S ARNr (Illumina Miseq) se estudió la estructura y diversidad del microbioma bacteriano y metanótrofo de suelo rizosférico de arroz proveniente de dos rotaciones diferentes (arroz continuo y arroz-pasturas). Si bien la comunidad bacteriana total no se vio afectada por la rotación agrícola, sí se observó un efecto en la comunidad metanótrofa. Mientras que en la rotación arroz continuo se observó una fuerte dominancia del género *Methylocystis*, en la rotación arroz-pasturas dominó el género *Methylocella*.

Por último, se optimizó exitosamente la técnica *Stable Isotope Probing* utilizando $^{13}\text{CH}_4$ en condiciones de microcosmos para el estudio de la comunidad metanótrofa que se encuentra activa en suelo rizosférico de arroz de dos rotaciones contrastantes. Si bien *Methylocystis* fue el género dominante en ambas comunidades activas, un estudio de abundancias diferenciales permitió constatar que los géneros *Methylothermophilus* y *Methyloglobulus* se encuentran activos en mayor abundancia en muestras del sistema de rotación arroz-pasturas, mientras que en la rotación de arroz continuo fueron los géneros *Crenothrix*, *Methyloparacoccus* y *Candidatus Methylospira* los que se encontraron mayormente representados.

En conclusión, esta tesis mostró que existe un efecto de la intensificación en la comunidad metanótrofa total y activa asociada a la planta de arroz, y que éste es mayor en este grupo microbiano que en la comunidad bacteriana total. Este resultado sugiere que la comunidad metanótrofa podría ser sensible a cambios en el manejo del suelo y la historia previa del cultivo, lo que representa un resultado interesante en la búsqueda de estrategias de mitigación de las emisiones de metano en estos agroecosistemas.

Palabras clave:

Arroz, intensificación, bacterias metanótrofas, *pmoA*, *Stable Isotope Probing*, secuenciación 16S ARNr

Tabla de contenidos

Resumen.....	vii
Introducción general	12
Cultivo de arroz: características y relevancia.....	12
Particularidades del sistema de producción de arroz en Uruguay	13
Procesos biogeoquímicos en el sistema arrocero y su impacto ambiental	15
Oxidación biológica de metano.....	19
Ecología de bacterias metanótrofas aerobias.....	24
Objetivos	27
Objetivo general.....	27
Objetivos específicos.....	27
Trabajo de tesis	27
Capítulo 1. Impacto de la intensificación en la abundancia, actividad y estructura de la comunidad metanótrofa asociada a la planta de arroz	29
1.1 Introducción	30
1.2 Materiales y métodos	33
1.2.1 Muestreo.....	33
1.2.2 Procesamiento de muestras.....	35
1.2.3 Caracterización fisicoquímica de los suelos (desnudo y rizosférico)	36
1.2.4 Potencial de oxidación de metano.....	36
1.2.5 Extracción y cuantificación de ADN.....	37
1.2.6 Abundancia de genes marcadores de metanotrofia en suelo y rizósfera.....	38
1.2.7 Ensayo de evaluación del efecto del amonio sobre la actividad metanótrofa potencial.....	39
1.2.8 Secuenciación masiva del gen 16S ARNr de comunidades bacterianas rizosféricas	40
1.2.9 Análisis estadístico	41
1.3 Resultados	42
1.3.1 Caracterización fisicoquímica de suelos y rizósferas	42
1.3.2 Potencial de oxidación de metano de suelo y rizósfera.....	44
1.3.3 Abundancia de bacterias metanótrofas en suelo y rizósfera.....	47
1.3.4 Correlación entre parámetros fisicoquímicos y la actividad y abundancia de metanótrofos en suelo	49
1.3.5 Ensayo de evaluación del efecto del amonio sobre la actividad metanótrofa potencial.....	51
1.3.6 Estructura y diversidad de comunidades microbianas rizosféricas de rotaciones contrastantes mediante secuenciación de genes 16S ARNr	53

1.4 Discusión y conclusiones	61
1.4.1 Efecto de la intensificación y parámetros fisicoquímicos en la actividad y abundancia de metanótrofos en suelo y rizósfera de arroz	61
1.4.2 Efecto del agregado de amonio en la actividad metanótrofa potencial aerobia de suelos rizosféricos de arroz	65
1.4.3 Comunidad microbiana de suelos rizosféricos de arroz de diferentes rotaciones arroceras.....	69
Capítulo 2. <i>Stable Isotope Probing</i> para el estudio de la comunidad metanótrofa activa en rizósfera de arroz.....	76
2.1 Introducción	77
2.2 Materiales y métodos.....	80
2.2.1 Experimento en microcosmos de incubación de suelo rizosférico con metano marcado ($^{13}\text{CH}_4$)	80
2.2.2 Extracción de ADN	81
2.2.3 Optimización de la ultra centrifugación y fraccionamiento del gradiente de CsCl	81
2.2.4 Abundancia del gen <i>pmoA</i> en las fracciones obtenidas	83
2.2.5 Secuenciación masiva de genes 16S ARNr	84
2.2.6 Análisis estadístico	86
2.3 Resultados	86
2.3.1 Experimento en microcosmos de incubación de suelo rizosférico con metano marcado ($^{13}\text{CH}_4$)	86
2.3.2 Optimización de la ultra centrifugación y fraccionamiento del gradiente de CsCl	87
2.3.3 Abundancia del gen <i>pmoA</i> en las fracciones obtenidas	90
2.3.4 Evaluación de la optimización de la técnica SIP mediante secuenciación masiva dirigida al gen 16S ARNr	91
2.3.5 Comunidad bacteriana y metanótrofa activa en rizósfera de plantas de arroz de rotaciones contrastantes.....	100
2.4 Discusión y conclusiones	107
2.4.1 Optimización de la técnica ADN- <i>Stable Isotope Probing</i>	107
2.4.2 Estudio de la comunidad activa por secuenciación de genes 16S ARNr	111
Conclusiones generales	116
Perspectivas.....	120
Referencias bibliográficas.....	121
Apéndices	136
Apéndice I. Muestreos realizados e identificación de las muestras	136
Apéndice II. Caracterización fisicoquímica	138

Apéndice III. Abundancia de bacterias metanótrofas en suelo y rizósfera: curvas estándar y de <i>melting</i>	139
Apéndice IV. Ensayo de actividad metanótrofa con agregado de amonio	140
Apéndice V. Secuenciación de genes 16S ARNr de suelo rizosférico de arroz.....	141
Apéndice VI. Optimización de la técnica ADN - SIP	143
Apéndice VII. Secuenciación masiva de genes 16S ARNr de fracciones SIP.....	144

Introducción general

Cultivo de arroz: características y relevancia

El arroz es considerado el alimento básico del 50% de la población mundial (Ding et al, 2019) y se estima que la demanda de este alimento aumentará entre 2010 y 2030 cerca de un 35 % (Ma et al., 2010), por lo que se requiere una producción de arroz que permita alimentar a la población mundial en aumento. Esto hace que el cultivo de arroz (*Oryza sativa*) constituya una de las actividades agrícolas de mayor relevancia a nivel mundial.

El arroz es uno de los principales cultivos en la matriz productiva del Uruguay. La relevancia económica del arroz en la agricultura nacional es muy alta, más del 90% de lo que se produce se exporta, y actualmente Uruguay ocupa el sexto puesto entre los exportadores mundiales, siendo los principales destinos la Unión Europea, Brasil e Irak (ACA, 2023).

En este país se diferencian tres zonas de producción (Figura 1) con características específicas relacionadas al tipo de suelo, topografía y condiciones climáticas (Deambrosi, 2007). La zona norte-litoral oeste está conformada por los departamentos de Artigas, Salto, Paysandú, Río Negro y Soriano; la zona centro por Rivera, Tacuarembó y Durazno y la zona este por Cerro Largo, Treinta y Tres, Rocha y Lavalleja. En la zafra arrocerá 2019/2020 se alcanzó un rendimiento promedio de 8620 kg/ ha (ACA, 2020). La zona este representó el 72% del área sembrada total, que abarcó más de 140000 hectáreas, y en dicha zona se cosechó el 71% de la producción total. Actualmente se ha logrado aumentar el rendimiento, alcanzándose un rendimiento promedio de 9577 kg/ha en un total de 159700 hectáreas cultivadas en la zafra 2022/2023. La mayor parte de los cultivares plantados en el país surgen del Programa de Mejoramiento Genético del INIA. Dentro de la especie *Oryza sativa* hay dos subespecies principales, Indica y Japónica, que han servido como excelente recurso para mapeo genético y desarrollo de nuevas variedades (Fernández-Baca et al., 2021). En las zafas 2019/2020 y 2022/2023 la variedad INIA Merín (cultivar del subtipo Índica) fue la más sembrada correspondiendo al 29% y 44% del área total, respectivamente. Este genotipo se ha destacado por su alta productividad, calidad molinera y sólida resistencia a *Pyricularia* (hongo patógeno del arroz) por lo que es menos dependiente de la aplicación de fungicidas (ACA, 2020).

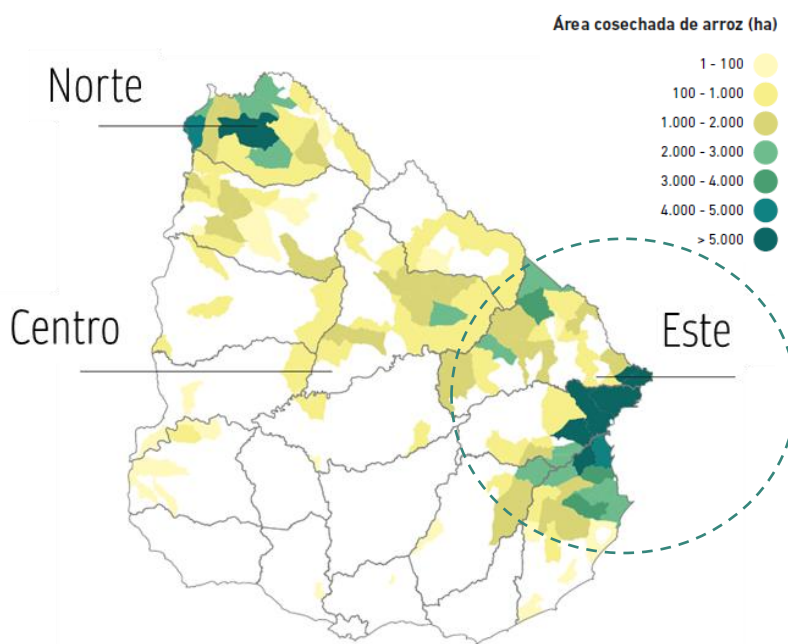


FIGURA 1. Distribución del cultivo de arroz en Uruguay (zafra 2016-2017). Figura extraída y modificada de la Guía de buenas prácticas de INIA (ACA, 2018).

En Uruguay el arroz se siembra en condiciones de secano entre setiembre y noviembre, pero lo sigue una fase en inundación que se extiende desde los 15 a 30 días posteriores a la emergencia hasta completar la madurez fisiológica de la planta, 15 o 20 días previos a la cosecha. Por lo tanto, la mayor parte del ciclo del cultivo se desarrolla en suelo inundado. Como fertilizantes se aplican fósforo y nitrógeno, así como potasio en algunos casos.

Particularidades del sistema de producción de arroz en Uruguay

El cultivo de arroz tradicional en nuestro país se caracteriza por alcanzar altos rendimientos utilizando prácticas de manejo agronómico con bajo impacto ambiental. Se basa en un sistema de producción en rotaciones que alterna dos años de arroz (cultivo de verano con cultivos de cobertura en invierno) con tres años de pasturas (gramíneas o leguminosas forrajeras) consecutivas, con pastoreo de ganado vacuno y ovino. Se busca mantener siempre el suelo cubierto en las distintas rotaciones de forma de evitar pérdida de nutrientes y crecimiento de malezas (Macedo et al., 2016). La incorporación de pasturas permite el descanso del suelo, reduce el deterioro de sus propiedades físicas por el cultivo de arroz y mejora en forma considerable su estructura. Se ha observado que esta rotación aumenta los contenidos de carbono orgánico del suelo y carbono en la biomasa microbiana frente a otras

rotaciones (Benintente et al., 2008; Macedo et al., 2022). Además, en el caso de las leguminosas, aporta nitrógeno al sistema y mejora su disponibilidad para el cultivo de arroz, reduciendo la dependencia de insumos externos (comparado con otros sistemas arroceros en el mundo) y aumentando la fertilidad del suelo (Maguire et al., 2020; Pittelkow et al., 2016). En suma, esta rotación de baja intensidad ha demostrado ser una alternativa productiva y ambientalmente ventajosa, así como la base del crecimiento sostenido de la productividad y la conservación de los recursos naturales en el tiempo, con un relativo bajo uso de insumos en el cultivo (Deambrosi, 2003; Pittelkow et al., 2016). Este sistema de producción tiene varias características particulares que lo hacen de baja intensidad, además de las bajas cantidades de fertilizante nitrogenado utilizado, la baja aplicación en cantidad y frecuencia de agroquímicos en general, la utilización de variedades nacionales, la siembra de un solo cultivo por año, la siembra en seco evitando inundación continua y la no práctica del monocultivo de arroz (ACA, 2018).

En los países asiáticos se ha buscado rotar el cultivo de arroz con cultivos en secano con el fin de aumentar la productividad del cultivo, diversificar el uso del suelo, mejorar el desequilibrio de nutrientes en la planta y el suelo, controlar enfermedades, mejorar la salud de la planta y mitigar la emisión de metano (Liu et al., 2015). La introducción de un cultivo en secano genera cambios importantes en las características del suelo como la disponibilidad de oxígeno y las condiciones redox, además de impactar en la comunidad microbiana ya que los exudados radiculares difieren entre especies de plantas (Breidenbach et al., 2016).

Debido a la necesidad de aumentar la productividad y el incremento en los costos de producción, el sector arrocero en Uruguay también se ha enfrentado a la necesidad de intensificar la producción, lo que se puede lograr aumentando la frecuencia de arroz en la rotación, acortando el ciclo de pasturas o incluyendo otros cultivos como puede ser la soja. Esta práctica modifica la disponibilidad de nutrientes, así como la actividad y composición de las poblaciones microbianas presentes tanto en el suelo como asociadas a la planta, lo que plantea un desafío para mantener la sustentabilidad del sistema arrocero y limitar su impacto en el ambiente. Actualmente, el auge de la soja en la región ha promovido la sustitución de la pastura por el cultivo de soja en rotación con arroz. Esta práctica reciente si bien más redituable para los productores, implica un uso más intensivo del suelo respecto a la rotación con pasturas. Sin embargo, estudios han sugerido que la rotación con soja puede ser una opción prometedora para reducir la emisión de metano (Eusufzai et al., 2010). Además, la inclusión de cultivos alternativos parece mejorar la productividad del siguiente cultivo de

arroz (Macedo et al., 2016). En el caso de la soja, este cultivo se beneficia del fósforo y potasio aplicados al arroz, y el nitrógeno fijado por sus nódulos podría favorecer al siguiente cultivo de arroz.

En 2012 se instaló un experimento a largo plazo en la estación experimental de Paso de la Laguna, en INIA Treinta y Tres, que contrasta distintos sistemas de rotación arroceras (con diferente grado de intensidad de uso del suelo) con el fin de responder la interrogante del efecto que tendrá esta intensificación en la productividad del cultivo. El mismo también permite monitorear aspectos ambientales como calidad de suelo, del agua o emisiones de gases de efecto invernadero como metano (Macedo et al., 2016). Previo a la instalación del experimento, el predio se encontró bajo un sistema de rotación arroz-pasturas por al menos 34 años (Macedo et al., 2021). Este ensayo está diseñado de tal forma que se encuentren todas las fases de las distintas rotaciones arroceras en estudio en forma simultánea y repetidas tres veces en el espacio (tres bloques). Las rotaciones arroceras evaluadas incluyen rotación con otros cultivos como soja o sorgo o con praderas de corta y larga duración. La rotación más intensiva corresponde al monocultivo de arroz (arroz continuo), sistema que, si bien es utilizado en algunos países, en Uruguay no se utiliza por el momento a nivel productivo. Por el contrario, la rotación menos intensiva es la rotación tradicionalmente utilizada por los productores arroceros en Uruguay que consiste en dos años de arroz seguidos por tres años de pasturas (pradera permanente larga). Este ensayo constituye el sitio de estudio de esta tesis.

Procesos biogeoquímicos en el sistema arroceras y su impacto ambiental

El ciclo de crecimiento de la planta de arroz presenta diferentes estadios fenológicos que determinan el estado de desarrollo del cultivo. Estos estadios se pueden agrupar en tres etapas principales: la vegetativa que involucra la germinación, crecimiento de la plántula, macollaje y elongación del tallo, la reproductiva que se extiende desde el inicio de la diferenciación del primordio floral hasta la floración, y la etapa de maduración del grano hasta el momento de la cosecha. Cada una de estas etapas conlleva cambios fisiológicos (producción de metabolitos, exudados y hormonas, requerimientos nutricionales) que provocan cambios en el ambiente en el que habita el microbioma asociado a la planta, lo que afecta a estas comunidades microbianas. Los requerimientos del cultivo varían según la etapa

de crecimiento necesitando distintas aplicaciones de fertilizantes o agroquímicos y diferentes condiciones de irrigación.

El arroz es una planta de humedal que se suele cultivar en suelos inundados, si bien se utilizan diferentes regímenes hídricos a nivel mundial, desde cultivo en secano hasta cultivo irrigado durante prácticamente todo el ciclo de crecimiento de la planta (Malyan et al., 2016). El suelo de arroz irrigado es un ecosistema estructurado, en el que se diferencian tres compartimentos caracterizados por distintas condiciones fisicoquímicas: el suelo desnudo anóxico, la superficie óxica del suelo y la zona asociada a las raíces, rizósfera y rizoplaneo, parcialmente óxica (Conrad, 2007; Liesack et al., 2000).

La rizósfera es la zona estrecha de suelo que rodea las raíces de la planta, es un microambiente complejo y dinámico con concentraciones heterogéneas de humedad, oxígeno y metano, y cuyas propiedades están influenciadas por la planta y sus exudados radiculares. Los exudados liberados por la raíz juegan un papel crucial en la selección de las comunidades microbianas que se asocian a ella (Butler et al., 2003; Luke et al., 2011). Algunos estudios han mostrado que la población bacteriana domina el microbioma de la rizósfera de arroz, y que la abundancia tanto de bacterias como de arqueas es mayor en rizósfera que en el suelo desnudo, independientemente de la etapa de crecimiento de la planta y la profundidad del suelo analizado (Breidenbach et al., 2015; Lee et al., 2015). Este fenómeno se conoce como el “efecto rizósfera”. Tanto las bacterias como hongos, virus y arqueas que habitan la rizósfera son atraídos por las rizodeposiciones de la planta de arroz. Se ha descrito al phylum *Proteobacteria* como miembros dominantes de la microbiota rizosférica, lo que concuerda con el hecho de que generalmente son estrategias *r* de rápido crecimiento, con la capacidad de utilizar una amplia gama de sustratos de carbono exudados por la planta (Philippot et al., 2013). Debido a su alta actividad microbiana, la rizósfera influye en los ciclos biogeoquímicos, el crecimiento de la planta y su tolerancia a estrés biótico y abiótico, por lo que está involucrada tanto en la productividad de la planta como en el funcionamiento del ecosistema (Philippot et al., 2013). La comunidad microbiana en la rizósfera exhibe dinámicas relacionadas con la etapa del cultivo (Li et al., 2019). Se observan cambios en la abundancia y diversidad de microorganismos a lo largo del ciclo de crecimiento de la planta (Eller y Frenzel, 2001), lo que puede estar asociado a los cambios en cantidad y composición de los exudados radiculares liberados por el arroz durante su crecimiento (Li et al., 2016), que seleccionen microorganismos diferentes en etapas del ciclo distintas. Li et al., (2014) observaron cambios significativos en la estructura de la comunidad

bacteriana rizosférica en las distintas etapas del cultivo a niveles taxonómicos bajos (familia, género u OTU).

En el cultivo de arroz inundado, la rizósfera, a diferencia del suelo desnudo, es una zona parcialmente óxica debido al oxígeno liberado por las raíces de la planta a través del aerénquima, un tejido parenquimatoso modificado con grandes espacios intercelulares en los que se almacena aire como adaptación de la planta a la inundación y que permite el transporte de gases desde y hacia las raíces. La inundación del cultivo provoca cambios fisicoquímicos en el suelo lo que crea gradientes redox y de nutrientes, radiales alrededor de las raíces. Esto hace que las comunidades microbianas que habitan ese ecosistema se modifiquen, generándose micronichos con diferentes condiciones de potencial redox aptos para diferentes tipos de microorganismos asociados al ciclo del C, N, Fe y/o S (Li et al., 2019; Liesack et al., 2000), utilizando aceptores externos de electrones alternativos al oxígeno y ocurriendo procesos fermentativos (Kögel-Knabner et al., 2010). Por lo tanto, a nivel de la rizósfera conviven procesos aerobios, como la oxidación de amonio, sulfuro, hierro y metano, con procesos anaerobios, como la reducción de nitrato, sulfato y ion férrico. Estas condiciones propician la degradación microbiana de materia orgánica en anaerobiosis que tiene como resultado la producción biológica de metano. Este proceso solo es llevado a cabo por microorganismos pertenecientes al dominio *Archaea*, usando CO₂ como aceptor de electrones y/o compuestos metilados como fuente de energía (Alpana et al., 2017). Las arqueas metanogénicas capaces de este metabolismo especializado son anaerobias estrictas y productoras obligadas de metano, por lo que son comunes en hábitats pobres en otros aceptores de electrones como sulfato, hierro (+3), nitrato y oxígeno (Lyu et al., 2018). La emisión de metano, así como de óxido nitroso por parte de estos ecosistemas hacen del cultivo de arroz inundado una de las principales fuentes antropogénicas de gases de efecto invernadero a nivel global.

El ciclo global del metano (CH₄) es uno de los componentes principales del ciclo biogeoquímico del carbono que tienen un efecto sobre el clima del planeta. El metano es considerado un potente gas de efecto invernadero, con una capacidad de retener calor en la atmósfera entre 15 y 34 veces mayor que la del dióxido de carbono (CO₂). Por esta razón, desempeña un papel clave en el calentamiento global y se estima que contribuye aproximadamente al 17 % del mismo (IPCC, 2013). Es producido por un amplio espectro de fuentes antropogénicas y naturales. Las emisiones globales de metano están impulsadas principalmente por actividades humanas como la producción ganadera y la agricultura en

irrigación (IEA, 2021). Las actividades agrícolas corresponden al 50% de la emisión de metano de origen antropogénico, de las cuales, el cultivo de arroz contribuye en un 20% aproximadamente, emitiendo un estimado de 31 Tg por año (IPCC, 2021; Malyan et al., 2016). Algunas estrategias posibles para reducir estas emisiones incluyen prácticas de irrigación controlada, como acortar el período de inundación o alternar fases de inundación y seco, aunque estas pueden implicar rendimientos inferiores en comparación con el manejo tradicional (Tarlera et al. 2016).

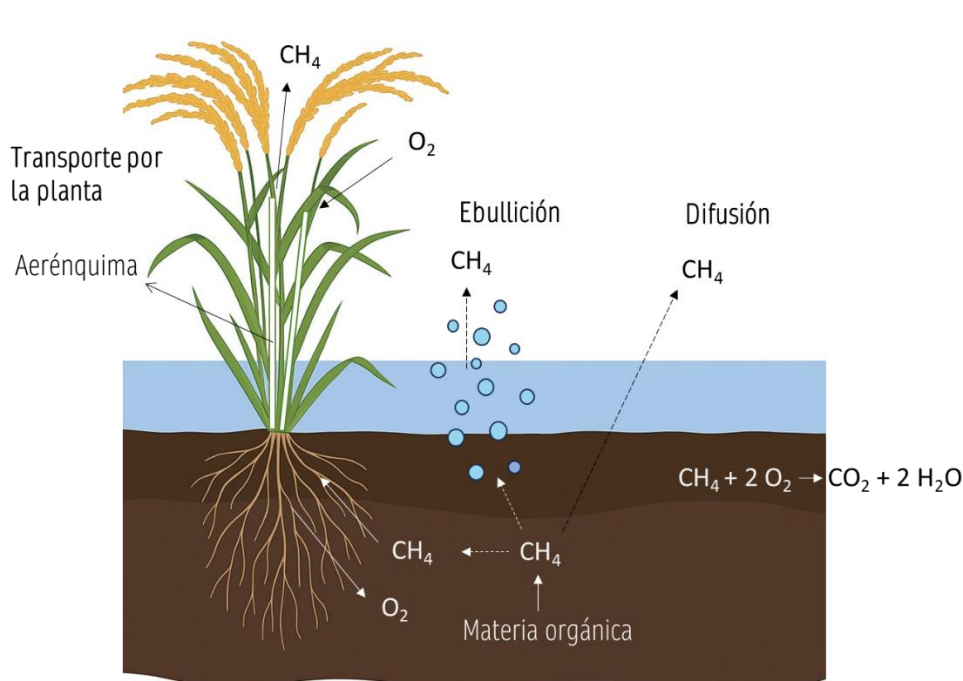


FIGURA 2. Diagrama de los procesos biogeoquímicos vinculados a la dinámica del metano en el cultivo de arroz inundado.

Hay tres posibles mecanismos para la emisión de metano del suelo a la atmósfera: difusión (proceso físico de movilidad del gas), ebullición (proceso de transporte de metano en forma de burbujas que ocurre cuando hay una alta producción del gas) y transporte mediado por la planta (Figura 2). Este último se produce a través del aerénquima y constituye el principal proceso biológico de emisión de metano en arroz (Malyan et al., 2016; Nouchi et al., 1990). Alrededor del 90% del metano proveniente de arrozales es emitido a través de la planta de arroz (Conrad, 2007).

La atmósfera es el principal sumidero de metano por la acción de radicales de OH y Cl. La oxidación fotoquímica en la atmósfera, así como la oxidación biológica en los suelos son los

principales mecanismos de degradación del metano. La oxidación de metano atmosférico por suelos aerobios también contribuye, aunque en menor medida que los suelos irrigados (Tate, 2015). Desde el punto de vista de la oxidación biológica, hasta el 90% del metano producido en el cultivo de arroz puede ser oxidado antes de ser liberado a la atmósfera, tanto en la interfase óxica-anóxica alrededor de las raíces de arroz como en la superficie del suelo (Henckel et al., 2001).

El ciclo del metano en el suelo es dependiente en gran medida de su microbiota, ya que la generación de este gas es resultado de las arqueas metanogénicas mientras que su consumo es controlado por bacterias metanótrofas. La emisión de metano a la atmósfera va a depender del balance entre su producción y su consumo por la actividad de estas dos comunidades. Dicho balance está condicionado por variables ambientales y es sensible a cambios en el manejo del suelo (Le Mer y Roger, 2001).

Oxidación biológica de metano

La metanotrofia u oxidación biológica de metano, es un proceso metabólico microbiano por el que se oxida metano a dióxido de carbono y se considera un caso particular de metilotrofia. Las bacterias oxidantes de metano son un grupo único de bacterias que pueden usar el CH_4 como fuente de carbono y de energía, por lo que tienen un rol central en el control de las emisiones, ya que funcionan como un biofiltro evitando que el metano producido en las capas anóxicas se escape a la atmósfera. El proceso de oxidación de CH_4 puede darse en condiciones tanto aerobias como anaerobias.

Las bacterias oxidantes de metano aerobias (BOM) son un grupo diverso de bacterias metilótrofes que se definen por su capacidad de oxidar metano con oxígeno como aceptor de electrones. El metano es oxidado a CO_2 vía metanol y formaldehído, y parte del carbono proveniente de ese metano se incorpora en la biomasa celular (Figura 3; Hanson y Hanson, 1996).

Además de las BOM que habitan ambientes aerobios, existen bacterias o arqueas metanótrofas anaerobias que utilizan aceptores de electrones alternativos como el nitrito, nitrato o el hierro, entre otros (Figura 4; Guerrero-Cruz et al., 2021; Smith y Wrighton, 2019). La oxidación anaerobia de metano fue reportada hace muchos años en sedimentos marinos (Barnes y Goldberg, 1976) y en este ambiente podría ser mediada por arqueas

anaerobias oxidantes de metano de la clase *Methanomicrobia*, que acoplan la oxidación de metano con la reducción de sulfato, nitrato, nitrito, óxidos metálicos o materia orgánica (Cabrol et al., 2020; Joye, 2012). Este proceso puede ser llevado a cabo también por bacterias anaerobias asignadas a Candidatus *Methyloirabilis*, pero de una forma muy particular. Estas bacterias acoplan la oxidación de metano a la desnitrificación, creando oxígeno molecular intracelularmente a partir de la reducción de nitrito y de esta forma pudiendo oxidar el metano usando la metano-monooxigenasa de la misma manera que los metanótrofos aerobios (Shukla et al., 2013).

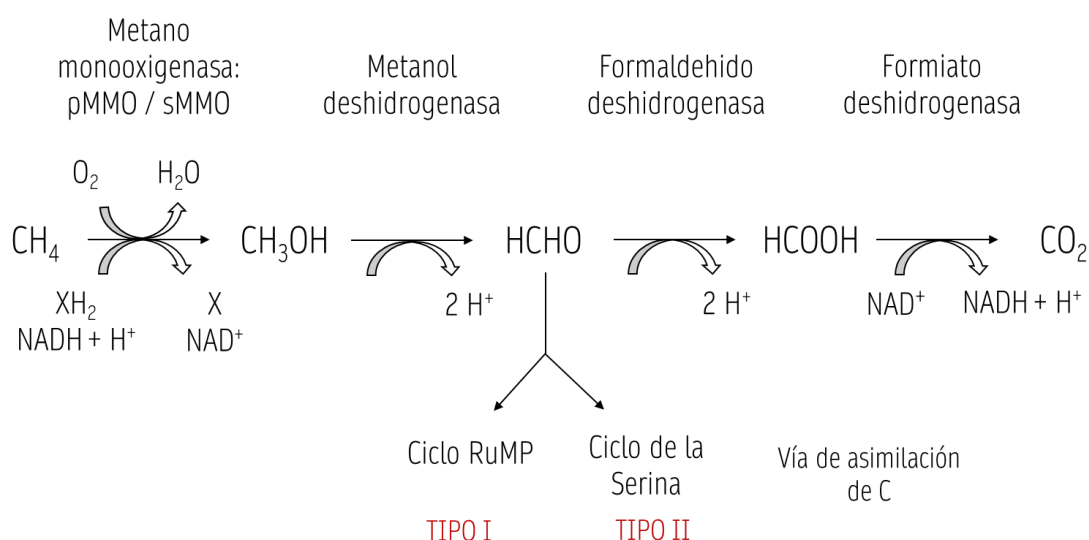


FIGURA 3. Vía de oxidación aerobia de metano en bacterias metanótrofas. Se presentan las dos formas de la metano monooxigenasa. La asimilación de carbono ocurre vía el ciclo de la ribulosa monofosfato (RuMP, metanótrofos tipo I) o el ciclo de la serina (metanótrofos tipo II). Imagen adaptada de Murrell et al. (2000).

Los metanótrofos conocidos hasta el momento pertenecen a los phyla bacterianos *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* y *Methyloirabilota* que contiene el género Candidatus *Methyloirabilis*, propuesto como metanótrofo anaerobio y que hasta hace poco se clasificaba como miembro del phylum candidato NC10 (Smith y Wrighton, 2019). Casi todas las bacterias metanótrofas disponibles en cultivo puro pertenecen al phylum *Proteobacteria* (Dedysh y Knief, 2018). Este se divide en dos clases principales *Gammaproteobacteria* y *Alphaproteobacteria*, y en dos grandes grupos basándose en características filogenéticas, morfológicas y fisiológicas (como la estructura de membranas intracitoplasmáticas), los tipo I y los tipo II. Dentro del tipo I (*Gammaproteobacteria*) se ubica la familia *Methylococcaceae* representada por varios géneros metanótrofos. El tipo II (*Alphaproteobacteria*) corresponde a las familias *Methylocystaceae* en la cual se han

descripto los géneros *Methylosinus* y *Methylocystis*, y la familia *Beijerinckiaceae* representada por los géneros *Methylocella*, *Methyloferula* y *Methylocapsa* (Dedysh, 2009). Este grupo de bacterias incluye metanótrofas obligadas y facultativas. Las bacterias filamentosas *Crenothrix polyspora* y *Clonothrix fusca* también han sido reportados como metanótrofos y son consideradas como gammaproteobacterias de tipo I (Stoecker et al., 2006). Los metanótrofos tipo I se pueden además subdividir en tipo Ia, que comprende los géneros *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylosarcina*, *Methylosoma*, *Methylosphaera*, *Methylovulum* y *Methylomicrobium*, y tipo Ib (también conocidos como tipo X), representados por *Methylococcus*, *Methylocaldum*, *Methylogaea*, *Methylohalobius* y *Methylothermus*. Estos últimos comparten algunas características con los metanótrofos tipo II. Estudios independientes del cultivo han detectado varios grupos de metanótrofos no cultivados del tipo Ia y especialmente del tipo Ib (Frindte et al., 2017). Una importante diferencia entre los metanótrofos tipo I y tipo II es la vía de asimilación de carbono utilizada. Los metanótrofos tipo I usan la vía de la ribulosa monofosfato para la asimilación del formaldehído, mientras que los tipo II usan el ciclo de la serina. Sin embargo, los tipo Ib poseen no solo las enzimas que catalizan las reacciones de la vía de la ribulosa monofosfato sino también las enzimas para la vía de la serina (Shukla et al., 2013).

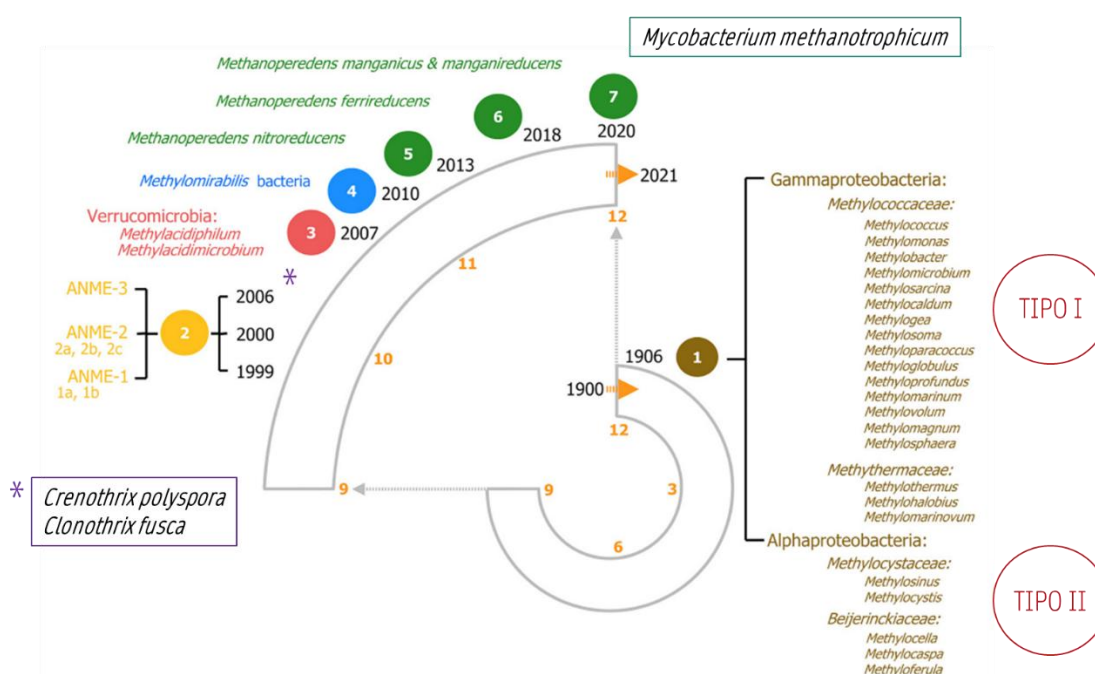


FIGURA 4. Esquema de los grupos de metanótrofos conocidos según su clasificación filogenética, en orden cronológico según fueron descubiertos. ANME: arqueas metanótrofas anaerobias. Imagen extraída y adaptada de Guerrero-Cruz et al. (2021).

Las BOM o bacterias metanótrofas, que constituyen el foco de estudio de esta tesis, se caracterizan por el uso de enzimas metano-monooxigenasas para catalizar la oxidación de metano a metanol (Figura 3), paso inicial de la oxidación de metano (Dedysh y Knief, 2018). Esta enzima es un potente catalizador de reacciones de oxidación y es capaz de oxidar un gran número de compuestos de carbono, lo que le confiere a las metanótrofas un gran potencial biotecnológico (Bowman, 2006). La metano-monooxigenasa se presenta en dos formas, dependiendo de la especie, una particulada o de unión a membrana (pMMO) y una soluble o citoplasmática (sMMO), y al menos una es necesaria para la oxidación aerobia de metano. La enzima metano monooxigenasa particulada (pMMO) se encuentra presente en todas las bacterias metanótrofas excepto en los géneros *Methylocella* y *Methyloferula* (*Alphaproteobacteria*, *Beijerinckiaceae*), que presentan únicamente la metano-monooxigenasa soluble (sMMO). En bacterias metanótrofas que poseen genes para ambas formas de la enzima el cobre regula la expresión de una u otra, estimulando la expresión de la pMMO a concentraciones altas y expresando la sMMO solo bajo condiciones deficitarias de cobre (Murrell et al., 2000). La metano-monooxigenasa soluble se encuentra en varios metanótrofos de la clase *Alphaproteobacteria* y algunos de *Gammaproteobacteria*, y tiene una baja afinidad por el metano comparado con la enzima particulada (Hanson y Hanson, 1996), si bien tiene la capacidad de oxidar un amplio rango de compuestos incluyendo hidrocarburos alifáticos y aromáticos (Ho et al., 2013).

Existen dos cinéticas diferenciadas en la oxidación biológica de metano en condiciones aerobias. En los suelos donde hay producción de metano como ser humedales o suelos de arroz inundado, la cinética de oxidación de metano es de baja afinidad y es llevada a cabo por metanótrofos tanto de tipo I como de tipo II. La cinética en suelos aerobios muestra una mayor afinidad aparente por el metano que la observada en suelos irrigados, lo que permite que actúen como un sumidero de metano atmosférico. Esta oxidación de concentraciones traza de metano se atribuye a metanótrofos con alta afinidad (Cai et al., 2016; Ho et al., 2013). Baani y Liesack (2008) encontraron una cepa del metanótrofo tipo II *Methylocystis* que presenta dos isoenzimas de la metano-monooxigenasa particulada con diferente cinética de oxidación de metano. La isoenzima conocida pMMO1 oxida metano a concentraciones mayores a 600 ppmv (partes por millón en volumen), por el contrario, la isoenzima pMMO2 es capaz de oxidar metano a concentraciones menores, incluso las cantidades traza de metano atmosférico. Se observó también que varios tipo II poseen los genes que codifican para la pMMO2 (pmoCAB2) pero no se han encontrado en metanótrofos tipo I hasta el momento.

El gen *pmoA* que codifica la subunidad alfa de la enzima pMMO es un biomarcador funcional específico para metanótrofos y ampliamente utilizado en estudios moleculares para detectarlos y cuantificarlos en distintos ambientes (Knief, 2015). Este gen se encuentra lo suficientemente conservado entre especies para ser usado en la construcción de filogenias y se ha observado una alta congruencia entre la filogenia del gen 16S ARNr y del gen *pmoA*. Los *primers* A189f y mb661r (Costello y Lidstrom, 1999) han sido los más usados para estudiar la diversidad del gen *pmoA* y se ha reportado que tienen gran especificidad para este gen (Cai et al., 2020), lo que puede deberse en parte a la capacidad del *primer* mb661r de discriminar el *pmoA* del gen homólogo *amoA* que codifica una subunidad de la enzima amonio monooxigenasa, presente en oxidantes de amonio (Luke et al., 2010).

Hasta hace unos años se pensaba que todos los metanótrofos eran obligados, restringidos a la utilización de metano y metanol. Sin embargo, dentro de los metanótrofos conocidos existe un grupo pequeño, los metanótrofos facultativos, que tienen la capacidad de metabolizar además de metano y metanol, compuestos con enlace carbono-carbono. En suelos de arroz el compuesto más comúnmente utilizado como sustrato alternativo es acetato (Jung et al., 2020), el cual es un importante intermediario en la descomposición anaerobia de materia orgánica en estos ambientes (Leng et al., 2015). Hasta el momento, los géneros *Methylocella*, *Methylocapsa* y *Methylocystis* han sido identificados como metanótrofos facultativos, siendo el primero el más versátil en cuanto a los sustratos que puede utilizar. *Crenothrix polyspora* también se ha reportado como un posible metanótrofo facultativo, aunque no se han logrado obtener ejemplares en cultivo puro.

Todos los miembros de las familias de metanótrofos pertenecientes a la clase *Gammaproteobacteria*, así como los de la familia *Methylocystaceae* son estrictamente metanótrofos. Sin embargo, la familia *Beijerinckiaceae* incluye organismos con distintos metabolismos, ya que contiene metanótrofos, metilótrofos y heterótrofos. De manera similar, el género *Methyloceanibacter* es metilótrofo facultativo, pero presenta una especie capaz de oxidar metano (Farhan Ul Haque et al., 2020; Smith y Wrighton, 2019).

En resumen, los microorganismos con potencial de oxidación de metano conocidos actualmente incluyen a las BOM aerobias pertenecientes a *Proteobacteria* y *Verrucomicrobia*, las BOM anaerobias del phylum *Methylomirabilota* y las arqueas metanótrofas anaerobias (ANME por sus siglas en inglés).

Ecología de bacterias metanótrofas aerobias

Los metanótrofos aerobios se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza donde el oxígeno y el metano estén disponibles. Han sido encontrados en diversos ambientes como en suelos, turberas, humedales, arrozales y en ecosistemas acuáticos como sedimentos y la columna de agua de ambientes marinos y de agua dulce (Bowman, 2006; Hanson y Hanson, 1996; Knief, 2015). En estos ecosistemas las bacterias metanótrofas se encuentran en las zonas de transición redox, con presencia de oxígeno de la zona óxica y metano producido en la zona anóxica. En el suelo de arroz particularmente, están presentes en la interfase óxica-anóxica del suelo, así como en la rizósfera de la planta de arroz (Conrad, 2007). Si bien los metanótrofos pertenecientes a *Proteobacteria* están extendidos en estos ambientes, *Verrucomicrobia* parece estar restringido a ambientes extremos (Dunfield et al., 2007).

El suelo puede ser considerado un banco de semillas microbiano (reservorio de microorganismos latentes) y las propiedades fisicoquímicas del suelo, así como los procesos biogeoquímicos estructuran la comunidad. Algunos metanótrofos son capaces de formar cistos y células latentes, que les permiten sobrevivir a condiciones adversas y formar parte de este banco de semillas microbiano del suelo de arroz (Luke et al., 2014). El microbioma asociado a la raíz de arroz se diferencia por la práctica de cultivo, la ubicación geográfica y la variedad de arroz, por lo que la colonización de la raíz es afectada tanto por la microbiota del suelo como por el genotipo de la planta (Edwards et al., 2015). La ubicación en la que crece la planta determina la microbiota nativa a la que están expuestas las raíces de la planta, pero la especie de planta y su genotipo determina que microorganismos van a crecer y prosperar en la rizósfera.

Los metanótrofos aerobios tipo I y II coexisten en suelo de arroz, pero generalmente presentan diferencias metabólicas y distintas estrategias de vida, lo que les permite predominar bajo condiciones diferentes y ocupar distintos nichos (Henckel et al., 2000; Ho et al., 2013). De esta forma, diferentes prácticas agrícolas previas al cultivo, así como la variabilidad natural, puede resultar en comunidades diferentes.

Los metanótrofos tipo II, especialmente *Methylocystis*, se han encontrado frecuentemente en mayor abundancia en suelo de arroz que los tipo I (Luke et al., 2010; Ma y Lu, 2011; Macalady et al., 2002), sin embargo, también se ha reportado que los metanótrofos activos en suelo de arroz son mayormente los tipo I (Ma et al., 2013; Qiu et al., 2008; Reim et al., 2012; Shrestha et al., 2008). Los metanótrofos tipo II son capaces de formar exosporas y

cistos bajo distintas formas de estrés, lo que les confiere resistencia a condiciones adversas como la desecación o temperaturas altas y parecen conformar la mayor parte del banco de semillas microbiano para la siguiente temporada de arroz (Leng et al., 2015). Por lo tanto, se vuelven relevantes luego de una perturbación o bajo condiciones cambiantes, cuando las tipo I reducen su población rápidamente. Esta característica, así como su capacidad para usar fuentes de carbono alternativas, contribuye a su predominancia en ambientes adversos como el suelo de arroz. La clase *Alphaproteobacteria* alberga los metanótrofos facultativos conocidos hasta el momento, lo que sugiere una mayor versatilidad metabólica de este grupo frente a *Gammaproteobacteria* y les confiere una estrategia de supervivencia y adaptación a condiciones de metano limitante (Ho et al., 2013). Los metanótrofos tipo I parecen ser dominantes en ambientes en donde el metano es limitante y la concentración de oxígeno es alta, pero responden rápidamente a la disponibilidad de sustrato. Por el contrario, ambientes con altos niveles de metano, bajas concentraciones de oxígeno y condiciones de crecimiento limitado como pH o concentraciones bajas de nitrógeno y/o cobre, favorecen a los metanótrofos tipo II (Chowdhury y Dick, 2013; Eller y Frenzel, 2001; Henckel et al., 2000; Shukla et al., 2013), cuya población es relativamente estable. Por lo tanto, los tipo I dominan cuando la disponibilidad de nutrientes es alta y cuando el suelo es drenado, pero los tipo II se vuelven más competitivos cuando los nutrientes se vuelven limitantes durante la etapa de inundación. Teniendo esto en consideración, Ho et al. (2013) clasificó a los tipo II como tolerantes al estrés y a los tipo I como competidores.

En relación al pH, la adaptación a condiciones levemente más ácidas (crecimiento óptimo a 5,0–6,0) es característica de los metanótrofos tipo II de la familia *Beijerinckiaceae* (*Methylocella*, *Methylocapsa*) y algunas cepas del género *Methylocystis* (Zhao et al., 2020).

La disponibilidad de nitrógeno también ha mostrado ser un factor de selección de estos grupos de metanótrofos, ya que se ha observado que el agregado de amonio estimula selectivamente a los metanótrofos tipo I (Hu y Lu, 2015; Mohanty et al., 2006; Noll et al., 2008). El gen *nifH* que codifica para la enzima nitrogenasa reductasa ha sido detectada en metanótrofos tanto de tipo I como II, pero la fijación de nitrógeno parece ser una característica principalmente de los tipo II. Estas características fisiológicas de los metanótrofos tipo I y II serán importantes a la hora de ocupar nichos diferenciados en el ecosistema.

Los metanótrofos son por lo tanto un grupo importante de bacterias, responsables de llevar adelante el ciclo global del metano, atenuando las potenciales emisiones de este gas a la atmósfera o incluso consumiendo el metano atmosférico. De este modo, constituyen uno de los grupos de microorganismos que cumplen un rol metabólico en modelar el ambiente. Las prácticas de manejo agrícola influyen en la comunidad microbiana del suelo, creando nichos en el ambiente que favorecen ciertos microorganismos. El efecto del uso de prácticas agrícolas como la intensificación del cultivo o el uso de distintas rotaciones ha sido estudiado en la comunidad bacteriana y la comunidad metanótrofa en particular, sin embargo, no se ha reportado el uso de técnicas como el ADN-SIP para el estudio del efecto de estas prácticas en la comunidad activa asociada al ciclo de metano en el suelo de arroz. En esta tesis se usaron una serie de metodologías y análisis moleculares para así comparar la abundancia, actividad y estructura de la comunidad metanótrofa presente en suelo de arroz bajo diferentes rotaciones arroceras. En los siguientes capítulos se abordará en mayor profundidad la ecología y rol de las bacterias metanótrofas aerobias en los sistemas de producción de arroz.

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar las comunidades de bacterias aerobias oxidantes de metano asociadas al cultivo de arroz y evaluar el impacto de la intensificación agrícola en ellas.

Objetivos específicos

- Relevar la dinámica de oxidantes de metano en suelo desnudo y suelo rizosférico de arroz de tres rotaciones diferentes a lo largo del ciclo de cultivo
- Determinar el potencial de oxidación de metano de suelo desnudo y suelo rizosférico de arroz de tres rotaciones diferentes a lo largo del ciclo de cultivo
- Estudiar la estructura y diversidad de las comunidades microbianas de suelo rizosférico de arroz
- Optimizar herramientas moleculares para estudiar la comunidad de oxidantes de metano activa en suelo rizosférico de arroz
- Identificar los microorganismos oxidantes de metano que se encuentran activos en rotaciones arroceras contrastantes

Trabajo de tesis

En la presente tesis se realizó el estudio y caracterización de las comunidades metanótrofas aerobias que habitan el suelo desnudo y rizosférico de plantas de arroz en sistemas de rotación con diferente grado de intensificación. Para esto se trabajó con un ensayo de campo a largo plazo que presenta distintas rotaciones de cultivo en forma simultánea y con replicados biológicos. Se estudió la dinámica de la abundancia y actividad potencial de bacterias oxidantes de metano a lo largo del ciclo de cultivo de arroz, mediante el uso de distintas herramientas moleculares como qPCR y ensayos en microcosmos. También se estudió la estructura de la comunidad por secuenciación masiva de amplicones. Por otra

parte, se optimizó una técnica que permitió estudiar la diversidad y estructura de la comunidad metanótrofa metabólicamente activa en suelo rizosférico de arroz proveniente de distintas rotaciones agrícolas.

Esta tesis se divide en dos capítulos. En el Capítulo 1 se presentan los resultados de abundancia de bacterias oxidantes de metano, actividad de oxidación de metano potencial y estructura de la comunidad, abordando así los tres primeros objetivos específicos. La optimización e implementación de la técnica *Stable Isotope Probing* para el estudio de la comunidad metanótrofa activa en suelo rizosférico de arroz de dos rotaciones agrícolas contrastantes, se describe en el Capítulo 2 y corresponde a los dos últimos objetivos específicos. Por último, se presentan las conclusiones globales y perspectivas de este trabajo.

Capítulo 1

Impacto de la intensificación en la abundancia, actividad y estructura de la comunidad metanótrofa asociada a la planta de arroz

1.1 Introducción

Humedales y suelos inundados, como el cultivo de arroz, son ecosistemas donde el ciclo de metano ocurre activamente y contribuye en gran medida al ciclo de carbono. En la interfase aerobia de estos sistemas, como ser la superficie del suelo o la rizósfera, la actividad de las bacterias oxidantes de metano limita el flujo de emisión de este gas de efecto invernadero a la atmósfera (Dedysh et al., 2005). La rizósfera es un compartimento del suelo altamente influenciado por la planta principalmente a través de sus exudados radiculares. Los exudados tales como acetato, lactato, oxalato y succinato, parecen moldear la comunidad microbiana, promoviendo el crecimiento de algunos taxones. Debido a la mayor incidencia de los exudados radiculares liberados por la planta, el contenido total de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, así como el carbono orgánico total, es mayor en la rizósfera que en el suelo desnudo (Li et al., 2019b). Esto da lugar a diferencias en ciertos parámetros fisicoquímicos entre estos dos compartimentos. La concentración de amonio y el pH han mostrado ser significativamente menores en la rizósfera que en el suelo desnudo, y la tendencia opuesta se observó para la concentración de nitrato en suelos de arroz (Li et al., 2019b).

La estructura de la comunidad metanótrofa así como su actividad de oxidación de metano en un determinado ecosistema se encuentra influenciado por distintos factores interrelacionados, entre los que se encuentran la temperatura, el pH, las concentraciones de metano, dióxido de carbono y oxígeno, el contenido de carbono y nitrógeno del suelo (Hanson y Hanson, 1996; Kharitonov et al., 2021; Malyan et al., 2016), así como prácticas de manejo del suelo como el sistema de rotación, la gestión hídrica y la aplicación de fertilizantes y pesticidas.

En Uruguay actualmente hay una creciente tendencia en el sector arrocero a la intensificación del cultivo, con el fin de aumentar la productividad y contrarrestar los altos costos de producción. La productividad y sostenibilidad agrícola de un cultivo dependen de las interacciones que establezca con el suelo, la comunidad microbiana de ese suelo y las prácticas de manejo agrícola. Estas prácticas de manejo a largo plazo modifican las características físicas y químicas del suelo y pueden afectar directamente la composición de las comunidades microbianas. No obstante, los cambios en las propiedades del suelo suelen manifestarse lentamente, incluso bajo prácticas de manejo profundamente contrastantes (Soman et al., 2017). A diferencia de los cambios producidos por ejemplo por un evento de fertilización, las alteraciones en el suelo por prácticas de manejo pueden llegar a verse luego

de décadas de establecido el cambio. Una rotación de cultivos apropiada se utiliza usualmente como una estrategia para contrarrestar los efectos negativos del cultivo intensivo (Xuan et al., 2012). La colonización de la raíz de la planta tanto por bacterias como por arqueas es afectada por los cultivos en rotación (Breidenbach et al., 2017), lo que influye en el establecimiento de una comunidad en nichos contiguos como la rizósfera.

En el caso del cultivo de arroz, el efecto del uso de distintas rotaciones ha sido ampliamente estudiado. En un estudio que comparó rotaciones arroceras con pastura, con soja, con soja y maíz, y arroz continuo, Benintende et al. (2008) observaron un efecto de las rotaciones sobre las propiedades del suelo tanto fisicoquímicas como bioquímicas (actividades enzimáticas) y microbiológicas (C y N de la biomasa microbiana). Por otro lado, rotaciones con maíz y un tipo de frijol, presentaron mayores rendimientos de arroz y comunidades bacterianas del suelo más abundantes y diversas que el monocultivo de arroz (Xuan et al., 2012). Maguire et al. (2020) al comparar la rotación arroz-pasturas con el arroz continuo no detectaron un efecto sobre la estructura ni sobre la diversidad de la comunidad bacteriana, aunque sí sobre la comunidad fúngica. Por su parte, Breidenbach et al. (2016) reportaron solo cambios mínimos en la estructura de la comunidad bacteriana en la rotación arroz-maíz respecto al monocultivo de arroz. En todos estos trabajos se obtuvieron comunidades dominadas por los phylum *Proteobacteria* y *Acidobacteria*, con altas abundancias de *Verrucomicrobia* y *Chloroflexi*. Cabe destacar que, en un estudio realizado en raíces de arroz y maíz, se observó que la estructura de la comunidad bacteriana establecida en los dos cultivos es diferente y que la comunidad presente en la raíz de arroz en rotación con maíz es diferente a la de arroz en monocultivo, indicando un efecto de la rotación (Breidenbach et al., 2017). La rotación arroceras ha demostrado tener un efecto en la abundancia de la comunidad metanótrofa además de en su estructura (Jiang et al., 2022), obteniéndose mayor número de copias del gen *pmoA* en monocultivo de arroz que en rotación con un cultivo en secano (Breidenbach et al., 2017). El potencial de oxidación de metano del suelo también se ha visto afectado por la rotación y por el laboreo, siendo mayor en el suelo de cultivos sin laboreo respecto al suelo con laboreo (Kollah et al., 2020).

De forma de mantener la fertilidad del suelo y la productividad del cultivo frente a la creciente demanda de alimento, cada vez es mayor el agregado externo de nutrientes al ecosistema, como ser la fertilización nitrogenada (Dai et al., 2018). La respuesta de la comunidad metanótrofa al contenido de nitrógeno ha sido un gran tema de estudio, debido a

que, si bien en principio se reportó el efecto inhibitorio de la fertilización nitrogenada en la metanotrofia (Bédard y Knowles, 1989; Conrad y Rothfuss, 1991), desde entonces se han obtenido resultados diversos. Numerosos trabajos han encontrado un efecto estimulante del amonio y la fertilización nitrogenada sobre la oxidación de CH_4 en suelos de arroz (Ferrando y Tarlera, 2009; He et al., 2019; Noll et al., 2008; Qiu et al., 2008; Shrestha et al., 2010), mientras que otros han demostrado un efecto inhibitorio (Alam y Jia, 2012; Yang et al., 2020; Zheng et al., 2013). Independientemente del efecto en la comunidad total, también se ha observado un efecto diferencial en los metanótrofos tipo I y II. Hu y Lu (2015) observaron que la adición de amonio en suelo de arroz tuvo un efecto inhibitorio sobre los tipo II pero estimulante sobre los tipo I, mientras que el agregado de nitrato podía estimular ambos tipos de metanótrofos. Por el contrario, Shrestha et al. (2010) reportó que la adición de sulfato de amonio suprimió los metanótrofos tipo I mientras que el agregado de urea no tuvo un efecto sobre la comunidad metanótrofa. Aún se comprende poco sobre los mecanismos que determinan el efecto del nitrógeno en el ciclo del metano. Un factor relevante es la similitud enzimática entre la metano monooxigenasa y la amonio monooxigenasa, lo que genera competencia por los sitios activos de la enzima (Bodelier y Frenzel, 1999). La conexión evolutiva de estas enzimas permite a estos microorganismos utilizar ambos sustratos (Alam y Jia, 2012), si bien las bacterias metanótrofas no obtienen energía de la oxidación de amonio, y las bacterias oxidantes de amonio no pueden crecer a partir de metano (Stein et al., 2012). Además de competir por la enzima, las bacterias oxidantes de metano van a competir por el oxígeno en ambientes donde este es limitado. El nitrógeno mineral es esencial para el crecimiento bacteriano y en suelos agrícolas existe una competencia entre la planta y los distintos microorganismos por este nutriente (Macalady et al., 2002), por esto el efecto estimulador se puede deber a un alivio de la limitación de nitrógeno con el agregado de fertilizante. Cuando el amonio no está disponible, aquellos metanótrofos que pueden hacerlo, deben recurrir a la fijación de nitrógeno lo cual es muy costoso energéticamente (Bodelier y Laanbroek, 2004), mientras que los metanótrofos que no tienen esa capacidad dependen de la presencia de nitrógeno mineral. También hay que tener en cuenta que el agregado de fertilizante puede tener un efecto en el crecimiento de la planta de arroz, pudiendo verse alterados la liberación de exudados radiculares y el suministro de oxígeno a la rizósfera. En el cultivo de arroz, los fertilizantes nitrogenados se aplican comúnmente como urea o como sales de amonio, estos últimos pueden generar en la rizósfera intermediarios con efecto tóxico como el nitrito, así como posibles efectos asociados a sus contraiones. El efecto de la fertilización va a estar asociado entonces a la concentración

agregada y al tipo de molécula nitrogenada, además de al sistema agrícola, la disponibilidad de nitrógeno y la comunidad metanótrofa presente en los suelos en estudio.

En el presente capítulo se busca estudiar el impacto de la implementación de distintas rotaciones arroceras con mayor o menor intensidad agrícola en la comunidad metanótrofa del suelo y asociada a las raíces de arroz. Para esto se determinó la abundancia de bacterias metanótrofas aerobias y el potencial de oxidación de metano de suelo desnudo y suelo rizosférico de arroz proveniente de tres rotaciones arroceras distintas, así como también se estudió la estructura de la comunidad bacteriana en suelo rizosférico de arroz de dos rotaciones contrastantes. Asimismo, se determinaron parámetros fisicoquímicos del suelo y se evaluó su efecto en la comunidad en estudio.

1.2 Materiales y métodos

1.2.1 Muestreo

Las muestras se extrajeron durante la zafra 2019/2020 en el ensayo de campo a largo plazo que se desarrolla en la unidad experimental de Paso de la Laguna en INIA Treinta y Tres (33°16'23" S; 54°10'24" O; 22 MASL). Este ensayo presenta un diseño estadístico de bloques completos al azar, con seis rotaciones arroceras como tratamientos y todas las fases de las rotaciones coexistiendo en tiempo y espacio. Para este trabajo se seleccionaron tres rotaciones: la R1 que corresponde al cultivo de arroz continuo (la más intensiva), la R4 que consiste en dos años de arroz seguidos por tres años de pasturas (rotación tradicional, menos intensiva), y por último R6, la rotación de arroz con soja alternando un año de cada cultivo, como se observa en la Tabla 1 (se indica la mínima unidad de cultivos del ciclo, que luego se repite). En el caso de la rotación R4 se propuso estudiar las dos fases de arroz por provenir de cultivos previos diferentes, por un lado, el arroz de primer año que sucede a tres años de pasturas (R41) y, por otro lado, el arroz de segundo año que proviene de otro cultivo de arroz (R42).

Año	1		2		3		4		5	
Rotación	PV	OI	PV	OI	PV	OI	PV	OI	PV	OI
R1	Arroz	CC								
R4	Arroz 1	CC	Arroz 2	Pastura	Pastura	Pastura	Pastura	Pastura	Pastura	Pastura
R6	Arroz	CC	Soja	CC						

TABLA 1. Rotaciones arroceras en estudio. R1: arroz continuo o monocultivo de arroz; R4: rotación tradicional con pasturas; R6: rotación con soja. PV: primavera-verano; OI: otoño-invierno. Arroz 1: arroz de primer año; Arroz 2: arroz de segundo año; CC: cultivo de cobertura.

Las pasturas perennes se pastorearon con corderos en forma rotativa en el año. En este ensayo de campo se sembró en todas las rotaciones en la etapa con arroz el cultivar INIA Merín del subtipo Índica del Programa de Mejoramiento Genético de INIA. En todas las rotaciones se plantaron cultivos de cobertura en invierno y los cultivos de verano se sembraron con siembra directa sin laboreo. Cultivos y pasturas se fertilizaron con nitrógeno, potasio y fósforo en la siembra. En los cultivos de arroz en rotación (con otros cultivos o pasturas) la fertilización nitrogenada consistió en 80–100 kg N/ hectárea, mientras que en el arroz continuo fue de 160 kg N/ hectárea y en todos los casos el N se aplicó como urea en dos etapas del ciclo, en el macollaje (aplicación sobre suelo seco) y al momento de la iniciación de la panícula (suelo inundado) (Macedo et al, 2021).

Se realizaron cuatro muestreos durante la zafra 2019-2020 en distintos momentos del ciclo de crecimiento del cultivo de arroz. El primer muestreo se realizó previo a la siembra de arroz (octubre de 2019) por lo que se extrajeron solo muestras de suelo en condiciones de secano. Los siguientes muestreos fueron realizados en etapas diferentes de crecimiento del cultivo de arroz luego de inundado, 47 días luego de la siembra (DAS) durante la etapa de macollaje (11 de diciembre de 2019), 75 DAS luego del primordio (8 de enero de 2020) y el último en la etapa de floración, 110 DAS (12 de febrero de 2020) (Figura 5 y Tabla A1 en Apéndice I). Se tomaron muestras compuestas de suelo con calador, de 10 cm de profundidad, de aproximadamente 500 gramos por parcela. Para la obtención de suelo rizosférico se extrajeron plantas de arroz enteras, con bloque de suelo de forma de mantener las raíces completas, se tomaron de seis a diez plantas por tratamiento en forma aleatoria, evitando el efecto borde. Todas las muestras se trasladaron y conservaron refrigeradas hasta el momento de su procesamiento en el laboratorio.

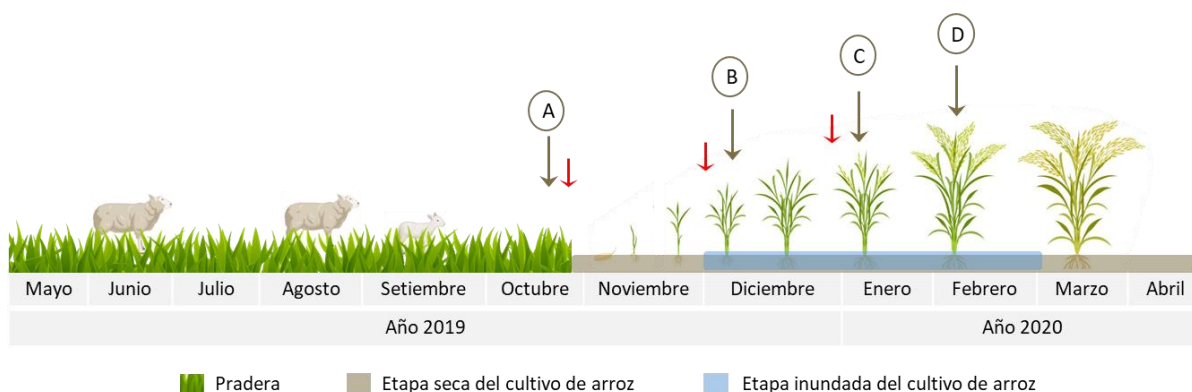


FIGURA 5. Esquema anual del cultivo de arroz. Las flechas oscuras indican los momentos en que se realizaron los muestreos, A: pre-siembra, B: macollaje; C: primordio y D: floración. Las flechas rojas indican la aplicación de fertilizantes al cultivo, en octubre se fertilizó con NPK con azufre, P_2O_5 y cloruro de potasio, y se fertilizó con urea en el momento del macollaje y en el primordio.

Debido al diseño del ensayo, se tienen triplicados biológicos de las distintas rotaciones (en parcelas de 18x60m en cada bloque), por lo que se obtienen 12 muestras de suelo y/o rizósfera en cada muestreo (fases de la rotación R1Az, R41Az, R42Az, R6Az).

Las muestras se nombraron usando un código que consta de 4 partes, en primer lugar las iniciales S o Rh según el tipo de muestra (S: suelo, Rh: suelo rizosférico), luego un número correspondiente a la rotación a la que pertenece (1: arroz continuo, 41: arroz de primer año de la rotación arroz-pasturas, 42: arroz de segundo año de la misma rotación y 6: rotación arroz-soja), lo sigue un número romano que indica el número de bloque de la que fue extraída (I, II o III), por último una letra de la “A” a la “D” indicando el muestreo al que pertenece en orden cronológico (Tabla A2, Apéndice I).

1.2.2 Procesamiento de muestras

En el laboratorio las fracciones de suelo extraídas con calador se limpiaron retirando el material vegetal y mesofauna presente, y se homogenizó la muestra. Para obtener el suelo rizosférico se disgregó el bloque de suelo y se retiró cuidadosamente de forma manual el suelo más adyacente a las raíces de la planta. Se almacenaron alícuotas de las muestras obtenidas para distintos fines, muestra fresca a 4–8°C para análisis fisicoquímicos y determinaciones del potencial metanótrofo, muestras congeladas a -70°C para análisis moleculares y suelo secado a 30°C para determinación del carbono oxidable por permanganato y como respaldo para análisis posteriores. En el caso de las plantas

muestreadas se midió longitud de raíces y parte aérea, así como peso de las raíces, como parámetros de rendimiento del cultivo.

1.2.3 Caracterización fisicoquímica de los suelos (desnudo y rizosférico)

La determinación del peso seco o porcentaje de humedad se realizó con el analizador de humedad MB27 OHAUS® a partir de 5 gramos de muestra fresca. Se determinó el pH de las distintas muestras, en el sobrenadante de una suspensión del suelo con agua destilada según Tan (2005). A las mismas muestras de suelo y suelo rizosférico fresco se les realizó determinación de contenido de N-NH_4^+ protocolo modificado de Rhine et al. (1998) por método de desarrollo de color en placas de ELISA, previa extracción de las muestras con KCl 2M. Las medidas se realizaron por duplicado y se preparó curva de calibración a partir de sulfato de amonio (ACS-ISO para análisis, 99%), en el rango de concentración 1–8 ppm. Para el análisis de carbono oxidable por permanganato (Cpox) o carbono lábil en suelo y rizósfera, las muestras fueron previamente secadas, molidas y tamizadas a 2 mm, la determinación se llevó a cabo mediante oxidación de la muestra con permanganato de potasio 0,2 M en cloruro de calcio 1 M y medida espectrofotométrica de la solución obtenida, según Weil et al. (2003). La determinación se realizó por duplicado y se preparó una curva de calibración entre 0,002 y 0,02 M de KMnO_4 (0–650 ppm C). Los suelos secados y tamizados a 2 mm extraídos en los muestreos previo a la siembra, en macollaje y en floración, fueron enviados a INIA La Estanzuela para análisis de contenido de S-SO_4 (por extracción con fosfato mono calcio y turbidimetría con cloruro de bario), y contenido de las formas quelatizables de Fe (mediante extracción con DTPA y medición del extracto por absorción atómica en fotometría de llama o por emisión atómica con equipo ICP-OES).

1.2.4 Potencial de oxidación de metano

Para la determinación del potencial de oxidación aerobia de metano de las distintas muestras de suelo y suelo rizosférico se realizaron ensayos en microcosmos (Figura 6). Se preparó en un vial de vidrio de 120 mL una suspensión de suelo fresco, equivalente a 5 g de peso seco, en 20 mL de agua destilada estéril y se preincubó a 30°C durante 72 horas en condiciones aerobias, según Ferrando y Tarlera (2009). Luego de ese tiempo los viales se cerraron con tapón de butilo y se precintaron. Se agregó metano (CH_4 99,995%; AGA®) como sustrato a los viales a una concentración de 7% (v/v) y se incubaron a 30°C con agitación orbital constante a 150 rpm. Las muestras del espacio gaseoso (*headspace*) del vial se tomaron con

jeringa y válvula *gas-tight*. Se realizó el seguimiento del consumo de metano mediante cromatografía gaseosa en equipo GC-2014 Shimadzu Scientific equipado con columna molecular Sieve 13x y un detector de conductividad térmica (GC-TCD). Se utilizó Argón como gas *carrier* con un flujo de 25 mL/min, el inyector se encontraba a 100°C, la temperatura de la columna utilizada fue de 35°C y la del detector 100°C.



FIGURA 6. Microcosmos utilizados para la determinación de la actividad de oxidación de metano potencial.

La actividad oxidante de metano se realizó por duplicado y se utilizaron como controles abióticos viales preparados en las mismas condiciones, pero utilizando suelo autoclavado (121°C, 15 minutos) y otro sin suelo, ambos con agregado de metano. El potencial de oxidación de metano se calculó por regresión lineal, a partir de la pendiente de la porción lineal del gráfico de concentración de CH₄ en función del tiempo de incubación.

1.2.5 Extracción y cuantificación de ADN

La extracción de ADN de los suelos y suelos rizosféricos se realizó utilizando el kit comercial DNeasy PowerSoil Pro de Qiagen a partir de 0,25 g de suelo (peso fresco). El ADN extraído se visualizó para verificar su integridad en un gel de agarosa 1% en buffer TBE 0,5X (30 min, 100mV) y se cuantificó utilizando el Qubit™ dsDNA HS Assay Kit con el fluorómetro Qubit® Invitrogen™. Finalmente, el ADN se almacenó a -20°C para posteriores análisis moleculares.

1.2.6 Abundancia de genes marcadores de metanotrofia en suelo y rizósfera

La abundancia del gen *pmoA* en las muestras de suelo desnudo y suelo rizosférico fue determinada mediante PCR cuantitativa (qPCR) utilizando los *primers* A189gcf/ mb661r (Costello y Lidstrom, 1999; Tabla 2). Las condiciones de amplificación fueron una etapa inicial de 5 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 5 segundos, hibridación y extensión a 60°C por 10 segundos, y adquisición de fluorescencia a 82°C durante un segundo, de acuerdo con Fernández-Scavino et al. (2022). Las cuantificaciones se realizaron en el termociclador Rotor Gene® y la solución de reacción, de volumen final 10 µL, se preparó a partir de 5 µL de la mezcla de reacción comercial Rotor Gene SYBR Green PCR Kit® (Qiagen), 2 µL de cada *primer* (1 µM) y 1 µL de ADN molde. Previo a la PCR las muestras de ADN se diluyeron 1:10 debido a la detección de inhibición en el ADN concentrado de suelos. Se realizaron duplicados técnicos de cada muestra y en cada corrida se usaron controles negativos (mezcla de reacción sin ADN molde). Se realizó la curva de calibración utilizando triplicados técnicos de siete diluciones sucesivas al décimo del estándar (gen *pmoA* de *Methylogaea oryzae* E10^T, DSM 23452), para obtener una curva con concentraciones en el rango de 2,67 a 2,67 x 10⁶ copias/µl. Esta curva se empleó para las siguientes corridas mediante la herramienta de importación de curvas en el Rotor-Gene Q Series Software, agregando una dilución intermedia del estándar a la corrida para calibrar la curva importada. Se realizó curva de *melting* en todas las corridas (muestras y estándares) para verificar la especificidad de la cuantificación.

TABLA 2. *Primers* y condiciones de amplificación utilizados para la cuantificación por qPCR del gen *pmoA*. T. Annealing: temperatura de hibridación y extensión, T. Fluorescencia: temperatura de adquisición de la fluorescencia.

<i>Primers</i>	Secuencia	Concentración	T. Annealing	T. Fluorescencia	Ciclos
A189gcf	5'-GG(AGCT) GAC TGG GAC TTC TGG-3'	1 µM	60 °C	82 °C	40
A661r	5'-CCG G(AC)G CAA CGT C(CT)T TAC C-3'	1 µM			

El número de copias del gen en cada muestra de suelo fue calculado en base seca a partir de los valores de humedad determinados previamente para cada muestra analizada. Los resultados finales, promedio de duplicado y corrección por factor de dilución, se expresaron como copias del gen *pmoA* por gramo de suelo seco.

1.2.7 Ensayo de evaluación del efecto del amonio sobre la actividad metanótrofa potencial

Dados los distintos niveles de amonio detectados en los suelos analizados y la correlación observada con los valores de potencial de oxidación de metano obtenidos (ver resultados en secciones 1.3.1 y 1.3.4), se realizó un ensayo en microcosmos para evaluar el efecto del amonio en la actividad potencial de oxidación de metano. Se seleccionaron suelos rizosféricos provenientes de rotaciones y etapas del cultivo que presentaron una concentración basal de amonio contrastante: rotación de arroz continuo (R1) y arroz de segundo año de la rotación arroz-pasturas (R42), en macollaje (47 DAS) y floración (110 DAS). Se utilizaron tres tratamientos correspondientes a tres niveles de amonio diferentes: (1) nivel bajo, sin agregado de amonio, correspondiente a la concentración de amonio en las muestras de las dos rotaciones en la etapa de floración, (2) nivel medio dado por las muestras en macollaje sin agregado de amonio y las en floración con agregado de amonio para alcanzar la concentración de las muestras en macollaje, (3) nivel alto para el que se agregó amonio en todas las muestras en una concentración 20 y 40 veces el nivel medio para R1 y R42 respectivamente. Los microcosmos se realizaron de la misma manera que en la sección 1.2.4, pero utilizando suelo secado a 30°C. Se preincubaron en condiciones aerobias a 30°C durante 72 horas y transcurrido ese tiempo se adicionó amonio a los viales a partir de soluciones de sulfato de amonio, para alcanzar las concentraciones finales que se detallan en la Tabla 3. Los viales se cerraron con tapón de butilo y se precintaron, para luego agregar metano en una concentración de 7% (v/v). El seguimiento del consumo de metano por GC-TCD y la determinación del potencial de oxidación de metano se realizó según se describe en la sección 1.2.4. Luego de consumido todo el metano del espacio gaseoso del vial se detuvo el ensayo.

TABLA 3. Niveles de concentración de amonio utilizados en el ensayo. Se utilizaron muestras de suelo rizosférico de la rotación arroz continuo (R1) y del segundo año de arroz de la rotación arroz-pasturas (R42), en dos momentos diferentes del ciclo de crecimiento del cultivo. Se indica la concentración final de amonio (mM) en el vial.

Etapas del cultivo	Rotación	Nivel de amonio		
		Bajo	Medio	Alto
Macollaje	R1	-	0.55 mM	10 mM
	R42	-	0.25 mM	10 mM
Floración	R1	0.06 mM	0.50 mM	10 mM
	R42	0.06 mM	0.22 mM	10 mM

1.2.8 Secuenciación masiva del gen 16S ARNr de comunidades bacterianas rizosféricas

Se estudió la comunidad bacteriana de los suelos rizosféricos de plantas de arroz en floración, de la rotación de arroz continuo (R1) y el primer año de arroz de la rotación arroz-pasturas (R41), mediante secuenciación masiva del gen 16S ARNr dirigida al dominio *Bacteria*.

La secuenciación de amplicones se realizó por tecnología de segunda generación Illumina MiSeq (secuencias *paired-end*, 250 pb) en el servicio de secuenciación MR DNA Molecular Reserch Laboratory (Texas, Estados Unidos). Se utilizaron los *primers* 515F-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA y 806R-GGACTACNVGGGTWTCTAAT (Caporaso et al., 2011), dirigidos a la región V4 del gen 16S ARNr de *Bacteria*. El procesamiento de los datos de secuenciación se llevó a cabo utilizando el paquete de código libre *Divisive Amplicon Denoising Algorithm* o DADA2 (Callahan et al., 2016) para inferir variantes de secuencia de amplicones (ASV), en el software R (Versión 4.1.3). Las secuencias fueron verificadas, filtradas y recortadas a una longitud aproximada de 200 pb, tanto las secuencias forward como las reverse. Las lecturas se cortaron y filtraron con un parámetro de calidad de 2 (truncQ), se removieron lecturas con bases ambiguas y con errores máximos esperados superiores a 2 (maxEE). El flujo de trabajo en DADA2 incluye las etapas de dereplicación de las secuencias, aprendizaje de las tasas de error, eliminación de las secuencias que pueden contener errores, fusión de las lecturas de los extremos emparejados como *contigs* (*merge*), examinación de los *contigs* en busca de desajustes para reducir errores, construcción de una tabla de abundancia de ASV y remoción de las secuencias quiméricas (usando el método “bimera”). Luego se realizó la asignación taxonómica de las ASV usando la base de datos de referencia SILVA (versión SILVA 138.1). Utilizando el paquete *phyloseq* (McMurdie y Holmes, 2013) se eliminaron las secuencias que fueron clasificadas taxonómicamente como secuencias de mitocondria, cloroplastos, eucariotas, arqueas y a las que no les fue asignado ningún taxón, de esta forma se obtuvieron las secuencias correspondientes a bacterias. Por último, se eliminaron los taxones representados por menos de tres lecturas en todo el set de datos, las cuales pueden ser resultado de errores de secuenciación. Se realizó normalización de los datos por rarefacción usando la función “rarefy_even_depth” del paquete *phyloseq* y el número de lecturas se transformó a abundancia relativa.

En paralelo, se realizó el mismo procedimiento, pero filtrando las secuencias asignadas a eucariotas y bacterias, además de las que no se pudieron clasificar taxonómicamente, de

forma de identificar las secuencias de arqueas que pueden estar presentes en las muestras de suelo rizosférico de arroz.

Para el análisis de la diversidad alfa de la comunidad bacteriana en cada muestra se evaluaron las curvas de rarefacción y se calcularon diferentes índices de diversidad como ser la riqueza observada, Chao 1, índice de equitatividad de Shannon-Weaver y el índice de Pielou para calcular la equitatividad o dominancia de taxones. La estimación de los índices de diversidad se realizó con la función “estimate_richness” del paquete *phyloseq* y la comparación estadística se realizó mediante el test de Kruskal-Wallis (no paramétrico). Se utilizaron funciones de los paquetes *phyloseq* (versión 1.40.0) y *ggplot2* (versión 3.3.6) para el análisis de los datos generados y la visualización de curvas de rarefacción, índices de diversidad alfa y estructura de la comunidad a diferentes niveles taxonómicos. Se construyó un diagrama de Venn, con el software libre EVenn, para visualizar la distribución de los géneros microbianos (o la última asignación taxonómica según la función “best_hit”) obtenidos en los suelos rizosféricos de las dos rotaciones.

1.2.9 Análisis estadístico

La totalidad de los análisis estadísticos descritos a continuación fueron realizados en el software RStudio versión 2022.07.0 (RStudio Team, 2015, R versión 4.2.1). Los resultados obtenidos para cada uno de los parámetros analizados se compararon mediante ANOVA factorial ($\alpha=0,05$), verificando los supuestos del análisis, y se realizó la comparación de medias mediante el test de Tukey. Para comparar los potenciales de oxidación de metano obtenidos para las distintas muestras, así como las abundancias del gen *pmoA* se realizaron ANOVA de dos vías, con los factores rotación y muestreo para los set de datos correspondientes a suelo y suelo rizosférico de forma independiente, y los factores rotación y material para las muestras obtenidas en cada muestreo. Además, se realizaron ANOVA de tres vías para verificar que no hubiera un efecto del bloque (réplicas biológicas) en los resultados obtenidos, y para la comparación del total de muestras (rotación, muestreo y material). Para evaluar los valores obtenidos para los distintos parámetros fisicoquímicos determinados se realizó ANOVA de tres vías con los factores rotación, muestreo y material. Para los casos en los que no se verificaron los supuestos del ANOVA (pH, contenido de amonio y de hierro, parámetros de rendimiento vegetal) se utilizaron los test no paramétricos Kruskal-Wallis y Dunn (con ajuste Benjamini-Hochberg) para comparación múltiple de medias. De forma de poder evaluar la correlación existente entre los resultados obtenidos

para las distintas determinaciones se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) utilizando los paquetes *stats* (4.2.1) y *ggbiplot* (0.55). Debido a que los diferentes parámetros en estudio no presentan una distribución normal de los datos (test Shapiro-Wilk) se realizó la determinación de coeficientes de correlación de Spearman, el cual es un test no paramétrico y para el cual se utilizó el paquete *stats* nuevamente.

1.3 Resultados

1.3.1 Caracterización fisicoquímica de suelos y rizósferas

Los suelos analizados presentaron valores de pH en el rango de 4,3–5,6, con diferencias significativas para muestreo (p-valor = 0,002), rotación (p-valor = 0,045) y material (p-valor = 0,0015). El pH de los suelos fue mayor al de las rizósferas, los suelos de arroz en etapa de floración tuvieron los pH más altos y los en macollaje los más bajos, por último, la rotación arroz continuo (R1) y el arroz de segundo año de la rotación arroz-pasturas (R42) fueron significativamente diferentes, presentando el primero, valores mayores de pH. Las humedades se encontraron en el entorno de 19–27%, las muestras extraídas en macollaje y primordio mostraron mayores porcentajes de humedad que las obtenidas previo a la inundación y durante la floración (p-valor = 0,0007). La rotación también tuvo un efecto sobre la humedad del suelo (p-valor = 0,009), siendo mayor en arroz de primer año de la rotación arroz-pasturas (R41) respecto al resto de las rotaciones. Los valores obtenidos de estos parámetros, así como de carbono oxidable por permanganato (Cpox) y amonio para los distintos suelos analizados se detallan en la Tabla A3, Apéndice II.

Las rotaciones en estudio presentaron valores de Cpox significativamente diferentes (p-valor = 0,004; test de Tukey) independientemente del tipo de material (suelo o rizósfera) y de la etapa del cultivo (Figura 7a). El arroz de primer año de la rotación arroz-pasturas (R41), el cual viene de 3 años de pasturas, y la rotación arroz continuo (R1) mostraron contenidos significativamente mayores de Cpox, si bien los valores obtenidos para R41 tienen una tendencia a ser mayores que los obtenidos para R1. Por otro lado, la rotación con soja presentó valores menores al resto. También se observó una tendencia a la disminución del contenido de Cpox a lo largo del ciclo del cultivo y los muestreos realizados, y a valores mayores en la rizósfera respecto al suelo, si bien en estos casos las diferencias no fueron significativas.

Para el contenido de amonio (Figura 7b) no se vio un efecto de las rotaciones ni del tipo de material, pero si del momento de muestreo (p-valor < 0,01; test de Dunn). Los eventos de fertilización nitrogenada se muestran en la Figura 5. Se obtuvieron valores significativamente mayores para los suelos y suelos rizosféricos de arroz en macollaje (47 DAS) respecto al resto de las etapas del ciclo de cultivo estudiadas, mientras que los suelos y rizósferas durante la floración (110 DAS) presentaron valores de amonio significativamente menores al resto.

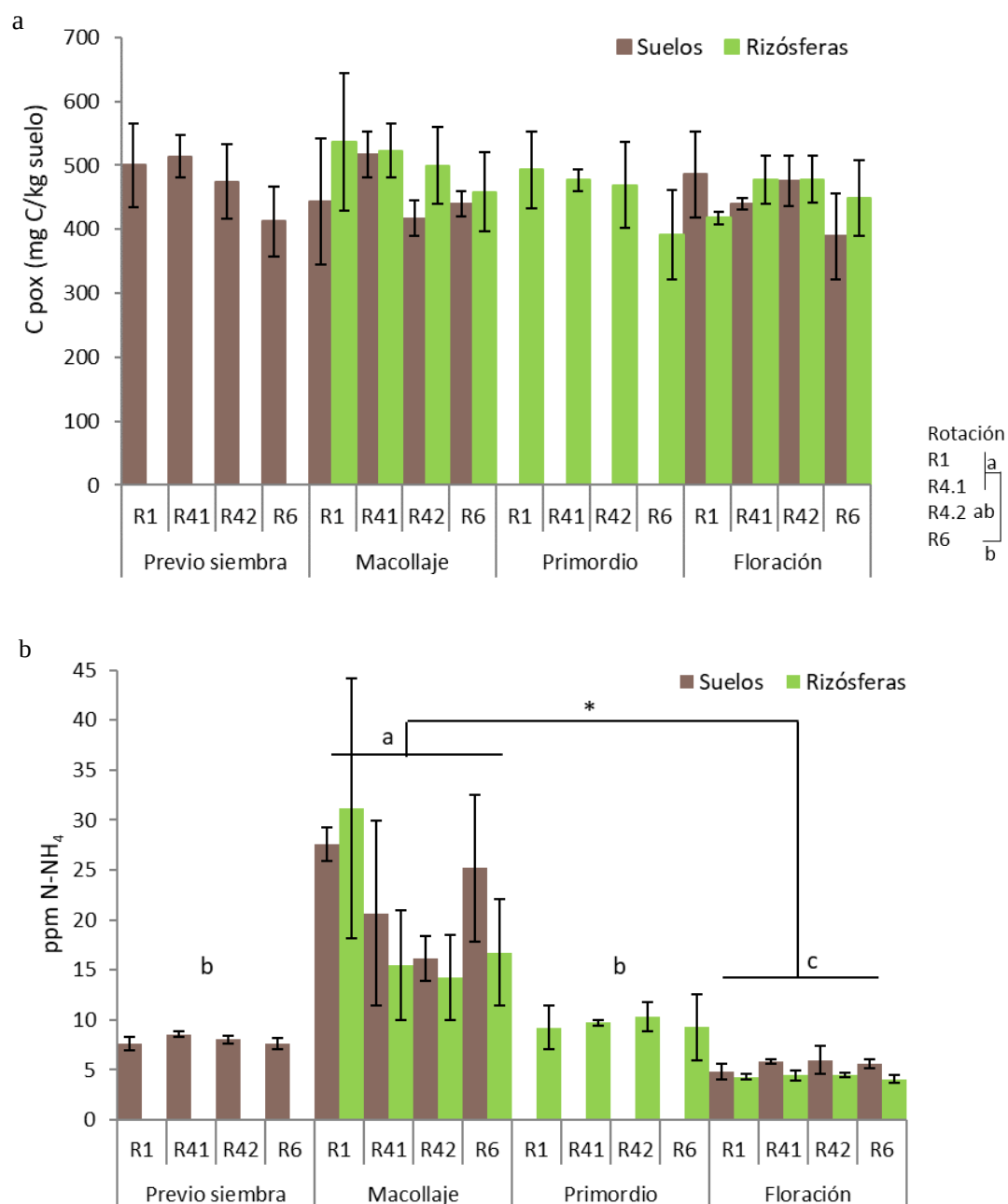


FIGURA 7. Resultados obtenidos para los parámetros carbono oxidable por permanganato (a) y amonio (como N; b) para las distintas muestras analizadas. Las diferencias significativas obtenidas del análisis estadístico son indicadas en la leyenda del gráfico de C pox (ANOVA $\alpha = 0,05$, p-valor = 0,00387) y sobre el gráfico en el caso del amonio (Kruskal-Wallis, p-valor < 0,01).

El contenido tanto de hierro como de sulfato del suelo no mostró un efecto significativo de la rotación. Sin embargo, el hierro aumentó su concentración a lo largo del transcurso de los muestreos, siendo significativamente mayor en el muestreo en floración y menor al resto en los suelos previo a la siembra de arroz (p -valor = 0,007; test de Dunn). Contrariamente, el contenido de sulfato presentó la tendencia opuesta, disminuyendo con el paso del tiempo, si bien este efecto no fue significativo.

En cuanto a los parámetros de rendimiento vegetal, estos no presentaron diferencias significativas entre rotaciones, si bien la rotación arroz continuo presentó una tendencia a mayores valores de longitud de raíces y parte aérea y menor peso de raíces respecto al resto de las rotaciones. Por otro lado, sí presentaron un efecto significativo del muestreo (p -valor < 0,001; test de Dunn), con un aumento de estos parámetros en el tiempo, acompañando el crecimiento de la planta. Estos datos no se presentan en esta tesis.

1.3.2 Potencial de oxidación de metano de suelo y rizósfera

El potencial de oxidación de metano (POM) de suelos y rizósferas mostró un efecto del ciclo de crecimiento de arroz. Mientras que antes de la siembra (octubre) se encontraron entorno a los 430 nanomol de CH_4 / h.g suelo seco, a los 47 DAS, en la etapa de macollaje (diciembre), se observó un aumento significativo del potencial metanótrofo de los suelos (p -valor < 0,01; test de Tukey) con valores cercanos a los 1300 nanomol de CH_4 / h.g suelo seco, mayores a los obtenidos en el resto de las etapas del cultivo (Figura 8). Los suelos rizosféricos también presentaron los mayores potenciales de oxidación en la etapa de macollaje (p -valor < 0,01) alcanzando valores en el entorno de los 1500 nanomol de CH_4 / h.g suelo seco.

En el caso de los suelos, el POM de suelo proveniente de la rotación arroz-pasturas con arroz de segundo año (S42) presentó valores significativamente menores al resto de las rotaciones (p -valor < 0,01; test de Tukey). Asimismo, se observó que los suelos de la rotación arroz continuo (S1) presentaron POM mayores al resto, aunque esta tendencia no fue significativa. Por otro lado, las rizósferas provenientes del sistema de arroz continuo (Rh1) y del arroz de primer año de la rotación arroz-pasturas (Rh41) presentaron un potencial metanótrofo mayor al arroz de segundo año de la rotación arroz-pasturas (p -valor = 0,0004). Al realizar la comparación estadística del set de datos de cada muestreo individualmente, se observó la misma tendencia (no se muestran los datos).

No se observó un efecto del tipo de muestra (suelo o rizósfera) en los resultados de POM determinados, excepto al observar los resultados obtenidos para el muestreo en floración donde se obtuvieron valores mayores en suelo rizosférico que en suelo de arroz (p-valor = 0,03; test de Tukey).

Las curvas de consumo de metano, a partir de las cuales se obtuvieron los valores de POM, presentaron formas similares para los suelos de las distintas rotaciones en cada etapa del ciclo de crecimiento del cultivo.

En el caso de los microcosmos control, con suelo autoclavado y sin suelo, la concentración de metano en el *headspace* del vial se mantuvo constante a lo largo de todo el experimento indicando ausencia de oxidación abiótica de metano y/o pérdidas de gas en el vial.

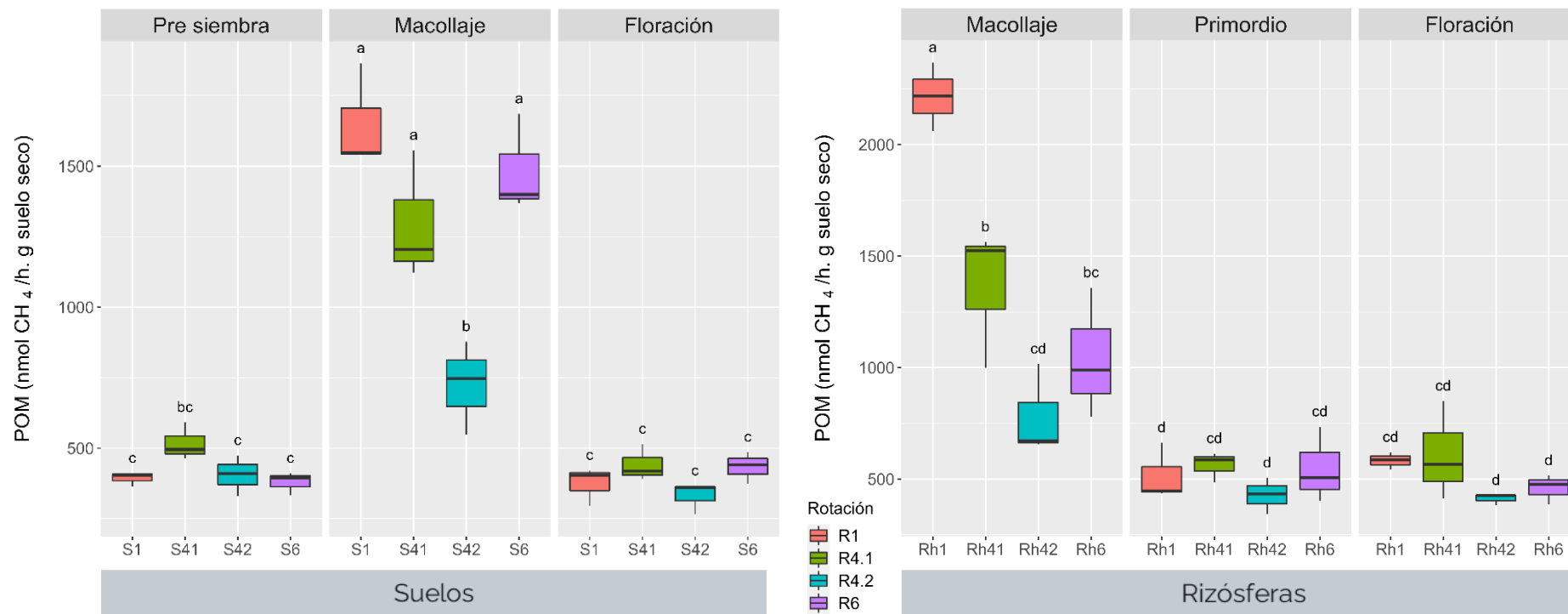


FIGURA 8. Potencial de oxidación de metano de los suelos y rizósferas provenientes de las rotaciones arroz continuo (S1 y Rh1), arroz-pasturas tanto el primer año de arroz (S41 y Rh41) como el segundo año (S42 y Rh42) y arroz-soja (S6 y Rh6), en las distintas etapas del ciclo de cultivo. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA con $\alpha=0,05$, test de Tukey).

1.3.3 Abundancia de bacterias metanótrofas en suelo y rizósfera

La abundancia de bacterias metanótrofas en los suelos y suelos rizosféricos obtenidos en los distintos momentos del ciclo de cultivo, de tres rotaciones arroceras diferentes, fue determinada mediante la cuantificación del gen marcador funcional *pmoA* por la técnica qPCR, a partir del ADN extraído de las muestras. La curva de calibración obtenida presentó un R^2 de 0,998 y la eficiencia de amplificación para el gen fue de 94% (Figura A1, Apéndice III). Las curvas de *melting* para las distintas muestras y estándares presentaron picos únicos, lo que constató la especificidad de los productos y la ausencia de dímeros de *primers* (Figura A2, Apéndice III).

Los resultados obtenidos se expresaron en número de copias del gen por gramo de suelo seco (gramos de suelo a partir de los cuales se extrajo el ADN) y se compararon estadísticamente según tipo de material, etapa del cultivo y rotación. Debido a que los resultados no presentaron una distribución normal y las varianzas no eran homogéneas, se realizó la transformación logarítmica de los datos para su análisis estadístico.

El número de copias de *pmoA* determinado en las distintas muestras se encontró entre $4,04 \times 10^6$ y $5,88 \times 10^7$ copias de *pmoA*/ g de suelo seco. La etapa de crecimiento de la planta no mostró un efecto en la abundancia del gen *pmoA* para ninguna de las rotaciones ni tipo de suelo (p-valor > 0,05). En este caso se vio un efecto solo de la rotación, siendo la rotación de arroz continuo (R1) la que presentó un mayor número de copias de *pmoA* por gramo de suelo seco, tanto en rizósfera como en suelo (p-valor < 0,01; test de Tukey), sin distinción del momento del ciclo del cultivo (Figura 9). No se observó un efecto del bloque en los resultados obtenidos.

Suelos y rizósferas no presentaron diferencias en la abundancia de metanótrofos en la comparación total, pero sí se observa un efecto significativo del material al comparar en forma aislada el set de muestras extraídas en macollaje (p-valor = 0,004; test de Tukey), las muestras en floración (p-valor = 0,045; test de Tukey) y el conjunto de los resultados obtenidos para las muestras en macollaje y en floración (p-valor = 0,0005; test de Tukey), obteniéndose abundancias mayores del gen *pmoA* en suelo rizosférico que en suelo desnudo, en los tres casos.

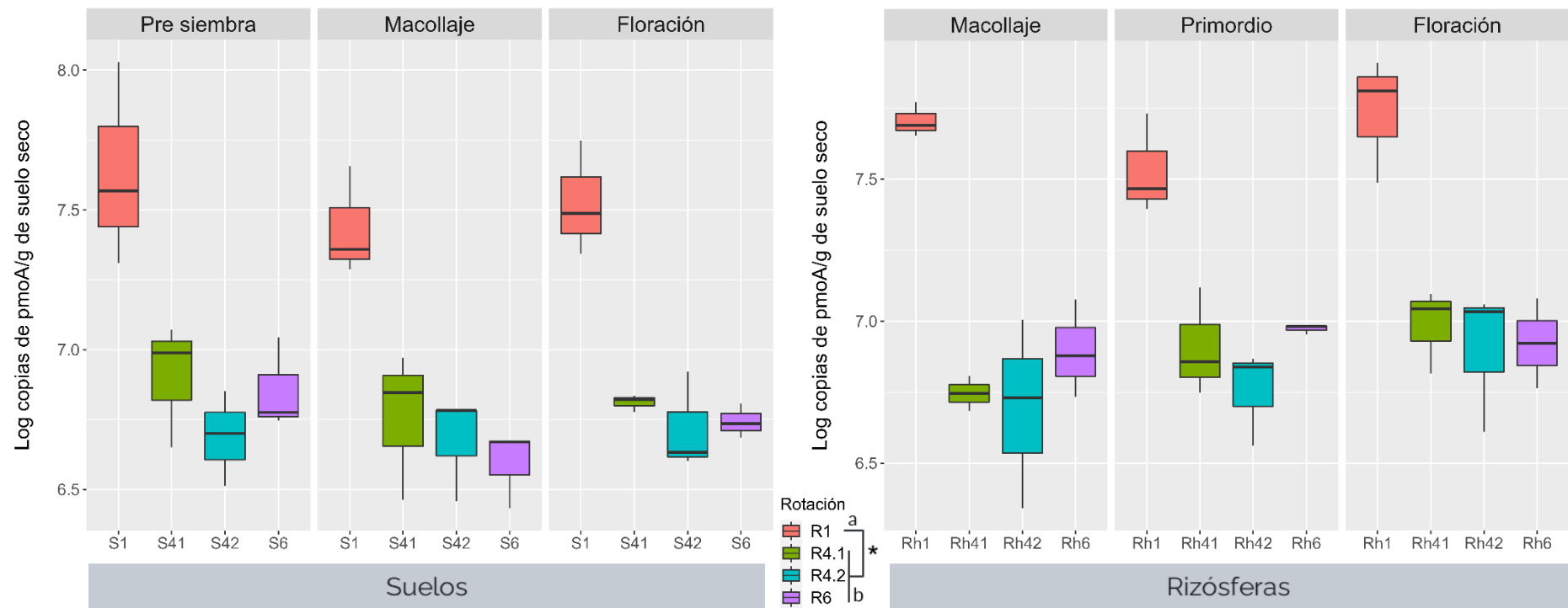


FIGURA 9. Abundancia del gen *pmoA* (log copias *pmoA*/g suelo seco) en suelos y rizósferas provenientes de las tres rotaciones arroceras: arroz continuo (R1), arroz-pasturas (R4.1 y R4.2) y arroz-soja (R6), en las distintas etapas del ciclo de cultivo. Las diferencias significativas obtenidas del análisis estadístico son indicadas en la leyenda de la figura (ANOVA con $\alpha=0,05$; test de Tukey).

1.3.4 Correlación entre parámetros fisicoquímicos y la actividad y abundancia de metanótrofos en suelo

Para evaluar si las características fisicoquímicas de los suelos en estudio se correlacionan con la abundancia y con la actividad potencial de metanótrofos, se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) exploratorio (Figura 10) y se calcularon los coeficientes de Spearman (ρ) correspondientes (Tabla 4).

En este PCA los dos primeros componentes principales (CP1 y CP2) permitieron explicar el 62,5% de la variabilidad total observada en el set de datos. Las muestras de suelo previo a la siembra del cultivo y las correspondientes a suelo y rizósfera de arroz en primordio floral y en floración son más parecidas entre sí en los parámetros determinados. El macollaje, tanto en suelo como en rizósfera, es la etapa en la que se observó la mayor dispersión de resultados, y la mayor contribución estuvo dada por el contenido de amonio y el potencial metanótrofo, así como la humedad y el carbono oxidable por permanganato. Se pudo observar una tendencia de las muestras correspondientes a esta etapa del cultivo a mayores valores de estos parámetros.

Respecto al efecto de la rotación se observó una tendencia de la rotación de arroz continuo (R1; círculos en la Figura 10) a agruparse hacia la parte inferior del gráfico separándose del resto de las rotaciones, siendo la variable que más influye en el componente CP2 y es mejor explicada la abundancia del gen *pmoA*. Este análisis no permitió diferenciar los resultados obtenidos según el tipo de muestra (suelo desnudo y rizosférico).

El gráfico permite observar también una fuerte correlación entre el contenido de amonio y el potencial de oxidación de metano de los suelos.

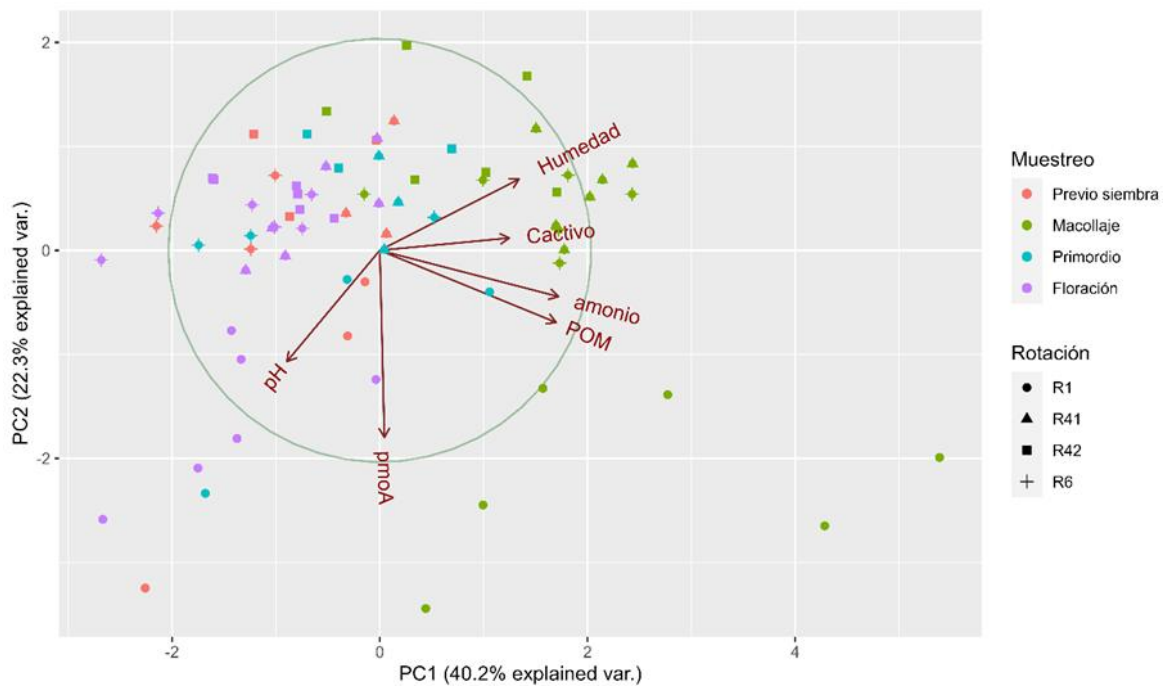


FIGURA 10. Análisis de Componentes Principales de las distintas variables determinadas: pH, C_{pox}, humedad, contenido de amonio, abundancia del gen *pmoA* y potencial de oxidación de metano (POM).

Los coeficientes de correlación de Spearman confirmaron la tendencia observada en el PCA, ya que el potencial de oxidación de metano presentó una fuerte correlación positiva con el contenido de amonio como se observa en la Tabla 4, la cual fue altamente significativa (p-valor < 0,01). El POM también mostró una correlación positiva con la humedad del suelo y una correlación negativa con el pH, pero si bien fueron significativas (p-valor < 0,05) eran correlaciones más débiles. Por otro lado, la humedad se correlacionó positivamente con el carbono oxidable por permanganato y el contenido de amonio.

TABLA 4. Matriz de correlaciones de Spearman (ρ) entre las variables fisicoquímicas, la abundancia de metanótrofos (*pmoA*) y el potencial de oxidación de metano (POM) de los suelos y rizósferas en estudio. Con asterisco se indican las correlaciones estadísticamente significativas ($\alpha = 0,05$).

	POM	<i>pmoA</i>	C _{pox}	Amonio	Humedad	pH
POM	1					
<i>pmoA</i>	0,11	1				
C _{pox}	0,20	0,17	1			
Amonio	0,70*	-0,18	0,21	1		
Humedad	0,40*	-0,14	0,60*	0,47*	1	
pH	-0,35*	0,22	-0,14	-0,29	-0,08	1

1.3.5 Ensayo de evaluación del efecto del amonio sobre la actividad metanótrofa potencial

Habiendo encontrado una correlación entre el potencial de oxidación de metano y el contenido de amonio en el suelo, se diseñó un ensayo en microcosmos para evaluar si la diferencia observada en el POM de suelos rizosféricos podía deberse a la presencia de diferentes concentraciones de amonio en los mismos.

En este ensayo, la adición de amonio tuvo efectos diferentes sobre la actividad metanótrofa dependiendo de la concentración agregada, como se observa en la Figura 11a. En primer lugar, se observó un POM mayor para los suelos con mayor contenido basal de amonio y un estímulo de la actividad frente al agregado de amonio en aquellas que presentaban una menor concentración natural, es decir, las rizósferas correspondientes al muestreo en floración. Al agregarle a dichas muestras una concentración de amonio tal que igualaran el contenido natural de las muestras extraídas en la etapa de macollaje (0,45 y 0,20 mM), su actividad metanótrofa aumentó significativamente ($p\text{-valor} < 0,01$; test de Tukey) alcanzando prácticamente los POM obtenidos para rizósfera en macollaje. Sin embargo, el agregado de una concentración mayor de amonio (10 mM) no supuso un aumento significativo en la actividad de oxidación de ninguna de las rizósferas ($p\text{-valor} > 0,05$). En el caso de las muestras de suelo rizosférico en macollaje, incluso se observó una inhibición de la oxidación de metano para ambas rotaciones en respuesta al agregado de una alta concentración de amonio.

Por otra parte, si bien la adición de bajas concentraciones de amonio estimuló la actividad metanótrofa en suelo rizosférico en la etapa de floración, no se observaron cambios en el inicio de la actividad (Figura 11b). No obstante, el aumento en la concentración de amonio sí impactó en la forma de las curvas de consumo de metano de las rizósferas de arroz en floración para las dos rotaciones estudiadas, volviéndolas más similares a las obtenidas para rizósfera de arroz en macollaje (Figura A3, Apéndice IV). Por el contrario, el agregado de concentraciones altas de amonio retrasó el comienzo del consumo de metano en todos los casos ($p\text{-valor} < 0,01$) y la rotación arroz-pasturas presentó mayor fase lag que la rotación arroz continuo independientemente de la etapa del cultivo y el nivel de amonio ($p\text{-valor} = 0,0005$).

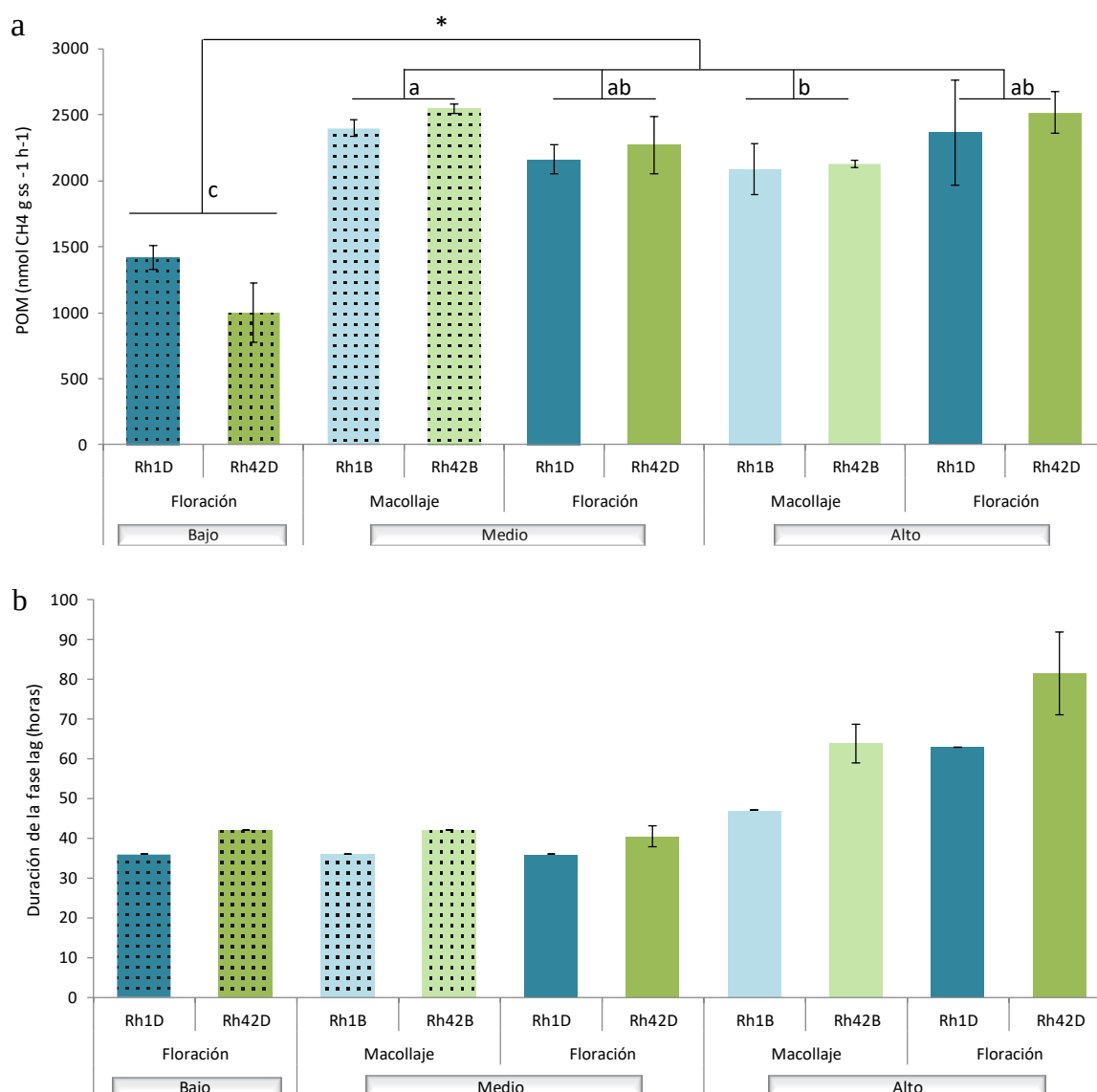


FIGURA 11. Potencial de oxidación de metano de los suelos rizosféricos de arroz extraídos de la rotación arroz continuo (R1; en azul) y arroz-pasturas (R42; en verde), en las etapas de macollaje (B) y floración (D) del cultivo, sin (relleno punteado) y con agregado de amonio (a). Letras distintas indican diferencias significativas para la interacción nivel de amonio*muestreo (ANOVA con $\alpha = 0,05$; test de Tukey). Duración de la fase de inicio (fase lag) de la actividad de oxidación de metano, en horas, para todas las muestras (b).

Al comparar los resultados obtenidos en este ensayo con las actividades determinadas a partir de suelo fresco (sección 1.3.2), se observó que el suelo seco presentó un mayor potencial de oxidación de metano que el suelo fresco. El suelo rizosférico de la rotación arroz continuo en macollaje (Rh1B) es el que presentó menor diferencia en la actividad potencial entre suelo fresco y seco, obteniéndose casi la misma pendiente (Figura A3, Apéndice IV). Además, el secado del suelo mejoró la forma de las curvas de consumo de metano, sobre todo para las muestras obtenidas en la etapa de floración (Figura A3, Apéndice IV). En relación al

comienzo de las actividades, el suelo seco presentó una mayor fase lag que el suelo húmedo en el caso de la rotación arroz continuo, pero no así para la rotación arroz-pasturas (Tabla A4, Apéndice IV).

1.3.6 Estructura y diversidad de comunidades microbianas rizosféricas de rotaciones contrastantes mediante secuenciación de genes 16S ARNr

Las rotaciones arroz continuo (R1) y arroz-pasturas (primer año de arroz; R41) fueron las seleccionadas para la optimización de la técnica *Stable Isotope Probing* (SIP), la cual se describe en el capítulo 2 de esta tesis. Por lo tanto, con el fin de complementar los análisis y permitir comparaciones pertinentes se secuenciaron los suelos rizosféricos originales correspondientes a dichas rotaciones en la etapa de floración (Rh1D y Rh41D), cuyos resultados se detallan en esta sección. Se brinda una descripción de la comunidad bacteriana total, la comunidad metanótrofa y una visión general de la comunidad metanogénica presente.

El número de lecturas obtenidas por tecnología Illumina Miseq para cada una de las muestras, tanto de los datos crudos (profundidad de la secuenciación) como luego de las principales etapas del procesamiento de los datos, se presentan en la Tabla A5, Apéndice V.

La diversidad y riqueza de las comunidades bacterianas presentes en estos suelos rizosféricos fueron evaluadas mediante las curvas de rarefacción y los índices de diversidad: riqueza observada, Chao1, Shannon y equitatividad de Pielou. Las muestras de suelo rizosférico se secuenciaron junto con las fracciones de ADN obtenidas en la implementación de la técnica SIP por lo que el procesamiento de los datos se realizó en forma conjunta. Las curvas de rarefacción obtenidas (Figura A4, Apéndice V) mostraron la riqueza de especies, cantidad de taxones en función del tamaño muestral o número de secuencias obtenidas para cada muestra, lo que permite observar la cobertura alcanzada en la secuenciación. Si bien el número máximo de ASV generadas fue diferente para cada muestra, en todas se alcanzó una meseta o un achatamiento de la curva lo que indica que la profundidad de secuenciación fue suficiente para cubrir la diversidad de especies en esos suelos. Para poder comparar la estructura de las comunidades presentes en los suelos rizosféricos de las dos rotaciones evaluadas, tanto entre sí como también con las comunidades de las muestras obtenidas por la técnica SIP, se realizó una normalización global de los datos mediante rarefacción, quitando secuencias en forma aleatoria hasta alcanzar el número de lecturas de la muestra

con menos, en este caso uno de los suelos rizosféricos de la rotación arroz continuo (Rh1). El número de secuencias luego de la normalización fue de 37202 a partir de las que se obtuvieron 3133 ASV en todas las muestras, 1542 de las mismas se encontraron en los suelos rizosféricos. En este caso, el suelo rizosférico correspondiente a la rotación de arroz continuo presentó un mayor número de ASV, 1091, mientras que para la rotación arroz-pasturas (R41) se encontraron 1014 ASV.



FIGURA 12. Índices de diversidad alfa calculados para las muestras de suelo rizosférico de arroz (n= 2) proveniente de las rotaciones arroz continuo (R1) y arroz-pasturas (R41). El *boxplot* representa la distribución de los datos a través de la mediana y los cuartiles, así como valores atípicos (*outliers*).

Las dos rotaciones estudiadas no presentaron comunidades significativamente diferentes en cuanto a su diversidad y riqueza (Figura 12), si bien se observa una tendencia a mayor diversidad en la rotación de arroz continuo (R1). El índice de Pielou promedio de 0,92 para la rotación de arroz continuo y 0,89 para la rotación arroz-pasturas (no se presentan en la figura), indica que ambas rotaciones presentaron comunidades diversas con una distribución de taxones homogénea. Se debe destacar que para sacar conclusiones con mayor sustento estadístico debería secuenciarse un mayor número de réplicas.

Se realizó un diagrama de Venn a partir de las 1542 ASV identificadas en estas muestras, para evaluar las que son comunes a las dos condiciones estudiadas y las exclusivas de una u

otra (Figura A5, Apéndice V). Un 37% de las ASV totales (563) fueron compartidas entre las dos rotaciones, mientras que un 34% (528) se encontró exclusivamente en la rotación de arroz continuo y un 29% (451) en la rotación arroz-pasturas. Sin embargo, al realizar un diagrama de Venn agrupando las ASV según su asignación taxonómica (a nivel de género o el último alcanzado) se observó que los suelos rizosféricos compartieron el 67% de un total de 420 géneros, mientras que los encontrados solo en una condición correspondieron a un 17% para el arroz continuo y 15% para la rotación arroz-pasturas (Figura 13).

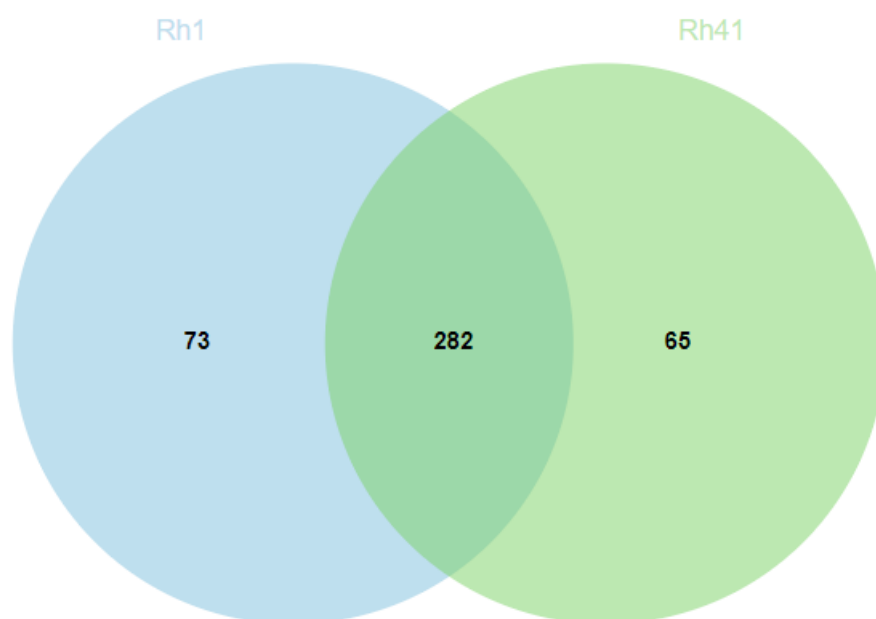


FIGURA 13. Diagrama de Venn a nivel de género para los suelos rizosféricos de las dos rotaciones, arroz continuo (Rh1) y arroz-pasturas (Rh41). Sobre cada círculo se presenta el número de géneros exclusivos para cada condición y en la intersección de ambos círculos el número de géneros compartidos.

El análisis taxonómico de las comunidades bacterianas asociadas a las plantas de arroz reveló un perfil a nivel de phylum muy similar para los dos sistemas de rotación estudiados, si bien se observaron diferencias en la abundancia de algunos de los taxones. Los phyla *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Acidobacteriota* y *Actinobacteriota* fueron los más abundantes en ambas condiciones. El phylum *Proteobacteria* constituyó una proporción importante de estas comunidades, pero solo estuvo representado en estos suelos por las clases *Alphaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*. La clase *Alphaproteobacteria* se encontró en mayor proporción representando el 81% de los taxones asignados al phylum en la rotación arroz-pasturas y 72% en arroz continuo.

El estudio de la comunidad bacteriana a nivel de clase (Figura 14) evidenció la presencia de bacterias no solo de las clases *Alphaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* sino también *Methylomirabilia* del phylum candidato *Methylomirabilota*, pudiendo corresponder a microorganismos metanótrofos. La clase *Verrucomicrobiae* también se encontró representada en la comunidad, sin embargo, las bacterias metanótrofas pertenecientes a esta clase se encuentran en la familia *Methylococcaceae* y no se asignaron miembros a dicha familia. Los grupos más abundantes en estas comunidades fueron *Bacilli*, *Alphaproteobacteria* y *Acidobacteriae* con abundancias mayores al 10%, seguidos de *Verrucomicrobiae*, *Thermoleophilia*, *Actinobacteria* y *Gammaproteobacteria*. En el caso de la rotación arroz continuo *Alphaproteobacteria* fue la clase mayormente representada (16%) seguida por la clase *Acidobacteriae* (13%). Por el contrario, en las muestras de la rotación arroz-pasturas la clase predominante fue *Bacilli* (19%) mientras que *Alphaproteobacteria* presentó una abundancia de 17%.

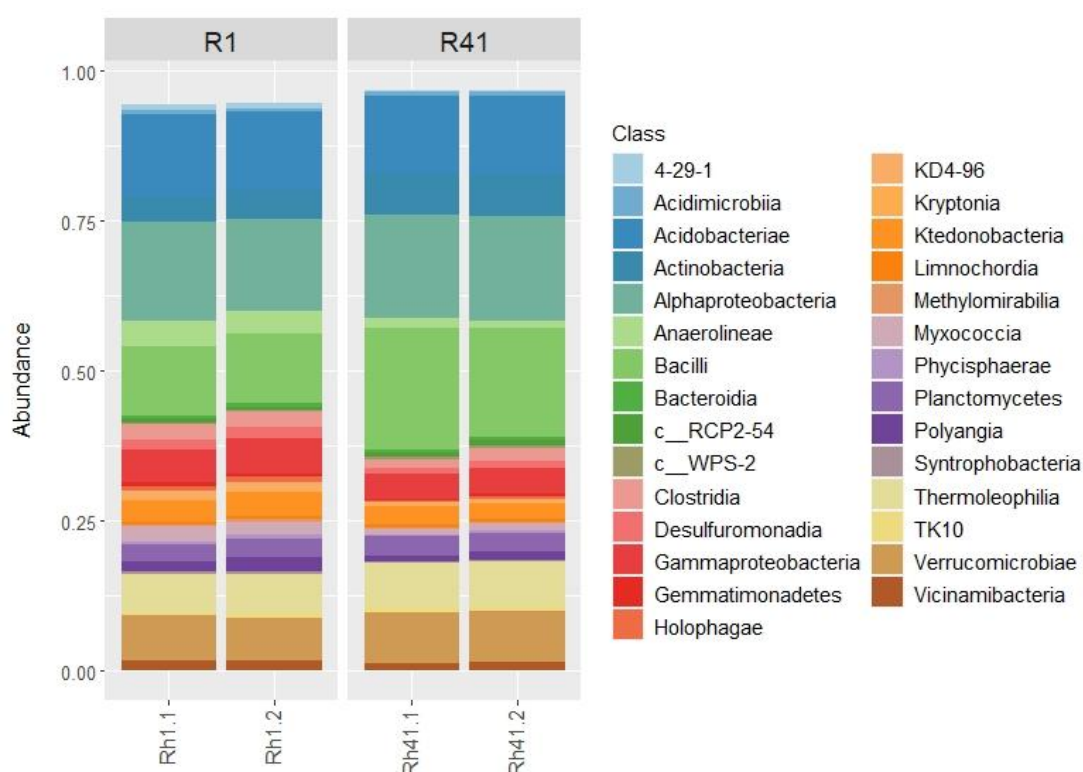


FIGURA 14. Abundancia relativa de las principales clases del dominio *Bacteria* de los suelos rizosféricos de arroz de las rotaciones arroz continuo (Rh1) y arroz-pasturas (Rh41). Se muestran las clases que están representadas en una abundancia relativa mayor al 1%.

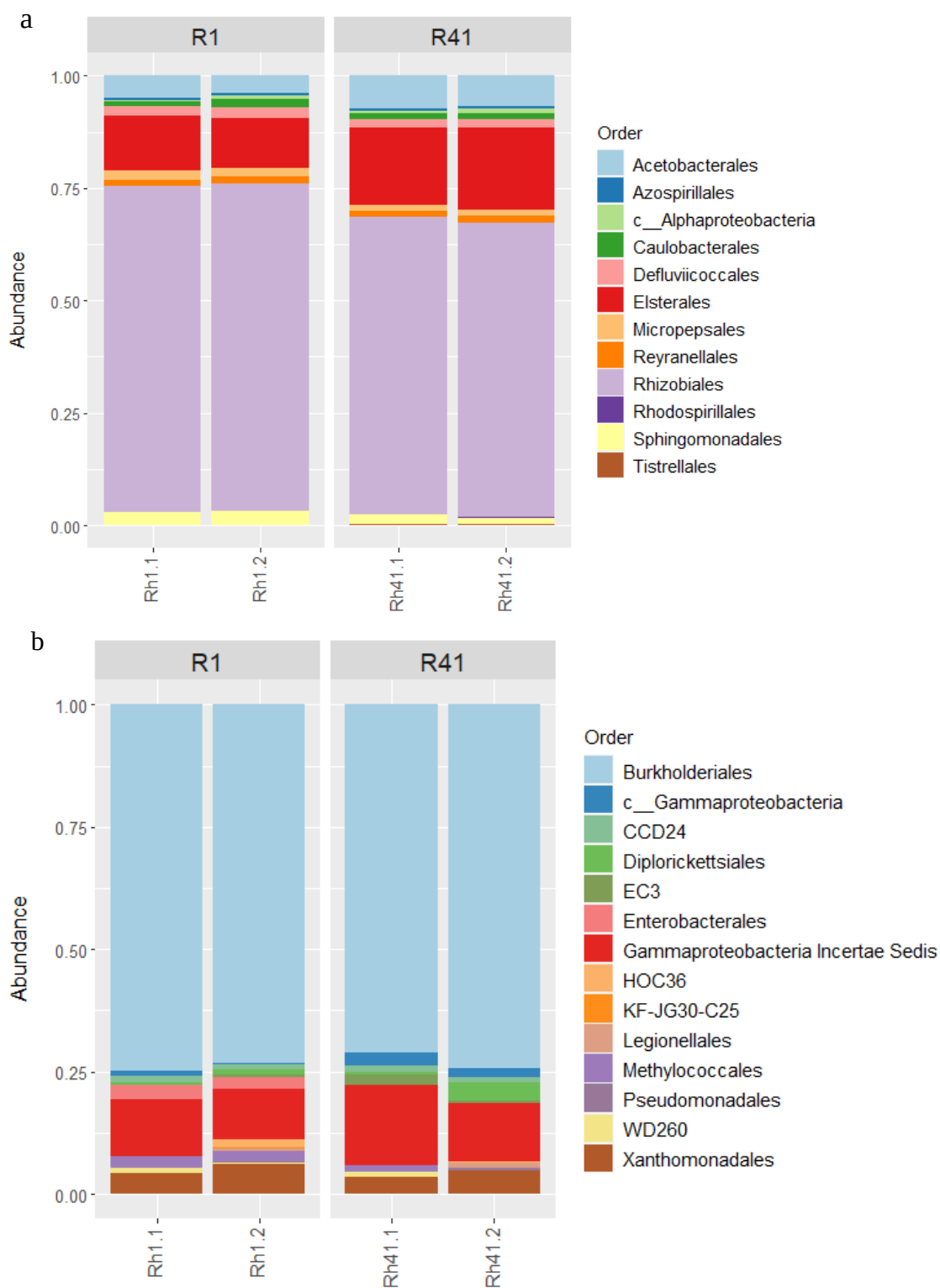


FIGURA 15. Composición taxonómica de la clase *Alphaproteobacteria* (a) y la clase *Gammaproteobacteria* (b) a nivel de orden, en los suelos rizosféricos de arroz provenientes de la rotación arroz continuo (Rh1) y arroz-pasturas (Rh41).

Al centrar la atención en las clases de *Proteobacteria* se pudo ver que *Alphaproteobacteria* estaba representada principalmente por secuencias asignadas a los órdenes *Rhizobiales*,

Elsterales y *Acetobacterales* en las cuatro muestras analizadas (Figura 15a), si bien se constató una alta predominancia del orden *Rhizobiales* con una abundancia relativa de casi 70% respecto a la abundancia total de *Alphaproteobacteria*. Un taxón asignado al orden *Rhodospirillales* se encontró solo en suelos rizosféricos de la rotación arroz-pasturas, por lo que se pudieron detectar ciertas diferencias entre las comunidades no solo en la abundancia de algunos taxones sino también en su presencia. En la clase *Gammaproteobacteria* también se observó una predominancia importante de un solo grupo taxonómico, en este caso el orden *Burkholderiales*, mientras que los órdenes *Gammaproteobacteria Incertae Sedis* y *Xanthomonadales* fueron los siguientes en abundancia (Figura 15b). Secuencias asignadas al orden *Enterobacterales* fueron encontradas exclusivamente en muestras de la rotación arroz continuo.

Debido a que el interés de este trabajo radica principalmente en la comunidad metanótrofa, se estudió la composición de dicha comunidad a nivel de género realizando una selección de géneros conocidos como oxidantes de metano (Figura 16). De esta forma se observó que los perfiles son diferentes para los suelos rizosféricos de arroz de las dos rotaciones. Si bien se encontraron solo cinco géneros metanótrofos presentes en estas muestras, estos permitieron establecer diferencias entre los dos tratamientos. Por un lado, el suelo rizosférico de arroz proveniente de la rotación de arroz continuo (R1) mostró una predominancia del género *Methylocystis*, seguido del género *Methylobacter* en las dos réplicas. Por otro lado, las muestras pertenecientes a la rotación arroz-pasturas (R41) presentaron al género *Methylocella* como predominante y *Methylocystis* en segundo lugar. Además, de acuerdo con lo observado previamente al realizar el diagrama de Venn con la comunidad total, se constató la presencia del género *Crenothrix* en forma exclusiva en la rotación de arroz continuo (R1). El otro género identificado, presente en ambas condiciones, fue *Methylobacterium-Methylobacter*. Tanto *Methylocystis* como *Methylocella* son metanótrofos de tipo II pertenecientes a la clase *Alphaproteobacteria* y en conjunto comprendieron el 80% de la comunidad metanótrofa identificada en los suelos rizosféricos, predominando ampliamente sobre el resto de los grupos taxonómicos detectados en todas las muestras secuenciadas.

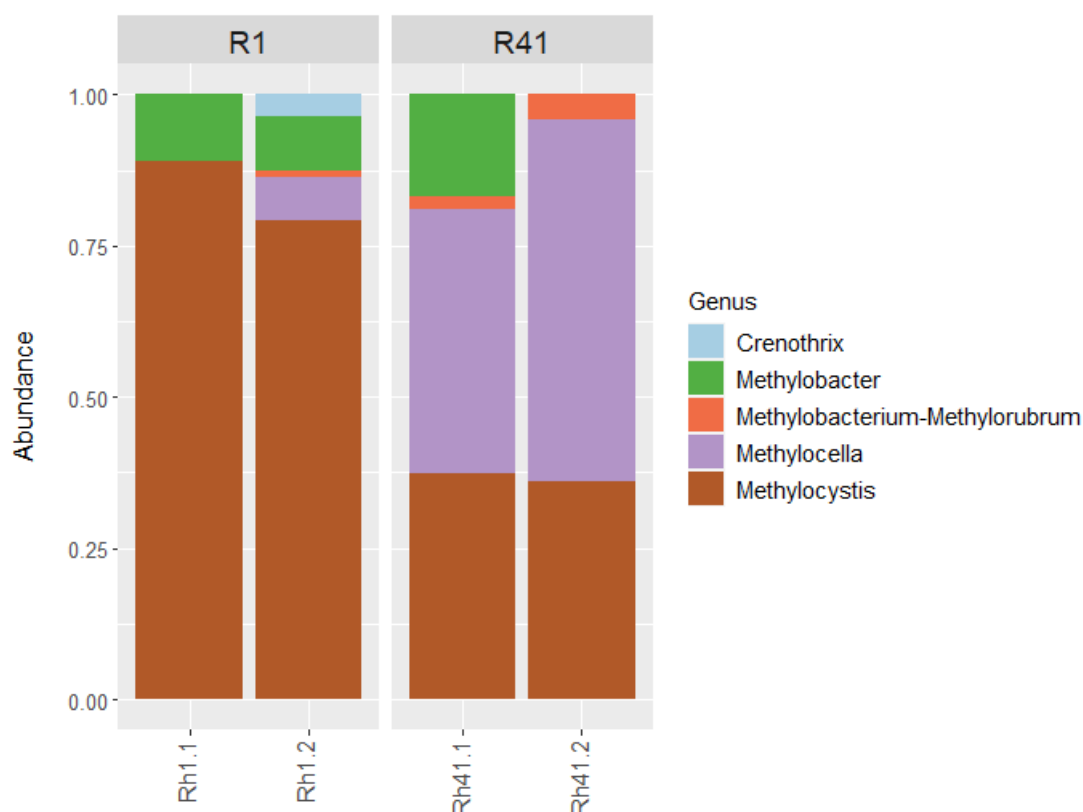


FIGURA 16. Abundancia relativa de bacterias metanótrofas a nivel de género presentes en los suelos rizosféricos de arroz provenientes de la rotación arroz continuo (Rh1) y arroz-pasturas (Rh41).

Los *primers* utilizados en este trabajo están dirigidos al gen 16S ARNr del dominio *Bacteria*, por lo que no serían los más adecuados para relevar al dominio *Archaea*. Sin embargo, las curvas de rarefacción obtenidas para estas cuatro muestras evidenciaron una profundidad de secuenciación suficiente para este dominio, lo que permitiría relevar la diversidad de arqueas presente en las mismas (Figura A6, Apéndice V). Teniendo esto en cuenta, se realizó un estudio exploratorio de la comunidad de arqueas presentes en estos suelos rizosféricos. Se encontraron representantes de cuatro phyla diferentes *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Halobacterota* y *Thermoplasmata*. El phylum *Crenarchaeota* fue predominante en las muestras de la rotación arroz-pasturas (R41) con una abundancia de 70%, mientras que *Halobacterota* predominó en la rotación de arroz continuo (R1) en casi un 55%. Los restantes dos phyla se encontraron en abundancias menores al 7% en todas las muestras.

Se realizó un gráfico de abundancias relativas de los géneros de arqueas encontrados en estos suelos rizosféricos, obteniéndose perfiles diferentes para las muestras de las distintas rotaciones (Figura 17). Entre los taxones encontrados se identificaron varios grupos metanogénicos, estando representados los tres phyla principales. Se observaron los géneros

Methanosarcina, *Methanocella*, *Methanosaeta*, *Methanospirillum*, arqueas del orden *Methanomicrobiales* y el grupo de arqueas metanogénicas no cultivadas *Rice Cluster I*, pertenecientes al phylum *Halobacterota*, así como los géneros *Methanobacterium* y *Methanomassiliicoccus* únicos representantes en estos suelos de los phyla *Euryarchaeota* y *Thermoplasmatota* respectivamente. Además, se encontraron representantes de los géneros *Candidatus Nitrocosmicus*, *Candidatus Nitrosotalea* y *Candidatus Nitrososphaera*, así como taxones sin clasificar asignados a la familia *Nitrososphaeraceae* y a la clase *Bathyarchaeia*, todos pertenecientes al phylum *Crenarchaeota*. En los suelos rizosféricos de arroz de la rotación de arroz continuo el género más abundante fue un representante del grupo *Rice Cluster I* el cual correspondió al 32% de la comunidad de arqueas. En el caso de la rotación arroz-pasturas, arqueas pertenecientes a la familia *Nitrososphaeraceae* predominaron en estos suelos con una abundancia relativa de 52%, seguido por el grupo *Rice Cluster I* en una abundancia aproximada de 16%. En ambas rotaciones el género metanogénico más abundante en segundo lugar fue *Methanocella* representando un 13% y 7% de la comunidad respectivamente. La mayoría de los grupos taxonómicos variaron en abundancia entre las dos rotaciones en estudio, pero algunas también en ocurrencia. Los géneros *Methanosaeta*, *Methanospirillum* y *Candidatus Nitrosotalea* se encontraron solo en las muestras de la rotación de arroz continuo; *Candidatus Nitrososphaera*, contrariamente, se encontró exclusivamente en la rotación arroz-pasturas, aunque en muy baja abundancia (1%).

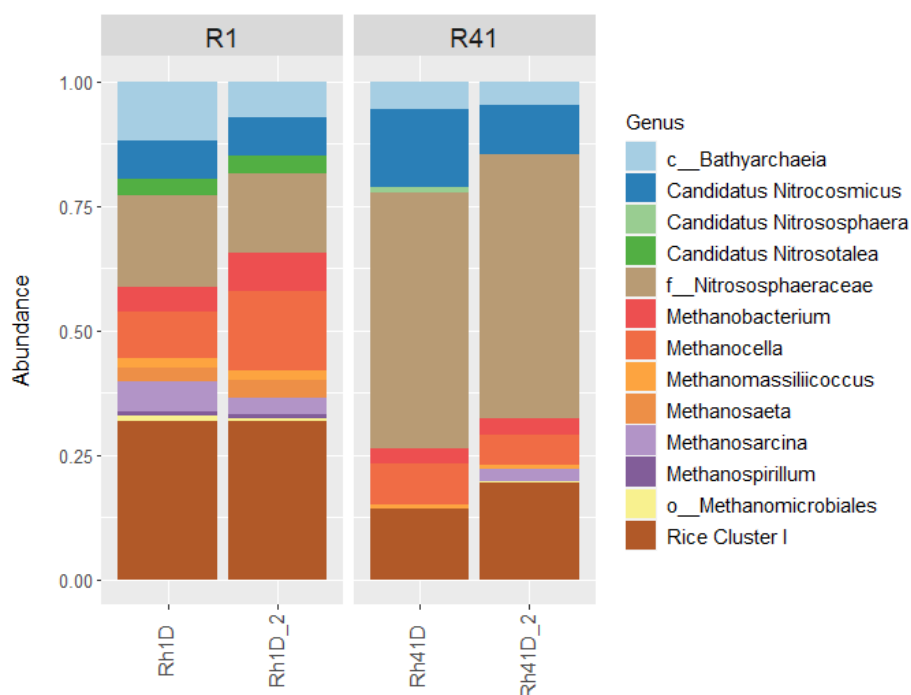


FIGURA 17. Abundancia relativa de arqueas a nivel de género, a partir de los datos obtenidos por secuenciación masiva de la región V4 del gen 16S ARNr. Rh1: rotación arroz continuo, Rh41: rotación arroz-pasturas.

1.4 Discusión y conclusiones

En este capítulo se estudió la actividad de oxidación de metano potencial y la abundancia de la comunidad metanótrofa en suelo y suelo rizosférico de arroz, en sistemas de rotación con diferente intensidad en el uso del suelo, y se estudió el efecto de parámetros fisicoquímicos como pH, humedad y contenido de amonio del suelo en dicha comunidad. Además, se estudió la estructura de la comunidad en suelo rizosférico de arroz de dos rotaciones contrastantes. Para esto se realizaron ensayos en microcosmos, PCR cuantitativa y secuenciación masiva del gen 16S ARNr, así como se utilizaron diferentes herramientas de análisis. Los resultados obtenidos mostraron que hay un efecto de la rotación arroceras en la abundancia de genes marcadores de metanotrofia y en la comunidad metanótrofa asociada a la raíz de la planta de arroz, mientras que el POM varía en función de la etapa de cultivo.

1.4.1 Efecto de la intensificación y parámetros fisicoquímicos en la actividad y abundancia de metanótrofos en suelo y rizósfera de arroz

El ensayo de campo a largo plazo de INIA Treinta y Tres que se utilizó como unidad experimental, se encontraba funcionando hacía 7 años al momento del muestreo (2019) y su diseño de bloques nos permitió tener réplicas biológicas, por lo que significó un insumo de gran relevancia para obtener resultados con sustento estadístico. De tres rotaciones seleccionadas en este ensayo de campo se obtuvieron las muestras de suelo y suelo rizosférico de arroz que utilizamos en las distintas actividades de este trabajo.

De acuerdo a lo descripto, los suelos fueron caracterizados evaluando diferentes parámetros fisicoquímicos. Los suelos de este trabajo presentaron pH cercanos a 5. Otros autores (Li et al., 2019) reportaron pH en el entorno de 5,8 en suelos bajo inundación continua. El pH fue el único parámetro evaluado que mostró una diferencia entre el suelo y el suelo rizosférico. Los suelos presentaron pH mayores que las rizósferas, lo que puede deberse a la presencia de ácidos orgánicos de los exudados radiculares los cuales pueden acidificar el suelo rizosférico (Li et al., 2019b).

Otro de los parámetros evaluado fue el carbono oxidable por permanganato que corresponde a las fracciones de carbono del suelo más lábiles, que son más fácilmente degradables (Corres et al., 2015; Weil et al., 2003). Por ello es más sensible a los efectos del manejo del suelo que el carbono orgánico y más relacionable a sus propiedades biológicas, pudiendo actuar como un indicador de los cambios tanto en la materia orgánica a corto plazo como en

la calidad del suelo (Gilsanz y Peralta, 2015). Este pool de carbono lábil incluye carbono de la biomasa microbiana, materia orgánica particulada y carbohidratos del suelo (Weil et al., 2003). En este trabajo este parámetro fue afectado por la rotación y se obtuvieron valores mayores para el arroz de primer año de la rotación tradicional (R41) y la rotación de arroz continuo (R1). En estudios previos realizados en el mismo ensayo se observó que la rotación arroz-pasturas estaba asociada al aumento del carbono orgánico del suelo (Macedo et al., 2022). En el caso del arroz continuo, el aumento de carbono lábil puede estar asociado a los rastrojos que cada año se devuelven al suelo lo que contribuye al carbono disponible. Por otro lado, los suelos de la rotación arroz continuo presentaron una alta actividad de oxidación de metano, y según se ha sugerido, la síntesis de biomasa mediada por la metanotrofia (carbono proveniente del metano) contribuye a la acumulación de materia orgánica en el suelo (Sultana et al., 2022). Por el contrario, los suelos de la rotación con soja (R6) presentaron los menores valores de este parámetro lo que podría estar indicando una pérdida de carbono orgánico lábil en este sistema.

Por otra parte, el contenido de amonio fue un parámetro con variación importante durante el ciclo de cultivo, lo que podría estar asociado a los momentos de fertilización. Se observó un aumento significativo en los niveles de amonio en la etapa de macollaje, pero no en el primordio. En ambos casos se fertilizó una semana antes del muestreo, pero en condiciones y cantidades distintas. En el trabajo realizado por Li et al. (2016) en un ensayo de crecimiento de plantas de arroz, se observó que el contenido de amonio presenta su valor máximo en la etapa de macollaje y luego disminuye con la etapa fenológica del arroz.

La determinación del potencial de oxidación de metano de los suelos en estudio se realizó mediante incubación en microcosmos con agregado de metano y seguimiento del consumo de dicho gas por cromatografía de gases. El estudio de la actividad *in situ* de los microorganismos representa un desafío técnico debido a los constantes cambios en las condiciones ambientales y parámetros fisicoquímicos en el cultivo de arroz, factores importantes que pueden influenciar la actividad de la comunidad metanótrofa (Sultana et al., 2019). Sin embargo, según ha sido reportado por Eller et al. (2005), los resultados obtenidos en ensayos de incubación en microcosmos para muestras de suelo de arroz son consistentes con la dinámica de las comunidades metanótroficas en campo; tanto al estudiar la diversidad y estructura como la actividad de la comunidad, los resultados son comparables, si bien se observan diferencias en los datos cuantitativos.

El POM de suelo desnudo se encontró entre 331 y 1651 nanomol de CH₄ h⁻¹ g suelo seco⁻¹, mientras que a nivel rizosférico se obtuvieron valores entre 410 y 2216 nanomol de CH₄ h⁻¹ g suelo seco⁻¹ (en floración y macollaje respectivamente, en ambos casos). La etapa del cultivo tuvo un efecto en el POM ya que se obtuvieron valores significativamente mayores en la etapa de macollaje respecto al resto de las etapas muestreadas. Los valores de POM obtenidos en este trabajo son comparables con los obtenidos por Ma et al. (2010) en rizósfera de arroz de tipo Índica extraída en la etapa entre macollaje y maduración. Eller y Frenzel (2001) también obtuvieron valores similares a los obtenidos en esta tesis excepto en la etapa de macollaje, además reportan una mayor fase lag en el consumo de metano en suelo respecto a la rizósfera lo que también se observa, aunque en menor medida, en este trabajo. Sin embargo, los valores de actividad potencial obtenidos fueron menores a los obtenidos por Ferrando y Tarlera (2009) en un estudio realizado previamente en arrozales de la misma estación experimental, donde obtuvieron valores cercanos a los 4 µmol CH₄/h. g suelo seco en rizósfera de arroz en etapa de floración. En un estudio realizado con suelo y rizósfera de arroz de un predio experimental en China, se observó también un aumento en la oxidación de metano (*in situ*) en la etapa de macollaje para luego volver a disminuir en el tiempo (Ma et al., 2013). Factores como las condiciones utilizadas para determinar el potencial de oxidación de metano, la variedad de arroz y propiedades del suelo pueden afectar los resultados obtenidos.

Para la cuantificación de oxidantes de metano, se realizó PCR cuantitativa dirigida al gen *pmoA* de las muestras de suelo y suelo rizosférico provenientes de las distintas rotaciones agrícolas y de las distintas etapas del ciclo de cultivo. La abundancia de metanótrofos se encontró entre 4,04 x10⁶ y 5,48 x10⁷ copias del gen *pmoA* g suelo seco⁻¹ en suelo desnudo y entre 5,61 x10⁶ y 5,88 x10⁷ copias del gen *pmoA* g suelo seco⁻¹ en rizósfera. Se observaron diferencias entre rotaciones, pero no se vio efecto del tipo de suelo ni de la etapa del cultivo. Los resultados obtenidos son un orden de magnitud menor a los reportados por Liu et al. (2019) en rizósfera de arroz con fertilización nitrogenada, siendo más cercanos al número de copias de *pmoA* obtenidos para el arroz sin fertilizar; en dicho trabajo tampoco se vio un efecto de la etapa del cultivo. Por otro lado, Schmidt y Eickhorst (2013) obtuvieron resultados similares en suelo de arroz cultivado en condiciones controladas, no observando diferencias entre las etapas del cultivo, excepto durante la floración cuando se observó un aumento en el número de metanótrofos por gramo de suelo seco (CARD-FISH) en rizósfera. Asimismo, Breidenbach y Conrad (2014) también reportaron un aumento en el número de

copias del gen 16S ARNr de bacteria durante la floración, posiblemente asociado a una mayor producción de exudados radiculares en esta etapa y una mayor liberación de oxígeno por las raíces. En este trabajo, a diferencia de lo esperado, los resultados obtenidos no mostraron un efecto de la floración. Respecto a la comparación entre rotaciones, se obtuvieron abundancias del gen *pmoA* significativamente mayores para la rotación de arroz continuo. Esto coincide con lo observado por Breidenbach et al. (2017) en un sistema de rotación arroz-maíz, donde las raíces de arroz de la rotación arroz continuo presentaron mayor número de copias del gen *pmoA* que las raíces de arroz en rotación con maíz. Los resultados obtenidos para suelo y rizósfera de la rotación intensiva en las distintas etapas del cultivo son similares a los reportados por Ma et al. (2010) para rizósfera de arroz en la etapa de macollaje donde se obtuvieron abundancias de alrededor de 1×10^7 copias *pmoA* por gramo de suelo seco, trabajo realizado en un predio experimental donde se cultivan distintas variedades de arroz. Al comparar con otros sistemas de rotación como arroz-trigo, la abundancia del gen *pmoA* (2×10^7 copias *pmoA* g suelo⁻¹) es comparable a la obtenida en esta tesis para las rotaciones arroz-pasturas y arroz-soja, pero es menor a la obtenida para el arroz continuo (Jiang et al., 2022). El mayor número de copias del gen marcador de metanotrofia observado en la rotación arroz continuo en este trabajo, acompaña a los mayores potenciales de oxidación de metano obtenidos para suelo y suelo rizosférico de arroz en esta rotación en la etapa de macollaje (sección 1.3.2). En un estudio realizado en la misma estación experimental obtuvieron abundancias dos órdenes de magnitud menores aproximadamente, pero con un aumento del número de copias del gen a lo largo del ciclo de cultivo, y con abundancias significativamente mayores en suelos que venían de un cultivo de arroz (arroz continuo y arroz de segundo año de la rotación arroz-pasturas) respecto a los que tuvieron otro cultivo previo, soja o pasturas (Fernández-Scavino et al., 2022).

El tipo de material (suelo desnudo o rizosférico) no mostró tener un efecto en la abundancia de metanótrofos ni en el potencial de oxidación de metano. Contrariamente, numerosos trabajos han constatado una mayor abundancia y actividad potencial en rizósfera que en suelo de arroz (Breidenbach et al., 2015; Li et al., 2019b; Ma et al., 2013; Schmidt y Eickhorst, 2013), lo que refleja el efecto estimulante de las raíces (Eller y Frenzel, 2001). Según los resultados obtenidos por Li et al. (2019b) el tipo de material tuvo un efecto en la comunidad activa del suelo mientras que la etapa fenológica de la planta solo mostró un efecto en las OTU raras o minoritarias de la comunidad activa. Los exudados (rizo deposiciones) liberados por las raíces de arroz se ha observado que promueven el

crecimiento y actividad microbiana en la rizósfera en comparación con el suelo desnudo (Butler et al., 2003) y durante la floración se ha reportado una mayor liberación de exudados radiculares respecto al resto de las etapas del ciclo de crecimiento (Aulakh et al., 2001), lo que explica que se observe un mayor potencial de oxidación en rizósfera que en suelo desnudo en dicha etapa.

Cabe mencionar, que otro factor a considerar es el efecto de los sistemas de rotación de arroz en las poblaciones metanogénicas ya que podría tener un efecto en la abundancia de las poblaciones metanótrofes dado que la concentración de metano disponible es un factor que afecta a esta comunidad (Mohanty et al., 2007). En estudios realizados en otros sistemas de rotación como arroz-maíz (Breidenbach et al., 2016) o arroz-soja (Liu et al., 2015) se observó una disminución de la abundancia de arqueas metanogénicas en suelo de arroz proveniente de las parcelas con rotación arroz-cultivo en secano frente a las parcelas con arroz continuo, así como una menor emisión de gas CH₄ por las primeras.

Al observar los resultados obtenidos para las variables fisicoquímicas de los suelos y su correlación con los parámetros microbiológicos, se constató que hay una alta correlación entre la actividad metanótropa potencial y el contenido de amonio, cuyos valores siguen una tendencia similar (Figura 10 y Tabla 4). Si bien se han obtenido resultados contradictorios por diversos autores en diferentes ensayos, varios han reportado un efecto estimulante de la fertilización nitrogenada sobre la oxidación de metano (Bodelier et al., 2000; Ferrando y Tarlera, 2009; Hu y Lu, 2015; Liu et al., 2016) por lo que este parámetro podría tener una incidencia en los resultados obtenidos. De forma de evaluar el efecto del amonio se realizó un ensayo, el cual se detalla en la sección 1.2.7 y cuyos resultados se discuten a continuación.

1.4.2 Efecto del agregado de amonio en la actividad metanótropa potencial aerobia de suelos rizosféricos de arroz

Las muestras de suelo y suelo rizosférico analizadas en esta tesis mostraron una correlación positiva entre el potencial de oxidación de metano y su contenido de amonio natural, sin embargo, el ensayo diseñado para evaluar esta relación mostró resultados dependientes de la concentración. Se observó un estímulo de la actividad frente al agregado de amonio al pasar del nivel bajo al medio de amonio (0,45 y 0,20 mM), pero el agregado de una concentración mayor (10 mM, nivel alto) no supuso un aumento significativo en la actividad de oxidación e incluso inhibió la actividad en las muestras en macollaje.

Este ensayo se llevó a cabo con suelos secados a temperatura ambiente a diferencia de la determinación del POM (sección 1.2.4), por lo que se compararon los resultados obtenidos en los dos casos. Ha sido utilizado suelo seco para la determinación de la actividad metanótrofa potencial en otros trabajos y se ha reportado que luego del secado de muestras de suelo de arroz a temperatura ambiente, el POM se recupera obteniéndose resultados comparables a las incubaciones con suelo fresco (Ho et al., 2016). Sin embargo, en dicho estudio si bien la actividad potencial no se vio afectada, la composición de la comunidad metanótrofa fue significativamente diferente luego del secado (Ho et al., 2016). En este trabajo los suelos secos presentaron una tendencia a mayores valores de potencial de oxidación de metano respecto a los mismos suelos frescos, lo que podría estar indicando un cambio en la composición o la actividad de la comunidad bacteriana luego de la desecación. Otro aspecto a considerar es que el contenido de amonio del suelo puede verse aumentado al secar un suelo (Tan, 2005; Ho et al., 2016), por lo que considerando que se observó un aumento de la oxidación de metano potencial de los suelos con el aumento en su contenido de amonio, se podría explicar el aumento en los valores obtenidos para los suelos secos como respuesta nuevamente a un mayor contenido de amonio en los mismos.

Si bien se ha demostrado que la actividad de oxidación de metano en suelo de arroz inundado es afectada por distintos parámetros ambientales como la fertilización nitrogenada, no hay un consenso por el momento en cuanto al efecto que esta tiene. Como ya se describió en la introducción, distintos estudios en campo y en microcosmos han constatado un efecto estimulante, inhibitorio o incluso ningún efecto del agregado de amonio o fertilización nitrogenada sobre la oxidación de CH_4 en suelos de arroz. Sin embargo, algunos autores han reportado un efecto del amonio dependiente de la concentración agregada, como observamos en este trabajo, por lo que la discusión se ha trasladado a la determinación del umbral a partir del cual se ve un efecto o el otro. Por ejemplo, Alam y Jia (2012) constataron la inhibición de la oxidación biológica de metano solo cuando la concentración de sulfato de amonio en el microcosmos fue de 200 ppm N ($1,4 \text{ mM NH}_4^+$), mientras que el agregado de 50 ppm N ($0,36 \text{ mM NH}_4^+$) no tuvo un efecto significativo.

La inhibición de la oxidación de metano por el agregado de amonio, como se detalló en la introducción de este capítulo, se puede deber a competencia por el sitio activo de la enzima metano monooxigenasa, además de la generación de intermediarios con efecto tóxico como el nitrito y la hidroxilamina a partir de la oxidación de amonio. En el caso de los arrozales, estos se caracterizan por concentraciones elevadas de metano (Cai et al., 2016), incluso en

la rizósfera, lo que disminuiría el efecto de la inhibición competitiva de la metano monooxigenasa por el amonio (Cai y Mosier, 2000). Asimismo, la asimilación de amonio y otros iones por la planta de arroz hace que compuestos tóxicos como el nitrito no se acumulen en el suelo y no queden disponibles para la comunidad metanótrofa (Eller y Frenzel, 2001), limitando así los posibles efectos nocivos de la fertilización nitrogenada. Además, en suelos con pH más bajos, se ha visto que el amonio ($pK_a = 9,25$) se encuentra mayormente en su forma protonada la cual no funciona como sustrato de la enzima monooxigenasa, por lo que no compete con el metano por el sitio activo (Yang et al., 2011). Por otro lado, el efecto estimulante del agregado de fertilización nitrogenada puede estar asociado a aliviar la necesidad de N cuando es un elemento limitante en el sistema.

Diversos autores han reportado que la relación entre la concentración de amonio y de metano disponible en condiciones de microcosmos parece tener un impacto importante en el efecto de inhibición o estimulación observado en la actividad metanótrofa. Según Cai y Mosier (2000) si la concentración de metano en ensayos de microcosmos es suficientemente alta el efecto inhibitorio se elimina en incubaciones posteriores mientras que si el metano se encuentra en bajas concentraciones el efecto inhibitorio se mantiene. Por tanto, en suelos de arroz el efecto inhibitorio causado por altas concentraciones de amonio podría ser temporal, y cuanto más alta es la concentración de metano inicial, más corto es el tiempo necesario para pasar de inhibición a estimulación de la oxidación. Asimismo, Yang et al (2011) sugieren que relaciones de $NH_4^+/CH_4 < 0,1$ no permitirían cubrir los requerimientos de N y por tanto la adición de NH_4^+ estimularía la oxidación de metano. En cambio, en ambientes con relaciones $> 0,1$ el amonio sería suficiente y por lo tanto el amonio agregado competiría con el metano o generaría intermediarios tóxicos que inhibirían su oxidación. El primer caso es lo que ocurre usualmente en los suelos de arroz inundado, donde la concentración de metano es alta y la relación NH_4^+/CH_4 es bastante menor al valor umbral establecido.

En este trabajo, las muestras en floración se encontraban en déficit de amonio, debido a que va disminuyendo su concentración a lo largo del ciclo de crecimiento de la planta, por lo tanto, el agregado de amonio tuvo un efecto estimulante en la actividad. Contrariamente, las muestras en macollaje presentaban contenidos de nitrógeno mayores por lo que la misma concentración de amonio pudo tener un efecto distinto observándose una inhibición posiblemente temporal. También se observó que el agregado de concentraciones altas de amonio causó un aumento de la fase lag en todos los casos. Un resultado análogo obtuvo Yang et al. (2011) en su ensayo en microcosmos, siendo mayor el retraso en el comienzo de

la actividad cuanto más alta era la concentración de amonio agregada. Diferente duración de la fase lag puede indicar que el estado fisiológico de los metanótrofos en la rizósfera es diferente (Eller y Frenzel, 2001). Los suelos rizosféricos en macollaje presentaron una fase lag más corta que los en floración. Esto sugiere que la comunidad de bacterias metanótrofas establecidas en macollaje se encuentran más adaptadas a concentraciones de amonio *in situ* más altas y por lo tanto podrían retomar su actividad en menor tiempo.

En un estudio en otro tipo de ecosistema, como ser sedimentos de lago de agua dulce, en el que utilizaron concentraciones de amonio similares a las empleadas en este trabajo, también se vio una estimulación de la actividad metanótrofa a concentraciones bajas de amonio (0,5 mM) mientras que concentraciones mayores de amonio, entre 2 y 20mM, mostraron un efecto inhibitorio en dicha actividad (Yang et al., 2020).

En relación a las rotaciones evaluadas en este ensayo, si bien mostraron la misma tendencia, el segundo año de la rotación arroz-pasturas mostró un mayor estímulo en su actividad. La oxidación de metano y su respuesta a la fertilización nitrogenada depende de la estructura de la comunidad presente y la biodiversidad de metanótrofos (Alam y Jia, 2012; Mohanty et al., 2006) por lo que también del uso previo del suelo (Aronson y Helliker, 2010). Como se mostró en esta tesis, las comunidades bacterianas metanótrofas establecidas en los suelos rizosféricos de rotaciones diferentes presentaron estructura distinta, lo que puede significar que respondan diferente a un mismo estímulo. Además, suelos con mayores períodos de aplicación de fertilizante mostraron una mayor inhibición de la oxidación de metano cuando se agrega nitrógeno (Aronson y Helliker, 2010). Esto podría explicar la tendencia a que los suelos de la rotación arroz continuo presenten POM más bajas al adicionar amonio al microcosmos, dado que esta rotación requiere una mayor cantidad de fertilizante nitrogenado anual (140 unidades de N frente a 86 aplicadas a la rotación arroz-pasturas).

El efecto del agregado de amonio en la oxidación biológica de metano va a depender entonces de las características del ecosistema, la concentración de metano presente, el amonio agregado y la relación entre ambos, así como de la comunidad microbiana establecida.

1.4.3 Comunidad microbiana de suelos rizosféricos de arroz de diferentes rotaciones arroceras

La secuenciación masiva del gen 16S ARNr de suelos rizosféricos de arroz provenientes de dos rotaciones contrastantes permitió comparar las comunidades bacterianas, y específicamente la comunidad metanótrofa, establecidas en estos sistemas y así contribuir al entendimiento del efecto de la intensificación en las mismas.

Los suelos rizosféricos de las rotaciones arroz continuo (R1) y arroz-pasturas (R41) presentaron comunidades bacterianas con riqueza (1091 ASV y 1014 ASV, respectivamente) y diversidad similares (índice de Shannon 6,16 y 5,91, respectivamente). Los índices de diversidad obtenidos fueron mayores a los reportados para rizósfera de arroz por otros autores (Breidebach et al., 2015).

Los phyla *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Acidobacteriota* y *Actinobacteriota* representaron más del 65% de la comunidad bacteriana total de la rizósfera de ambas rotaciones. Esto coincide con lo observado por Scavino et al. (2013) en suelo de arroz, previo a la inundación, de una rotación arroz-pasturas en el mismo sistema arrocerero, donde se identificaron como los phyla bacterianos predominantes *Firmicutes* (28–40%), *Proteobacteria* (20–28%) y *Acidobacteria* (16–18%). También se observó en dicho trabajo predominancia del orden *Rhodospirillales*, orden que aquí se encuentra presente solamente en la rotación arroz-pasturas. En ambos trabajos, a su vez, *Proteobacteria* se encontró mayormente representado por el orden *Rhizobiales* y *Firmicutes* por el orden *Bacillales*. Estos phyla fueron descriptos como predominantes durante la descomposición de rastrojo y residuos vegetales tanto en suelo y suelo rizosférico de arroz, como en raíz (Rui et al., 2009; Shrestha et al., 2011). *Firmicutes*, y especialmente el orden *Clostridiales*, es uno de los principales fermentadores de residuos vegetales en suelos de arroz y su capacidad de formar endosporas podría favorecer su supervivencia bajo condiciones de estrés como las establecidas en el cultivo de arroz y así explicar su predominancia (Rui et al., 2009).

Distintas prácticas agrícolas como la rotación con cultivos de secano o la introducción de variedades de arroz en secano (cultivo sin inundación) se ha visto que alteran la composición de las comunidades tanto metanótrofas como metanogénicas del suelo, teniendo como resultado cambios en las emisiones de gas metano (Breidenbach et al., 2017; Jiang et al., 2022). De acuerdo con Breidenbach et al. (2017) la comunidad bacteriana asociada a la raíz de arroz en rotaciones con un cultivo en secano es ligeramente diferente de la comunidad

establecida en arroz en rotación arroz continuo y corresponde a un punto medio entre la comunidad de arroz y la comunidad asociada a la raíz del otro cultivo en rotación. En este trabajo las comunidades microbianas presentes en los suelos rizosféricos de los dos sistemas de rotación arrocería no mostraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles taxonómicos más altos. Esto no condice con otro estudio en el que la estructura de la comunidad microbiana sufre cambios significativos al comparar una rotación de arroz continuo con otros sistemas de rotación arroz con cultivo en secano (Xuan et al., 2012). Sin embargo, Li et al. (2019b) reportó que las diferencias en las comunidades bacterianas de suelo y rizósfera de arroz se establecen en las poblaciones minoritarias, ya que estos miembros minoritarios o raros son más sensibles a cambios ambientales que los taxones más abundantes.

En el caso de la rotación arroz-pasturas los suelos rizosféricos presentaron una abundancia relativa del phylum *Actinobacteriota* del 15% mientras que en la rotación de arroz continuo la abundancia fue un poco menor, de 12%, con una abundancia de la clase *Actinobacteria* de 7% y 4% respectivamente. De acuerdo con los resultados obtenidos en un metaanálisis realizado por Trivedi et al. (2016) la respuesta más rápida a las prácticas de manejo del suelo está dada por un grupo de phyla entre los que se encuentran además de *Proteobacteria*, *Gemmatimonadota* y *Actinobacteriota*, los cuales presentan una mayor abundancia relativa en suelos naturales que en suelos agrícolas. *Actinobacteria* es un phylum de bacterias gram positivas, entre las que se encuentran bacterias aerobias acidófilas, lo que le conferiría ventaja en ambientes con pH bajos como estos suelos, y taxones con capacidad de formar esporas lo que le permite sobrevivir en condiciones adversas. Por otro lado, *Acidobacteria* también ha mostrado una correlación negativa con el pH del suelo (Dai et al., 2018), lo que podría contribuir a su mayor abundancia.

El phylum *Proteobacteria* juega un papel crucial en la oxidación de metano en suelo de arroz y por eso la estructura y abundancia de esta comunidad se ha estudiado en forma más exhaustiva. Este phylum comprendió el 21–22% de la comunidad bacteriana en ambas rotaciones en estudio. A nivel de clase para la rotación arroz-pasturas el 17% correspondió a *Alphaproteobacteria* y el 4% a *Gammaproteobacteria*, por el contrario, para la rotación arroz continuo las abundancias relativas de las clases de *Proteobacteria* fueron 16 y 6% respectivamente (ratio tipo I/ tipo II de 0,24 y 0,36 respectivamente). Esta mayor abundancia de *Alphaproteobacteria* frente a *Gammaproteobacteria* se ha observado en suelos de arroz en reiteradas ocasiones (Ho et al., 2016; Luke et al., 2014; Ma y Lu, 2011; Macalady et al.,

2002). En un suelo de arroz en rotación con trigo, Alam y Jia (2012) observaron una comunidad metanótrofa con predominancia de metanótrofos tipo II (ratio tipo I/ tipo II es de 0,75) mayormente relacionados a los géneros *Methylocystis* y *Methylosinus*. Si bien ambas clases de *Proteobacteria* se encuentran regularmente en suelo de arroz se ha reportado que los tipo II cobran mayor importancia durante el período de inundación cuando la disponibilidad de metano es alta, y los tipo I en suelo drenado (Henckel et al., 2000). Por otro lado, se ha observado un aumento en la abundancia de metanótrofos tipo II a lo largo del ciclo de crecimiento de la planta de arroz (Macalady et al., 2002), por lo que en suelo rizosférico de arroz en floración podría verse aumentado.

De las secuencias totales obtenidas a partir de la secuenciación de amplicones del gen 16S ARNr bacteriano el 1,1% correspondió a secuencias asignadas a metanótrofos conocidos en las muestras de la rotación de arroz continuo y el 0,35% en la rotación arroz-pasturas. Estos porcentajes son acordes a los encontrados en otros estudios en suelo de arroz, donde los metanótrofos constituyen menos del 0,5% (Jia et al., 2019), 1–2% (Macalady et al., 2002) o 0,25–3,27% de la comunidad microbiana total (Lee et al., 2015). La población de metanótrofos raramente constituye más del 1% de la comunidad total bacteriana (Eller y Frenzel, 2001), incluso al referirnos a la rizósfera que es un *hotspot* de oxidación de metano. Dentro de la comunidad metanótrofa se identificaron los géneros *Methylocystis*, *Methylocella*, *Methylobacter* y *Methylobacterium* en ambas rotaciones, y *Crenothrix* presente solo en la rotación de arroz continuo. En la rotación arroz-pasturas el género dominante fue *Methylocella*, género muy particular desde el punto de vista genético, morfológico y metabólico. Es un metanótrofo facultativo, por lo que es capaz de usar como fuente de energía compuestos de un solo carbono como metano y metanol, pero también compuestos más complejos como acetato, piruvato, succinato, malato y etanol (Farhan Ul Haque et al., 2020). Este grupo de bacterias no posee la enzima metano monooxigenasa particulada (pMMO; Theisen et al., 2005), presente en casi todas las bacterias metanótrofas, sino que posee únicamente la metano monooxigenasa soluble (sMMO; Dunfield et al., 2003). Sin embargo, se ha encontrado en suelos asociados a una gran diversidad de plantas (Rahman et al., 2011). Esto denota la relevancia de la secuenciación del gen 16S ARNr frente al gen *pmoA* de forma de poder detectar metanótrofos que no posean este gen, como es el caso de *Methylocella* y de esta forma tener un mejor acercamiento a la diversidad real de la comunidad bacteriana. Por otro lado, el género predominante en la rotación arroz continuo fue *Methylocystis*, un metanótrofo tipo II perteneciente a la clase *Alphaproteobacteria*, capaz

de fijar nitrógeno (Bowman, 2006) y que ha sido aislado de diversos ambientes como acuíferos subterráneos, turberas y humedales (Jung et al., 2020). La dominancia del género *Methylocystis* en la comunidad metanótrofa ya ha sido observada en todos los compartimentos de suelo de arroz (Breidenbach et al., 2017; Eller y Frenzel, 2001; Farhan Ul Haque et al., 2020; Vishwakarma y Dubey, 2010). En trabajos realizados por nuestro grupo en la misma estación experimental, se ha observado la presencia de *Methylocystis* en la interfase suelo-agua y la rizósfera de arroz (Ferrando y Tarlera, 2009), así como en la comunidad endófito en hoja de arroz (Ferrando, 2013). Al igual que *Methylocella*, *Methylocystis* es un género metanótrofo facultativo. Debido a su capacidad para metabolizar diversos compuestos carbonados además del metano, estos metanótrofos pueden presentar una ventaja competitiva en ambientes donde la producción de metano sea variable en el tiempo (Dedysh et al., 2005), por fluctuaciones en parámetros como temperatura y humedad, o en este caso por alternancia en las condiciones de inundación y secano, pudiendo utilizar acetato como fuente de carbono secundario en suelo de arroz (Leng et al., 2015). *Methylobacterium* es un metilótrofo aerobio miembro de la clase *Alphaproteobacteria*, con capacidad de fijar nitrógeno, que presenta especies metanótrofas y algunas especies son bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Kang et al., 2022). Este género presentó una tendencia a encontrarse en mayor abundancia en la rotación arroz-pasturas. Presente en el suelo rizosférico de ambas rotaciones se encontró el género *Methylobacter*, género metanótrofo obligado aerobio de la clase *Gammaproteobacteria*, con algunas especies capaces de formar cistos y gránulos de poli hidroxibutirato. Algunas poseen citocromos de alta afinidad permitiendo la oxidación de metano a concentraciones de oxígeno muy bajas (Guerrero-Cruz et al., 2021). Por último, se identificó en suelo de arroz continuo, *Crenothrix* una bacteria filamentosa oxidante de metano perteneciente a la clase *Gammaproteobacteria*, sin especies cultivadas, que contiene una enzima metano monooxigenasa inusual (Stoecker et al., 2006) lo que genera que los *primers* utilizados para relevar el gen *pmoA* no amplifiquen exitosamente el gen de este género y se generen discordancias en los resultados obtenidos (Shiau et al., 2018). Sin embargo, se ha reportado su presencia en suelo de arroz en otros trabajos (Luke et al., 2014; Shiau et al., 2018). Este género se ha visto que se adapta a condiciones anóxicas o de hipoxia y a fluctuaciones en las condiciones redox del suelo (Yang et al., 2022) y se ha encontrado como metanótrofo activo predominante en la columna de agua anóxica en lagos árticos (Cabrol et al., 2020). Además, se ha identificado como un potencial metanótrofo facultativo capaz de asimilar acetato y glucosa (Stoecker et al., 2006).

Las bacterias oxidantes de metano son controladas por diversos factores entre los que se encuentran sus sustratos principales metano y oxígeno, pero también el nitrógeno. La competencia por nitrógeno favorece a distintos tipos de metanótrofos según las condiciones (Bodelier et al., 2000; Noll et al., 2008). Según la bibliografía, los metanótrofos tipo I son favorecidos por concentraciones altas de nitrógeno por lo que pueden superar a los de tipo II en ambientes ricos en este nutriente (Noll et al., 2008). Por el contrario, el crecimiento de los de tipo II parece ser independiente de la disponibilidad de nitrógeno sugiriendo que se pueden apoyar en la fijación de nitrógeno (Zheng et al., 2014). Como se discutió previamente, la concentración de amonio en los suelos de esta etapa del ciclo es relativamente baja por lo que se podría estar favoreciendo a los oxidantes de metano de tipo II y en el caso de *Methylocystis* esta capacidad de fijar nitrógeno le otorgaría una ventaja frente al resto de las bacterias metanótrofas.

De acuerdo con Zhao et al. (2020), el pH del suelo es otra variable ambiental determinante en la composición de la comunidad metanótrofa en los suelos de arroz y determina que en suelos con un pH relativamente bajo (5,44–6,10) el metano sea consumido primordialmente por metanótrofos tipo II, mientras que en suelos con pH alto dominan los tipo I. En los suelos rizosféricos utilizados en este experimento el pH determinado es bajo (entre 4 y 5) por lo que este factor también podría estar incidiendo en la predominancia observada del género *Methylocystis* en la comunidad activa. A su vez, numerosas especies del género *Methylocella* han sido reportadas como acidófilas (Dunfield et al., 2003) y se ha observado mayor abundancia de este género en ambientes con pH bajos (Rahman et al., 2011). Hay que tener en cuenta que el pH puede estar teniendo efecto en otros parámetros como la disponibilidad de micronutrientes lo que puede ser crítico en la comunidad establecida (Knief et al., 2003).

Otra característica de los metanótrofos tipo II es la capacidad de formar cistos bajo condiciones de estrés, lo que les permite ser un gran reservorio de la comunidad metanótrofa para la siguiente temporada de arroz (Leng et al., 2015). Sin embargo, la detección del gen *pmoA* en suelo no implica que la bacteria se encuentre fisiológicamente activa, por lo que de esta forma no se puede saber cuáles géneros efectivamente están involucrados en la oxidación de metano en estos suelos rizosféricos de arroz.

A pesar de la conocida inespecificidad de los *primers* empleados para amplificar secuencias del dominio *Archaea*, se decidió realizar un análisis exploratorio de este grupo con base en los datos de secuenciación obtenidos, ya que se obtuvo una buena cobertura de su diversidad.

Si bien no es el objeto de estudio de esta tesis, la comunidad de arqueas metanogénicas está íntimamente relacionada con la comunidad metanótrofa en el contexto de las emisiones de metano por lo que aporta al entendimiento del funcionamiento del ecosistema.

Las arqueas metanogénicas son anaerobias estrictas, pero pueden sobrevivir en condiciones secas y óxicas en el cultivo de arroz (Asakawa, 2021) e incluso se ha observado mayor abundancia de arqueas en la rizósfera de arroz que en el suelo desnudo (Breidenbach et al., 2015). Distintos trabajos han mostrado que la abundancia y composición de la comunidad de arqueas metanogénicas en suelo de arroz exhibe una gran estabilidad (Liu et al., 2015), en algunos casos se ha mostrado incambiada durante el ciclo de cultivo independientemente de los periodos de inundación y secano o incluso en rotaciones con cultivos no inundados (Asakawa, 2021; Scavino et al., 2013; Watanabe et al., 2006). En otros estudios de la comunidad de arqueas metanogénicas en rotaciones arroceras, se observó que en rotaciones arroz-cultivo en secano la abundancia de metanogénicos disminuyó respecto a rotaciones de arroz continuo (Breidenbach et al., 2016; Liu et al., 2015). Incluso en un estudio realizado en el mismo sistema que este trabajo, se observó un aumento de metanogénicos al pasar de la rotación tradicional arroz-pasturas al arroz continuo (Pereira-Mora et al., 2022). Lo mismo se observó para estos suelos, a los que se les realizó cuantificación del gen *mcrA* (fuera del marco de esta tesis) obteniendo valores significativamente mayores en la rotación de arroz continuo (R1); además, en la secuenciación de amplicones dirigida al gen 16S ARNr bacteriano se identificó un mayor número de taxones asignados a arqueas en las muestras de dicha rotación respecto a la rotación arroz-pasturas (R41). De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, los miembros de la comunidad de arqueas detectados en el análisis de secuenciación dirigida al gen 16S ARNr de bacteria pertenecieron a los phyla *Halobacterota*, *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota* y *Thermoplasmatota*. Esta comunidad se diferencia marcadamente de la presente en la rizósfera de otros cultivos como maíz, soja o papa, la cual se encuentra usualmente dominada por el phylum *Thaumarchaeota* (Ding et al., 2019). Las arqueas metanogénicas observados en este trabajo se encontraron representadas por los géneros *Methanosarcina* (acetoclástico, hidrogenotrófico y metilótrofo), *Methanocella* (hidrogenotrófico), *Methanosaeta* (acetoclástico), *Methanospirillum* (hidrogenotrófico), *Methanobacterium* (hidrogenotrófico y metilótrofo) y *Methanomassiliicoccus* (metilótrofo), además de por el grupo Rice Cluster I (hidrogenotrófico) y el orden *Methanomicrobiales* (hidrogenotrófico). Estos grupos fueron encontrados en suelo de arroz previamente (Breidenbach et al., 2016; Wang et al., 2010) y

demuestran que en este sistema puede ocurrir tanto metanogénesis hidrogenotrófica (producción de metano por oxidación de hidrogeno, formiato o alcoholes simples) como acetoclástica (utilizan acetato como sustrato). Los resultados obtenidos coinciden con los observados por Pereira-Mora et al. (2022) quienes estudiaron el efecto de la intensificación en el cultivo de arroz sobre la comunidad metanogénica realizado en la misma unidad experimental encontrando una comunidad con estructura muy similar y con predominancia de metanógenos asignados a *Methanosarcina*, Rice Cluster I y *Methanobacterium*. Los géneros *Methanosarcina* y *Methanocella* se han encontrado presentes en condiciones de suelo seco, aerobio (Liu et al., 2015) y se ha observado que poseen genes que codifican para enzimas de detoxificación que les permiten sobrevivir a la exposición a oxígeno en suelo aerobio o en la rizósfera (Breidenbach et al., 2015), ya que los citocromos y hemo proteínas de las catalasas pueden defenderlos del oxígeno tóxico (Jiang et al., 2022). Las arqueas pertenecientes al Rice Cluster I también presentan estas enzimas (Conrad, 2007). *Methanosaeta* género presente solo en la rotación de arroz continuo, se ha encontrado que ve reducida su supervivencia en cultivos en secano ya que las condiciones aerobias pueden dañar a algunos géneros metanogénicos entre los que se incluye (Scavino et al., 2013) y se ha observado que la introducción de este tipo de cultivos en las rotaciones de arroz tiene resultados fatales sobre este género (Liu et al., 2015). *Methanospirillum* y *Candidatus Nitrosotalea* son los otros dos géneros presentes en la rotación de arroz continuo en forma exclusiva, siendo el primero un género metanógeno estrictamente anaerobio, fijador de N₂ y capaz de crecimiento autótrofo (Ferry y Boone, 2015) y el segundo un arquea aerobia autótrofa oxidante de amonio que crece óptimamente a pH bajos alrededor de 5,0 (Prosser y Nicol, 2016). Por otro lado, el género *Candidatus Nitrososphaera* se encontró exclusivamente en la rotación arroz-pasturas, estas son arqueas aerobias, autótrofas y oxidantes de amonio que precisan concentraciones de amonio en el ambiente menores a 3 mM (Kerou y Schleper, 2016) y con pH óptimos menores a 5,5 (Hetz y Horn, 2021), como es el caso de los suelos analizados en este trabajo.

En suma, a nivel rizosférico, las plantas de arroz provenientes de las rotaciones arroz continuo y arroz-pasturas presentan comunidades metanótroficas y de arqueas distintas, como ya se ha observado con otras rotaciones arroceras como arroz-maíz, arroz-trigo o arroz-colza (Breidenbach et al., 2016; Jiang et al., 2022).

Capítulo 2

***Stable Isotope Probing* para el estudio de la comunidad metanótrofa activa en rizósfera de arroz**

2.1 Introducción

Las bacterias metanótrofas son un grupo especializado de microorganismos que juegan un rol crucial en el ciclo del metano y más específicamente en la oxidación biológica del metano producido durante el cultivo de arroz bajo inundación. Por lo tanto, el estudio de esta comunidad ha sido de gran importancia para evaluar el impacto ambiental de este agroecosistema, el cual contribuye al 7–10% del metano de origen antropogénico (IPCC, 2021). Técnicas de identificación tradicionales como el enriquecimiento selectivo o aislamiento en cultivo puro han sido usados para estudiar la diversidad de metanótrofos en distintos ambientes (Kharitonov et al., 2021), aunque se restringen a la pequeña fracción de la comunidad microbiana que puede ser cultivada. Metodologías moleculares independientes del cultivo como PCR en tiempo real, DGGE, T-RFLP, microarray de ADN y métodos basados en secuenciación, permiten estudiar la composición y abundancia de estas comunidades empleando genes marcadores como el gen 16S ARNr o genes funcionales asociados a una capacidad metabólica en particular, como es el gen *pmoA* asociado a la metanotrofia. Esto adquiere mayor importancia en grupos de microorganismos que constituyen una fracción pequeña de la comunidad microbiana total presente en el ambiente, como es el caso de los metanótrofos. Según ha sido reportado, representan de 0,25 a 3,27% de la comunidad bacteriana total en suelo de arroz (Jia et al., 2019; Lee et al., 2015). Asimismo, existen diversas limitantes que han dificultado la identificación taxonómica de los metanótrofos que se encuentran activos consumiendo gas metano en estos ecosistemas complejos. A lo largo de los años se han desarrollado técnicas que permiten relacionar filogenia con las funciones ecosistémicas, como ser el marcado isotópico de biomoléculas (Boschker et al., 1998), la combinación de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) con microradioautografía (Lee et al., 1999), *array* de isótopos (Adamczyk et al., 2003) y *Stable Isotope Probing* (Radajewski et al., 2000). Estudios basados en ARN que hacen uso de la herramienta RT-PCR también permiten identificar microorganismos activos en el ambiente y han sido utilizados para el estudio de la comunidad metanótrofa activa (Cui et al., 2020; Esson et al., 2016; Reim et al., 2012). Estudiar la actividad transcripcional del gen funcional *pmoA* permite conocer, en la mayoría de los casos, la actividad de metanótrofos aerobios directamente.

La técnica *Stable Isotope Probing* (SIP) es una herramienta que permite establecer conexiones entre la estructura y la función de comunidades de microorganismos (Radajewski et al., 2000). Ésta se basa en la incorporación de sustratos específicos enriquecidos en un

isótopo estable con una abundancia natural baja (como ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O , ^2H), en biomarcadores celulares o la biomasa de microorganismos que utilizan dicho sustrato, mediante la incubación de la muestra en presencia del sustrato marcado. Esta incorporación produce un aumento de la masa y por lo tanto densidad del biomarcador celular permitiendo su separación física del material no marcado isotópicamente. Se hace seguimiento de la separación por determinación de la densidad y luego se analiza el material por métodos moleculares de ecología microbiana. Dependiendo del biomarcador celular utilizado también puede determinarse por técnicas como cromatografía de gases con combustión y espectrometría de masa de relación isotópica (GC-C-IRMS) el cual permite determinar y cuantificar el enriquecimiento isotópico (Chen y Murrell, 2011).

SIP es considerada una técnica robusta para identificar poblaciones microbianas que asimilan sustratos marcados de interés en comunidades ambientales complejas (Mooshammer et al., 2021). Sin embargo, puede presentar limitaciones, como el sesgo de enriquecimiento, es decir que no refleje el proceso metabólico natural del sustrato en el ambiente (Neufeld et al., 2007) y que los microorganismos estén activos solo en las condiciones particulares de incubación ensayadas. Otra dificultad es la alimentación cruzada que puede ocurrir cuando metabolitos marcados son liberados por un consumidor primario y asimilados por otros microorganismos marcando su biomasa, o si hay predación de estos consumidores primarios. La alimentación cruzada ocasiona la identificación errónea de organismos que, si bien no son directamente responsables del proceso en estudio, se conectan con otros que sí lo son, vía una red alimentaria microbiana o una cadena trófica (Mooshammer et al., 2021).

Existen diferentes variantes de la técnica según la biomolécula a analizar. El primer uso de isótopos estables fue descrito para marcar los ácidos grasos derivados de fosfolípidos de bacterias reductoras de sulfato (PLFA-SIP; Boschker et al., 1998), unos años después se utilizó un isótopo estable de carbono para marcar el ADN de bacterias metilótrofas en muestras ambientales y se utilizó por primera vez el término SIP (ADN-SIP; Radajewski et al., 2000). Luego se desarrollaron las técnicas dirigidas al ARN (ARN-SIP) y a proteínas. Todas estas variantes han sido utilizadas por diferentes grupos para el estudio de la comunidad metanótrofa en suelo (Bodelier et al., 2013; Dumont et al., 2011; Qiu et al., 2008; Shrestha et al., 2008; Zhang et al., 2020). La alta sensibilidad del PLFA-SIP permite utilizar menores tiempos y concentración de sustrato, pero para ARN-SIP y ADN-SIP la síntesis de ácidos nucleicos debe ser suficiente para la separación y detección de las moléculas

marcadas. El DNA-SIP es la variante menos sensible ya que, a diferencia de las otras, la replicación de ADN normalmente requiere división celular.

En la técnica ADN-SIP, compuestos que contengan carbono, nitrógeno u oxígeno marcados con un isótopo estable, son asimilados por la biomasa microbiana de una muestra ambiental. Estos isótopos estables van a incorporarse en el nuevo ADN sintetizado permitiendo la separación por centrifugación isopícnica en gradiente de CsCl de este ADN “pesado” del ADN “liviano” no marcado, correspondiente a organismos que no asimilaron el compuesto. Los primeros experimentos se basaban en la visualización bajo luz UV y la separación con jeringa del ADN marcado del gradiente de CsCl con bromuro de etidio. En 2004, Lueders et al., desarrollaron un nuevo método para la separación del ADN de interés, que consistía en la recolección de ADN a lo largo del gradiente de densidad separándolo en fracciones, para luego evaluar la distribución de ADN de la comunidad microbiana total en el mismo. El posterior análisis molecular de los ácidos nucleicos marcados provee información funcional y filogenética sobre los microorganismos responsables del metabolismo del sustrato de interés (Neufeld et al., 2007). Esto permite caracterizar la población microbiana activa sin conocimiento previo de cuales organismos estarán involucrados y sin la necesidad de aislarlos en cultivo, así como identificar nuevas capacidades metabólicas en bacterias presentes en el ambiente.

Esta técnica se ha utilizado en numerosos estudios ecológicos y ha demostrado ser efectiva en el estudio de la actividad metabólica de metanótrofos en distintos ambientes. Se ha implementado en muestras de suelo de bosque (Radajewski et al., 2000), sedimentos de lagos (Dumont et al., 2011; Esson et al., 2016; Yang et al., 2022), sedimentos marinos (Paul et al., 2017), humedales (Deng et al., 2016) y suelos de uso agrícola como en arrozales (Sultana et al., 2019) permitiendo identificar metanótrofos activos. El ADN-SIP también se ha combinado con metagenómica para vincular actividad metabólica *in situ* y composición genómica (Coyotzi et al., 2016; Dumont y Murrell, 2005; Ma et al., 2021).

Las comunidades metanótroficas establecidas en ambientes dinámicos como el cultivo de arroz son resultado de la adaptación ecológica a prácticas de manejo agrícola y evolución (Shiau et al., 2018). Por lo tanto, el estudio del efecto de estos cambios ha sido de gran interés ecológico. Esta técnica ha sido utilizada para estudiar la respuesta de la comunidad metanótrofa activa ante variaciones en parámetros fisicoquímicos como la temperatura (Zhang et al., 2020) o el pH del suelo (Zhao et al., 2020), así como frente a prácticas de

manejo del suelo, entre ellas el pastoreo (Li et al., 2020) y el uso de fertilizantes nitrogenados, como la adición de urea en suelos de arroz, mostrando la estimulación de metanótrofos tipo I (Noll et al., 2008). En este trabajo se busca estudiar la comunidad metanótrofa que se encuentra activa en contextos de intensificación del uso de suelo.

En este capítulo se presenta la puesta a punto de la técnica *Stable Isotope Probing* dirigida al ADN para el estudio en el laboratorio de la comunidad de oxidantes de metano activa y la aplicación de esta técnica para el estudio de este grupo microbiano en suelo rizosférico de arroz proveniente de rotaciones arroceras contrastantes respecto a la intensificación agrícola.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Experimento en microcosmos de incubación de suelo rizosférico con metano marcado ($^{13}\text{CH}_4$)

Para la técnica SIP se seleccionaron los suelos rizosféricos correspondientes a la rotación intensiva de arroz continuo (R1) y al arroz de primer año de la rotación tradicional arroz-pasturas (R41), del muestreo correspondiente a la etapa de floración (110 DAS). Se utilizó un pool de los suelos de los bloques I y II de cada tratamiento.

Las incubaciones para la técnica fueron realizadas en microcosmos. Cada microcosmos fue construido agregando 5 g en peso seco de suelo rizosférico fresco en viales estériles de 115 mL y agua destilada estéril hasta completar los 20 mL. Los viales se preincubaron durante 72 horas en condiciones aerobias y con agitación a 150 rpm en shaker orbital SHK2000 Barnstead. Luego de transcurrido este tiempo los viales se cerraron con tapón de butilo y se precintaron. Se les inyectó un volumen correspondiente a 7% (v/v) de metano marcado con un isótopo estable (99% ^{13}C ; Sigma-Aldrich, cat. no. 490229-1L), con jeringa y válvula *gas-tight*. Se realizaron además incubaciones de todas las muestras con metano sin marcar ($^{12}\text{CH}_4$ 99,995%; AGA) en la misma concentración como control.

Las muestras correspondientes a las dos rotaciones en estudio (R1 y R41) fueron incubadas con metano marcado y sin marcar, con 4 réplicas para cada tratamiento (2 rotaciones x 2 tratamientos x 4 réplicas = 16 microcosmos) a 30°C con agitación en shaker orbital a 150 rpm y en oscuridad. En este experimento de incubación en el tiempo (*time course incubation*) se realizó un seguimiento diario del consumo de metano, mediante medidas de la

concentración del gas en la fase gaseosa del vial (0,5 mL) en cromatógrafo de gases GC-2014 (Shimadzu Scientific) con columna Porapak Q y detector de ionización de llama (GC-FID). El gas *carrier* utilizado fue N₂ de alta pureza (30 mL/min), la temperatura de la columna 55°C y la temperatura del detector 140°C. Una vez verificado el consumo del metano agregado se realizó una nueva alimentación de sustrato a los viales con jeringa y válvula *gas-tight*. Esto se realizó dos veces de forma de asegurar una incorporación de metano que permitiera el análisis posterior, del orden de 100 μ moles de acuerdo con Chen y Murrell (2011). Se verificó, además, el nivel de oxígeno presente durante el experimento mediante GC-TCD (se detalla en la sección 1.2.4) en momentos puntuales, para asegurarnos que no fuera limitante para la oxidación de metano.

Se sacrificaron dos réplicas por cada rotación y tratamiento a dos tiempos diferentes, a los 9 días y a los 14 días de incubación. La suspensión de suelo de cada microcosmos se centrifugó y los *pellets* fueron almacenados a -70°C para su posterior análisis.

2.2.2 Extracción de ADN

Se extrajo el ADN total a partir de 0,25 gramos de suelo (*pellet*) de cada microcosmos utilizando el kit comercial DNeasy PowerSoil Pro de Qiagen, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN obtenido se determinó utilizando el Qubit™ dsDNA HS Assay Kit con el fluorómetro Qubit® Invitrogen™, y la integridad de ese ADN se verificó en gel de agarosa. Las muestras de ADN se almacenaron a -20 °C.

2.2.3 Optimización de la ultra centrifugación y fraccionamiento del gradiente de CsCl

La optimización de la técnica ADN-SIP se realizó en base al protocolo descrito por Neufeld et al. (2007b), evaluando distintos parámetros del procedimiento según se detalla a continuación.

Para lograr la separación del ADN marcado del no marcado se realizó centrifugación isopícnica del ADN total extraído de cada microcosmos, que genera como resultado un gradiente de densidad el cual se puede fraccionar. Para la etapa de ultra centrifugación se mezcló el ADN con el buffer gradiente GB (100 mM Tris-HCl; 100 mM KCl; 1,0 mM EDTA, pH 8,0) y con la solución stock de CsCl 7,163 M (Sigma-Aldrich, C4036; $\geq 98\%$),

para obtener una densidad final de la mezcla de 1,725 g/mL. Durante la optimización se probaron dos cantidades diferentes de ADN de partida 1 y 2 μg . La mezcla se agregó lentamente a un tubo de ultracentrífuga de 8 mL de volumen con jeringa y aguja estériles. Luego de sellado el tubo, se ultracentrifugó a 177.000 xg por 40 horas a 20°C en micro ultracentrífuga Sorvall MX 150+ con rotor de ángulo fijo S80-AT3-2014 a vacío para generar un gradiente de cloruro de cesio.

El fraccionamiento del gradiente obtenido en el tubo se realizó mediante el uso de una bomba peristáltica de micro volúmenes Gilson Minipuls 3, con la que se bombeó agua destilada estéril coloreada con cristal violeta al sistema a una velocidad aproximada de 680 $\mu\text{L}/\text{min}$, desde la sección superior del tubo, permitiendo eluir de forma controlada su contenido y recuperar fracciones de diferentes densidades (Figura 18). En esta etapa se evaluaron como variables el flujo de elución y el volumen recogido en las fracciones, dado por la velocidad de la bomba, el calibre de los orificios de entrada y de salida de líquido del tubo, y el tiempo de recogida de cada fracción. De las fracciones obtenidas se tomó una alícuota de 20 μL para medida del índice de refracción y se recuperó el ADN del resto del volumen.



FIGURA 18. Fraccionamiento del gradiente de CsCl mediante bombeo de agua coloreada.

El índice de refracción de cada fracción obtenida se midió con un refractómetro de ABBE Boeco digital y luego se convirtió a valor de densidad, mediante la curva de calibración realizada previamente que establece una relación lineal entre el índice de refracción y la densidad de las soluciones de CsCl. Para construir la curva se prepararon soluciones de

CsCl/buffer GB con densidades en el rango de 1,650–1,850 g/mL a las cuales se les midió el índice de refracción con corrección de temperatura (nD-TC) con el refractómetro y se les determinó la densidad por peso de un volumen fijo en balanza analítica (por triplicado). En la primera prueba de fraccionamiento realizada se determinó la densidad de las distintas fracciones tanto por medida del índice de refracción y conversión con la curva estándar como también mediante gravimetría, para comparar ambos métodos. Se evaluó, de esta forma, la formación del gradiente de CsCl durante la ultra centrifugación y la posibilidad de detectar las diferencias de densidad necesarias para separar el ADN marcado del no marcado mediante medidas de índice de refracción.

El ADN obtenido en cada fracción se recuperó mediante precipitación con PEG (polietilenglicol 6000) y glicógeno (Invitrogen, 5 mg/mL) como *carrier* de precipitación, se purificó con etanol 70% y se disolvió en 30 µL de agua estéril para posteriores análisis. La cuantificación del ADN total de cada fracción se realizó con el Qubit™ dsDNA HS Assay Kit.

2.2.4 Abundancia del gen *pmoA* en las fracciones obtenidas

El seguimiento de la técnica se realizó mediante la determinación de la densidad de las distintas fracciones obtenidas en el gradiente y la cuantificación del ADN total de las mismas, según se describe en la sección 2.2.3, además de la cuantificación de un gen marcador específico de la comunidad objetivo. Para ello, se realizó PCR cuantitativa dirigida al gen marcador funcional *pmoA* de las fracciones en las que se obtuvo ADN, lo que permitió determinar el crecimiento y la eficiencia de incorporación de ¹³C en el ADN genómico de la comunidad metanótrofa. Los *primers* y condiciones utilizadas en la qPCR fueron los mismos que los detallados en la sección 1.2.6. Las reacciones fueron realizadas en una mezcla de 10 µL conteniendo 5 µL de la mezcla de reacción comercial Rotor Gene SYBR Green PCR Kit® (QIAGEN), 2µL de cada *primer* (1µM) y 1µL de ADN molde. Se utilizó el termociclador Rotor Gene® para las determinaciones y se realizaron duplicados técnicos de cada muestra. Para estas determinaciones se utilizó la herramienta de importación de curvas en el Rotor-Gene Q Series Software. Se realizó curva de *melting* en todas las corridas (muestras y estándar) para verificar la especificidad de la cuantificación, al observarse un único pico de temperatura de *melting* o fusión en cada caso se confirmó la ausencia de

productos no específicos o dímeros de *primers*. La eficiencia de la amplificación al importar la curva fue de 94% obtenida con un R^2 de 0,998.

Para evaluar la distribución de las copias del gen *pmoA* a lo largo del gradiente de densidad y el enriquecimiento de las distintas fracciones en bacterias metanótrofas se realizó una normalización de las copias del gen *pmoA* de cada fracción sobre el total de copias del gen a lo largo del gradiente (todo el ADN de partida), a lo que le llamaremos abundancia relativa del gen *pmoA* en este trabajo.

2.2.5 Secuenciación masiva de genes 16S ARNr

Las comunidades microbianas enriquecidas en las fracciones liviana (^{12}C -ADN) y pesada (^{13}C -ADN) de los microcosmos incubados con metano marcado y los microcosmos control fueron caracterizadas por secuenciación de amplicones del gen 16S ARNr, para las dos rotaciones en estudio por duplicado (8 muestras por rotación). Las fracciones a secuenciar se seleccionaron de acuerdo a la abundancia relativa del gen *pmoA* obtenida por qPCR, la concentración de ADN y las densidades de cada fracción, teniendo en cuenta que según Deng et al. (2018) la fracción liviana se espera encontrar en un rango de densidades de 1,66–1,73 g/mL y la fracción pesada en densidades mayores (1,73–1,80 g/mL). En el desarrollo de esta tesis las diferentes muestras secuenciadas se nombrarán como se detalla en la Tabla 5 a continuación, con tres términos separados por guión que refieren respectivamente a la incubación (metano marcado o sin marcar), la fracción (pesada o liviana) y la rotación (R1: arroz continuo o R41: arroz-pasturas), y por último el número de réplica (1 y 2).

TABLA 5. Código utilizado para las distintas muestras secuenciadas. Se muestra como ejemplo solo las fracciones obtenidas para el suelo rizosférico de la rotación arroz continuo (R1) por duplicado. En el caso de la rotación arroz-pasturas el código de la muestra es el mismo en cada caso sustituyendo R1 por R41.

Código	Incubación	Fracción	Rotación	Réplica
12_H_R1.1	$^{12}\text{CH}_4$	Pesada (H)	R1	1
12_H_R1.2	$^{12}\text{CH}_4$	Pesada (H)	R1	2
12_L_R1.1	$^{12}\text{CH}_4$	Liviana (L)	R1	1
12_L_R1.2	$^{12}\text{CH}_4$	Liviana (L)	R1	2
13_H_R1.1	$^{13}\text{CH}_4$	Pesada (H)	R1	1
13_H_R1.2	$^{13}\text{CH}_4$	Pesada (H)	R1	2
13_L_R1.1	$^{13}\text{CH}_4$	Liviana (L)	R1	1
13_L_R1.2	$^{13}\text{CH}_4$	Liviana (L)	R1	2

En el caso de las fracciones pesadas de la incubación con metano marcado, correspondiente a la comunidad activa, la concentración de ADN recuperada era muy baja para la preparación de la biblioteca de secuenciación por lo que se realizó un paso previo de concentración del ADN, para esto se utilizaron filtros Microcon® 100 DNA fast flow centrifugal filter de Merck. Junto con las fracciones de ADN obtenidas por la técnica SIP, se enviaron a secuenciar muestras de ADN de suelo rizosférico original, sin incubar, correspondientes a las dos rotaciones seleccionadas para esta técnica, como fue descripto en el Capítulo 1.

Se realizó la secuenciación masiva de amplicones dirigida a la región V4 del gen 16S ARNr de *Bacteria* (primers 515F y 806R; Caporaso et al., 2011) utilizando la tecnología Illumina MiSeq (secuencias *paired-end*, 250 pb), en el servicio de secuenciación MR DNA Molecular Reserch Laboratory. El procesamiento de los datos de secuenciación MiSeq se llevó a cabo utilizando el software R y el paquete de código libre DADA2, como se detalló en la sección 1.2.8 de esta tesis.

Para estudiar la diversidad alfa de las distintas muestras, se calcularon diferentes índices de diversidad como ser la riqueza observada, el índice de Shannon-Weaver, el índice Chao1 y el índice de equitatividad de Pielou. La diversidad beta de las comunidades de los distintos tratamientos se analizó mediante un estudio de coordenadas principales (PCoA) con medida de distancia de Bray Curtis. La estimación de los índices de diversidad alfa y la construcción de los gráficos de diversidad beta se realizó mediante el software R Studio, utilizando los paquetes *phyloseq* (1.40.0) y *ggplot2* (3.3.6).

Se realizaron análisis de abundancias diferenciales para comparar estadísticamente la abundancia de taxones entre dos condiciones. Los análisis de abundancias diferenciales se realizaron también en el software R Studio utilizando el paquete *DESeq2* (1.36.0), a partir de las secuencias sin normalizar. Se construyó un diagrama de Venn, con el software libre EVenn, para observar la distribución de las ASV de las comunidades bacterianas activas obtenidas por la técnica SIP entre las dos rotaciones (R1 y R41).

De forma de mostrar la distribución de los géneros metanótrofos en la comunidad original y la comunidad activa de suelo rizosférico de las rotaciones en estudio, se realizó un *heatmap* basado en los valores de abundancia relativa transformados con raíz cuadrada y promediados los duplicados biológicos. Se construyó usando el paquete *ampvis2* (2.7.32) en el software R Studio.

2.2.6 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos de este capítulo fueron realizados utilizando el software R Studio (Versión 4.1.3). Para la comparación tanto de los valores de diversidad alfa de las distintas muestras, como de la abundancia relativa de grupos taxonómicos entre tratamientos, se realizaron test ANOVA de una vía y Kruskal-Wallis con un alfa de 0,05. En los casos en los que se obtuvo una diferencia significativa se realizó el test de Tukey. Para la comparación de la estructura de las comunidades obtenidas en los distintos tratamientos se realizaron análisis de varianza multivariado permutacional (PERMANOVA) y en los casos en los que las varianzas no mostraron ser homogéneas se utilizaron test estadísticos multivariados no paramétricos como el análisis de similitud ANOSIM.

2.3 Resultados

2.3.1 Experimento en microcosmos de incubación de suelo rizosférico con metano marcado ($^{13}\text{CH}_4$)

La primera etapa de la técnica SIP consiste en incubar la muestra con un sustrato marcado con un isótopo estable, que pueda ser metabolizado por la comunidad objeto de estudio, por lo que en este caso se utilizó gas metano enriquecido en ^{13}C . Se realizaron dos incubaciones, una con metano marcado con ^{13}C y otra con metano sin marcar realizando un total de tres alimentaciones sucesivas, al inicio de la incubación, a los 5 y a los 9 días (Figura 19). Se sacrificaron la mitad de las incubaciones (duplicado de cada condición) a los 9 días de incubación cuando alcanzaron una incorporación promedio de entre 74 y 89 μmoles de metano por gramo de suelo. El resto de los microcosmos incorporaron entre 86 y 110 μmoles de metano hasta los 14 días de incubación cuando fueron sacrificados. La incorporación alcanzada en los dos casos se encuentra en el rango 5–500 μmol de ^{13}C por gramo de suelo dentro del cual la biomasa de suelos puede ser marcada en forma suficiente según Neufeld et al. (2007b). No se observó una diferencia evidente en los perfiles de consumo de metano entre los suelos incubados con metano marcado y los incubados con metano sin marcar. Para los análisis posteriores se utilizaron las muestras de 9 días de incubación de forma de minimizar la influencia de la alimentación cruzada en los resultados, en caso de que la incorporación del sustrato marcado no hubiese sido suficiente se habría realizado el procedimiento utilizando las muestras con más tiempo de incubación.

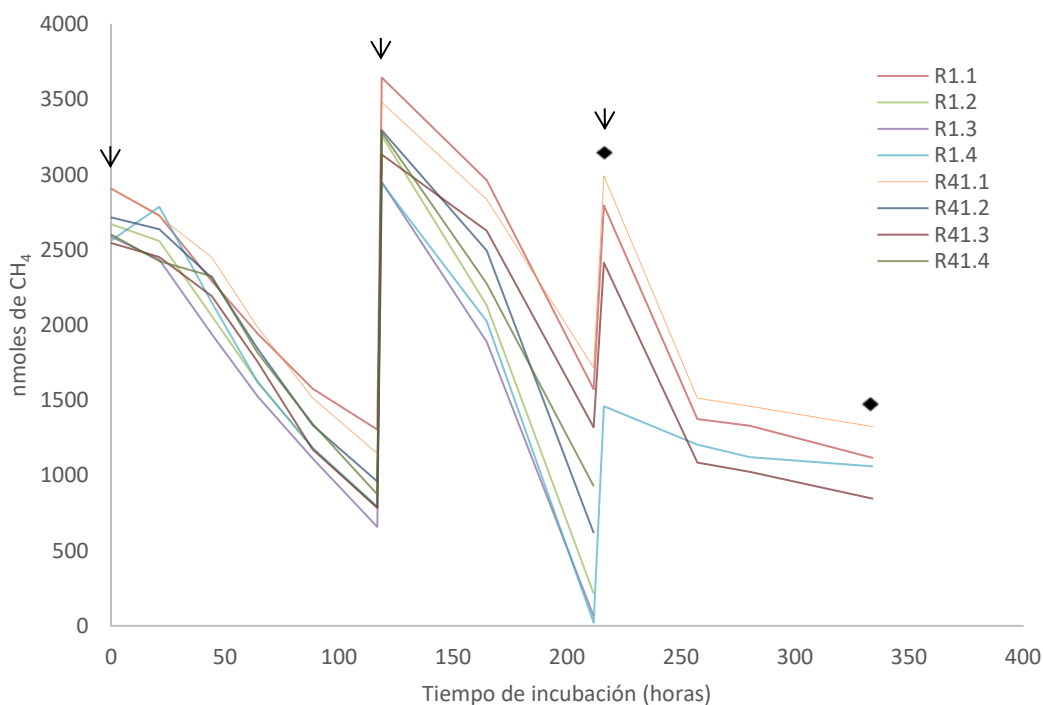


FIGURA 19. Consumo de metano de los suelos en microcosmos a lo largo del tiempo de incubación medido por GC-FID. Se indican los nanomoles de metano en el espacio gaseoso del vial en función del tiempo, de los cuatro microcosmos con rizósfera de arroz de la rotación arroz continuo (R1) y cuatro de la rotación arroz-pasturas (R41). Se numeran las réplicas del 1 al 4. Las flechas indican las alimentaciones con metano marcado y sin marcar, los rombos indican los muestreos destructivos o sacrificios de los microcosmos.

2.3.2 Optimización de la ultra centrifugación y fraccionamiento del gradiente de CsCl

Se evaluaron los parámetros detallados en la sección 2.2.3, cuyos resultados se presentan a continuación.

Concentración de ADN de partida

En relación a la concentración de ADN de partida, se utilizó 1 µg de acuerdo a lo sugerido por bibliografía (Neufeld et al., 2007b) pero se recuperó una muy baja concentración que no permitió continuar con los análisis posteriores. Se descartó la presencia de contaminación con DNAasas en los reactivos que estuvieran afectando el resultado. Para el resto de las corridas se partió de una mayor cantidad de ADN (2 µg). En esta prueba se aumentó también la concentración de glicógeno utilizado para la precipitación del ADN, de 20 µg (según establece el protocolo) a 25 µg.

Condiciones de elución del gradiente

Durante la optimización nos enfrentamos con la dificultad de lograr separar las fracciones pesadas (conteniendo el ^{13}C -ADN) de las livianas (con ^{12}C -ADN). En las primeras pruebas de fraccionamiento significó un problema la generación de un aumento de presión en el sistema dado por el similar calibre de los orificios de entrada y de salida de líquido del tubo de centrífuga, lo que afectó el flujo de elución y no permitió una correcta separación de las fracciones. Es importante controlar el calibre de los orificios que se realizan al tubo, de forma de lograr una elución controlada. En este caso resultó óptimo el uso de la aguja 24Gx1'' para el orificio de entrada y la aguja 20Gx1 1/2'' para el orificio de la base del tubo. Con estas medidas se logró un flujo constante y fracciones de volúmenes similares (aprox. 350 μL).

Evaluación de la formación del gradiente de CsCl

La determinación de la densidad tanto de la solución stock de CsCl, como de las soluciones a ultra centrifugar y de las diferentes fracciones obtenidas, es un componente importante del protocolo de la técnica SIP. La densidad de las fracciones obtenidas se puede conocer mediante determinación de la masa de volúmenes fijos o mediante medida del índice de refracción con el uso de un refractómetro, como se describió en la sección 2.2.3, para lo cual se construyó la curva de calibración necesaria (Figura A7, Apéndice VI). A partir de la prueba realizada, en la que se determinó la densidad de las fracciones de un mismo tubo por ambos métodos, se pudo constatar que las técnicas se correlacionaron bien y que ambas permitieron ver la formación del gradiente, pudiendo usarse cualquiera de las dos alternativas (Figura A8, Apéndice VI). Se decidió seguir trabajando con los índices de refracción y hacer el seguimiento del procedimiento mediante esta determinación, por su mayor simplicidad y rapidez.

La etapa de ultra centrifugación resultó ser exitosa ya que se obtuvo el gradiente en cloruro de cesio deseado (rango de densidad esperado entre 1,690–1,760 g/mL según Neufeld et al. 2007b), que se evidenció en el gradiente de densidades obtenido para las distintas fracciones recogidas desde 1,64 a 1,78 g/mL (Figura 20a). Este hecho demuestra que el rotor de ángulo fijo empleado se puede utilizar exitosamente para esta técnica, a pesar de que el protocolo que se tomó como referencia fue desarrollado para un rotor vertical (VTi 65.2, Beckman) y que las condiciones de centrifugación fueron optimizadas para el mismo.

Mediante cuantificación de ADN de las fracciones obtenidas se pudo constatar que éste se encuentra en cantidades detectables en las fracciones con densidades entre 1,69–1,72 g/mL, correspondiente a la fracción liviana (^{12}C), y entre las densidades 1,72–1,80 g/mL, correspondiente a la fracción pesada (^{13}C ; Figura 20b), de acuerdo a lo reportado en bibliografía (Lueders et al., 2004; Deng et al., 2018).

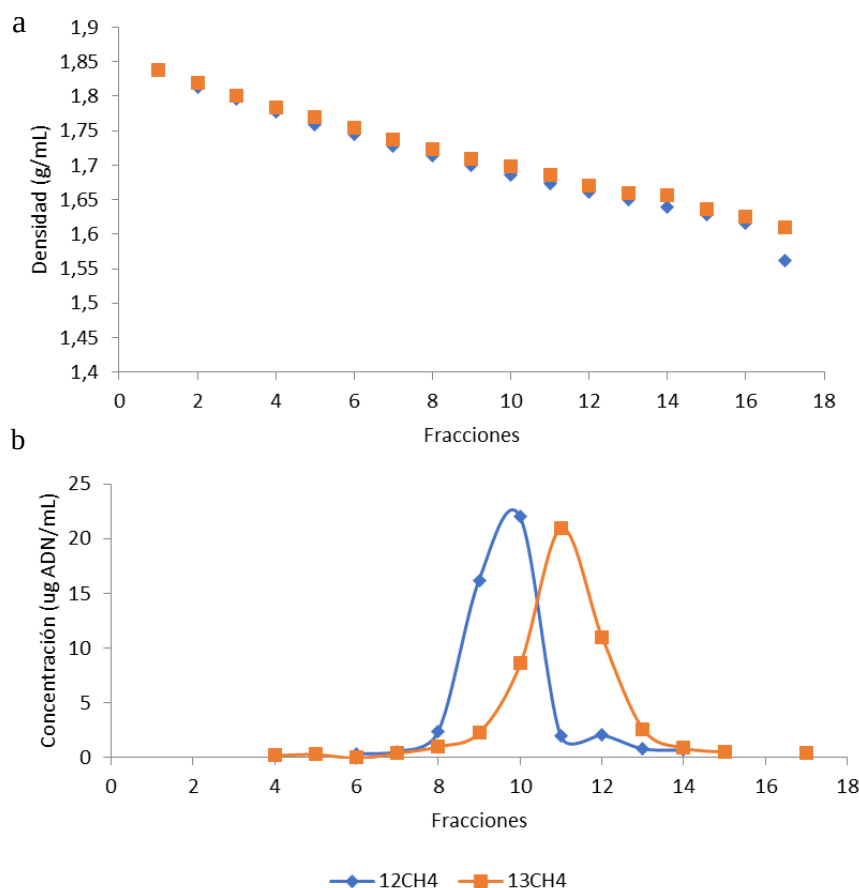


FIGURA 20. Gradiente de densidad (a) y concentración de ADN (b) de las distintas fracciones obtenidas.

Condiciones del experimento de *Stable Isotope Probing* (SIP) optimizado para estudio de metanótrofas aerobias activas en rizósfera de arroz

Como resultado de esta optimización se obtuvieron condiciones óptimas para las variables evaluadas que permitieron la separación de las fracciones de ADN pesado y liviano. En este caso, se trabajó con los microcosmos con menor tiempo de incubación (9 días), se realizó una centrifugación a 177.000 xg por 40 horas con 2 µg de ADN de partida y en el fraccionamiento se recogieron las fracciones cada 30 segundos a flujo constante. Con esta metodología se obtuvieron entre 18 y 20 fracciones de aproximadamente 350 µL.

2.3.3 Abundancia del gen *pmoA* en las fracciones obtenidas

Para evaluar la técnica y el enriquecimiento de metanótrofos en las fracciones pesadas obtenidas mediante la misma, se hizo PCR cuantitativa del gen marcador funcional *pmoA* de las distintas fracciones. En los tratamientos incubados con $^{13}\text{CH}_4$ se observó un pico de abundancia relativa del gen *pmoA* hacia las fracciones con densidades mayores (fracciones 7, 8 y/o 9), correspondientes al ADN pesado (Figura 21). El aumento en la abundancia relativa de dicho gen comparado con las fracciones de ADN de igual densidad en las muestras de la incubación control, indicó una exitosa incorporación de ^{13}C en el ADN de la microbiota metabólicamente involucrada en la oxidación de metano, así como un exitoso enriquecimiento y separación por ultra centrifugación. Mientras tanto, para el tratamiento control con $^{12}\text{CH}_4$ el pico de número de copias del gen fue observado únicamente en las fracciones con menor densidad (de la 10 en adelante), correspondientes al ADN liviano.

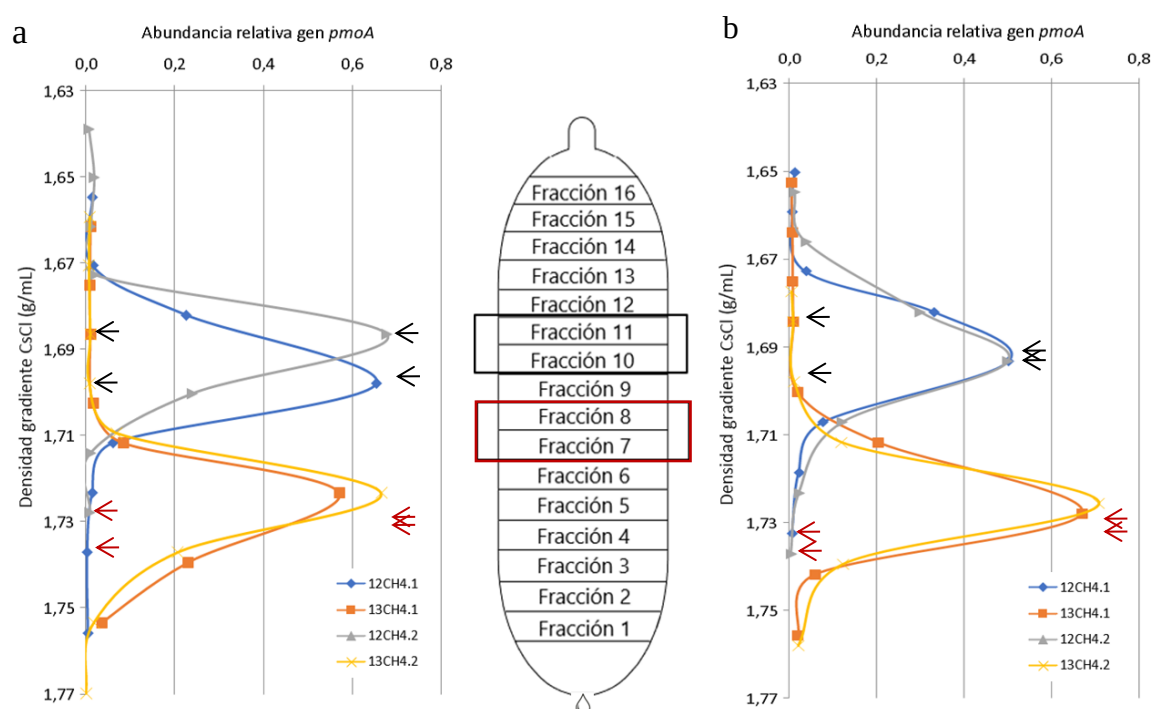


FIGURA 21. Abundancia relativa del gen *pmoA* en las fracciones a lo largo del gradiente de densidades de las incubaciones con $^{13}\text{CH}_4$ (en tonos naranja el duplicado) y las incubaciones control con $^{12}\text{CH}_4$ (en gris y azul el duplicado). Se muestran los resultados obtenidos para los suelos rizosféricos de la rotación de arroz continuo, R1 (a) y la rotación arroz-pasturas, R41 (b). Las flechas indican las fracciones (o el pool de fracciones) seleccionadas para su secuenciación, en negro las fracciones livianas (tanto para la incubación con $^{13}\text{CH}_4$ por duplicado, como para la incubación con $^{12}\text{CH}_4$ por duplicado) y en rojo las pesadas, también para ambas incubaciones y por duplicado.

De acuerdo a los resultados de la PCR cuantitativa se eligieron las fracciones 7 y 8 (con densidades entre 1,72–1,74 g/mL) y se combinaron para representar la fracción de ADN pesado en la incubación con $^{13}\text{CH}_4$, y la fracción 10 u 11 dependiendo de la muestra (con densidades entre 1,69–1,70 g/mL) correspondiente a la fracción de ADN liviano en la incubación con $^{12}\text{CH}_4$, fracciones que presentaron alto número de copias del gen *pmoA*. Esto se realizó para cada duplicado. Además, a partir de estos resultados y teniendo en cuenta la concentración de ADN y la densidad de las fracciones, se seleccionaron las correspondientes a la fracción liviana y pesada de los tratamientos con $^{13}\text{CH}_4$ y $^{12}\text{CH}_4$, respectivamente, para su análisis por secuenciación y comparación con las fracciones de interés.

2.3.4 Evaluación de la optimización de la técnica SIP mediante secuenciación masiva dirigida al gen 16S ARNr

La estructura de la comunidad de bacterias asociadas a las distintas fracciones obtenidas en la técnica SIP fue determinada por secuenciación masiva dirigida al gen ARNr 16S del dominio *Bacteria*. Fueron secuenciadas las fracciones pesada y liviana de cada microcosmo incubado con $^{13}\text{CH}_4$ (denominadas 13-H y 13-L en las figuras, respectivamente) así como las fracciones pesada y liviana de las incubaciones control con $^{12}\text{CH}_4$ (12-H y 12-L en las figuras, respectivamente).

La profundidad de secuenciación de los datos crudos obtenidos por tecnología Illumina Miseq se detallan en la Tabla A6 del Apéndice VII, así como el número de lecturas obtenido para cada muestra luego de las distintas etapas del procesamiento de los datos. A partir de las 20 muestras se obtuvieron 1209408 lecturas de alta calidad con una longitud promedio de 252 pb en la región V4 del gen 16S ARNr. De estas lecturas se generaron 3331 ASV de las cuales 3282 pertenecían al dominio *Bacteria*. Aquellas ASV no asignadas a dicho dominio fueron eliminadas, así como las secuencias correspondientes a mitocondria y cloroplasto y las que no se pudieron asignar a ningún phylum. Las ASV obtenidas se filtraron nuevamente eliminando aquellas que se encontraban representadas por menos de 3 lecturas en el set de datos y que pudieran ser resultado de errores de secuenciación. Finalmente se hizo normalización de los datos obteniéndose 37202 lecturas para cada muestra y 3133 ASV, de las cuales 2693 ASV se encontraron en las distintas fracciones obtenidas por la técnica SIP.

La buena cobertura de secuenciación alcanzada y las curvas de rarefacción obtenidas (Figura A4, Apéndice V), en las que la riqueza de especies alcanzó una meseta, sugieren una profundidad de secuenciación suficiente para estudiar la diversidad de las comunidades bacterianas presentes en las muestras en estudio, permitiendo relevar la riqueza total de especies identificadas y distinguir los taxones bacterianos involucrados en el consumo de metano de los que no lo están.

TABLA 6. Valores de índice de diversidad alfa para las distintas muestras secuenciadas. Se indican, para las incubaciones con metano marcado (13) y control con metano sin marcar (12), los resultados obtenidos para las fracciones pesadas (H) y livianas (L) de las rotaciones de arroz continuo (R1) y arroz- pasturas (R41) por duplicado (1 y 2). Se presentan también los valores de índice de diversidad para los suelos rizosféricos originales (Rh) de ambas rotaciones. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA, $p < 0,05$).

Muestra	Riqueza observada	Shannon	Chao1	Equitatividad
12_H_R1.1	840	5.96	844	0.88
12_H_R1.2	785	5.96	789	0.89
12_H_R41.1	888	5.89	888	0.87
12_H_R41.2	650	5.63	650	0.87
12_L_R1.1	834	5.95	834	0.88
12_L_R1.2	737	5.98	739	0.91
12_L_R41.1	542	5.63	542	0.89
12_L_R41.2	682	5.77	684	0.88
13_H_R1.1	310	2.98	313	0.52
13_H_R1.2	410	3.22	413	0.54
13_H_R41.1	348	2.86	348	0.49
13_H_R41.2	407	3.28	407	0.55
13_L_R1.1	781	6.11	781	0.92
13_L_R1.2	910	6.25	912	0.92
13_L_R41.1	915	6.26	919	0.92
13_L_R41.2	907	6.18	911	0.91
Rh1.1	651	5.98	651	0.92
Rh1.2	960	6.34	962	0.92
Rh41.1	671	5.81	671	0.89
Rh41.2	847	6.01	847	0.89

Al comparar los índices de diversidad para todas las muestras secuenciadas (Tabla 6), se observó la misma tendencia. En todos los casos las comunidades bacterianas enriquecidas en las fracciones pesadas de la incubación con metano marcado presentaron riquezas significativamente menores al resto de las fracciones analizadas (ANOVA, $p\text{-valor} < 0,01$).

Respecto al índice de Shannon se pudo ver nuevamente que la diversidad de la comunidad fue significativamente más baja para la fracción pesada de la incubación con $^{13}\text{CH}_4$ (ANOVA, p-valor < 0,01), lo que es esperable ya que es una fracción enriquecida en un grupo microbiano. Esta tendencia se observó también para los índices Chao1 y de equitatividad, donde valores más cercanos a cero indican existencia de taxones fuertemente dominantes (ANOVA, p-valor < 0,01). No se observó diferencias en los índices de diversidad para el resto de las fracciones evaluadas entre sí ni respecto a la comunidad de los suelos rizosféricos sin incubar, cuyos índices de diversidad se reportan al final de la tabla.

La abundancia relativa de las bacterias presentes en cada fracción de ADN fue analizada al nivel taxonómico de clase (Figura 22). Al observar la estructura de estas comunidades se pudo ver que *Alphaproteobacteria* fue la clase predominante en todas las fracciones, si bien su proporción difiere entre las fracciones pesadas y las livianas. En las fracciones pesadas de la incubación con metano marcado ($^{13}\text{CH}_4$ _H) representó más del 70% del total en las cuatro muestras, mientras que representó 13–34% del total en el resto de las fracciones. Dentro de esta clase de *Proteobacteria* la familia predominante fue *Beijerinckiaceae* tanto en las fracciones pesadas como en las livianas de la incubación control, mientras que en las fracciones livianas de la incubación con $^{13}\text{CH}_4$ esta clase estuvo mayormente representada por la familia *Xanthobacteraceae*. Otra diferencia en las comunidades se pudo observar en las clases de bacteria *Acidobacteriae*, *Thermoleophilia* y *Actinobacteria* las cuales se encontraron en mayor abundancia en las fracciones livianas de ambas incubaciones. La estructura de las comunidades activas de suelo rizosférico se va a detallar en la sección siguiente.

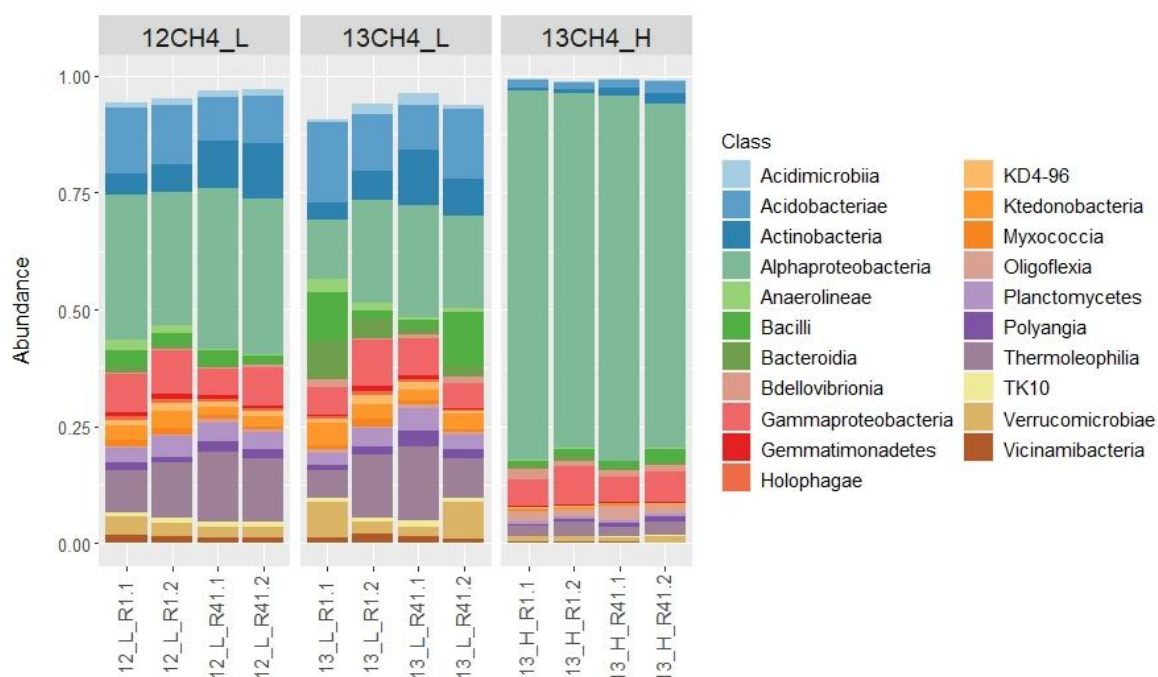


FIGURA 22. Abundancia relativa de bacterias a nivel de clase en las fracciones livianas de ambos tipos de incubación y la fracción pesada de la incubación con metano marcado, respectivamente. Se muestran las clases con abundancias relativas mayores a 5%.

Para evaluar la diferencia o similitud entre las comunidades bacterianas obtenidas para las distintas muestras, se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en la distancia de Bray-Curtis de la composición a nivel de género (Figura 23). Para las muestras de las dos rotaciones evaluadas se observa un claro agrupamiento de las fracciones pesadas de la incubación con metano marcado hacia la derecha del gráfico, separándose del resto de las fracciones, lo que indica que la comunidad microbiana activa presenta una composición diferente a la de la comunidad microbiana original. También se observa una leve separación de las rotaciones, la rotación intensiva R1 tiende a agruparse en la sección inferior del gráfico mientras que la arroz-pasturas (R41) en la sección superior. Los primeros dos componentes principales explicaron un 65,1% de la variación total en la composición de las comunidades bacterianas.

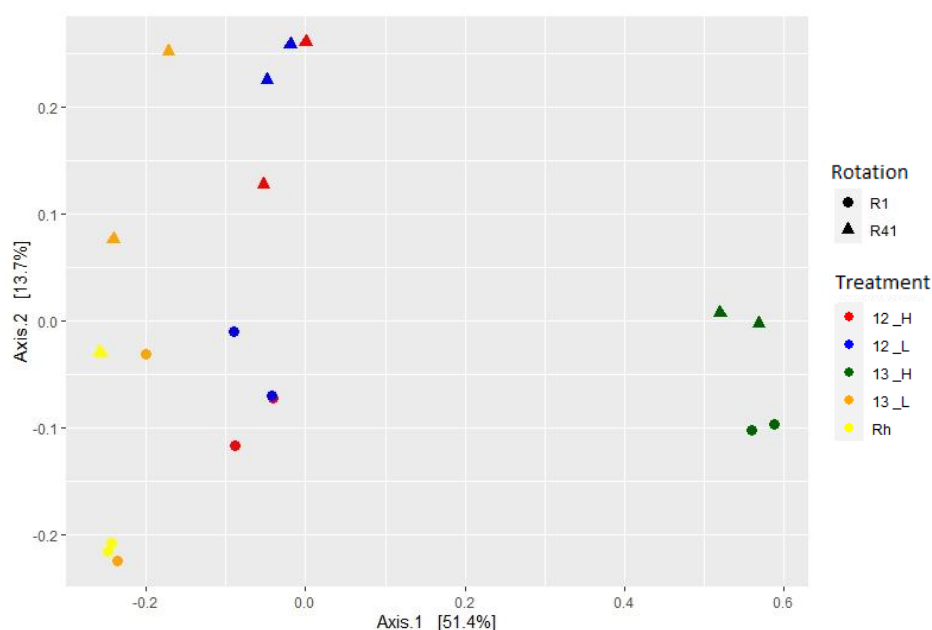


FIGURA 23. Análisis de coordenadas principales basado en la distancia de Bray-Curtis de la comunidad bacteriana de los suelos rizosféricos originales y las distintas fracciones del SIP. En los ejes se indica el porcentaje de la variabilidad total explicada.

Se realizaron análisis PERMANOVA y ANOSIM de forma de evaluar el grado de significancia de las diferencias observadas en el gráfico PCoA. Esta comparación estadística permitió confirmar que la comunidad de la fracción pesada de la incubación con metano marcado (13_H, Figura 23), correspondiente a la fracción de ADN de la comunidad activa, fue significativamente diferente a la del resto de las fracciones (ANOSIM, $p < 0,01$). La incubación de los suelos rizosféricos tuvo un efecto sobre las comunidades detectadas en las fracción liviana (12_L) cuando se comparan con las establecidas en las muestras de rizósferas (Rh) sin incubar (ANOSIM, $p = 0,025$). Sin embargo, la fracción liviana de la incubación con metano marcado (13_L) no se diferenció significativamente de la fracción liviana de la incubación control (12_L), ni del suelo rizosférico original (Rh). Al realizar la comparación de la estructura de las comunidades de las fracciones liviana (12_L) y pesada (12_H) de la incubación control, no se observó diferencia entre ellas.

La fracción pesada de la incubación control (12_H) fue incluida en el análisis por secuenciación de forma de tener un control adicional para evaluar el éxito de la técnica. En un caso ideal no se esperaba obtener ADN en estas fracciones, dado que no debería haber ADN pesado en la incubación con metano sin marcar, por lo que es necesario analizar la comunidad obtenida. En las distintas figuras y tabla presentadas hasta el momento (Tabla 6, Figuras 22 y 23) se observó que la comunidad presente en estas fracciones es diferente a la

presente en las fracciones de igual densidad de la incubación con $^{13}\text{CH}_4$ (13_H), pero muy similar a la obtenida en las fracciones livianas de la misma incubación (12_L) por lo que la comunidad bacteriana detectada en la fracción pesada puede deberse a un escurrimiento del ADN en el gradiente de cloruro de cesio.

Una vez realizados análisis exploratorios y establecidas las diferencias estadísticas entre las comunidades se realizaron análisis de abundancias diferenciales para determinar los géneros que se encuentran más representados en la fracción pesada con $^{13}\text{CH}_4$, es decir que se enriquecieron significativamente en esta condición. En primer lugar, se compararon las comunidades bacterianas presentes en las fracciones pesadas y livianas de la incubación con metano marcado (Figura 24), para evaluar la separación de las fracciones dentro de un mismo tubo de centrífuga, para una misma muestra. En este caso, se presentan los resultados obtenidos para la muestra correspondiente a la rotación arroz-pasturas (R41), pero los mismos son análogos a los obtenidos para la rotación arroz continuo (R1). Lo observado en este gráfico es consistente con lo visto anteriormente ya que la fracción pesada se encuentra enriquecida en géneros metanótrofos. Este análisis indica que hay varios géneros que presentan una abundancia diferente entre las fracciones de esta incubación. No solo géneros reconocidos como metanótrofos se encontraron en mayor abundancia en la fracción pesada, *Hyphomicrobium* y *Bdellovibrio* son géneros que también se vieron enriquecidos, así como taxones asignados a la familia *Gemmatimonadaceae* o *Hyphomicrobiaceae*, y taxones sin clasificar asignados al orden *Gaiellales* y el orden *0319-6G20*. En el caso de la fracción liviana, el número de géneros que se encontraron en más abundancia en esta fracción fue mayor, y destacó la presencia entre ellos de un taxón de la familia *Methyloiligellaceae* dentro del orden *Rhizobiales*, una familia metilótrofa con algunos géneros metanótrofos. Sin embargo, solo se encontró una ASV relacionada a esta familia en todas las muestras estudiadas.

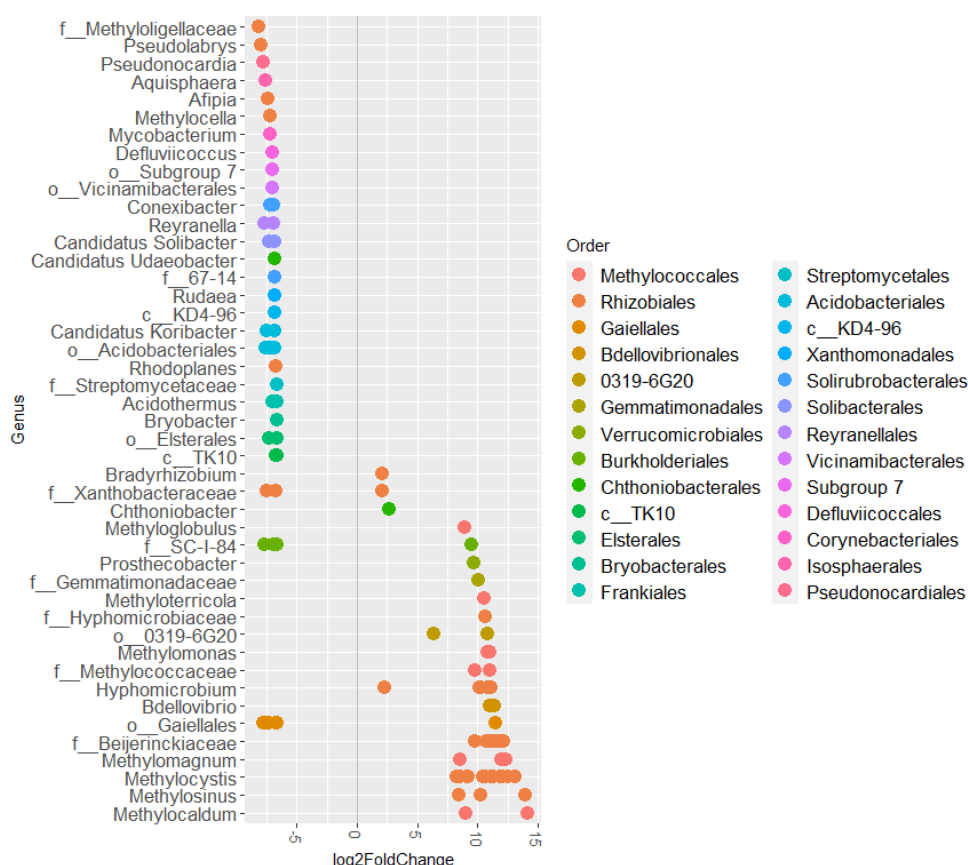


FIGURA 24. Abundancias diferenciales para los géneros bacterianos identificados en la incubación con metano marcado del suelo rizosférico de la rotación arroz-pasturas (R41). El valor log2FoldChange es el resultado de aplicar el logaritmo en base 2 al valor de la abundancia diferencial obtenida para la fracción pesada (derecha) respecto a la fracción liviana (izquierda). Se grafican los géneros con abundancias diferenciales significativas (alfa de 0,05).

Asimismo, se realizó una comparación de abundancias diferenciales entre las fracciones pesadas de ambas incubaciones $^{13}\text{CH}_4$ y $^{12}\text{CH}_4$ (Figura 25), para verificar que la presencia de los organismos en la fracción pesada se debía a un enriquecimiento de la biomasa con ^{13}C . En ese caso, los géneros metanótrofos deberían encontrarse mayormente representados en la fracción pesada de la incubación con metano marcado, lo que efectivamente se observó en este análisis. Además de géneros y familias metanótrofas otros géneros se encontraron enriquecidos como *Bdellovibrio* e *Hyphomicrobium*, como se constató anteriormente. Si bien se observaron diferencias con el gráfico de abundancias diferenciales que compara las fracciones de la incubación con metano marcado (Figura 24), los taxones resaltados en los resultados del análisis anterior se encuentran enriquecidos de igual manera al comparar estas fracciones.

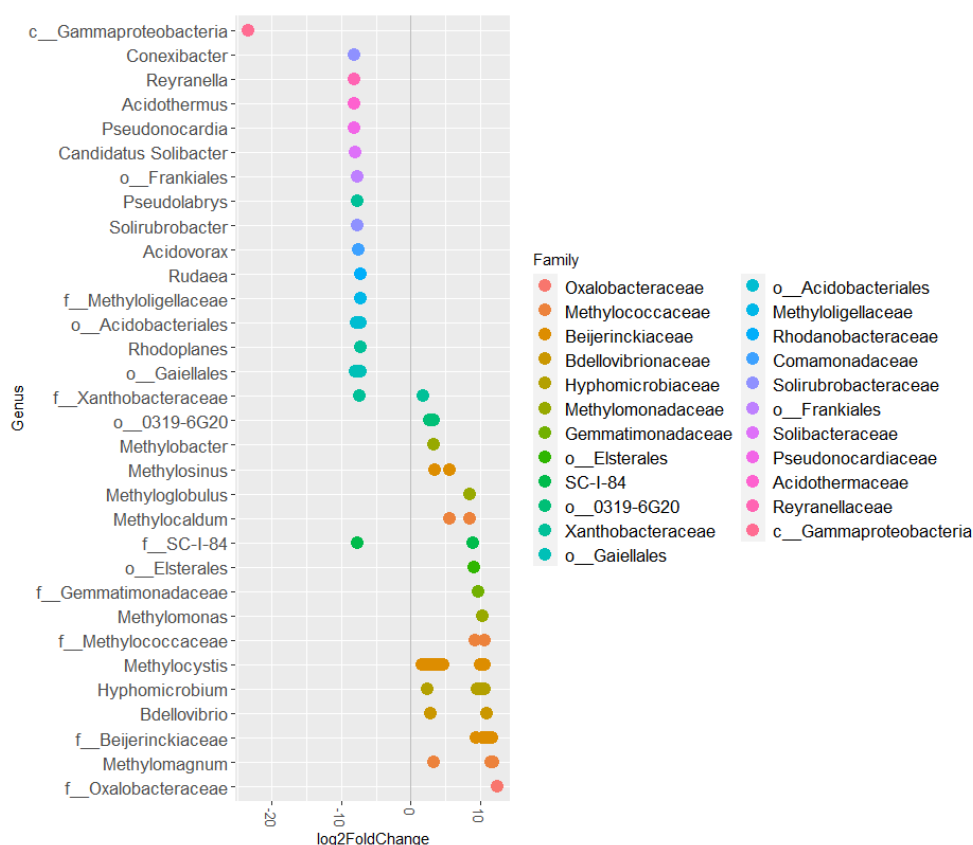


FIGURA 25. Abundancias diferenciales para los géneros bacterianos identificados en las fracciones pesadas de las incubaciones con $^{12}\text{CH}_4$ y $^{13}\text{CH}_4$. El valor log2FoldChange es el resultado de aplicar el logaritmo en base 2 al valor de la abundancia diferencial obtenida para la incubación con $^{13}\text{CH}_4$ (derecha) respecto a la incubación control con $^{12}\text{CH}_4$ (izquierda). Se muestran los resultados para el suelo rizosférico de la rotación arroz-pasturas (R41). Se grafican los géneros con abundancias diferenciales significativas (alfa de 0,05).

A partir de la asignación taxonómica realizada durante el análisis de los datos de secuenciación masiva, se seleccionó el subset de secuencias correspondientes a géneros metanótrofos. En la Figura 26, se muestra la abundancia relativa de estos géneros en las distintas fracciones analizadas. La abundancia de comunidades metanótroficas en las fracciones pesadas de la incubación con $^{13}\text{CH}_4$ indica el grado en que las bacterias oxidantes de metano fueron marcadas con ^{13}C . En este caso, los genes 16S ARNr asignados a metanótrofos representaron entre el 70% y el 76% de la comunidad microbiana total, como se observa en la figura, lo que sugiere un marcado importante de la comunidad metanótrofa luego de la incubación por 9 días. En cambio, en el caso de la fracción liviana de estas incubaciones la abundancia relativa de las secuencias del gen 16S ARNr asignados a bacterias metanótroficas fue muy baja, entre el 0,35% y el 1,6%, indicando que efectivamente hubo un enriquecimiento de géneros metanótroficos en la fracción pesada y se generó la separación de las dos fracciones. Esta diferencia entre las comunidades metanótroficas de las

fracciones pesada y liviana es significativa, basada en el test ANOVA (p-valor < 0,01). Respecto a las fracciones liviana y pesada de las incubaciones control ($^{12}\text{CH}_4$) se observaron perfiles muy similares en todas las fracciones, pero con abundancias entre 11% y 17%, significativamente menores a las obtenidas para las fracciones pesadas de la incubación con $^{13}\text{CH}_4$ (ANOVA, p-valor < 0,01), constatando que el enriquecimiento en géneros metanótrofos se debe a una correcta implementación de la técnica. Este resultado muestra claramente que la mayor abundancia relativa de bacterias oxidantes de metano se observó en la fracción pesada, coincidiendo con el patrón de distribución del número de copias del gen *pmoA* (Figura 21).

Cabe destacar que se observó un efecto de la incubación en la comunidad bacteriana al comparar la abundancia de géneros metanótrofos en las fracciones de la incubación control (metano sin marcar) con su abundancia en los suelos rizosféricos originales sin incubar (Figura A9, Apéndice VII). La fracción liviana idealmente debería retener la composición de la comunidad total, por lo que actúa como un indicador de un posible crecimiento relativo de ciertos organismos durante la incubación SIP.

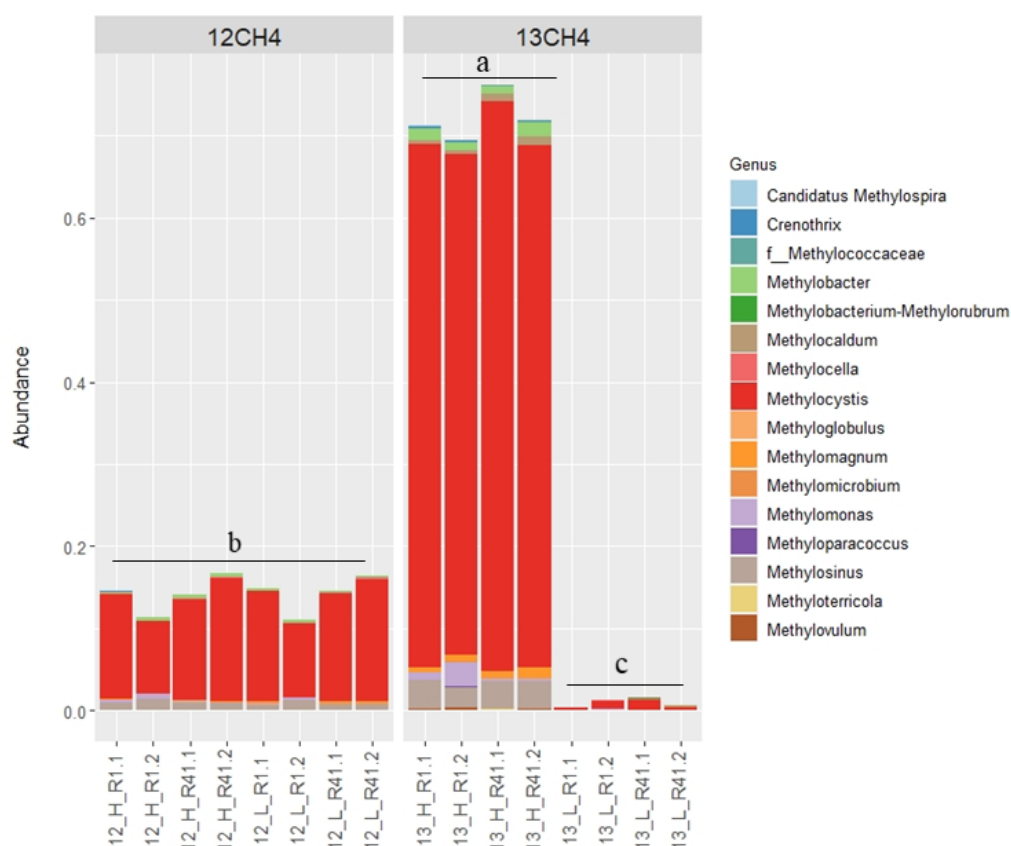


FIGURA 26. Abundancia relativa de géneros metanótrofos en las distintas fracciones obtenidas por la técnica SIP. Las letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA, $p < 0,05$).

Los resultados descriptos en esta sección nos permiten afirmar que se logró la optimización de la técnica. Habiendo constatado que la misma fue exitosa y que la comunidad metanótrofa fue efectivamente marcada con ^{13}C , se procedió a comparar la comunidad activa en las distintas rotaciones arroceras evaluadas.

2.3.5 Comunidad bacteriana y metanótrofa activa en rizósfera de plantas de arroz de rotaciones contrastantes

Una vez optimizada la técnica se estudiaron y compararon las fracciones pesadas correspondientes a la incubación con metano marcado ($^{13}\text{CH}_4$) para las dos rotaciones (por duplicado).

En primer lugar, para la comparación de las comunidades bacterianas totales activas en las condiciones del ensayo de SIP, se realizó un diagrama de Venn a partir de las secuencias correspondientes a cada una de las rotaciones en estudio (Figura 27). Se obtuvieron 202 y 221 ASV en las muestras de la rotación intensiva y la rotación arroz-pasturas respectivamente. En la figura se puede observar que hay 150 ASV compartidas entre las dos condiciones, mientras que 123 ASV se encuentran en forma única en alguna de ellas, siendo la rotación arroz-pasturas la que presenta más ASV exclusivas.



FIGURA 27. Diagrama de Venn de las comunidades bacterianas para las dos rotaciones en estudio, R1: rotación arroz continuo y R41: arroz de primer año de la rotación arroz-pasturas. La intersección de ambos círculos representa las ASV compartidas.

No se observaron diferencias significativas en la diversidad alfa de las comunidades bacterianas activas presentes en suelo rizosférico de las rotaciones de arroz continuo y arroz-pasturas, de acuerdo a la comparación de medias realizada (ANOVA y Test de Tukey). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 28 y se detallan en la Tabla 6 (sección 2.3.4).

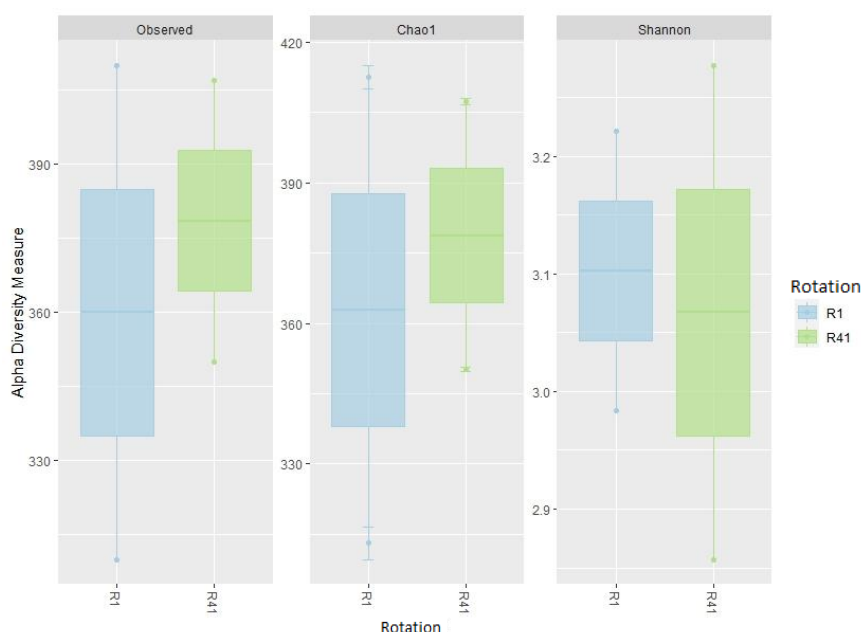


FIGURA 28. Diversidad alfa de las comunidades bacterianas activas correspondientes a las dos rotaciones en estudio, R1 (rotación intensiva de arroz continuo) y R41 (rotación arroz-pasturas).

La estructura de la comunidad bacteriana de la fracción activa tanto a nivel de phylum como de clase no mostró prácticamente diferencia entre las dos rotaciones en estudio (estos resultados no se presentan). En ambos casos se observó una alta predominancia de un solo grupo taxonómico, el phylum *Proteobacteria* y la clase *Alphaproteobacteria*, con abundancias relativas mayores al 80 y 70% respectivamente. A nivel de familia, las diferencias se vieron mayormente en familias no asociadas a la actividad metanótrofa, si bien *Beijerinckiaceae* fue la que presentó mayor abundancia en todas las muestras (Figura 29). Una familia no clasificada dentro del orden *Rhodospirillales* fue el segundo taxón más abundante en las muestras de la rotación intensiva (R1), mientras que se encontró en una abundancia relativa ínfima en la rotación arroz-pasturas (R41). En el caso de la rotación R41, *Methylococcaceae* y una familia del orden 0319-6G20 (clase *Oligoflexia*) fueron las siguientes familias con mayor abundancia.

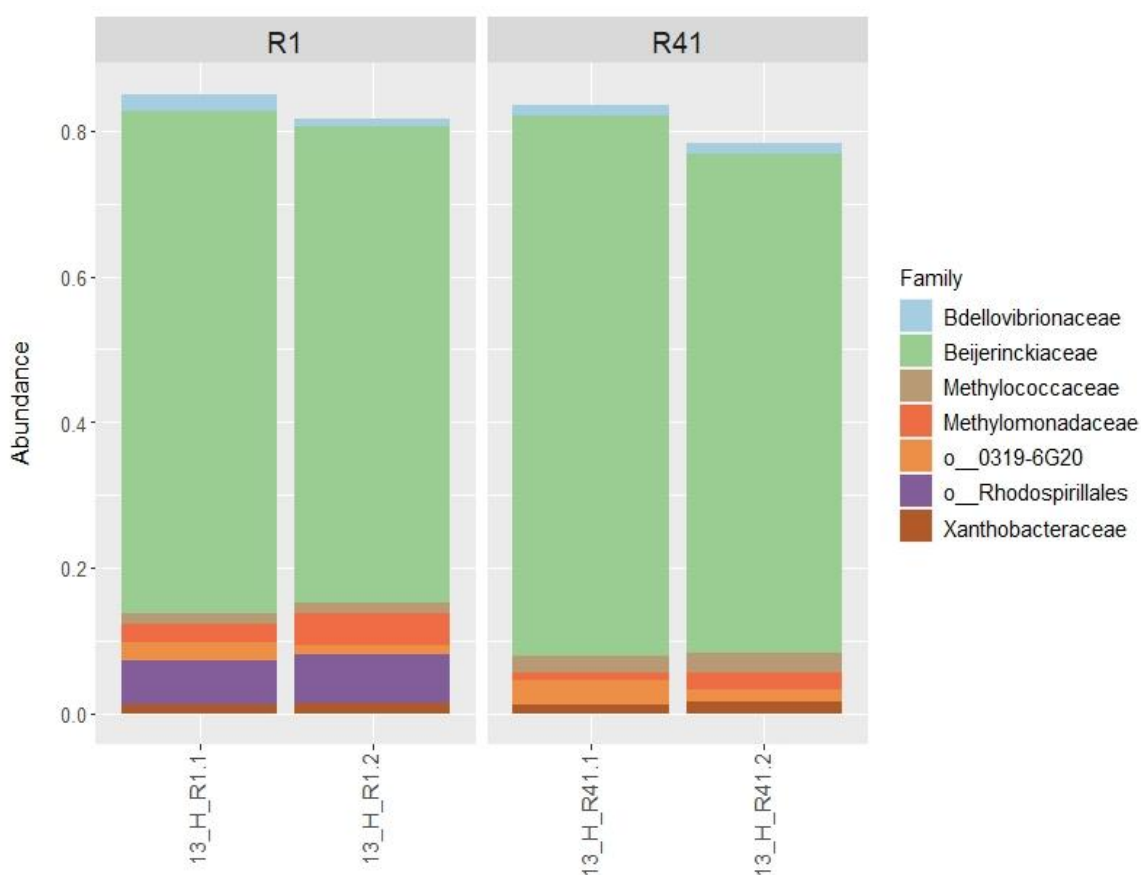


FIGURA 29. Abundancia relativa de las principales familias del dominio *Bacteria* en la comunidad activa de las rotaciones en estudio, la rotación de arroz continuo (R1) y la rotación arroz-pasturas (R41). Se presentan las familias con abundancias relativas mayores al 5%.

Como se puede ver en la Figura 30, la estructura de la comunidad bacteriana a nivel de género fue muy similar para las dos rotaciones, con una fuerte predominancia del género *Methylocystis* como se describió en la sección anterior y se ha venido constatando en los distintos niveles taxonómicos. La diferencia más notoria se observó al igual que a nivel de familia, en la abundancia relativa de un grupo no metanótrofo que no pudo clasificarse más allá del orden *Rhodospirillales*, visiblemente más abundante en la comunidad de la rotación intensiva. La composición de la comunidad bacteriana basada en el gen 16S ARNr mostró que las fracciones pesadas no solo contienen bacterias oxidantes de metano sino también otros géneros no asociados a esta función.

Para evaluar la diferencia entre la composición de las comunidades de ambas rotaciones se realizó comparación estadística mediante el test PERMANOVA, pero no se obtuvo una diferencia significativa. Cabe destacar que, para poder realizar esta comparación con mayor sustento estadístico, se debería contar con más de dos réplicas por rotación.

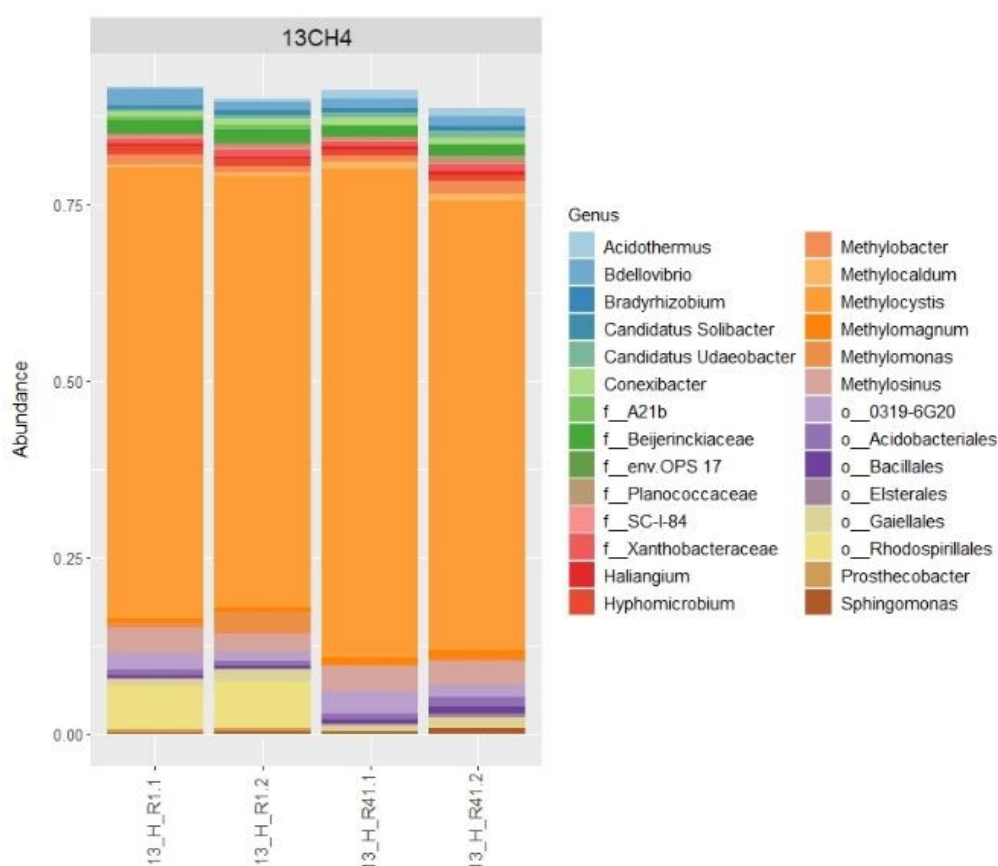


FIGURA 30. Abundancia relativa de los principales géneros del dominio *Bacteria* en la comunidad activa de las rotaciones en estudio, la rotación intensiva de arroz continuo (R1) y la arroz-pasturas (R41). Se presentan los géneros con abundancias relativas mayores al 1%.

Se realizó un análisis de abundancias diferenciales a nivel de género (Figura 31) para poder analizar las diferencias entre las comunidades bacterianas activas de los suelos provenientes de rotaciones diferentes. En la figura se observan varios géneros que presentaron abundancias diferentes entre una rotación y otra, si bien la mayor parte no están relacionados con la metanotrofia. Es posible constatar que, como se vio anteriormente, el taxón que no se pudo clasificar más allá del orden *Rhodospirillales* se encontró mayormente representado en la rotación arroz continuo, R1. Como éste, hay otros géneros que se encontraron en mayor abundancia en la rotación intensiva en comparación con la tradicional y parecen ser más que los enriquecidos en la rotación tradicional. Sin embargo, resulta de mayor interés el análisis de los géneros identificados como metanótrofos. Cabe destacar que hay géneros bacterianos identificados que presentaron abundancia relativa bajas, por lo que por cuestiones estadísticas pueden no observarse en estos gráficos, pero aun así estar siendo afectados por las prácticas de manejo del suelo.

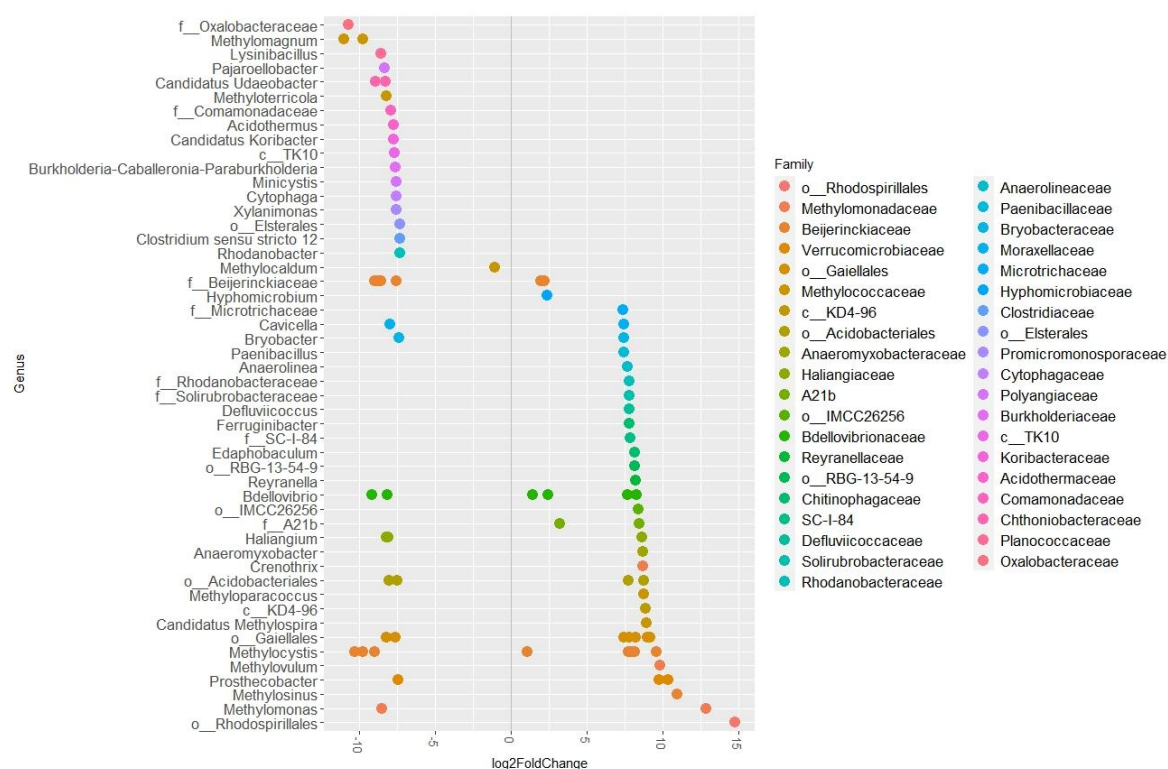


FIGURA 31. Abundancias diferenciales para los géneros bacterianos identificados en la fracción marcada con ^{13}C para ambas rotaciones. El valor log2FoldChange es el resultado de aplicar el logaritmo en base 2 al valor de la abundancia diferencial obtenida para la rotación de arroz continuo, R1 (derecha) respecto a la rotación arroz-pasturas, R41 (izquierda). Se grafican los géneros con abundancias diferenciales significativas ($\alpha=0,05$).

Para el análisis de la comunidad metanótrofa activa se realizó una selección de los géneros metanótrofos conocidos presentes en la comunidad bacteriana. Todas las secuencias relacionadas a metanótrofos de las distintas muestras fueron asignadas al phylum *Proteobacteria*, ninguna de las ASV fue asignada a los phyla *Verrucomicrobia* ni *Methylomirabilota*. Al igual que en la comunidad bacteriana total, se observó una alta predominancia del género *Methylocystis* en el suelo rizosférico de ambas rotaciones arroceras (Figura A10, Apéndice VII). Los géneros *Methylosinus*, *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylomagnum* y *Methylocaldum* también se encontraron formando parte de la comunidad metanótrofa activa en todas las muestras en estudio (Figura 32). Asimismo, se constató la presencia de géneros exclusivos para cada rotación, los géneros *Candidatus Methylospira* y *Methylomicrobium* se encontraron únicamente representadas en los suelos de la rotación intensiva (R1), mientras que los géneros *Methylostericola* y *Methyloglobulus* solo se encontraron presentes en las muestras de la rotación arroz-pasturas (R41).

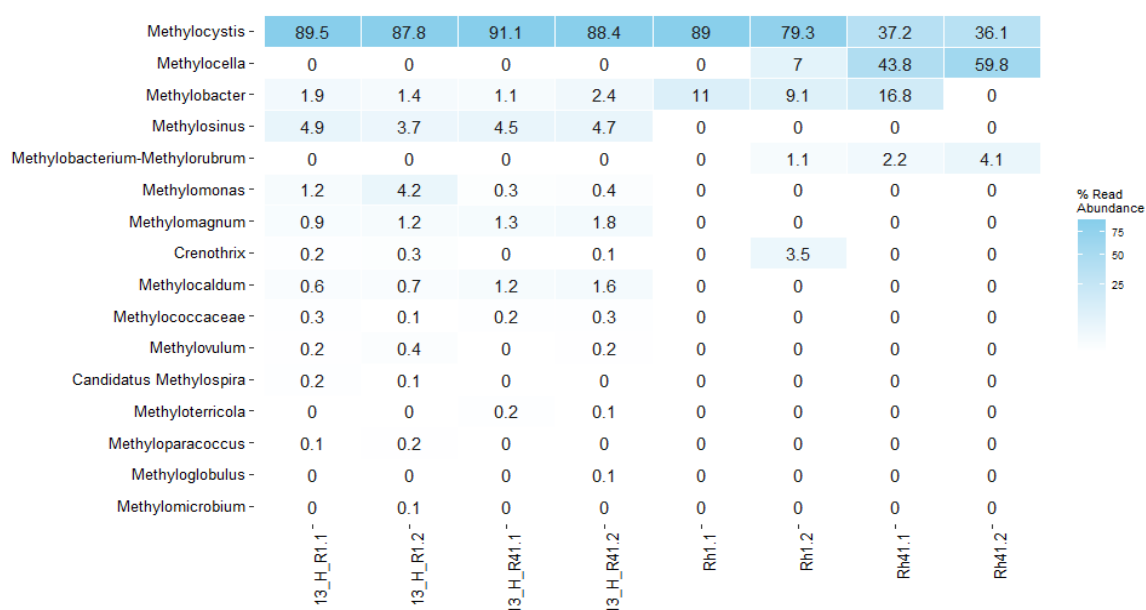


FIGURA 32. Heatmap de abundancia relativa de géneros metanótrofos en la comunidad activa de suelo de arroz de las rotaciones arroz continuo (R1) y arroz-pasturas (R41), y en los suelos rizosféricos originales (Rh1 y Rh41), basado en la secuenciación de amplicones del gen 16S ARNr. Los datos se presentan como el promedio de los duplicados biológicos transformados con la raíz cuadrada.

Para estudiar específicamente las diferencias en la comunidad metanótrofa entre las rotaciones se hizo análisis de abundancias diferenciales para este subset (Figura 33). En este análisis se presenta la abundancia a nivel de ASV, cada uno se encuentra representado por un punto por lo que pueden haber ASV asignadas a un mismo género que se encuentren algunos enriquecidos en una rotación y otros en la otra. Este es el caso para los géneros *Methylomagnum*, *Methylocystis*, *Methylovulum*, *Methylosinus* y *Methylomonas*, los últimos tres con una ASV enriquecida en cada rotación. Sin embargo, se puede constatar que los géneros *Methyloterricola* y *Methyloglobulus* se encontraron en mayor abundancia en muestras del sistema de rotación arroz-pasturas, mientras que los géneros *Crenothrix*, *Methyloparacoccus* y *Candidatus Methylospira* se encontraron mayormente representados en suelos de la rotación de arroz continuo. Esto condice con lo observado en el diagrama de Venn (Figura 27), ya que géneros que en dicho análisis se encuentran solo en una rotación también mostraron mayor abundancia en esa condición según el análisis de abundancias diferenciales.

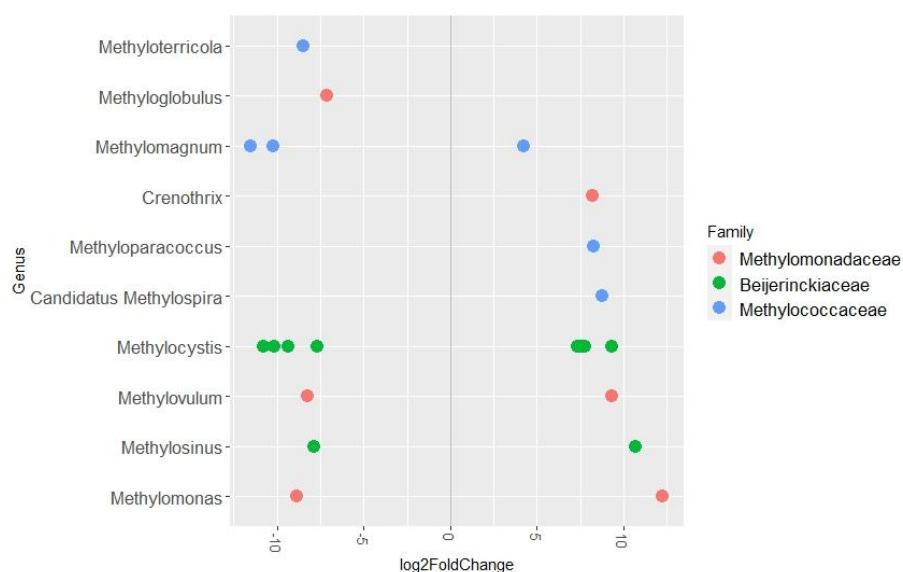


FIGURA 33. Abundancias diferenciales para los géneros bacterianos metanótrofos identificados en la fracción marcada con ^{13}C para ambas rotaciones. El valor log2FoldChange es el resultado de aplicar el logaritmo en base 2 al valor de la abundancia diferencial obtenida para la rotación de arroz continuo R1 (derecha) respecto a la rotación arroz-pasturas R41 (izquierda). Se grafican los géneros con abundancias diferenciales significativas (alfa de 0,05).

El *heatmap* de la Figura 32 permitió, además de representar las diferencias en la abundancia de géneros metanótrofos en las distintas fracciones activas, compararlas con la comunidad de los suelos rizosféricos originales. En cuanto a las comunidades activas los resultados que se observan en el diagrama coinciden con lo observado en los análisis anteriores. Al comparar estas comunidades con las de los suelos rizosféricos originales, se observó que, si bien la mayoría de los géneros se encontraron enriquecidos en las fracciones activas, hay géneros como *Methylocella* o *Methylobacter* que presentaron mayor abundancia en los suelos sin incubar, por lo que no estarían activos en el suelo rizosférico de arroz en estas condiciones.

Los distintos géneros metanótrofos encontrados en las fracciones pesadas de la incubación con metano marcado de los suelos rizosféricos en estudio, se detallan en la Tabla A7 del Apéndice VII. Se describe el nombre de cada una de las ASV encontradas y su clasificación filogenética hasta el nivel de género. De esta forma se presentan las comunidades metanótrofas aerobias activas obtenidas mediante la técnica ADN-SIP para el suelo rizosférico de arroz proveniente de los sistemas de rotación arroz continuo (R1) y arroz-pasturas (arroz de primer año, R41).

2.4 Discusión y conclusiones

En este capítulo se describió el estudio de la comunidad metanótrofa establecida en rizósfera de plantas de arroz de diferentes rotaciones arroceras, que se encuentra activa en condiciones de microcosmos, mediante la técnica *ADN-Stable Isotope Probing*, combinada con la cuantificación del gen marcador funcional *pmoA* por PCR cuantitativa y la secuenciación de amplicones del gen 16S ARNr del dominio *Bacteria*. Para esto, previamente la técnica fue optimizada en las condiciones de laboratorio. Los resultados mostraron que la optimización fue exitosa, que su implementación permitió conocer la composición y diversidad de la comunidad metanótrofa activa en suelo rizosférico de arroz, y que esta comunidad presentó diferencias en sus taxones minoritarios entre rotaciones.

2.4.1 Optimización de la técnica *ADN- Stable Isotope Probing*

La técnica SIP al igual que otras técnicas está sujeta a sesgos y limitaciones, por lo que el éxito de la metodología va a depender del diseño experimental (Neufeld et al., 2007).

La primer etapa importante en la optimización de esta técnica es la incubación, en este caso se realizó en forma análoga al ensayo de actividad metanótrofa potencial (sección 1.2.4). Se realizó una preincubación de los microcosmos durante 72 horas en condiciones aerobias para agotar los sustratos endógenos que pudieran ser consumidos aeróbicamente cuando se cierran los viales, disminuyendo la disponibilidad de oxígeno para las bacterias metanótrofas. Se realizaron incubaciones de todas las muestras tanto con metano marcado como con metano sin marcar (^{12}C), como control, para confirmar que la densidad del ADN en el gradiente se debe al enriquecimiento con ^{13}C y no a su contenido G+C. Si bien los gráficos de actividad de oxidación de metano obtenidos en la incubación SIP muestran una tendencia similar a los obtenidos para el ensayo de actividad metanótrofa potencial, las pendientes son menores, pudiendo deberse a la mayor afinidad de las enzimas por isótopos más livianos y el consumo preferencial del isótopo ^{12}C del metano por las bacterias metanótrofas (De Visscher et al., 2004).

Durante la incubación para ADN-SIP la incorporación de ^{13}C suficiente en el ADN de los metanótrofos activos es crítica para el éxito de la técnica, ya que, si no se incorporase suficiente carbono marcado al ADN éste no sería distinguible entre el total de moléculas no marcadas relativamente abundantes. Sin embargo, la incorporación de mucho sustrato y/o

un tiempo de incubación excesivo puede también ser problemático generando un sesgo en el enriquecimiento y propiciando la alimentación cruzada (Neufeld et al., 2007). Por tanto, puede ser útil determinar el potencial de oxidación de metano ($^{12}\text{CH}_4$) de la muestra previo a la incubación con $^{13}\text{CH}_4$ (Radajewski y Murrell, 2002), como se realizó en esta tesis, de forma de tener mayor conocimiento del tiempo de incubación necesario para la incorporación de ^{13}C . En este trabajo, para ambos tiempos de incubación estudiados se alcanzó una incorporación dentro del rango 5–500 μmol de ^{13}C por gramo de suelo, de alrededor de 80 y 98 μmol de metano en 9 y 14 días de incubación respectivamente, lo cual sería suficiente para el desarrollo de la técnica según Neufeld et al. (2007b). Por otro lado, para una correcta separación del ADN debe predominar el consumo de metano sobre otros sustratos por lo que esta técnica es más adecuada para concentraciones de metano altas (>1% v/v; Radajewski y Murrell, 2002). En busca de asegurar el marcado suficiente del ADN bacteriano, en este trabajo se utilizó una concentración de saturación aproximada de 7% (v/v), lo que está en consonancia con otros estudios que agregan de 5–10% (v/v) de metano (McDonald et al., 2005).

Luego de llevado a cabo el experimento de incubación en microcosmos y el fraccionamiento del gradiente obtenido por centrifugación isopícnica, donde se obtuvieron entre 18 y 20 fracciones en el rango de densidades 1,50–1,85 g/mL, el seguimiento se realizó por determinación de la densidad, cuantificación de ADN y PCR cuantitativa dirigida al gen marcador funcional *pmoA*. Como se observó en los resultados, la determinación de la densidad de las distintas fracciones obtenidas permitió constatar la formación del gradiente en CsCl . Para evaluar la separación del ADN en dicho gradiente se cuantificó el mismo en las fracciones con densidades dentro del rango de interés 1,69–1,80 g/mL (Lueders et al., 2004; Deng et al., 2018). La concentración de ADN determinada en las fracciones con densidad correspondiente al ADN pesado de la incubación con metano marcado es mucho menor a la observada en la fracción liviana de la incubación control, ya que la comunidad metanótrofa activa corresponde a una pequeña parte de la comunidad bacteriana total. Esto es conveniente ya que según Neufeld et al. (2007) la cantidad de ADN en la banda correspondiente a la fracción pesada con ^{13}C debería ser bastante menor a la cantidad de ADN en la banda de ADN liviano con ^{12}C de forma de minimizar el sesgo del experimento de ADN-SIP. En este trabajo, se observó además que el ADN se distribuyó a lo largo del gradiente en cantidades traza (0,1 μg ADN/mL), pero detectables. Se ha reportado que cuando se trabaja con muestras ambientales puede observarse una mancha o escurrimiento

en el gradiente de densidad lo que puede deberse a fracciones de ADN con niveles intermedios de incorporación del ^{13}C (Radajewski y Murrell, 2002). En un estudio realizado por Lueders et al. (2004) se observó que incluso en cultivos puros el ADN se distribuye a lo largo del gradiente de densidad y contamina las fracciones más densas, por lo tanto, una cierta cantidad de ácidos nucleicos inespecíficos del entorno debe esperarse a lo largo de todo el gradiente. Otra variable a considerar es el contenido G+C del ADN, el cual influye en la densidad del genoma microbiano en CsCl pudiendo aumentar la densidad del ADN con ^{12}C si el contenido es alto y acercarlo al ADN marcado con ^{13}C que tenga contenido G+C bajo (Lueders et al., 2004); por lo tanto, esto debe ser tomado en cuenta al interpretar los resultados de muestras ambientales. El contenido G+C de los taxones microbianos que habitan ambientes naturales puede variar entre 30 y 70% o incluso más, por lo que va a influir de forma importante en la separación del ADN marcado con ^{13}C (Jia et al., 2019). Teniendo estos dos aspectos en consideración, la sola presencia de un organismo en la fracción pesada no necesariamente significa un alto grado de marcado con ^{13}C , para esto debe compararse con las fracciones livianas y confirmar que están enriquecidas selectivamente en esa fracción.

La determinación de la abundancia del gen *pmoA* por PCR cuantitativa en las distintas fracciones también permitió evaluar la correcta separación de las fracciones pesadas y livianas, al obtenerse un pico único de abundancia relativa del gen en los tratamientos incubados con $^{12}\text{CH}_4$ y también un pico único en las incubaciones con $^{13}\text{CH}_4$, pero en fracciones con densidad mayor. Como se observó en la Figura 21b, en el caso de la muestra de la rotación arroz-pasturas (R41) los picos correspondientes a la incubación control con $^{12}\text{CH}_4$ parecen ser más pequeños que los de la incubación con $^{13}\text{CH}_4$, lo que puede deberse al ya mencionado escurrimiento del ADN en el gradiente que ocasionó el ensanchamiento del pico de abundancia relativa del gen. El enriquecimiento en la abundancia de copias del gen *pmoA* de la fracción pesada con ^{13}C , evidenció el marcado exitoso de la comunidad metanótrofa como ha sido sugerido previamente (Cai et al., 2016; He et al., 2019). Este resultado indicó el crecimiento de metanótrofos (con el gen *pmoA*) a partir del sustrato $^{13}\text{CH}_4$ durante la incubación en microcosmos, y la separación exitosa del ADN genómico marcado de metanótrofos activos del ADN de la comunidad microbiana no activa del suelo, luego de 9 días de incubación.

Para confirmar el enriquecimiento y el éxito de la técnica se analizaron las comunidades bacterianas por secuenciación de amplicones del gen 16S ARNr de las distintas fracciones

obtenidas. Por lo descrito anteriormente se secuenciaron las fracciones pesadas y livianas tanto de la incubación con metano marcado como de la incubación control para hacer las comparaciones pertinentes. En el gráfico de abundancias relativas de los géneros metanótrofos conocidos (Figura 26) se pudo observar que, en las fracciones pesadas de las incubaciones con metano marcado las secuencias asignadas a géneros metanótrofos correspondieron aproximadamente a un 70% de las secuencias del gen 16S ARNr, mientras que para el resto de las fracciones la abundancia relativa fue significativamente más baja, siendo menor a 17% para la incubación control. Esta predominancia de secuencias asignadas a organismos de un determinado grupo o filotipo en la fracción pesada, indica que hubo una incorporación activa y significativa de ^{13}C y, como resultado, un marcado de estos microorganismos durante la incubación, cuando se compara con el tratamiento control. En distintos trabajos realizados utilizando la técnica SIP, se observó que las bibliotecas de genes 16S ARNr construidas a partir de la fracción de ADN pesado de la incubación con $^{13}\text{CH}_4$ de muestras ambientales contenían un alto porcentaje de secuencias de metanótrofos, 96% en suelo de bosque (Radajewski y Murrell, 2002) o 90% en arroz (Zheng et al., 2014); mientras que en las fracciones de ADN con ^{12}C los metanótrofos constituían un pequeño porcentaje de la biblioteca. El alto porcentaje observado en las fracciones pesadas de la incubación con $^{13}\text{CH}_4$ sugiere que la mayor parte de la biomasa marcada en el ensayo corresponde a consumidores primarios y que la alimentación cruzada fue limitada. Secuencias que aparecen en baja frecuencia pueden corresponder a bacterias que crecen lento a partir de ese sustrato, bacterias que se alimentan de compuestos secundarios marcados con ^{13}C o trazas de ^{12}C -ADN que puedan estar presentes en la fracción pesada (McDonald et al., 2005) por las razones que se discutieron anteriormente. En relación a las fracciones livianas del tratamiento control fue posible observar también un enriquecimiento de microorganismos involucrados en el metabolismo del metano luego del tiempo de incubación, al compararlo con la comunidad del suelo rizosférico original sin incubar (Figura A9, Apéndice VII), este efecto se ha observado anteriormente (do Carmo Linhares et al., 2021; Leng et al., 2015; Noll et al., 2008; Zheng et al., 2014). Esson et al. (2016) documentó que la abundancia relativa de metanótrofos en las incubaciones para la técnica SIP de suelos de humedal ácido aumentó de 4% *in situ* a 25–36% luego de 8 a 14 días de incubación.

En el estudio de la diversidad alfa de las distintas fracciones secuenciadas se observó que las comunidades bacterianas presentes en las fracciones pesadas de la incubación con $^{13}\text{CH}_4$ mostraron riquezas significativamente menores que el resto (Tabla 6). Estas fracciones se

diferenciaron también en los otros índices evaluados, presentando una diversidad más baja y una mayor dominancia de algunos taxones. Esto coincide con lo observado por Guo et al. (2020), donde las medidas de alfa diversidad en general fueron significativamente menores para esa fracción. En ese estudio de comunidades asociadas al consumo de rastrojos de arroz marcados con ^{13}C , las fracciones pesadas de la incubación con $^{13}\text{CH}_4$ formaron un cluster en el gráfico PCoA y se separaron de las fracciones livianas de ambas incubaciones, como también se observó en este trabajo (Figura 23).

De esta forma se constata que se logró la optimización de la técnica y que la implementación de la misma fue exitosa, de acuerdo a los resultados reportados por otros investigadores y lo descrito en este capítulo.

2.4.2 Estudio de la comunidad activa por secuenciación de genes 16S ARNr

El uso de la secuenciación masiva del gen 16S ARNr para estudiar la estructura de la comunidad microbiana de las fracciones de ADN obtenidas por la técnica SIP, nos permitió vincular la actividad metabólica de la comunidad con su composición genómica y, de esta forma, ganar conocimiento en la composición y diversidad de las comunidades bacteriana y metanótrofa activas en suelo rizosférico de arroz bajo distintas rotaciones agrícolas.

En la comunidad activa del suelo rizosférico de arroz en estudio se observaron representantes de distintas familias asociadas a la metanotrofia, tanto del orden *Alphaproteobacteria* (tipo II) como *Gammaproteobacteria* (tipo I). Las secuencias asignadas a metanótrofos tipo II dominaron la comunidad en el suelo rizosférico original como se detalló en el capítulo 1 de esta tesis. Si bien la incubación con metano en microcosmos provocó un aumento de la abundancia relativa de secuencias del gen 16S ARNr correspondientes a metanótrofos tipo I, como también sucedió en el experimento SIP realizado por Zheng et al. (2014), se mantuvo e intensificó la dominancia de los tipo II asociados al género *Methylocystis*, en todas las fracciones estudiadas. Mientras que en los suelos rizosféricos representó el 79–89% de la comunidad metanótrofa en la rotación de arroz continuo (R1) y el 37% en la rotación arroz-pasturas (R41), en la comunidad metanótrofa activa representó el 90 y 88% respectivamente. Este aumento en la abundancia del género *Methylocystis* en los suelos rizosféricos de la rotación arroz-pasturas puede estar asociado a características del suelo como el pH (como se describió en la sección 1.4.3), ya que otros autores observaron un aumento significativo de

la abundancia relativa de dicho género al incubar suelos con pH bajo, con agregado de metano marcado para la técnica SIP (Zhao et al., 2020). Se obtuvieron un total de 27 ASV distintas afiliadas al género *Methylocystis*, de los cuales ocho se encontraron en forma exclusiva o enriquecidos en los suelos rizosféricos de la rotación arroz continuo, mientras que cuatro se enriquecieron en los de la rotación arroz-pasturas. Metanótrofos pertenecientes a este género de la familia *Beijerinckiaceae* ya fueron encontrados como predominantes en suelo de arroz (Eller y Frenzel, 2001; Shiau et al., 2018; Shrestha et al., 2008) y en la comunidad activa de dicho ecosistema (Murase y Frenzel, 2007; Sultana et al., 2019), así como de raíces de arroz (Qiu et al., 2009) utilizando la técnica SIP. En la comunidad metanótrofa activa el siguiente grupo predominante fue *Methylosinus*, metanótrofo perteneciente también a la familia *Beijerinckiaceae*, que se ha asociado a suelos con pH menor a 6 (Knief et al., 2003) e incluso se ha encontrado dominando la comunidad activa de un suelo ácido de arroz (Shiau et al., 2018). La presencia de esta familia de oxidantes de metano en suelo de arroz es esperable ya que ha sido observado en numerosos trabajos (Ma et al., 2013; Luke et al., 2014; Shiau et al., 2018; Jiang et al., 2022), pero por el contrario su predominancia en las fracciones pesadas de la incubación con $^{13}\text{CH}_4$ no ha sido tan reportada. Qiu et al. (2008), a diferencia de lo observado aquí, constataron que la oxidación de metano en rizósfera de arroz *in situ* se debe principalmente a metanótrofos de tipo I; lo mismo fue observado por Shrestha et al. (2008) al realizar PLFA-SIP de rizósfera de arroz.

Como se vio en la sección 1.3.6, los géneros metanótrofos predominantes en la comunidad de las rizósferas originales fueron *Methylocystis*, *Methylocella* y *Methylobacter*. El género *Methylobacter* si bien se encontró en la comunidad activa y en una abundancia relativa mayor que en la rizósfera original, no se encontró como dominante en las incubaciones, lo que puede deberse a la influencia de las condiciones de incubación las cuales podrían estar favoreciendo a otros géneros sobre éste. Otro es el caso del género *Methylocella* el cual, a pesar de ser el género metanótrofo dominante (44–60%) en los suelos originales de la rotación arroz-pasturas, no se encontró presente en las fracciones pesadas (ninguna secuencia asignada a este género) lo que sugiere que no estaría activo asimilando carbono a partir del metano, al menos en las condiciones de este ensayo. Otra explicación podría ser que este género esté siendo superado por otros metanótrofos de crecimiento más rápido pudiendo distorsionar la abundancia relativa de los organismos activos (He et al., 2012; McDonald et al., 2005), ya que se ha reportado que este género es de crecimiento más lento que otros metanótrofos (Farhan Ul Haque et al., 2020). Por otro lado, *Methylocella* presenta

una característica particular, dado que fue el primer metanótrofo facultativo descrito, es decir que puede obtener carbono y energía no solo del metano y metanol sino también de otros sustratos con más de un carbono incluyendo ácidos orgánicos y alcoholes (Dedysh et al., 2005). Se ha observado que en presencia de acetato (producto de fermentación presente en suelos inundados) este es consumido preferentemente por *Methylocella*, dando como resultado una tasa de crecimiento y una eficiencia de conversión de carbono mayores respecto al consumo de metano (Dedysh et al., 2005), lo que puede explicar que no se encuentre consumiendo metano activamente. Si bien se ha reportado su presencia en raíces de arroz (Bao et al., 2014), no suele encontrarse en las comunidades metanótroficas asociadas a esta planta (Luke y Frenzel, 2011b). En un experimento de ADN-SIP realizado con sedimentos de lagos del ártico por He et al. (2012) también obtuvieron secuencias asignadas al género *Methylocella* en la comunidad total pero no en la activa. En esta tesis lo mismo sucedió con un taxón de la familia *Methyloiligellaceae* presente en la comunidad del suelo rizosférico y en la fracción liviana, que no fue detectado en la fracción pesada, además de que no se vio enriquecido en el transcurso de la incubación por lo que se encontró en la misma abundancia en la comunidad de las fracciones livianas del SIP y en el suelo rizosférico original.

La intensificación del uso del suelo tiene un gran efecto sobre las comunidades que lo habitan (como se describió en el Capítulo 1), sin embargo, poco se ha estudiado el efecto sobre las comunidades activas. En este trabajo se logró identificar un grupo de metanótrofos activos en rizósfera de plantas de arroz en condiciones de microcosmos (detallados en la Tabla A7 del Apéndice VII), no necesariamente representativo de las condiciones en el suelo de arrozales *in situ*, dadas las concentraciones de metano impuestas en el ensayo y el sesgo de enriquecimiento. En consonancia con nuestra hipótesis la composición de la comunidad bacteriana asociada a la fracción pesada de ^{13}C -ADN presentó diferencias para las dos rotaciones en estudio. El análisis de la composición de la comunidad activa reveló que *Candidatus Methylospira*, *Methyloparacoccus*, *Crenothrix*, *Methyloiterricola* y *Methyloglobulus* fueron los taxones mayormente diferenciados entre las dos rotaciones, y por lo tanto podrían estar contribuyendo a diferencias en el consumo de metano potencial en ambos suelos rizosféricos. Todos estos taxones corresponden a metanótrofos tipo I, los cuales, si bien en este estudio no fueron dominantes en la comunidad activa, se ha visto que se encuentran más activos en suelos de arroz contribuyendo en mayor medida al potencial de oxidación de metano del suelo (Shiau et al., 2018) independientemente de su abundancia.

La presencia de secuencias no relacionadas a bacterias metanótrofas conocidas en la fracción pesada de la incubación con $^{13}\text{CH}_4$ es uno de los aspectos más complejos de la interpretación de los resultados obtenidos por esta técnica en muestras ambientales. Diferentes trabajos que han empleado la técnica con $^{13}\text{CH}_4$ han reportado secuencias de organismos no metanótrofos cuya relación con bacterias oxidantes de metano puede ser explicada, sin embargo, se han encontrado secuencias de organismos cuyo rol en la oxidación de metano no es clara (McDonald et al., 2005). En cuanto a la diversidad bacteriana de las fracciones pesadas con ^{13}C obtenidas en este trabajo en comparación con el resto de las fracciones (Figuras 24 y 25), se observó no solo la presencia y enriquecimiento en metanótrofos sino también metilótrofos conocidos (*Hyphomicrobium*) y otros grupos filogenéticos sin vínculo conocido con procesos metilótrofos (como las clases *Bdellovibrionia*, *Gemmatimonadetes* y *Actinobacteria*). La familia *Gemmatimonadaceae* pertenece al phylum *Gemmatimonadetes* el cual comprende aproximadamente el 2% de las comunidades bacterianas del suelo si bien poco se conoce de su ecología (DeBruyn et al., 2011). Kaupper et al. (2022) estudió una red de interacciones establecidas en torno al metano en comunidades naturales complejas, encontrando en suelo de arroz una correlación positiva entre los taxones asignados a géneros metanótrofos y a la familia *Gemmatimonadaceae*. Se han encontrado secuencias asignadas a esta familia en la comunidad activa de diversos experimentos (Qiu et al., 2008; He et al., 2012; Deng et al., 2018), siendo posibles explicaciones la contaminación de la fracción pesada con ^{12}C -ADN y/o la alimentación cruzada de compuestos con ^{13}C , aunque se ha planteado la opción de que puedan corresponder a nuevos géneros o especies metanótrofas (Deng et al., 2018). En la misma línea, se observó la presencia en la comunidad activa de los suelos rizosféricos de ambas rotaciones, del género *Mycobacterium* perteneciente al phylum *Actinobacteria*, dentro del cual Van Spanning et al. (2022) recientemente ha reportado una especie metanótrofa. Dicho trabajo reporta también que esta especie, única hasta el momento con capacidad de oxidación aerobia de metano fuera de los phylum *Proteobacteria* y *Verrucomicrobia*, podría abundar en ambientes con bajo pH y alta concentración de metano.

Por otro lado, se observaron grupos que se vinculan con la comunidad metanótrofa de forma diversa. Se constató la presencia de secuencias asignadas a *Hyphomicrobium* sp., metilótrofos no metanótrofos miembros de la clase *Alphaproteobacteria*, que ya se han encontrado como contaminante formando consorcios en enriquecimientos de metanótrofos (Calhoun y King, 1998), seguramente creciendo a partir de los metabolitos liberados de la oxidación de metano. Esto refleja asociaciones entre grupos microbianos relacionadas con

el ciclo del metano y una posible cadena trófica derivada del mismo. Los metilótrofos no metanótrofos son capaces de crecer sobre varios sustratos de carbono como el metanol, aminas metiladas, formaldehído entre otros (Lueders et al., 2004b). Por ende, la presencia de la familia *Hyphomicrobiaceae* es un indicio de que podría haber ocurrido alimentación cruzada, aunque esto no interferiría con la interpretación de los resultados obtenidos sobre los metanótrofos rizosféricos activos en esta tesis. Miembros de esta familia se encontraron también en análisis de ADN-SIP y ARN-SIP de suelos y sedimentos de diversos ambientes (Dumont et al., 2011; Deng et al., 2016; do Carmo Linhares et al., 2021) e incluso en suelo rizosférico de arroz (Qiu et al., 2008).

En cuanto a los grupos no metilótrofos se encontró *Bdellovibrio* sp. un conocido predador de bacterias gram negativas que fue detectado en la fracción activa en otros experimentos (Morris et al., 2002; Murase y Franzel, 2007), al igual que *Cytophaga* sp. (Morris et al., 2002; Radajewski y Murrell, 2002). Según se ha reportado en ambos casos, el marcado de estos organismos puede ser resultado de la predación. Otro taxón enriquecido en estas fracciones fue uno sin clasificar asignado al orden 0319-6G20, este orden se encuentra en el mismo phylum que *Bdellovibrio* (*Bdellovibrionota*) pero dentro de la clase *Oligoflexia*, aunque poco se sabe de este grupo candidato (Waite et al., 2020). Por último, enriquecidos en la comunidad activa se observaron representantes del orden *Gaiellales* un linaje taxonómico del phylum *Actinobacteria* representado por un único género, *Gaiella* aerobio y quimioheterótrofo, pero difícil de cultivar (Chen et al., 2021). Secuencias asociadas a este phylum también fueron detectadas en las fracciones pesadas ¹³C-ADN de otros trabajos con SIP (Lueders et al., 2004b; He et al., 2012; Deng et al., 2016), ya que este grupo no incluye metanótrofos conocidos este suceso podría estar asociado a un flujo de C derivado del metano durante la incubación (Qiu et al., 2008).

La técnica ADN-SIP seguida del análisis de secuenciación del gen 16S ARNr, demostró ser una herramienta adecuada para detectar microorganismos activos relacionados directa o indirectamente con la oxidación aerobia de metano en microcosmos.

Conclusiones generales

En este trabajo se estudió la abundancia, composición y actividad de la comunidad de bacterias oxidantes de metano asociadas a plantas de arroz provenientes de un ensayo de campo a largo plazo establecido en INIA Treinta y Tres (estación experimental Paso de la Laguna, Treinta y Tres, Uruguay). Se determinó la dinámica de la abundancia y potencial metanótrofo de suelo y rizósfera de arroz proveniente de tres rotaciones arroceras (arroz continuo, arroz-pasturas y arroz-soja) a lo largo del ciclo de cultivo. Los resultados obtenidos indican que la rotación agrícola afectó la abundancia de genes marcadores de metanotrofia (gen *pmoA*), mientras que en el caso del potencial de oxidación de metano (POM) este presentó diferencias entre etapas del cultivo, pero no entre rotaciones. El cultivo de arroz intensivo (R1) fue la rotación que presentó la mayor abundancia de bacterias oxidantes de metano independientemente de la etapa de crecimiento de la planta. Asimismo, aunque no fue estadísticamente significativo, se observó una tendencia a mayores valores de POM en esa rotación en la etapa de macollaje. Por otro lado, el arroz de segundo año de la rotación arroz-pasturas (R42) fue la fase de las rotaciones estudiadas que mostró el menor POM, así como una tendencia a menores abundancias de estos microorganismos. La etapa de macollaje fue la que presentó mayores valores de POM para todas las rotaciones.

Además de la etapa del cultivo y la rotación arroceras, el contenido de amonio tuvo un efecto en el potencial de oxidación de metano, observándose una fuerte correlación entre ambos parámetros. El ensayo realizado mostró que el efecto del contenido de amonio sobre el POM fue dependiente de la concentración basal de amonio presente en el suelo y la concentración final luego del agregado. Al pasar de concentraciones del orden de 0,06 mM a concentraciones cercanas a 0,25 o 0,55 mM de amonio se observó una estimulación de la actividad potencial, mientras que concentraciones más altas de amonio (10 mM) mostraron un efecto inhibitorio.

La secuenciación de amplicones dirigida al gen 16S ARNr del dominio *Bacteria* permitió estudiar la estructura y diversidad de las comunidades microbianas establecidas en los suelos rizosféricos originales provenientes de las rotaciones arroz continuo y arroz-pasturas. Respecto a la comunidad bacteriana total, no se observaron diferencias en diversidad ni composición entre las rotaciones, al menos a niveles taxonómicos altos. Los phyla *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Acidobacteriota* y *Actinobacteriota* fueron los más abundantes

en ambas comunidades. En contraste, las comunidades metanótrofas a nivel rizosférico fueron diferentes, siendo los géneros *Methylocystis* y *Methylocella* los dominantes en las rotaciones arroz continuo y arroz-pasturas respectivamente. La presencia de *Methylocella* en la comunidad metanótrofa rizosférica de arroz no ha sido descrita en otros trabajos.

Por otra parte, en esta tesis se logró optimizar exitosamente la técnica ADN- *Stable Isotope Probing*. Mediante incubaciones en microcosmos con $^{13}\text{CH}_4$, se compararon las comunidades metanótrofas rizosféricas activas de plantas de arroz de dos rotaciones contrastantes: arroz continuo y arroz-pasturas. El estudio realizado permitió concluir que la comunidad metanótrofa que se encuentra activa es diferente a la comunidad metanótrofa total presente en suelo rizosférico y presenta diferencias en sus taxones minoritarios entre rotaciones.

A partir de los resultados obtenidos por ADN-SIP también fue posible comparar la comunidad bacteriana rizosférica total de arroz, en monocultivo y en rotación con pasturas, con la comunidad activa asociada al consumo de metano. Estas comunidades fueron significativamente diferentes, en diversidad y estructura, jugando un papel relevante en esta diferencia las ASV minoritarias, tal como han reportado otros autores respecto al rol de miembros minoritarios en la respuesta de la comunidad a cambios ambientales, siendo más sensibles a estos factores. En este análisis se encontraron numerosos taxones bacterianos enriquecidos diferencialmente en la comunidad bacteriana total o en la activa. Los phyla *Bacilli*, *Planctomycetes*, *Acidobacteria* y *Clostridia*, se encontraron en mayor abundancia en la comunidad bacteriana total del suelo de las dos rotaciones secuenciadas. Por otro lado, taxones asignados a *Verrucomicrobia*, *Alphaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*, así como otros relacionados a bacterias predadoras como *Oligoflexia* y *Bdellovibrio*, se vieron enriquecidos en la comunidad bacteriana activa. Algunos grupos microbianos que se encontraron en mayor abundancia en la comunidad activa, como los relacionados a los órdenes *Rhodospirillales* y *Methylococcales*, así como géneros metanótrofos del orden *Rhizobiales*, presentaron una abundancia relativa en la comunidad bacteriana rizosférica total menor a 1%, lo que indicaría que grupos bacterianos poco frecuentes o minoritarios en la comunidad total pueden estar activos y ser claves en el ciclo del carbono.

Los géneros *Methylocystis* y *Methylocella*, dominantes en la comunidad metanótrofa total de los suelos rizosféricos, tienen ambos la particularidad de ser metanótrofos facultativos, lo que les confiere una versatilidad metabólica y ventaja competitiva en estos ambientes donde

la concentración de metano es variable y el acetato se presenta como un sustrato alternativo. Sin embargo, en la comunidad activa asociada al consumo de metano *Methylocystis* fue el género ampliamente dominante en ambas rotaciones, lo que indica que pese a su capacidad para utilizar otros sustratos efectivamente se encuentra consumiendo metano. Contrariamente, *Methylocella* no se encontró en la comunidad activa por lo que no estaría consumiendo activamente metano en las condiciones del ensayo. Se ha demostrado que especies de este género consumen acetato preferentemente y solo comienzan a oxidar metano cuando el acetato se agotó en el sistema, por lo que, en las condiciones del ensayo de incubación realizado, este podría ser un factor que explique su ausencia en la comunidad metanótrofa activa.

Las comunidades metanótrofas rizosféricas activas provenientes de las dos rotaciones en estudio también presentaron diferencias. De acuerdo con el análisis de abundancias diferenciales realizado, géneros metanótrofos de tipo I (clase *Gammaproteobacteria*) fueron responsables de las diferencias observadas. Mientras los géneros *Candidatus Methylospira*, *Methyloparacoccus* y *Crenothrix* se encontraron en mayor abundancia en la rotación arroz continuo, *Methyloiterricola* y *Methyloglobulus* fueron más abundantes en la rotación arroz-pasturas. Estas bacterias identificadas en la comunidad activa contribuyen al consumo de metano en la interfase óxica-anóxica de la rizósfera de arroz por lo que tienen una función ecológica importante en la regulación de las emisiones atmosféricas de GEI. Pero además en el caso de *Methylocystis* y de miembros del género *Methyloglobulus* la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico les confiere una ventaja, y asociados a la planta de arroz podrían estar promoviendo el crecimiento vegetal. Los géneros *Candidatus Methylospira* y *Crenothrix* prefieren ambientes con concentraciones bajas de oxígeno y altas de metano, demostrando el potencial de estos metanótrofos para participar activamente de los gradientes ambientales que se establecen en ambientes como el suelo de arroz inundado, lo que explicaría su presencia en la rotación de arroz continuo. Las diferencias en las comunidades establecidas en las dos rotaciones podrían estar contribuyendo a las variaciones en su potencial de oxidación de metano, aunque hay que considerar que las tendencias en la actividad potencial no siempre pueden verse reflejadas en cambios en la comunidad.

En este trabajo se evidenció la importancia de la secuenciación masiva del gen 16S ARNr en el estudio de comunidades metanótrofas, de forma de poder relevar géneros metanótrofos que no presentan el gen *pmoA* o presentan dificultad para ser detectados secuenciando dicho gen, como pueden ser *Methylocella* y *Crenothrix*, respectivamente, ambos géneros presentes

en las comunidades bacterianas estudiadas. Cabe destacar que estos grupos tampoco estarían siendo considerados en la determinación de la abundancia de metanótrofos por cuantificación del gen *pmoA*, lo que constituye una limitación del análisis realizado. Este gen marcador funcional es ampliamente utilizado sobre todo en ambientes como suelo de arroz donde *Methylocella* y *Methyloferula* no suelen ser dominantes, sin embargo, en este trabajo *Methylocella* se encontró en la comunidad bacteriana de los suelos rizosféricos de arroz, e incluso en forma dominante en la comunidad metanótrofa del suelo de arroz en rotación con pasturas.

Por otro lado, dado que el experimento en microcosmos utilizado en la técnica ADN-SIP se realizó en condiciones determinadas por la temperatura de incubación, concentración de metano y de oxígeno, de acuerdo con las utilizadas en el ensayo del potencial de oxidación de metano, estos resultados pueden no reflejar las condiciones que los microorganismos experimentan *in situ* pudiendo favorecer el crecimiento de algunos grupos bacterianos o determinadas interacciones entre ellos. La detección de determinados grupos bacterianos en la comunidad activa podría deberse no solo a sus potenciales funciones en el metabolismo del metano sino también a su adaptación a las condiciones ambientales cambiantes durante el crecimiento de la planta. Debido a la capacidad de algunos metanótrofos de formar estructuras de resistencia que persisten en los suelos, cambios en las condiciones del ambiente podrían seleccionar y activar diferentes grupos moldeando de esta forma la comunidad establecida. Por lo tanto, diferencias entre la comunidad presente y la activa podría indicar que ciertos organismos se activaron en diferentes momentos del ciclo bajo condiciones ambientales óptimas.

En el contexto de la intensificación en Uruguay, este trabajo mostró que el uso de diferentes rotaciones arroceras induce cambios en la composición de la comunidad metanótrofa tanto total como activa, así como en su abundancia y en menor medida en su actividad potencial. Los microorganismos activos, representan solo una pequeña fracción de la comunidad bacteriana total y participan en la utilización de metano actuando como impulsores de los procesos biogeoquímicos del suelo asociados al carbono. El estudio de estos grupos activos provee información más precisa sobre los microorganismos funcionales en el microbioma del suelo. Esta tesis constituye el primer estudio del efecto de la intensificación en la comunidad metanótrofa activa determinada por ADN-SIP y contribuye al conocimiento de la oxidación aerobia de metano en suelos de arroz de Uruguay.

Perspectivas

Sería interesante estudiar, mediante secuenciación del gen 16S ARNr y del gen *pmoA*, la estructura y diversidad de las comunidades total y metanótrofa de suelo rizosférico proveniente de las tres rotaciones arroceras estudiadas (arroz-pasturas, arroz continuo y arroz-soja). Esto permitiría completar el estudio de la dinámica de la abundancia y potencial metanótrofo ya determinados a lo largo de las etapas del cultivo, conocer la estructura y diversidad de la comunidad rizosférica de la rotación arroz-soja y determinar si se observan cambios en la comunidad entre rotaciones y durante el ciclo.

Dada la relevancia que parece tener el género *Methylocella* en rizósfera de una de las rotaciones arroceras estudiadas, sería importante hacer un relevamiento por qPCR del gen *mmoX* en la comunidad total presente en suelos rizosféricos de las tres rotaciones y en la comunidad activa obtenida por la técnica SIP, para evaluar el rol que podría estar desempeñando la enzima sMMO en la oxidación de metano en suelo rizosférico de arroz.

Respecto al ensayo para evaluar el efecto del amonio, sería interesante evaluar si los distintos potenciales de oxidación de metano obtenidos responden a cambios en la comunidad activa mediante estudios basados en ARN.

Por último, se podrían complementar los estudios realizados con un enfoque transcriptómico, de forma de poder evaluar los microorganismos que se encuentran presentes y se activan en esas condiciones ambientales. En este caso, la cuantificación de los genes *pmoA* y *mmoX* en los transcriptos podría aportar más información de la relevancia de estas enzimas en la actividad oxidante de metano de la comunidad metanótrofa rizosférica. Asimismo, avanzando un paso más en las tecnologías ómicas, sería interesante realizar un estudio de metaproteómica de forma de obtener un conocimiento más vasto de la diversidad funcional de la comunidad microbiana. Este abordaje permitiría conocer los procesos metabólicos que están ocurriendo asociados no solo al ciclo del carbono sino también al ciclo del nitrógeno. Por ejemplo, la fijación de nitrógeno, proceso llevado a cabo por algunas metanótrofas y de gran relevancia en la sustentabilidad de los cultivos, que podría explicar el rol de este grupo asociado a la planta de arroz y permitir un mayor entendimiento de la contribución de esta comunidad al funcionamiento del ecosistema, a lo largo de las etapas del cultivo y en las distintas rotaciones.

Referencias bibliográficas

- ACA (2020) Arroz. Asociación de cultivadores de arroz. Revista N° 101 <https://www.aca.com.uy/revista-no-101/>
- ACA (2023) Arroz. Asociación de cultivadores de arroz. Revista N° 107 <https://www.aca.com.uy/revista-no-107/>
- ACA. (2018). Guía de Buenas Prácticas en el Cultivo de Arroz en Uruguay. Consultado el 22 de setiembre de 2022, desde <http://www.aca.com.uy/>
- Adamczyk, J., Hesselsoe, M., Iversen, N., Horn, M., Lehner, A., Nielsen, P. H., Schloter, M., Roslev, P., & Wagner, M. (2003). The isotope array, a new tool that employs substrate-mediated labeling of rRNA for determination of microbial community structure and function. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), 6875–6887. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.11.6875-6887.2003>
- Alam, M. S., & Jia, Z. (2012). Inhibition of methane oxidation by nitrogenous fertilizers in a paddy soil. *Frontiers in Microbiology*, 3, 246. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00246>
- Alpana, S., Vishwakarma, P., Adhya, T. K., Inubushi, K., & Dubey, S. K. (2017). Molecular ecological perspective of methanogenic archaeal community in rice agroecosystem. *The Science of the Total Environment*, 596–597, 136–146. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.011>
- Aronson, E. L., & Helliker, B. R. (2010). Methane flux in non-wetland soils in response to nitrogen addition: A meta-analysis. *Ecology*, 91(11), 3242–3251. <https://doi.org/10.2307/20788157>
- Asakawa, S. (2021). Ecology of methanogenic and methane-oxidizing microorganisms in paddy soil ecosystem. *Soil Science and Plant Nutrition*, 67(5), 520–526. <https://doi.org/10.1080/00380768.2021.1953355>
- Aulakh, M. S., Wassmann, R., Bueno, C., Kreuzwieser, J., & Rennenberg, H. (2001). Characterization of Root Exudates at Different Growth Stages of Ten Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars. *Plant Biology*, 3(02), 139–148. <https://doi.org/10.1055/s-2001-12905>
- Baani, M., & Liesack, W. (2008). Two isozymes of particulate methane monooxygenase with different methane oxidation kinetics are found in *Methylocystis* sp. strain SC2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(29), 10203–10208. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702643105>
- Bao, Z., Okubo, T., Kubota, K., Kasahara, Y., Tsurumaru, H., Anda, M., Ikeda, S., & Minamisawa, K. (2014). Metaproteomic identification of diazotrophic methanotrophs and their localization in root tissues of field-grown rice plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(16), 5043–5052. <https://doi.org/10.1128/AEM.00969-14>
- Barnes, R. O., & Goldberg, E. D. (1976). Methane production and consumption in anoxic marine sediments. *Geology*, 4(5), 297. [https://doi.org/10.1130/0091-7613\(1976\)4<297:mpacia>2.0.co;2](https://doi.org/10.1130/0091-7613(1976)4<297:mpacia>2.0.co;2)
- Bédard, C., & Knowles R. (1989). Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH₄, NH₄⁺, and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. *Microbiol Rev.* 1989 Mar;53(1):68-84. doi: 10.1128/mr.53.1.68-84.1989. PMID: 2496288; PMCID: PMC372717.

- Benintende, S. M., Benintende, M. C., Sterren, M. A., & De Battista, J. J. (2008). Soil microbiological indicators of soil quality in four rice rotations systems. *Ecological Indicators*, 8(5), 704–708. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2007.12.004>
- Bodelier, P. L., & Frenzel, P. (1999). Contribution of methanotrophic and nitrifying bacteria to CH₄ and NH₄⁺ oxidation in the rhizosphere of rice plants as determined by new methods of discrimination. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5), 1826–1833. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.5.1826-1833.1999>
- Bodelier, P. L., & Laanbroek, H. J. (2004). Nitrogen as a regulatory factor of methane oxidation in soils and sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, 47(3), 265–277. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00304-0](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00304-0)
- Bodelier, P. L., Meima-Franke, M., Hordijk, C. A., Steenbergh, A. K., Hefting, M. M., Bodrossy, L., von Bergen, M., & Seifert, J. (2013). Microbial minorities modulate methane consumption through niche partitioning. *The ISME Journal*, 7(11), 2214–2228. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.99>
- Bodelier, P. L., Roslev, P., Henckel, T., & Frenzel, P. (2000). Stimulation by ammonium-based fertilizers of methane oxidation in soil around rice roots. *Nature*, 403(6768), 421–424. <https://doi.org/10.1038/35000193>
- Boschker, H., Nold, S., Wellsbury, P., Bos, D., de Graaf, W., Pel, R., Parkes, R. J., & Cappenberg, T. E. (1998). Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by ¹³C-labelling of biomarkers. *Nature* 392, 801–805. <https://doi.org/10.1038/33900>
- Bowman, J. (2006). The Prokaryotes || The Methanotrophs — The Families Methylococcaceae and Methylocystaceae. (Chapter 3.1.14), 266–289. doi:10.1007/0-387-30745-1_15
- Breidenbach, B., Blaser, M. B., Klose, M., & Conrad, R. (2016). Crop rotation of flooded rice with upland maize impacts the resident and active methanogenic microbial community. *Environmental Microbiology*, 18(9), 2868–2885. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13041>
- Breidenbach, B., Brenzinger, K., Brandt, F. B., Blaser, M. B., & Conrad, R. (2017). The effect of crop rotation between wetland rice and upland maize on the microbial communities associated with roots. *Plant and Soil*, 419(1), 435–445. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3351-5>
- Breidenbach, B., & Conrad, R. (2014). Seasonal dynamics of bacterial and archaeal methanogenic communities in flooded rice fields and effect of drainage. *Frontiers in Microbiology*, 5, 752. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00752>
- Breidenbach, B., Pump, J., & Dumont, M. G. (2015). Microbial Community Structure in the Rhizosphere of Rice Plants. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1537. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01537>
- Butler, J. L., Williams, M. A., Bottomley, P. J., & Myrold, D. D. (2003). Microbial community dynamics associated with rhizosphere carbon flow. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), 6793–6800. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.11.6793-6800.2003>
- Cabrol, L., Thalasso, F., Gandois, L., Sepulveda-Jauregui, A., Martinez-Cruz, K., Teisserenc, R., Tananaev, N., Tveit, A., Svenning, M. M., & Barret, M. (2020). Anaerobic oxidation of methane and associated microbiome in anoxic water of Northwestern Siberian lakes. *The Science of the Total Environment*, 736, 139588. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139588>

- Cai, Y., Zheng, Y., Bodelier, P. L. E., Conrad, R., & Jia, Z. (2016). Conventional methanotrophs are responsible for atmospheric methane oxidation in paddy soils. *Nature Communications*, 7, 11728. <https://doi.org/10.1038/ncomms11728>
- Cai, Y., Zhou, X., Shi, L., & Jia, Z. (2020). Atmospheric Methane Oxidizers Are Dominated by Upland Soil Cluster Alpha in 20 Forest Soils of China. *Microbial Ecology*, 80(4), 859–871. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01570-1>
- Cai, Z. C., & Mosier, A. R. (2000). Effect of NH₄Cl addition on methane oxidation by paddy soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 32(11), 1537–1545. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00065-1](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00065-1)
- Calhoun, A., & King, G. M. (1998). Characterization of Root-Associated Methanotrophs from Three Freshwater Macrophytes: *Pontederia cordata*, *Sparganium eurycarpum*, and *Sagittaria latifolia*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(3), 1099–1105. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.3.1099-1105.1998>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., & Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 Suppl 1(Suppl 1), 4516–4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>
- Chen, Y. & Murrel, C. (2011) DNA Stable Isotope Probing. In: *Stable Isotope Probing and Related Technologies*. ASM Press.
- Chen, R.-W., He, Y.-Q., Cui, L.-Q., Li, C., Shi, S.-B., Long, L.-J., & Tian, X.-P. (2021). Diversity and Distribution of Uncultured and Cultured Gaiellales and Rubrobacterales in South China Sea Sediments. *Frontiers in Microbiology*, 12, 657072. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.657072>
- Chowdhury, T. R., & Dick, R. P. (2013). Ecology of aerobic methanotrophs in controlling methane fluxes from wetlands. *Applied Soil Ecology: A Section of Agriculture, Ecosystems & Environment*, 65, 8–22. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.12.014>
- Conrad, R., & Rothfuss, F. (1991). Methane oxidation in the soil surface layer of a flooded rice field and the effect of ammonium. *Biology and Fertility of Soils*, 12(1), 28–32. <https://doi.org/10.1007/bf00369384>
- Conrad, Ralf. (2007). Microbial Ecology of Methanogens and Methanotrophs. In *Advances in Agronomy* (Vol. 96, pp. 1–63). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(07\)96005-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(07)96005-8)
- Corres, A., Gilsanz, J. C., Silvera, M., Arbolea, J. & Leoni, C. (2015) Abonos verdes, enmiendas orgánicas y mínimo laboreo: alternativas para mejorar la salud del suelo y potenciar la producción hortícola. *Revista INIA* 2015. No42. 31-37
- Costello, A. M., & Lidstrom, M. E. (1999). Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), 5066–5074. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.11.5066-5074.1999>

- Coyotzi, S., Pratscher, J., Murrell, J. C., & Neufeld, J. D. (2016). Targeted metagenomics of active microbial populations with stable-isotope probing. *Current Opinion in Biotechnology*, 41, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.02.017>
- Cui, J., Zhao, J., Wang, Z., Cao, W., Zhang, S., Liu, J., & Bao, Z. (2020). Diversity of active root-associated methanotrophs of three emergent plants in a eutrophic wetland in northern China. *AMB Express*, 10(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-00984-x>
- 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(8), 3452–3461. <https://doi.org/10.1111/gcb.14163>
- De Visscher, A., De Pourcq, I., & Chanton, J. (2004). Isotope fractionation effects by diffusion and methane oxidation in landfill cover soils. *Journal of Geophysical Research*, 109 (D18111), 1–8. doi:10.1029/2004JD004857
- Deambrosi, E. (2003). The uruguayan rice production system and its sustainability. In: *Proceedings of the 3rd International Temperate Rice Conference*, Punta del Este, Uruguay, INIA.
- Deambrosi, E. (2007) Rice production situation in Uruguay. *National rice programmes*. (84-85)
- DeBruyn, J. M., Nixon, L. T., Fawaz, M. N., Johnson, A. M., & Radosevich, M. (2011). Global biogeography and quantitative seasonal dynamics of Gemmatimonadetes in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(17), 6295–6300. <https://doi.org/10.1128/AEM.05005-11>
- Dedysh, S. N. (2009). Exploring methanotroph diversity in acidic northern wetlands: Molecular and cultivation-based studies. *Microbiology*, 78(6), 655–669. <https://doi.org/10.1134/S0026261709060010>
- Dedysh, Svetlana N., & Knief, C. (2018). Diversity and Phylogeny of Described Aerobic Methanotrophs. In M. G. Kalyuzhnaya & X.-H. Xing (Eds.), *Methane Biocatalysis: Paving the Way to Sustainability* (pp. 17–42). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-74866-5_2
- Dedysh, Svetlana N., Knief, C., & Dunfield, P. F. (2005). *Methylocella* species are facultatively methanotrophic. *Journal of Bacteriology*, 187(13), 4665–4670. <https://doi.org/10.1128/JB.187.13.4665-4670.2005>
- Deng, Y., Cui, X., & Dumont, M. G. (2016). Identification of active aerobic methanotrophs in plateau wetlands using DNA stable isotope probing. *FEMS Microbiology Letters*, 363(16). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw168>
- Deng, Y., Gui, Q., Dumont, M., Han, C., Deng, H., Yun, J., & Zhong, W. (2018). Methylococcaceae are the dominant active aerobic methanotrophs in a Chinese tidal marsh. *Environmental Science and Pollution Research International*, 26(1), 636–646. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3560-3>
- Ding, L. J., Cui, H. L., Nie, S. A., Long, X. E., Duan, G. L., & Zhu, Y. G. (2019). Microbiomes inhabiting rice roots and rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(5). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz040>

- do Carmo Linhares, D., Saia, F. T., Duarte, R. T. D., Nakayama, C. R., de Melo, I. S., & Pellizari, V. H. (2021). Methanotrophic Community Detected by DNA-SIP at Bertioga's Mangrove Area, Southeast Brazil. *Microbial Ecology*, 81(4), 954–964. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01659-7>
- Dumont, M. G., & Murrell, J. C. (2005). Stable isotope probing - linking microbial identity to function. *Nature Reviews. Microbiology*, 3(6), 499–504. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1162>
- Dumont, M. G., Pommerenke, B., Casper, P., & Conrad, R. (2011). DNA-, rRNA- and mRNA-based stable isotope probing of aerobic methanotrophs in lake sediment. *Environmental Microbiology*, 13(5), 1153–1167. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02415.x>
- Dunfield, P. F., Khmelenina, V. N., Suzina, N. E., Trotsenko, Y. A., & Dedysh, S. N. (2003). *Methylocella silvestris* sp. nov., a novel methanotroph isolated from an acidic forest cambisol. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(Pt 5), 1231–1239. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02481-0>
- Dunfield, P. F., Yuryev, A., Senin, P., Smirnova, A. V., Stott, M. B., Hou, S., Ly, B., Saw, J. H., Zhou, Z., Ren, Y., Wang, J., Mountain, B. W., Crowe, M. A., Weatherby, T. M., Bodelier, P. L. E., Liesack, W., Feng, L., Wang, L., & Alam, M. (2007). Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum Verrucomicrobia. *Nature*, 450(7171), 879–882. <https://doi.org/10.1038/nature06411>
- Edwards, J., Johnson, C., Santos-Medellín, C., Lurie, E., Podishetty, N. K., Bhatnagar, S., Eisen, J. A., & Sundaesan, V. (2015). Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(8), E911–20. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414592112>
- Eller, G., & Frenzel, P. (2001). Changes in activity and community structure of methane-oxidizing bacteria over the growth period of rice. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2395–2403. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2395-2403.2001>
- Eller, Gundula, Krüger, M., & Frenzel, P. (2005). Comparing field and microcosm experiments: a case study on methano- and methylo-trophic bacteria in paddy soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 51(2), 279–291. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.09.007>
- Esson, K. C., Lin, X., Kumaresan, D., Chanton, J. P., Murrell, J. C., & Kostka, J. E. (2016). Alpha- and Gammaproteobacterial Methanotrophs Codominate the Active Methane-Oxidizing Communities in an Acidic Boreal Peat Bog. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(8), 2363–2371. <https://doi.org/10.1128/AEM.03640-15>
- Eusufzai, M. K., Tokida, T., Okada, M., Sugiyama, S. I., Liu, G. C., Nakajima, M., & Sameshima, R. (2010). Methane emission from rice fields as affected by land use change. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 139(4), 742–748. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2010.11.003>
- Farhan Ul Haque, M., Xu, H.-J., Murrell, J. C., & Crombie, A. (2020). Facultative methanotrophs - diversity, genetics, molecular ecology and biotechnological potential: a mini-review. *Microbiology*, 166(10), 894–908. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000977>
- Fernández-Baca, C. P., Rivers, A. R., Kim, W., Iwata, R., McClung, A. M., Roberts, D. P., Reddy, V. R., & Barnaby, J. Y. (2021). Changes in rhizosphere soil microbial communities across plant

developmental stages of high and low methane emitting rice genotypes. *Soil Biology & Biochemistry*, 156, 108233. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108233>

Fernández-Scavino, A., Oreggioni, D., Martínez-Pereyra, A., Tarlera, S., Terra, J. A., & Irisarri, P. (2022). Season and No-Till Rice Crop Intensification Affect Soil Microbial Populations Involved in CH₄ and N₂O Emissions. *Frontiers in Soil Science*, 2. <https://doi.org/10.3389/fsoil.2022.832600>

Ferrando, L. (2013) Factores que afectan la composición y diversidad de la comunidad de bacterias endófitas en arroz (*Oryza sativa*). RIQUIM—Repositorio Institucional de la Facultad de Química—Universidad de la República, Uruguay. <http://riquim.fq.edu.uy/items/show/725>

Ferrando, L., & Tarlera, S. (2009). Activity and diversity of methanotrophs in the soil-water interface and rhizospheric soil from a flooded temperate rice field. *Journal of Applied Microbiology*, 106(1), 306–316. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04004.x>

Ferry, J. G., & Boone, D. R. (2015). *Methanospirillum*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–6). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00511>

Frindte, K., Maarastawi, S. A., Lipski, A., Hamacher, J., & Knief, C. (2017). Characterization of the first rice paddy cluster I isolate, *Methylothermicola oryzae* gen. nov., sp. nov. and amended description of *Methylothermicola ishizawai*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(11), 4507–4514. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002319>

Gilsanz, J. C., & Peralta, G. (2015). Determinación de carbono activo en suelos bajo diferentes situaciones productivas en Uruguay. V Congreso Latinoamericano de Agroecología - SOCLA (7 al 9 de octubre de 2015, La Plata). <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/52665>

Guerrero-Cruz, S., Vaksmaa, A., Horn, M. A., Niemann, H., Pijuan, M., & Ho, A. (2021). Methanotrophs: Discoveries, Environmental Relevance, and a Perspective on Current and Future Applications. *Frontiers in Microbiology*, 12, 678057. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.678057>

Guo, T., Zhang, Q., Ai, C., Liang, G., He, P., Lei, Q., & Zhou, W. (2020). Analysis of microbial utilization of rice straw in paddy soil using a DNA-SIP approach. *Soil Science Society of America Journal*. *Soil Science Society of America*, 84(1), 99–114. <https://doi.org/10.1002/saj2.20019>

Hanson, R. S., & Hanson, T. E. (1996). Methanotrophic Bacteria. *MICROBIOLOGICAL REVIEWS*, 60(2), 439–471. <https://doi.org/10.1128/MMBR.60.2.439-471.1996>

He, D., Zhang, L., Dumont, M. G., He, J.-S., Ren, L., & Chu, H. (2019). The response of methanotrophs to additions of either ammonium, nitrate or urea in alpine swamp meadow soil as revealed by stable isotope probing. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(7). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz077>

He, R., Wooller, M. J., Pohlman, J. W., Catranis, C., Quensen, J., Tiedje, J. M., & Leigh, M. B. (2012). Identification of functionally active aerobic methanotrophs in sediments from an arctic lake using stable isotope probing. *Environmental Microbiology*, 14(6), 1403–1419. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02725.x>

Henckel, T., Jäkel, U., & Conrad, R. (2001). Vertical distribution of the methanotrophic community after drainage of rice field soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 34(3), 279–291. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2001.tb00778.x>

- Henckel, T., Roslev, P., & Conrad, R. (2000). Effects of O₂ and CH₄ on presence and activity of the indigenous methanotrophic community in rice field soil. *Environmental Microbiology*, 2(6), 666–679. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2000.00149.x>
- Hetz, S. A., & Horn, M. A. (2021). Burkholderiaceae Are Key Acetate Assimilators During Complete Denitrification in Acidic Cryoturbated Peat Circles of the Arctic Tundra. *Frontiers in Microbiology*, 12, 628269. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628269>
- Ho, A., Kerckhof, F.-M., Luke, C., Reim, A., Krause, S., Boon, N., & Bodelier, P. L. E. (2013). Conceptualizing functional traits and ecological characteristics of methane-oxidizing bacteria as life strategies. *Environmental Microbiology Reports*, 5(3), 335–345. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2012.00370.x>
- Ho, A., Lüke, C., Reim, A., & Frenzel, P. (2016). Resilience of (seed bank) aerobic methanotrophs and methanotrophic activity to desiccation and heat stress. *Soil Biology & Biochemistry*, 101, 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.07.015>
- Hu, A., & Lu, Y. (2015). The differential effects of ammonium and nitrate on methanotrophs in rice field soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 85, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.02.033>
- IEA, International Energy Agency (2021), Methane Tracker 2021, IEA, Paris. <https://www.iea.org/reports/methane-tracker-2021>, License: CC BY 4.0
- IPCC, 2013: Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1535 pp.
- IPCC, 2021: Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Masson-Delmotte, V., P. Zhai, A. Pirani, S.L. Connors, C. Péan, S. Berger, N. Caud, Y. Chen, L. Goldfarb, M.I. Gomis, M. Huang, K. Leitzell, E. Lonnoy, J.B.R. Matthews, T.K. Maycock, T. Waterfield, O. Yelekçi, R. Yu, and B. Zhou (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 2391 pp. doi:10.1017/9781009157896.
- Jia, Z., Cao, W., & Hernández García, M. (2019). DNA-Based Stable Isotope Probing. *Methods in Molecular Biology*, 2046, 17–29. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9721-3_2
- Jiang, M., Xu, P., Wu, L., Zhao, J., Wu, H., Lin, S., Yang, T., Tu, J., & Hu, R. (2022). Methane emission, methanogenic and methanotrophic communities during rice-growing seasons differ in diversified rice rotation systems. *The Science of the Total Environment*, 842, 156781. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156781>
- Joye, S. B. (2012). Microbiology: A piece of the methane puzzle [Review of Microbiology: A piece of the methane puzzle]. *Nature*, 491(7425), 538–539. Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1038/nature11749>
- Jung, G.-Y., Rhee, S.-K., Han, Y.-S., & Kim, S.-J. (2020). Genomic and Physiological Properties of a Facultative Methane-Oxidizing Bacterial Strain of *Methylocystis* sp. from a Wetland. *Microorganisms*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111719>

- Kang, Y., Walitang, D. I., Seshadri, S., Shin, W.-S., & Sa, T. (2022). Methane Oxidation Potentials of Rice-associated Plant Growth Promoting Methylobacterium Species. *Korean Journal of Environmental Agriculture*, 41(2), 115–124. <https://doi.org/10.5338/KJEA.2022.41.2.15>
- Kaupper, T., Mendes, L. W., Poehlein, A., Frohloff, D., Rohrbach, S., Horn, M. A., & Ho, A. (2022). The methane-driven interaction network in terrestrial methane hotspots. *Environmental Microbiome*, 17(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s40793-022-00409-1>
- Kerou, M., & Schleper, C. (2016). Nitrososphaeraceae. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–2). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00265>
- Kharitonov, S., Semenov, M., Sabrekov, A., Kotsyurbenko, O., Zhelezova, A., & Schegolkova, N. (n.d.). Microbial Communities in Methane Cycle: Modern Molecular Methods Gain Insights into Their Global Ecology. <https://doi.org/10.3390/environments8020016>
- Knief, C. (2015). Diversity and Habitat Preferences of Cultivated and Uncultivated Aerobic Methanotrophic Bacteria Evaluated Based on pmoA as Molecular Marker. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1346. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01346>
- Knief, C., Lipski, A., & Dunfield, P. F. (2003). Diversity and activity of methanotrophic bacteria in different upland soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), 6703–6714. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.11.6703-6714.2003>
- Kögel-Knabner, I., Amelung, W., Cao, Z., Fiedler, S., Frenzel, P., Jahn, R., Kalbitz, K., Kölbl, A., & Schlöter, M. (2010). Biogeochemistry of paddy soils. *Geoderma*, 157(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2010.03.009>
- Kollah, B., Bakoriya, M., Dubey, G., Parmar, R., Somasundaram, J., Shirale, A., Gupta, S. C., Patra, A. K., & Mohanty, S. R. (2020). Methane consumption potential of soybean-wheat, maize-wheat and maize-gram cropping systems under conventional and no-tillage agriculture in a tropical vertisol. *The Journal of Agricultural Science*, 158(1–2), 38–46. <https://doi.org/10.1017/S0021859620000416>
- Le Mer, J., & Roger, P. (2001). Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: A review. *European Journal of Soil Biology*, 37(1), 25–50. [https://doi.org/10.1016/S1164-5563\(01\)01067-6](https://doi.org/10.1016/S1164-5563(01)01067-6)
- Lee, H. J., Jeong, S. E., Kim, P. J., Madsen, E. L., & Jeon, C. O. (2015). High resolution depth distribution of Bacteria, Archaea, methanotrophs, and methanogens in the bulk and rhizosphere soils of a flooded rice paddy. *Frontiers in Microbiology*, 6, 639. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00639>
- Lee, N., Nielsen, P. H., Andreasen, K. H., Juretschko, S., Nielsen, J. L., Schleifer, K. H., & Wagner, M. (1999). Combination of fluorescent in situ hybridization and microautoradiography-a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 1289–1297. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.3.1289-1297.1999>
- Leng, L., Chang, J., Geng, K., Lu, Y., & Ma, K. (2015). Uncultivated Methylocystis Species in Paddy Soil Include Facultative Methanotrophs that Utilize Acetate. *Microbial Ecology*, 70(1), 88–96. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0540-0>

- Li, H., Yu, Y., Guo, J., Li, X., Rensing, C., & Wang, G. (2019). Dynamics of the rice rhizosphere microbial community under continuous and intermittent flooding treatment. *Journal of Environmental Management*, 249, 109326. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109326>
- Li, H., Su, J. Q., Yang, X. R., & Zhu, Y. G. (2019b). Distinct rhizosphere effect on active and total bacterial communities in paddy soils. *The Science of the Total Environment*, 649, 422–430. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.373>
- Li, H., Yang, X., Weng, B., Su, J., Nie, S., Gilbert, J. A., & Zhu, Y. G. (2016). The phenological stage of rice growth determines anaerobic ammonium oxidation activity in rhizosphere soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 100, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.05.015>
- Li, X., Rui, J., Mao, Y., Yannarell, A., & Mackie, R. (2014). Dynamics of the bacterial community structure in the rhizosphere of a maize cultivar. *Soil Biology & Biochemistry*, 68, 392–401. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.10.017>
- Li, Y., Liu, Y., Pan, H., Hernández, M., Guan, X., Wang, W., Zhang, Q., Luo, Y., Di, H., & Xu, J. (2020). Impact of grazing on shaping abundance and composition of active methanotrophs and methane oxidation activity in a grassland soil. *Biology and Fertility of Soils*, 56(6), 799–810. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01461-0>
- Liesack, W., Schnell, S., & Revsbech, N. P. (2000). Microbiology of flooded rice paddies. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(5), 625–645. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00563.x>
- Liu, D., Ishikawa, H., Nishida, M., Tsuchiya, K., Takahashi, T., Kimura, M., & Asakawa, S. (2015). Effect of paddy-upland rotation on methanogenic archaeal community structure in paddy field soil. *Microbial Ecology*, 69(1), 160–168. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0477-3>
- Liu, H., Liu, G., Li, Y., Wu, X., Liu, D., Dai, X., Xu, M., & Yang, F. (2016). Effects of land use conversion and fertilization on CH₄ and N₂O fluxes from typical hilly red soil. *Environmental Science and Pollution Research International*, 23(20), 20269–20280. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7239-3>
- Liu, J., Zang, H., Xu, H., Zhang, K., Jiang, Y., Hu, Y., & Zeng, Z. (2019). Methane emission and soil microbial communities in early rice paddy as influenced by urea-N fertilization. *Plant and Soil*, 445(1), 85–100. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04091-0>
- Lueders, T., Manefield, M., & Friedrich, M. W. (2004). Enhanced sensitivity of DNA- and rRNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients. *Environmental Microbiology*, 6(1), 73–78. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00536.x>
- Lueders, T., Wagner, B., Claus, P., & Friedrich, M. W. (2004b). Stable isotope probing of rRNA and DNA reveals a dynamic methylotroph community and trophic interactions with fungi and protozoa in oxic rice field soil. *Environmental Microbiology*, 6(1), 60–72. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00535.x>
- Luke, C., Bodrossy, L., Lupotto, E., & Frenzel, P. (2011). Methanotrophic bacteria associated to rice roots: the cultivar effect assessed by T-RFLP and microarray analysis. *Environmental Microbiology Reports*, 3(5), 518–525. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00251.x>

- Luke, C., & Frenzel, P. (2011b). Potential of pmoA amplicon pyrosequencing for methanotroph diversity studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(17), 6305–6309. <https://doi.org/10.1128/aem.05355-11>
- Luke, C., Frenzel, P., Ho, A., Fiantis, D., Schad, P., Schneider, B., Schwark, L., & Utami, S. R. (2014). Macroecology of methane-oxidizing bacteria: the β -diversity of pmoA genotypes in tropical and subtropical rice paddies. *Environmental Microbiology*, 16(1), 72–83. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12190>
- Luke, C., Krause, S., Cavigiolo, S., Greppi, D., Lupotto, E., & Frenzel, P. (2010). Biogeography of wetland rice methanotrophs. *Environmental Microbiology*, 12(4), 862–872. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02131.x>
- Lyu, Z., Shao, N., Akinyemi, T., & Whitman, W. B. (2018). Methanogenesis. *Current Biology: CB*, 28(13), R727–R732. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.021>
- Ma, K., Conrad, R., & Lu, Y. (2013). Dry/Wet cycles change the activity and population dynamics of methanotrophs in rice field soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(16), 4932–4939. <https://doi.org/10.1128/AEM.00850-13>
- Ma, K. E., Qiu, Q., & Lu, Y. (2010). Microbial mechanism for rice variety control on methane emission from rice field soil. *Global Change Biology*, 16(11), 3085–3095. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2009.02145.x>
- Ma, K., & Lu, Y. (2011). Regulation of microbial methane production and oxidation by intermittent drainage in rice field soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 75(3), 446–456. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.01018.x>
- Ma, R. C., Chu, Y. X., Wang, J., Wang, C., Leigh, M. B., Chen, Y., & He, R. (2021). Stable-isotopic and metagenomic analyses reveal metabolic and microbial link of aerobic methane oxidation coupled to denitrification at different O₂ levels. *The Science of the Total Environment*, 764, 142901. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142901>
- Macalady, J. L., McMillan, A. M. S., Dickens, A. F., Tyler, S. C., & Scow, K. M. (2002). Population dynamics of type I and II methanotrophic bacteria in rice soils. *Environmental Microbiology*, 4(3), 148–157. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00278.x>
- Macedo, I., Castillo, J., Saldain, N., Martínez, S., Ayala, W., Hernández, J., Serrón, N., Bordagorri, A., Zorrilla, G., & Terra, J. (2016). Nuevas rotaciones arroceras: primeros datos de productividad. *Arroz*, N° 88 (Diciembre), 34–39.
- Macedo, Ignacio, Pravia, M. V., Castillo, J., & Terra, J. A. (2021). Soil organic matter in physical fractions after intensification of irrigated rice-pasture rotation systems. *Soil and Tillage Research*, 213, 105160. <https://doi.org/10.1016/j.still.2021.105160>
- Macedo, Ignacio, Roel, A., Ayala, W., Pravia, M. V., Terra, J. A., & Pittelkow, C. M. (2022). Irrigated rice rotations affect yield and soil organic carbon sequestration in temperate South America. *Agronomy Journal*, 114(2), 961–975. <https://doi.org/10.1002/agj2.20964>
- Maguire, V. G., Bordenave, C. D., Nieva, A. S., Llames, M. E., Colavolpe, M. B., Gárriz, A., & Ruiz, O. A. (2020). Soil bacterial and fungal community structure of a rice monoculture and rice-pasture

rotation systems. *Applied Soil Ecology: A Section of Agriculture, Ecosystems & Environment*, 151, 103535. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103535>

Malyan, S. K., Bhatia, A., Kumar, A., Gupta, D. K., Singh, R., Kumar, S. S., Tomer, R., Kumar, O., & Jain, N. (2016). Methane production, oxidation and mitigation: A mechanistic understanding and comprehensive evaluation of influencing factors. *The Science of the Total Environment*, 572, 874–896. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.182>

McDonald, I. R., Radajewski, S., & Murrell, J. C. (2005). Stable isotope probing of nucleic acids in methanotrophs and methylotrophs: A review. *Organic Geochemistry*, 36(5), 779–787. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2005.01.005>

McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS One*, 8(4), e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>

Mohanty, S. R., Bodelier, P. L. E., & Conrad, R. (2007). Effect of temperature on composition of the methanotrophic community in rice field and forest soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 62(1), 24–31. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00370.x>

Mohanty, S. R., Bodelier, P. L. E., Floris, V., & Conrad, R. (2006). Differential effects of nitrogenous fertilizers on methane-consuming microbes in rice field and forest soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), 1346–1354. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1346-1354.2006>

Mooshammer, M., Kitzinger, K., Schintlmeister, A., Ahmerkamp, S., Nielsen, J. L., Nielsen, P. H., & Wagner, M. (2021). Flow-through stable isotope probing (Flow-SIP) minimizes cross-feeding in complex microbial communities. *The ISME Journal*, 15(1), 348–353. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00761-5>

Morris, S. A., Radajewski, S., Willison, T. W., & Murrell, J. C. (2002). Identification of the functionally active methanotroph population in a peat soil microcosm by stable-isotope probing. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3), 1446–1453. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1446-1453.2002>

Murase, J., & Frenzel, P. (2007). A methane-driven microbial food web in a wetland rice soil. *Environmental Microbiology*, 9(12), 3025–3034. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01414.x>

Murrell, J. C., McDonald, I. R., & Gilbert, B. (2000). Regulation of expression of methane monooxygenases by copper ions. *Trends in Microbiology*, 8(5), 221–225. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(00\)01739-x](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(00)01739-x)

Neufeld, J. D., Dumont, M. G., Vohra, J., & Murrell, J. C. (2007). Methodological considerations for the use of stable isotope probing in microbial ecology. *Microbial Ecology*, 53(3), 435–442. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9125-x>

Neufeld, J. D., Vohra, J., Dumont, M. G., Lueders, T., Manefield, M., Friedrich, M. W., & Murrell, J. C. (2007b). DNA stable-isotope probing. *Nature Protocols*, 2(4), 860–866. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.109>

Noll, M., Frenzel, P., & Conrad, R. (2008). Selective stimulation of type I methanotrophs in a rice paddy soil by urea fertilization revealed by RNA-based stable isotope probing. *FEMS Microbiology Ecology*, 65(1), 125–132. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00497.x>

- Nouchi, I., Mariko, S., & Aoki, K. (1990). Mechanism of Methane Transport from the Rhizosphere to the Atmosphere through Rice Plants. *Plant Physiology*, 94(1), 59–66. <https://doi.org/10.1104/pp.94.1.59>
- Paul, B. G., Ding, H., Bagby, S. C., Kellermann, M. Y., Redmond, M. C., Andersen, G. L., & Valentine, D. L. (2017). Methane-Oxidizing Bacteria Shunt Carbon to Microbial Mats at a Marine Hydrocarbon Seep. *Frontiers in Microbiology*, 8, 186. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00186>
- Pereira-Mora, L., Terra, J. A., & Fernández-Scavino, A. (2022). Methanogenic community linked to organic acids fermentation from root exudates are affected by rice intensification in rotational soil systems. *Applied Soil Ecology: A Section of Agriculture, Ecosystems & Environment*, 176, 104498. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104498>
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & van der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews. Microbiology*, 11(11), 789–799. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>
- Pittelkow, C. M., Zorrilla, G., Terra, J., Riccetto, S., Macedo, I., Bonilla, C., & Roel, A. (2016). Sustainability of rice intensification in Uruguay from 1993 to 2013. *Global Food Security*, 9, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2016.05.003>
- Prosser, J. I., & Nicol, G. W. (2016). *Candidatus Nitrosotalea*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–7). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01292>
- Qiu, Q., Conrad, R., & Lu, Y. (2009). Cross-feeding of methane carbon among bacteria on rice roots revealed by DNA-stable isotope probing. *Environmental Microbiology Reports*, 1(5), 355–361. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00045.x>
- Qiu, Q., Noll, M., Abraham, W.-R., Lu, Y., & Conrad, R. (2008). Applying stable isotope probing of phospholipid fatty acids and rRNA in a Chinese rice field to study activity and composition of the methanotrophic bacterial communities in situ. *The ISME Journal*, 2(6), 602–614. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.34>
- Radajewski, S., Ineson, P., Parekh, N. R., & Murrell, J. C. (2000). Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature*, 403(6770), 646–649. <https://doi.org/10.1038/35001054>
- Radajewski, S., & Murrell, J. C. (2002). Stable isotope probing for detection of methanotrophs after enrichment with $^{13}\text{CH}_4$. *Methods in Molecular Biology*, 179, 149–157. <https://doi.org/10.1385/1-59259-238-4:149>
- Rahman, M. T., Crombie, A., Chen, Y., Stralis-Pavese, N., Bodrossy, L., Meir, P., McNamara, N. P., & Murrell, J. C. (2011). Environmental distribution and abundance of the facultative methanotroph *Methylocella*. *The ISME Journal*, 5(6), 1061–1066. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.190>
- Reim, A., Lüke, C., Krause, S., Pratscher, J., & Frenzel, P. (2012). One millimetre makes the difference: high-resolution analysis of methane-oxidizing bacteria and their specific activity at the oxic-anoxic interface in a flooded paddy soil. *The ISME Journal*, 6(11), 2128–2139. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.57>

- Rhine, E. D., Mulvaney, R. L., Pratt, E. J., & Sims, G. K. (1998). Improving the Berthelot reaction for determining ammonium in soil extracts and water. *Soil Science Society of America Journal*, 62(2), 473. <https://doi.org/10.2136/sssaj1998.03615995006200020026x>
- Rui, J., Peng, J., & Lu, Y. (2009). Succession of bacterial populations during plant residue decomposition in rice field soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(14), 4879–4886. <https://doi.org/10.1128/AEM.00702-09>
- Scavino, A. F., Ji, Y., Pump, J., Klose, M., Claus, P., & Conrad, R. (2013). Structure and function of the methanogenic microbial communities in Uruguayan soils shifted between pasture and irrigated rice fields. *Environmental Microbiology*, 15(9), 2588–2602. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12161>
- Schmidt, H., & Eickhorst, T. (2013). Spatio-temporal variability of microbial abundance and community structure in the puddled layer of a paddy soil cultivated with wetland rice (*Oryza sativa* L.). *Applied Soil Ecology: A Section of Agriculture, Ecosystems & Environment*, 72, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.06.002>
- Shiau, Y.-J., Cai, Y., Jia, Z., Chen, C.-L., & Chiu, C.-Y. (2018). Phylogenetically distinct methanotrophs modulate methane oxidation in rice paddies across Taiwan. *Soil Biology & Biochemistry*, 124, 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.05.025>
- Shrestha, M., Abraham, W.-R., Shrestha, P. M., Noll, M., & Conrad, R. (2008). Activity and composition of methanotrophic bacterial communities in planted rice soil studied by flux measurements, analyses of *pmoA* gene and stable isotope probing of phospholipid fatty acids. *Environmental Microbiology*, 10(2), 400–412. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01462.x>
- Shrestha, M., Shrestha, P. M., & Conrad, R. (2011). Bacterial and archaeal communities involved in the in situ degradation of (13) C-labelled straw in the rice rhizosphere. *Environmental Microbiology Reports*, 3(5), 587–596. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00267.x>
- Shrestha, M., Shrestha, P. M., Frenzel, P., & Conrad, R. (2010). Effect of nitrogen fertilization on methane oxidation, abundance, community structure, and gene expression of methanotrophs in the rice rhizosphere. *The ISME Journal*, 4(12), 1545–1556. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.89>
- Shukla, P. N., Pandey, K. D., & Mishra, V. K. (2013). Environmental Determinants of Soil Methane Oxidation and Methanotrophs. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43(18), 1945–2011. <https://doi.org/10.1080/10643389.2012.672053>
- Smith, G. J., & Wrighton, K. C. (2019). Metagenomic Approaches Unearth Methanotroph Phylogenetic and Metabolic Diversity. In *Methylootrophs and Methylootroph Communities*. Caister Academic Press. <https://doi.org/10.21775/9781912530045.03>
- Soman, C., Li, D., Wander, M. M., & Kent, A. D. (2017). Long-term fertilizer and crop-rotation treatments differentially affect soil bacterial community structure. *Plant and Soil*, 413(1), 145–159. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-3083-y>
- Stein, L. Y., Roy, R., & Dunfield, P. (2012). Aerobic Methanotrophy and Nitrification: Processes and Connections. In eLS. unknown. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0022213>

- Stoecker, K., Bendinger, B., Schöning, B., Nielsen, P. H., Nielsen, J. L., Baranyi, C., Toenshoff, E. R., Daims, H., & Wagner, M. (2006). Cohn's *Crenothrix* is a filamentous methane oxidizer with an unusual methane monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(7), 2363–2367. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506361103>
- Sultana, N., Zhao, J., Cai, Y., Rahman, G. K. M. M., Alam, M. S., Faheem, M., Ho, A., & Jia, Z. (2022). Methanotrophy-driven accumulation of organic carbon in four paddy soils of Bangladesh. *Pedosphere*, 32(2), 348–358. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(20\)60030-3](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(20)60030-3)
- Sultana, N., Zhao, J., Zheng, Y., Cai, Y., Faheem, M., Peng, X., Wang, W., & Jia, Z. (2019). Stable isotope probing of active methane oxidizers in rice field soils from cold regions. *Biology and Fertility of Soils*, 55(3), 243–250. <https://doi.org/10.1007/s00374-018-01334-7>
- Tan, K. H. (2005). *Soil sampling, preparation, and analysis* (2nd edition). CRC press. <https://www.taylorfrancis.com/books/mono/10.1201/9781482274769/soil-sampling-preparation-analysis-kim-tan>
- Tarlera, S., Capurro, M. C., Irisarri, P., Scavino, A. F., Cantou, G., & Roel, A. (2016). Yield-scaled global warming potential of two irrigation management systems in a highly productive rice system. *Scientia Agricola*, 73(1), 43–50. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0050>
- Tate, K. R. (2015). Soil methane oxidation and land-use change – from process to mitigation. *Soil Biology & Biochemistry*, 80, 260–272. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.10.010>
- Theisen, A. R., Ali, M. H., Radajewski, S., Dumont, M. G., Dunfield, P. F., McDonald, I. R., Dedysh, S. N., Miguez, C. B., & Murrell, J. C. (2005). Regulation of methane oxidation in the facultative methanotroph *Methylocella silvestris* BL2. *Molecular Microbiology*, 58(3), 682–692. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04861.x>
- Trivedi, P., Delgado-Baquerizo, M., Anderson, I. C., & Singh, B. K. (2016). Response of Soil Properties and Microbial Communities to Agriculture: Implications for Primary Productivity and Soil Health Indicators. *Frontiers in Plant Science*, 7, 990. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00990>
- Van Spanning, R. J. M., Guan, Q., Melkonian, C., Gallant, J., Polerecky, L., Flot, J.-F., Brandt, B. W., Braster, M., Iturbe Espinoza, P., Aerts, J. W., Meima-Franke, M. M., Piersma, S. R., Bunduc, C. M., Ummels, R., Pain, A., Fleming, E. J., van der Wel, N. N., Gherman, V. D., Sarbu, S. M., ... Bitter, W. (2022). Methanotrophy by a *Mycobacterium* species that dominates a cave microbial ecosystem. *Nature Microbiology*, 7(12), 2089–2100. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01252-3>
- Vishwakarma, P., & Dubey, S. K. (2010). DNA microarray analysis targeting *pmoA* gene reveals diverse community of methanotrophs in the rhizosphere of tropical rice soils. *Current Science*, 99(8), 1090–1095. <http://www.jstor.org/stable/24066118>
- Waite, D. W., Chuvochina, M., Pelikan, C., Parks, D. H., Yilmaz, P., Wagner, M., Loy, A., Naganuma, T., Nakai, R., Whitman, W. B., Hahn, M. W., Kuever, J., & Hugenholtz, P. (2020). Proposal to reclassify the proteobacterial classes Deltaproteobacteria and Oligoflexia, and the phylum Thermodesulfobacteria into four phyla reflecting major functional capabilities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(11), 5972–6016. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004213>

- Wang, G., Watanabe, T., Jin, J., Liu, X., Kimura, M., & Asakawa, S. (2010). Methanogenic archaeal communities in paddy field soils in north-east China as evaluated by PCR-DGGE, sequencing and real-time PCR analyses. *Soil Science and Plant Nutrition*, 56(6), 831–838. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2010.00521.x>
- Watanabe, T., Kimura, M., & Asakawa, S. (2006). Community structure of methanogenic archaea in paddy field soil under double cropping (rice–wheat). *Soil Biology & Biochemistry*, 38(6), 1264–1274. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.09.020>
- Weil, R. R., Islam, K. R., Stine, M. A., Gruver, J. B., & Samson-Liebig, S. E. (2003). Estimating active carbon for soil quality assessment: A simplified method for laboratory and field use. *American Journal of Alternative Agriculture*, 18(1), 3–17. <https://doi.org/10.1079/AJAA200228>
- Xuan, D. T., Guong, V. T., Rosling, A., Alström, S., Chai, B., & Högberg, N. (2012). Different crop rotation systems as drivers of change in soil bacterial community structure and yield of rice, *Oryza sativa*. *Biology and Fertility of Soils*, 48(2), 217–225. <https://doi.org/10.1007/s00374-011-0618-5>
- Yang, N., Lü, F., He, P., & Shao, L. (2011). Response of methanotrophs and methane oxidation on ammonium application in landfill soils. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(5), 1073–1082. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3389-x>
- Yang, Y., Chen, J., Pratscher, J., & Xie, S. (2022). DNA-SIP reveals an overlooked methanotroph, *Crenothrix* sp., involved in methane consumption in shallow lake sediments. *The Science of the Total Environment*, 814, 152742. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152742>
- Yang, Y., Tong, T., Chen, J., Liu, Y., & Xie, S. (2020). Ammonium Impacts Methane Oxidation and Methanotrophic Community in Freshwater Sediment. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 250. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00250>
- Zhang, L., Dumont, M. G., Bodelier, P. L. E., Adams, J. M., He, D., & Chu, H. (2020). DNA stable-isotope probing highlights the effects of temperature on functionally active methanotrophs in natural wetlands. *Soil Biology & Biochemistry*, 149, 107954. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107954>
- Zhao, J., Cai, Y., & Jia, Z. (2020). The pH-based ecological coherence of active canonical methanotrophs in paddy soils. *Biogeosciences*, 17(6), 1451–1462. <https://doi.org/10.5194/bg-17-1451-2020>
- Zheng, Y., Huang, R., Wang, B. Z., Bodelier, P. L. E., & Jia, Z. J. (2014). Competitive interactions between methane- and ammonia-oxidizing bacteria modulate carbon and nitrogen cycling in paddy soil. *Biogeosciences*, 11(12), 3353–3368. <https://doi.org/10.5194/bg-11-3353-2014>
- Zheng, Y., Zhang, L.-M., & He, J.-Z. (2013). Immediate effects of nitrogen, phosphorus, and potassium amendments on the methanotrophic activity and abundance in a Chinese paddy soil under short-term incubation experiment. *Journal of Soils and Sediments*, 13(1), 189–196. <https://doi.org/10.1007/s11368-012-0601-2> INIA Treinta y Tres.

Apéndices

Apéndice I. Muestreos realizados e identificación de las muestras

TABLA A1. Muestreos realizados

Muestreo	Fecha	DAS	Etapas del cultivo	Irrigación
A	23/10/2019	-	Previo a la siembra	No
B	11/12/2019	47	Macollaje	Si (8 días)
C	08/01/2020	75	Primordio	Si (36 días)
D	12/02/2020	110	Floración	Si (71 días)

TABLA A2. Código utilizado para designar a las distintas muestras analizadas. R1: rotación arroz continuo, R41: arroz de primer año de la rotación arroz-pasturas, R42: arroz de segundo año de la rotación arroz-pasturas, R6: rotación arroz-soja.

Código	Material	Rotación	Bloque	Muestreo	Código	Material	Rotación	Bloque	Muestreo
S1IA	Suelo	R1	1	Previo a la siembra	Rh1IC	Rizósfera	R1	1	Primordio
S1IIA	Suelo	R1	2	Previo a la siembra	Rh1IIC	Rizósfera	R1	2	Primordio
S1IIIA	Suelo	R1	3	Previo a la siembra	Rh1IIIC	Rizósfera	R1	3	Primordio
S41IA	Suelo	R41	1	Previo a la siembra	Rh41IC	Rizósfera	R41	1	Primordio
S41IIA	Suelo	R41	2	Previo a la siembra	Rh41IIC	Rizósfera	R41	2	Primordio
S41IIIA	Suelo	R41	3	Previo a la siembra	Rh41IIIC	Rizósfera	R41	3	Primordio
S42IA	Suelo	R42	1	Previo a la siembra	Rh42IC	Rizósfera	R42	1	Primordio
S42IIA	Suelo	R42	2	Previo a la siembra	Rh42IIC	Rizósfera	R42	2	Primordio
S42IIIA	Suelo	R42	3	Previo a la siembra	Rh42IIIC	Rizósfera	R42	3	Primordio
S6IA	Suelo	R6	1	Previo a la siembra	Rh6IC	Rizósfera	R6	1	Primordio
S6IIA	Suelo	R6	2	Previo a la siembra	Rh6IIC	Rizósfera	R6	2	Primordio
S6IIIA	Suelo	R6	3	Previo a la siembra	Rh6IIIC	Rizósfera	R6	3	Primordio
S1IB	Suelo	R1	1	Macollaje	S1ID	Suelo	R1	1	Floración
S1IIB	Suelo	R1	2	Macollaje	S1IID	Suelo	R1	2	Floración
S1IIIB	Suelo	R1	3	Macollaje	S1IIID	Suelo	R1	3	Floración
S41IB	Suelo	R41	1	Macollaje	S41ID	Suelo	R41	1	Floración
S41IIB	Suelo	R41	2	Macollaje	S41IID	Suelo	R41	2	Floración
S41IIIB	Suelo	R41	3	Macollaje	S41IIID	Suelo	R41	3	Floración
S42IB	Suelo	R42	1	Macollaje	S42ID	Suelo	R42	1	Floración
S42IIB	Suelo	R42	2	Macollaje	S42IID	Suelo	R42	2	Floración
S42IIIB	Suelo	R42	3	Macollaje	S42IIID	Suelo	R42	3	Floración
S6IB	Suelo	R6	1	Macollaje	S6ID	Suelo	R6	1	Floración
S6IIB	Suelo	R6	2	Macollaje	S6IID	Suelo	R6	2	Floración
S6IIIB	Suelo	R6	3	Macollaje	S6IIID	Suelo	R6	3	Floración
Rh1IB	Rizósfera	R1	1	Macollaje	Rh1ID	Rizósfera	R1	1	Floración
Rh1IIB	Rizósfera	R1	2	Macollaje	Rh1IID	Rizósfera	R1	2	Floración
Rh1IIIB	Rizósfera	R1	3	Macollaje	Rh1IIID	Rizósfera	R1	3	Floración
Rh41IB	Rizósfera	R41	1	Macollaje	Rh41ID	Rizósfera	R41	1	Floración
Rh41IIB	Rizósfera	R41	2	Macollaje	Rh41IID	Rizósfera	R41	2	Floración
Rh41IIIB	Rizósfera	R41	3	Macollaje	Rh41IIID	Rizósfera	R41	3	Floración
Rh42IB	Rizósfera	R42	1	Macollaje	Rh42ID	Rizósfera	R42	1	Floración
Rh42IIB	Rizósfera	R42	2	Macollaje	Rh42IID	Rizósfera	R42	2	Floración
Rh42IIIB	Rizósfera	R42	3	Macollaje	Rh42IIID	Rizósfera	R42	3	Floración
Rh6IB	Rizósfera	R6	1	Macollaje	Rh6ID	Rizósfera	R6	1	Floración
Rh6IIB	Rizósfera	R6	2	Macollaje	Rh6IID	Rizósfera	R6	2	Floración
Rh6IIIB	Rizósfera	R6	3	Macollaje	Rh6IIID	Rizósfera	R6	3	Floración

Apéndice II. Caracterización fisicoquímica

TABLA A3. Resultados obtenidos para los parámetros fisicoquímicos determinados. Se presentan como el promedio $\pm$ desviación estándar ($n = 3$) de réplicas biológicas (bloques). Los valores de contenido de hierro quelatizable y S-SO₄ no tienen réplicas. PS: Previo a la siembra de arroz.

Material	Rotación	Muestreo	N-NH ₄ (ppm)	Cpox (ppm)	Humedad (%)	pH	Fe (mg/kg)	S-SO ₄ (μ g S/g)
Suelo	R1	PS	7.6 $\pm$ 0.6	501 $\pm$ 65	21.3 $\pm$ 2.3	4.87 $\pm$ 0.31	96.0	12.1
Suelo	R4.1	PS	8.6 $\pm$ 0.3	514 $\pm$ 33	23.3 $\pm$ 0.4	4.58 $\pm$ 0.05	161	5.90
Suelo	R4.2	PS	8.0 $\pm$ 0.4	475 $\pm$ 59	22.0 $\pm$ 1.3	4.63 $\pm$ 0.07	157	6.20
Suelo	R6	PS	7.7 $\pm$ 0.6	413 $\pm$ 54	19.4 $\pm$ 1.6	4.57 $\pm$ 0.02	120	3.90
Suelo	R1	Macollaje	27.6 $\pm$ 1.7	444 $\pm$ 99	22.5 $\pm$ 2.4	4.79 $\pm$ 0.28	-	-
Suelo	R4.1	Macollaje	20.7 $\pm$ 9.3	517 $\pm$ 36	25.5 $\pm$ 0.9	4.65 $\pm$ 0.05	-	-
Suelo	R4.2	Macollaje	16.2 $\pm$ 2.2	417 $\pm$ 28	24.3 $\pm$ 2.1	4.49 $\pm$ 0.06	-	-
Suelo	R6	Macollaje	25.2 $\pm$ 7.4	440 $\pm$ 19	23.8 $\pm$ 1.6	4.51 $\pm$ 0.14	-	-
Rizósfera	R1	Macollaje	31.2 $\pm$ 13.0	537 $\pm$ 107	24.6 $\pm$ 3.8	4.61 $\pm$ 0.12	175	7.40
Rizósfera	R4.1	Macollaje	15.4 $\pm$ 5.5	523 $\pm$ 42	26.6 $\pm$ 0.2	4.41 $\pm$ 0.05	170	3.80
Rizósfera	R4.2	Macollaje	14.3 $\pm$ 4.3	500 $\pm$ 60	25.6 $\pm$ 1.5	4.32 $\pm$ 0.03	199	5.80
Rizósfera	R6	Macollaje	16.7 $\pm$ 5.3	458 $\pm$ 61	25.5 $\pm$ 2.3	4.47 $\pm$ 0.10	190	3.00
Rizósfera	R1	Primordio	9.2 $\pm$ 2.2	493 $\pm$ 60	23.5 $\pm$ 3.0	4.79 $\pm$ 0.29	-	-
Rizósfera	R4.1	Primordio	9.7 $\pm$ 0.3	477 $\pm$ 17	26.3 $\pm$ 0.4	4.77 $\pm$ 0.14	-	-
Rizósfera	R4.2	Primordio	10.3 $\pm$ 1.5	469 $\pm$ 67	24.7 $\pm$ 1.3	4.60 $\pm$ 0.16	-	-
Rizósfera	R6	Primordio	9.25 $\pm$ 3.3	392 $\pm$ 70	23.6 $\pm$ 2.4	4.68 $\pm$ 0.09	-	-
Suelo	R1	Floración	4.9 $\pm$ 0.8	486 $\pm$ 67	22.9 $\pm$ 3.3	5.20 $\pm$ 0.27	-	-
Suelo	R4.1	Floración	5.8 $\pm$ 0.2	440 $\pm$ 9.1	25.8 $\pm$ 0.5	5.19 $\pm$ 0.10	-	-
Suelo	R4.2	Floración	6.0 $\pm$ 1.4	476 $\pm$ 39	24.2 $\pm$ 2.0	4.95 $\pm$ 0.07	-	-
Suelo	R6	Floración	5.6 $\pm$ 0.4	389 $\pm$ 67	24.3 $\pm$ 1.8	4.90 $\pm$ 0.07	-	-
Rizósfera	R1	Floración	4.3 $\pm$ 0.3	418 $\pm$ 10	19.0 $\pm$ 0.7	4.62 $\pm$ 0.17	218	6.00
Rizósfera	R4.1	Floración	4.4 $\pm$ 0.5	477 $\pm$ 37	23.9 $\pm$ 1.0	4.42 $\pm$ 0.14	304	6.33
Rizósfera	R4.2	Floración	4.4 $\pm$ 0.2	478 $\pm$ 37	19.5 $\pm$ 1.7	4.45 $\pm$ 0.11	287	4.10
Rizósfera	R6	Floración	4.1 $\pm$ 0.4	449 $\pm$ 59	19.2 $\pm$ 3.2	4.64 $\pm$ 0.06	243	3.47

Apéndice III. Abundancia de bacterias metanótrofas en suelo y rizósfera: curvas estándar y de *melting*

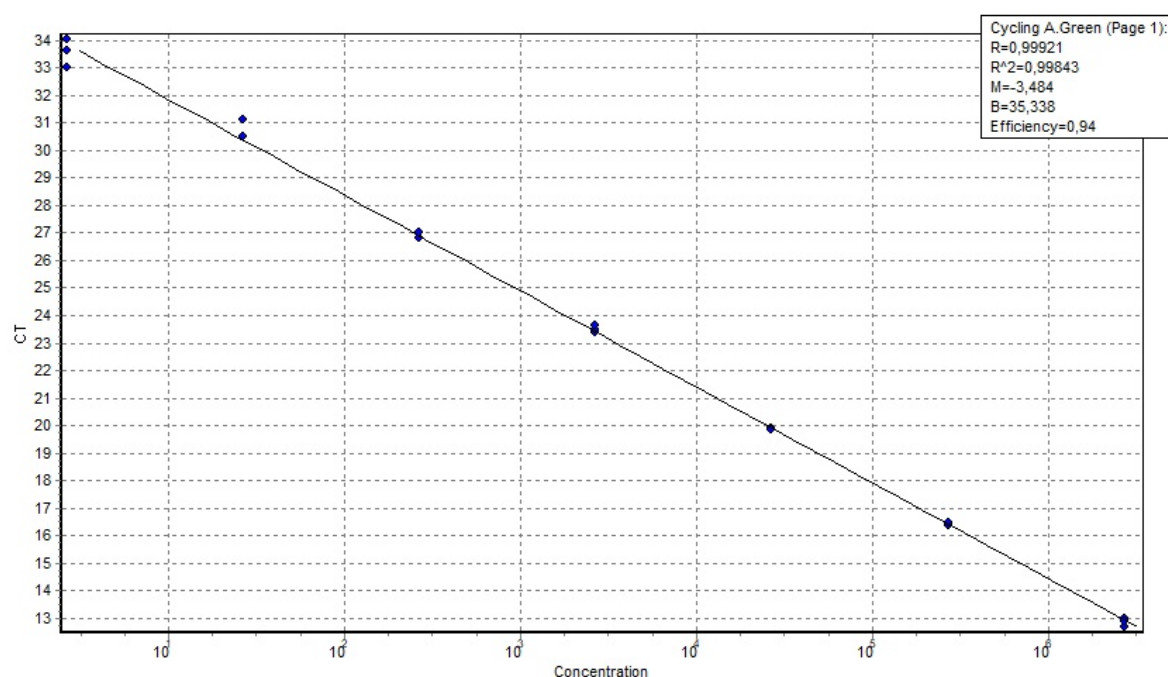


FIGURA A1. Curva de calibración obtenida a partir de la dilución sucesiva del estándar para cuantificación del gen *pmoA* por qPCR. Se representa el ciclo umbral de fluorescencia o CT vs concentración. Los puntos azules corresponden a las réplicas de las distintas diluciones del estándar.

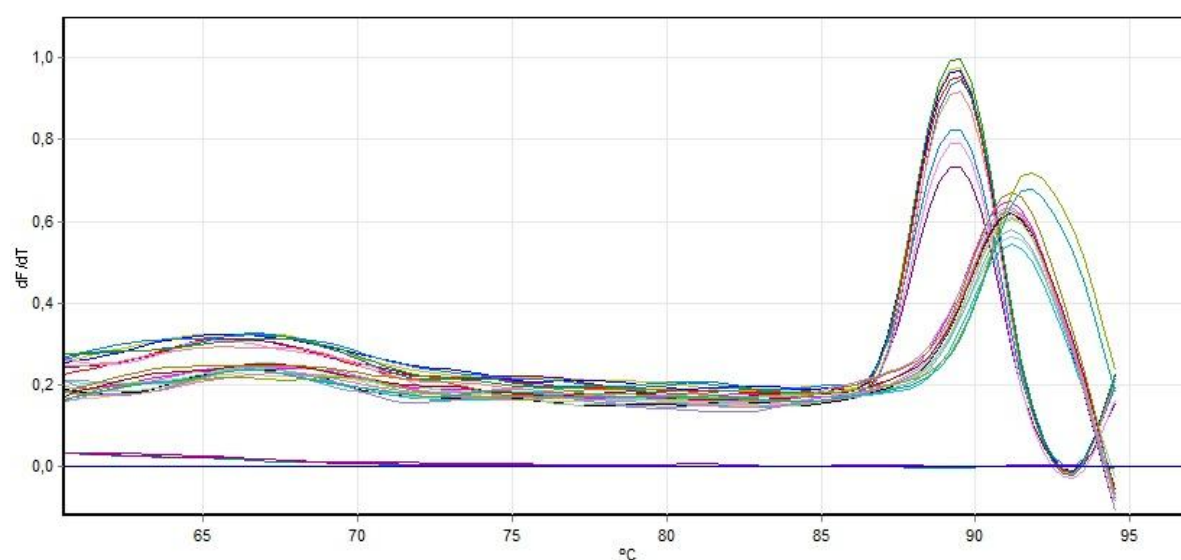


FIGURA A2. Curva de *melting* obtenida por qPCR del gen *pmoA*. Se muestran las curvas correspondientes a los estándares de la curva de calibración, las muestras de suelo y suelo rizosférico en estudio y los controles negativos.

Apéndice IV. Ensayo de actividad metanótrofa con agregado de amonio

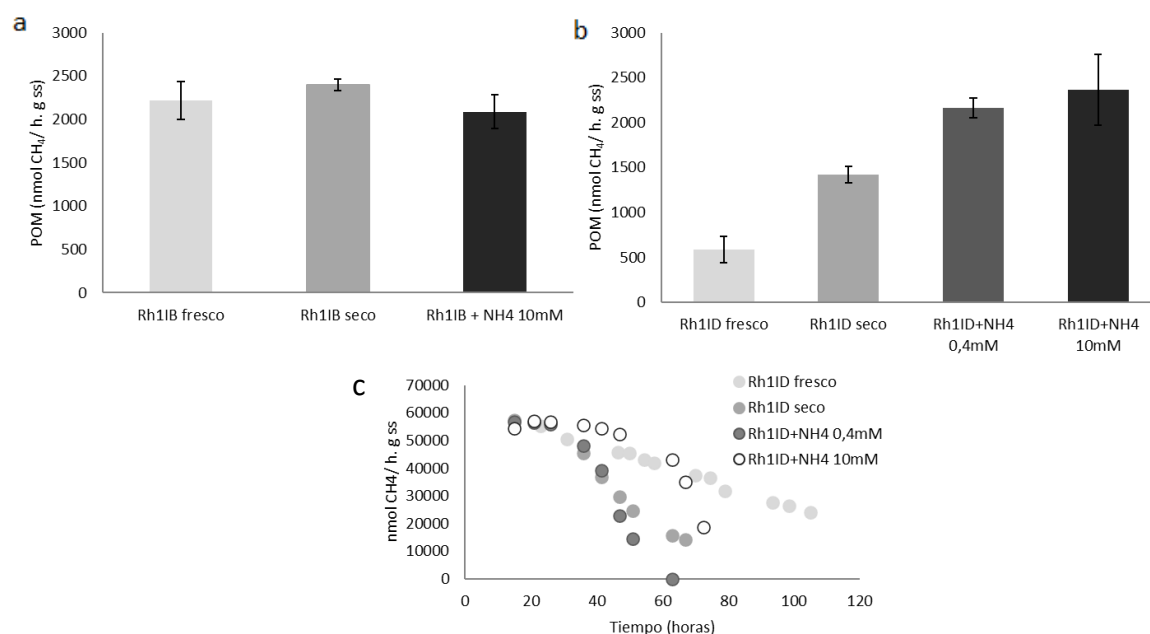


FIGURA A3. Potencial de oxidación de metano de los suelos rizosféricos de la rotación de arroz continuo (R1), obtenidos en la etapa de macollaje del cultivo (a) y en la etapa de floración (b). Curvas de consumo de metano de las rizósferas de arroz de la rotación R1 en floración (c). Se presentan los resultados obtenidos durante el ensayo sin y con agregado de solución de amonio, y se comparan con los valores de POM y las curvas obtenidas a partir de suelo fresco.

TABLA A4. Duración en horas de la fase lag o fase de inicio de la actividad de oxidación de metano para las muestras de suelo rizosférico fresco, seco y seco con agregado de solución de amonio (tres niveles de amonio) de la rotación arroz continuo (R1) y arroz- pasturas (R42) en dos etapas del ciclo de cultivo.

Etapas del cultivo	Rotación	Muestra	Fase lag (h)
Macollaje	R1	Rh1B fresco	30.5
		Rh1B (0,55 mM)	36
		Rh1B (10 mM)	47
	R42	Rh42B fresco	46
		Rh42B (0,25 mM)	42
		Rh42B (10 mM)	64
Floración	R1	Rh1D fresco	31
		Rh1D (0,06 mM)	36
		Rh1D (0,50 mM)	36
		Rh1D (10 mM)	63
	R42	Rh42D fresco	46.5
		Rh42D (0,06 mM)	42
		Rh42D (0,22 mM)	40.5
		Rh42D (10 mM)	81.5

Apéndice V. Secuenciación de genes 16S ARNr de suelo rizosférico de arroz

TABLA A5. Resultado de las etapas de procesamiento de datos de secuenciación en número de lecturas.

Muestra	Secuencia sin procesar (<i>paired end</i>)	Luego del filtrado	Después de eliminar el ruido y fusionar lecturas	Eliminación de quimeras y clasificación
Rh1	68009	62732	39427	38327
Rh1.2	105614	96875	65580	63249
Rh41	84030	76352	50607	46793
Rh41.2	103907	96311	64892	59390

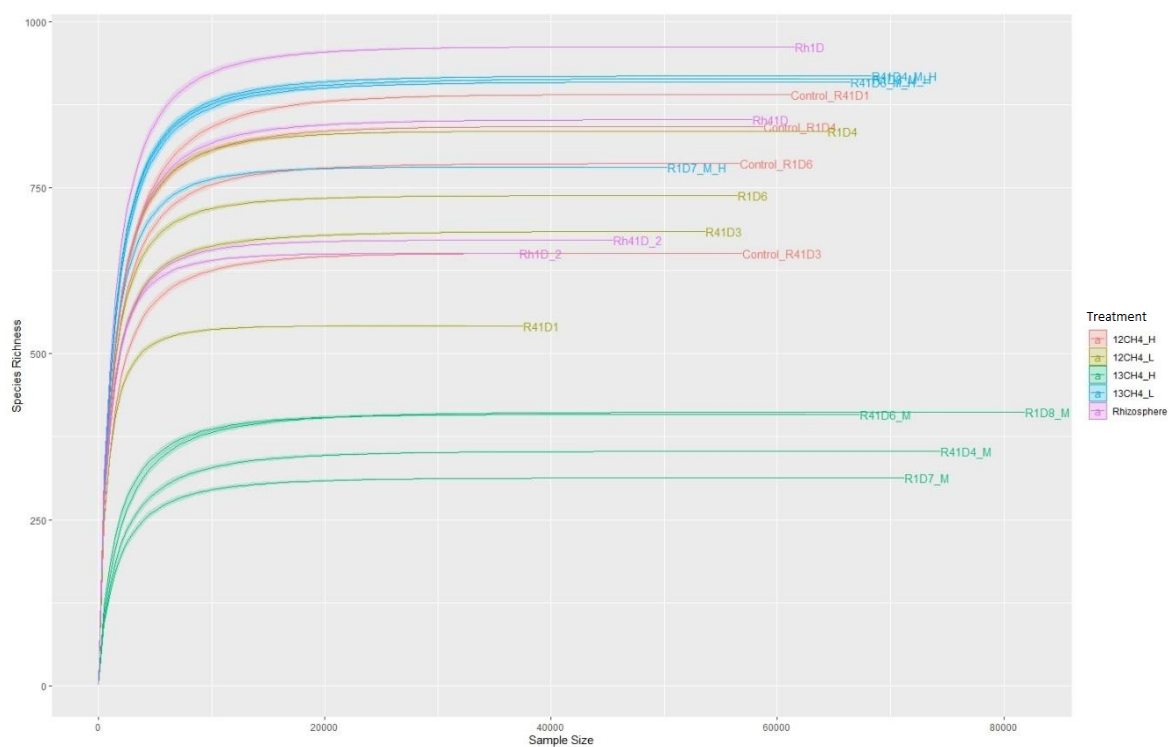


FIGURA A4. Curva de rarefacción donde se observa la profundidad de secuenciación respecto a la riqueza o número de ASV obtenidas para los suelos rizosféricos originales y las distintas fracciones secuenciadas.



FIGURA A5. Diagrama de Venn de las ASV compartidas entre los suelos rizosféricos de la rotación arroz continuo (Rh1) y del primer año de arroz de la rotación arroz-pasturas (Rh41). El número en la intersección de ambos círculos corresponde a las ASV compartidas por las dos condiciones.

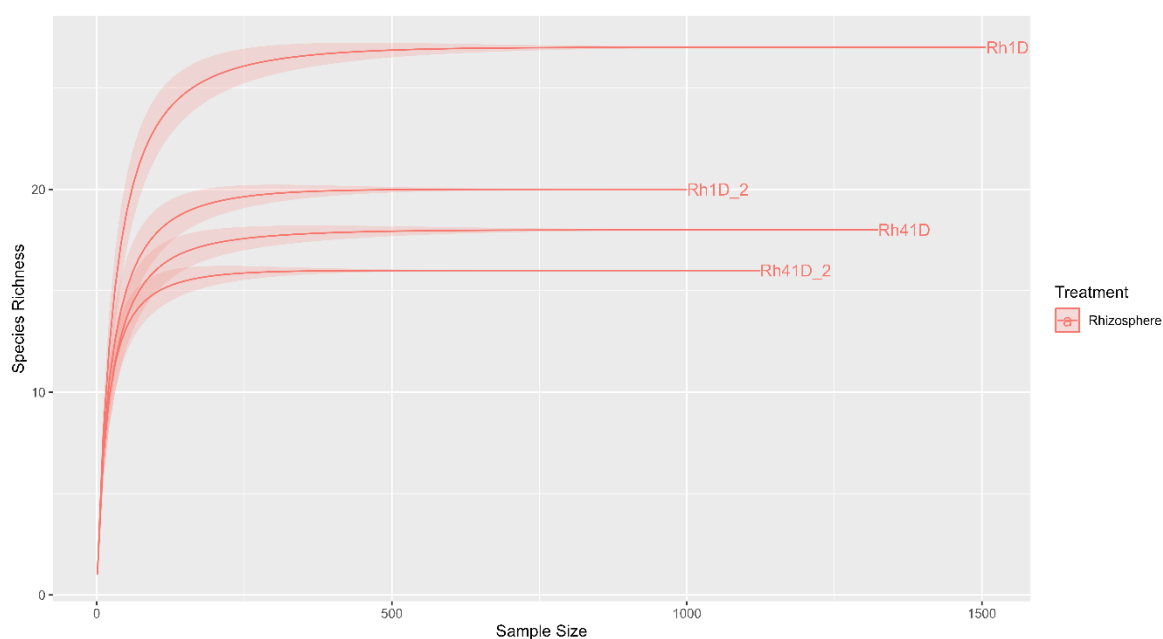


FIGURA A6. Curva de rarefacción donde se observa la profundidad de secuenciación respecto a la riqueza o número de ASV obtenidas del dominio *Archaea*.

Apéndice VI. Optimización de la técnica ADN - SIP

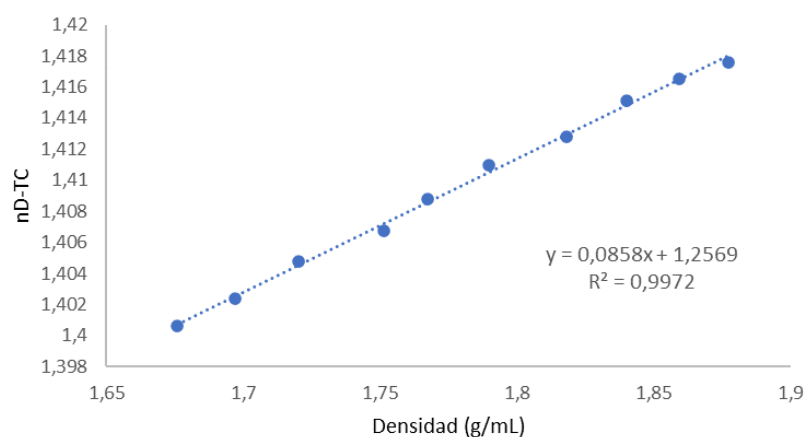


FIGURA A7. Curva de calibración de estándares de CsCl/buffer GB con medidas de índice de refracción corregido por temperatura y densidad.

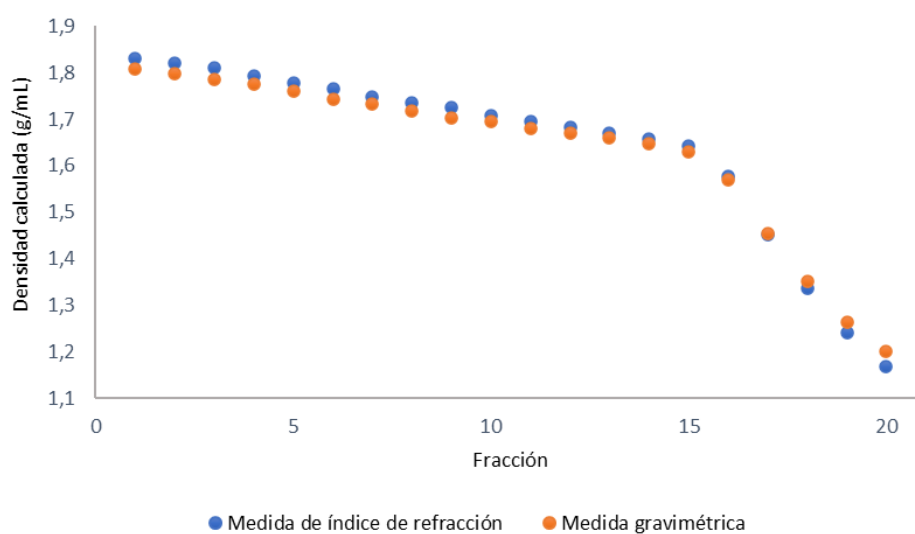


FIGURA A8. Determinación de la densidad para las fracciones obtenidas por fraccionamiento de un tubo de SIP por las dos metodologías: medida gravimétrica de volúmenes de líquido y medida del índice de refracción con posterior conversión a densidad usando la curva de calibración.

Apéndice VII. Secuenciación masiva de genes 16S ARNr de fracciones SIP

TABLA A6. Resultado de las etapas de procesamiento de datos de secuenciación en número de lecturas.

Muestra	Secuencias crudas (paired end)	Luego del filtrado	Después de eliminar el ruido y fusionar lecturas	Eliminación de quimeras y clasificación
12_H_R1.1	92460	85334	62309	59766
12_H_R1.2	94999	87261	61003	57543
12_H_R41.1	97639	91408	66274	62145
12_H_R41.2	96168	88111	60969	57453
12_L_R1.1	111606	102499	71143	65082
12_L_R1.2	100905	92930	62140	56789
12_L_R41.1	66338	60172	40123	37635
12_L_R41.2	96245	87795	59856	53775
13_H_R1.1	115985	107397	91317	71368
13_H_R1.2	135230	124534	103788	82068
13_H_R41.1	121533	112779	95097	74548
13_H_R41.2	107316	98000	81192	67494
13_L_R1.1	83178	76340	52673	51494
13_L_R1.2	113415	104321	72659	68732
13_L_R41.1	115260	106427	73256	68502
13_L_R41.2	115104	106994	72238	67255

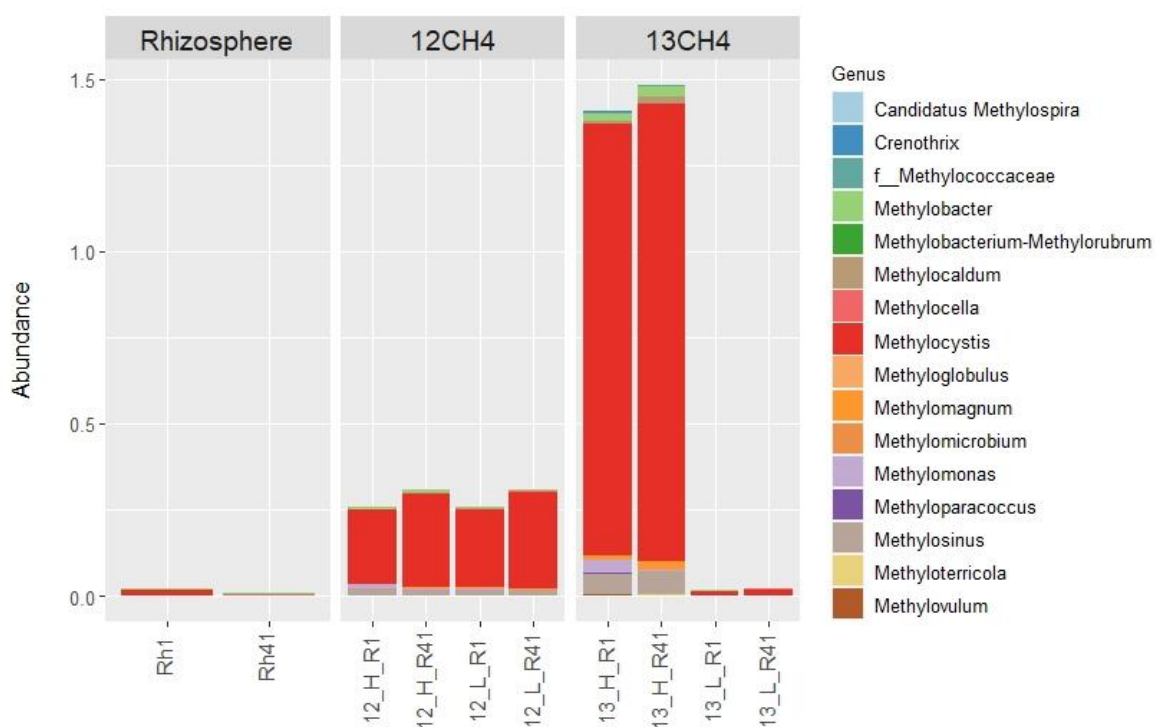


FIGURA A9. Abundancia de géneros metanótrofos en los suelos rizosféricos sin incubar (Rh1 y Rh41) y en las fracciones pesadas (H) y livianas (L), tanto de las incubaciones con metano sin marcar (12CH₄) como con metano marcado (13CH₄).

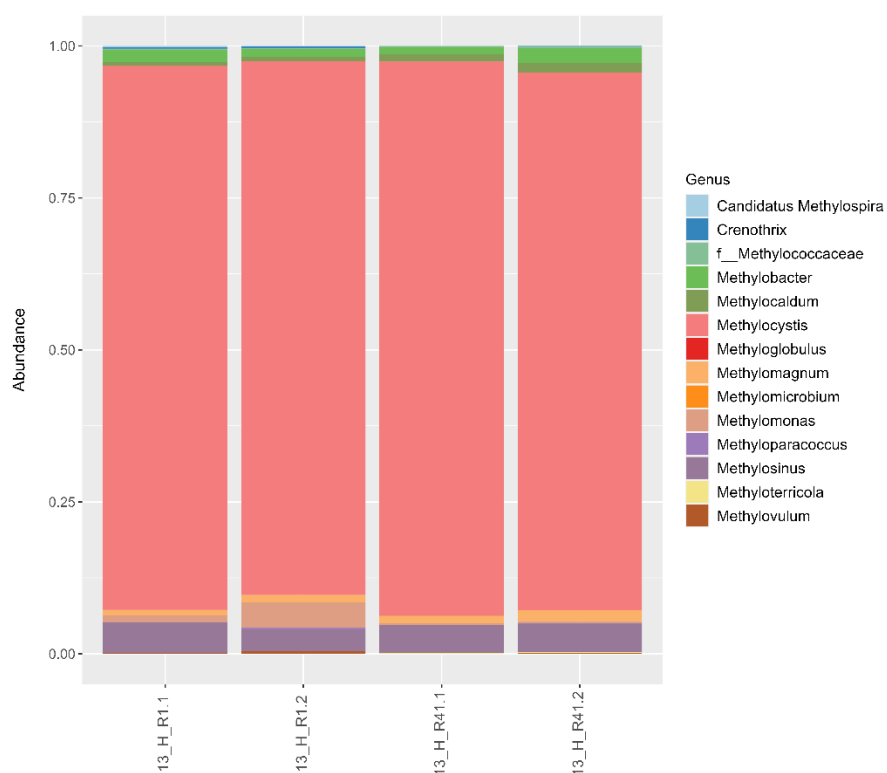


FIGURA A10. Abundancia relativa de géneros metanótrofos en la comunidad activa de las rotaciones en estudio, la rotación intensiva de arroz continuo (R1) y la arroz-pasturas (R41).

TABLA A7. Géneros metanótrofos activos obtenidos por ADN-SIP en las dos rotaciones estudiadas, la rotación intensiva de arroz continuo (R1) y la rotación arroz-pasturas (R41).

Rotación	Nombre ASV	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género
R1	ASV932	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	Methylococcaceae	Candidatus Methylospira
	ASV2081	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	Methylomonadaceae	Methylomicrobium
	ASV1	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylocystaceae	Methylocystis
	ASV12	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylocystaceae	Methylosinus
	ASV40	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	Methylomonadaceae	Methylomonas
	ASV22	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	Methylomonadaceae	Methylobacter
	ASV183	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	Methylococcaceae	Methylomagnum
	ASV62	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	Methylococcaceae	Methylocaldum
	ASV484	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	Methylomonadaceae	Methylovulum
	ASV856	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	Methylomonadaceae	Crenothrix
	ASV611	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	Methylococcaceae	f__Methylococcaceae
	ASV955	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	Methylococcaceae	Methyloparacoccus
R41	ASV1023	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	Methylococcaceae	Methyloterricola
	ASV1779	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	Methylomonadaceae	Methyloglobulus
	ASV1	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylocystaceae	Methylocystis
	ASV12	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylocystaceae	Methylosinus
	ASV40	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	Methylomonadaceae	Methylomonas
	ASV22	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	Methylomonadaceae	Methylobacter
	ASV183	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	Methylococcaceae	Methylomagnum
	ASV62	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	Methylococcaceae	Methylocaldum
	ASV484	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	Methylomonadaceae	Methylovulum
	ASV856	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	Methylomonadaceae	Crenothrix
	ASV611	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	Methylococcaceae	f__Methylococcaceae
	ASV955	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	Methylococcaceae	Methyloparacoccus