

Informe final publicable de proyecto

Caracterización de variables biológicas que controlan la producción de metano en planta en el cultivo de arroz

Código de proyecto ANII: FCE_1_2017_1_136722

28/04/2021

FERNÁNDEZ SCAVINO, Ana (Responsable Técnico - Científico)

GHIAZZA, Cecilia (Investigador)

BELLINI LISORIO, Maria Inés (Investigador)

OREGGIONI GADEA, Daniela Aielen (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE QUÍMICA (Institución Proponente) \\
FACULTAD DE QUÍMICA. FUNDACIÓN PARA EL PROGRESO DE LA QUÍMICA

Resumen del proyecto

El cultivo de arroz (*Oryza sativa*) es la segunda actividad agropecuaria que emite más gases de efecto invernadero (GEI). El principal gas emitido es el metano que se produce después de la inundación del cultivo y su flujo es máximo en la fase de floración de la planta, en febrero. Se produce por la actividad de microorganismos anaerobios que pertenecen a dos grandes grupos de procariotas: bacterias fermentadoras y archaeas metanogénicas. Estos microorganismos se asocian para degradar compuestos orgánicos, como los exudados radiculares de la planta, produciendo metano y dióxido de carbono. El flujo de metano depende de cuáles son las especies microbianas asociadas a las raíces de las plantas, prontas para consumir los exudados.

En este proyecto comparamos distintas variedades de arroz plantadas en distintos suelos para determinar si alguna combinación suelo-variedad podría tener una microbiota asociada que tuviera menor potencial de emisión de metano y por lo tanto que contribuyera a una producción de arroz más sustentable.

En experimentos de laboratorio que simulan la emisión en floración, determinamos que la velocidad de producción de metano y la estructura de las comunidades microbianas asociadas a las raíces dependen del tipo de suelo. En los suelos del este, más ácidos y con menor contenido de materia orgánica que los del norte, se constató menor producción de metano. En estos suelos, la variedad Olimar produjo menos metano ya sea si el cultivo previo al arroz era pastura o era soja. Este comportamiento está asociado a la presencia diferencial de archaeas metanogénicas. Las combinaciones variedad- suelo que produjeron menos metano tienen mayor proporción de Methanocellales asociadas a las raíces de las plantas. Estos microorganismos podrían ser indicadores de un sistema que tiene el potencial de minimizar la emisión de metano en las condiciones de cultivo de arroz en nuestro país.

Ciencias Agrícolas / Otras Ciencias Agrícolas / No Corresponde / Microbiología ambiental y agrícola

Palabras clave: metanogenesis / exudados de raíces de arroz / Stable Isotope Probing (SIP) /

Introducción

GASES DE EFECTO INVERNADERO (GEI)

El arroz (*Oryza sativa*) es el tercer rubro de las exportaciones agropecuarias de nuestro país. Tiene alto impacto económico y ambiental, representa una fracción muy importante de suelo cultivado y consume la mayor cantidad de agua para riego en el territorio nacional. El manejo del cultivo en Uruguay constituye un sistema peculiar en el contexto de la producción mundial de arroz de clima templado. Hasta ahora, el cultivo se ha realizado en rotación con pasturas para ganadería. El ciclo generalmente consta de dos veranos consecutivos con arroz seguidos de 4 años de pasturas mejoradas (leguminosas) para ganadería (Deambrosi et al. 2002). Esto implica la alternancia de condiciones anaerobias que resultan de la inundación (un mes posterior a la siembra de arroz hasta pocas semanas antes de la cosecha) con condiciones óxicas de secano durante el invierno y durante los veranos con pasturas.

Actualmente, la rentabilidad de la soja es tal, que es difícil que los productores la excluyan en un sistema de rotación, particularmente con la caída del precio del arroz (ACA, 2012). Los productores de arroz han comenzado a hacer un uso intensivo del suelo, ya sea con arroz continuo o con rotación arroz-soja, que mejora la rentabilidad económica, y a considerar la reducción de los insumos como los fertilizantes

nitrogenados y fosfatados. En 2012 en la Unidad Experimental de Paso de la Laguna, en INIA Treinta y Tres, se implementaron ensayos de uso intensivo del suelo con rotación de distintos cultivos (Día de Campo -Arroz, INIA Treinta y Tres- Unidad Experimental Paso de la Laguna, Informe técnico, 2012), para sistematizar los resultados obtenidos y evaluar la sustentabilidad de estas alternativas.

Uno de los mayores impactos ambientales de la producción de arroz es la emisión de gases de efecto invernadero (GEI). Los dos principales GEI se producen en etapas distintas, el metano (CH₄) durante las condiciones anaerobias provocadas por la inundación, y el óxido nitroso (N₂O) en la transición óxica-anóxica asociada a la fertilización nitrogenada. El gas que más contribuye al efecto invernadero en arrozales es el metano, por la cantidad emitida y por su coeficiente de transferencia de calor. El sector agrícola es el que más contribuye a las emisiones de metano (93- 95% en el período 1990-2012) en Uruguay y dentro de este rubro el cultivo de arroz es la segunda actividad mas importante después de la fermentación entérica (Garía & Oyhançabal, 2016).

Los valores de flujo de metano en el sistema uruguayo tradicional (rotación con pasturas) se encuentran dentro del rango de los reportados a nivel internacional para arroz de clima templado (Irisarri et al. 2012). Entre las alternativas para

reducir la emisión se han encontrado el manejo del agua, reduciendo el período de inundación (anaerobio), se reducen considerablemente las emisiones aunque esta opción no asegura un rendimiento igual al manejo tradicional de inundación al macollaje (Tarlera et al. 2016). Estudios realizados en otros países sugieren que la rotación arroz-soja puede ser una opción prometedora para reducir la emisión de metano (Eusufzai et al., 2010).

El metano emitido deriva en gran parte (más del 60%) de los compuestos orgánicos fotosintetizados por la planta y una menor proporción proviene de la degradación de la materia orgánica del suelo y de los residuos vegetales agregados como fertilizantes (Watanabe et al., 1999; Yuan et al., 2012). La máxima emisión de metano se produce en la fase tardía de crecimiento vegetativo, entre las etapas de formación de panícula y floración de la planta (entre los días 50 y 100 después de emergencia) (Tarlera et al., 2016). Debido a que la producción de exudados depende de los cultivares (Aulakh et al., 2001a), una alternativa para reducir las emisiones es seleccionar variedades que produzcan menor cantidad de exudado o que éstos sean degradados más lentamente.

LOS PROCESOS MICROBIANOS QUE CONDUCEN A LA EMISIÓN DE METANO DURANTE EL CULTIVO DE ARROZ

La degradación de compuestos orgánicos en condiciones anaerobias y en ausencia de nitrato, sulfato e ión férrico conduce a la producción de metano y anhídrido carbónico. En esta descomposición participan procariotas del dominio Archaea (metanogénicas) y del dominio Bacteria (bacterias fermentadoras). Los sustratos de las archaeas metanogénicas en suelos de arroz son el H_2+CO_2 y el acetato, que resultan de la fermentación de compuestos carbonados, especialmente ácidos orgánicos de cadena corta, por otras bacterias que conforman una cadena trófica constituida por bacterias hidrolíticas, fermentadoras primarias y fermentadoras secundarias. Las bacterias fermentadoras secundarias oxidan compuestos de entre 3 y 5 carbonos, mono o dicarboxílicos, produciendo acetato, anhídrido carbónico e H_2 . En condiciones estándar algunas de estas reacciones no son favorables y no liberan energía suficiente para el crecimiento de las bacterias fermentadoras secundarias. Cuando hay un consumidor muy activo y con gran afinidad por H_2 , como un metanogénico, la energía libre de la reacción es negativa y suficiente para generar ATP para el crecimiento de los fermentadores secundarios. Es así que algunas de estas bacterias, llamadas sintróficas, dependen de la presencia de metanogénicas para crecer (Zehnder & Stumm, 1988). La inundación reduce la concentración de oxígeno en el suelo. El oxígeno llega al suelo y rizósfera a través de la difusión del agua de inundación (que es pobre porque la solubilidad del oxígeno en agua es baja) y a través del aerénquima de la planta que conduce los gases producidos en la raíz (metano y CO_2) hacia la atmósfera; por el contrario, los gases de la atmósfera y los producidos en la fotosíntesis (nitrógeno en el primer caso y oxígeno en ambos) son conducidos hacia las raíces. El oxígeno que llega a las raíces es utilizado por bacterias aerobias y su concentración depende de la cantidad de materia orgánica oxidable y de la actividad de estas bacterias, pero generalmente desaparece rápidamente o se concentra en algunas regiones de la rizósfera generando un gradiente decreciente hacia el suelo sin raíces (Schutz et al. 1989).

Inicialmente se produce metano a partir de H_2+CO_2 , y hasta un 40% del metano en esa etapa proviene de la actividad de las metanogénicas del llamado Rice Cluster I (RCI), que se identificó como el metanogénico hidrogenotrófico más activo en la rizósfera (Lu and Conrad, 2005). Este nuevo linaje de metanogénicas, que está ampliamente distribuido en el mundo (Conrad et al., 2006) ha sido detectado en raíces de arroz por métodos independientes del cultivo (Großkopf et al., 1998; Lueders et al., 2001). Sólo recientemente se aislaron e identificaron microorganismos de este cluster (Sakai et al. 2008) como miembros del orden Methanocellales, archaeas con particularmente alta tolerancia al oxígeno y con alta afinidad por H_2 (Erkel et al., 2006).

Le sigue la producción de metano a partir de acetato, utilizado por las bacterias de los géneros *Methanosarcina* y *Methanosaeta* (Chin et al. 2004). Los microorganismos del primero de estos géneros, a diferencia de la mayoría de las bacterias metanogénicas que utilizan casi exclusivamente un único sustrato, pueden utilizar H_2 y también acetato (Boone et al., 1993), pero en este ecosistema parecen utilizar especialmente acetato aumentando su población justo antes de que se alcance la máxima concentración de acetato (Chin et al. 2004).

El análisis de suelos de arrozales en varias regiones del mundo (Italia, Filipinas y China) y diversos climas reveló que las bacterias metanogénicas se organizan en comunidades que tienen similitudes pero también diferencias (Ramakrishnan et al. 2001). Si bien están presentes los mismos microorganismos, su proporción relativa cambia y define el tiempo que demora en detectarse la producción de metano después de la inundación. Los suelos más ricos en bacterias del RCI comienzan a producir metano antes que los que tienen preferencialmente bacterias del género *Methanosarcina*. Después de 30 días de inundación, las comunidades de todos los suelos resultaron cuanti y cualitativamente muy similares (Ramakrishnan et al. 2001). Esta convergencia hacia una estructura común sugiere que la inundación prolongada favorece el desarrollo de las mismas bacterias metanogénicas frente a otras que colonizaron y fueron importantes en las primeras etapas de la inundación.

LA RESILIENCIA EN COMUNIDADES BACTERIANAS METANOGÉNICAS DEL SUELO

Recientemente hemos estudiado la estructura de la comunidad metanogénica en suelos arroceros uruguayos durante el ciclo completo de seis años de rotación arroz/pasturas contrastando con un suelo no agrícola (Fernández et al., 2013). En este trabajo se pudo cuantificar e identificar las bacterias metanogénicas que estaban presentes en el suelo en cada año del ciclo y en un suelo no agrícola. La principal conclusión de este trabajo fue que los cuatro años de pasturas que siguen al arroz no distorsionan la comunidad metanogénica del suelo, integrada principalmente por metanogénicas del RCI y Methanosarcina, y los suelos con pastura o con arroz emiten metano a la misma velocidad. También se observó que el suelo no agrícola tenía una comunidad bacteriana y un comportamiento muy diferente de los otros seis suelos. Se podría decir entonces que el cultivo de arroz imprime un cambio en la comunidad de bacterias metanogénicas que no se altera aún después de cuatro años de pasturas en suelos óxicos.

Pero estos cambios se han estudiado en suelo desnudo, generalmente después de secar el suelo a temperatura ambiente (facilita su conservación), extracción de las raíces y tamizado del suelo, que rompe los micronichos donde los consorcios bacterianos suelen ser más eficientes en el metabolismo de compuestos orgánicos. Sin embargo, se ha demostrado que la emisión de metano es cultivar dependiente (Kerdchoechuen 2005). Por otra parte, el análisis de las poblaciones de bacterias capaces de metabolizar compuestos fotosintetizados de *O. sativa* pone en evidencia que la estructura de la comunidad activa en la rizósfera es diferente de la que es activa en suelo (Hernández et al. 2015).

Se ha visto que cuando se planta arroz en el suelo proveniente del sedimento de un río, constituido por una comunidad de archaeas donde predominan las Methanomicrobiales, estos microorganismos colonizan las raíces de arroz desplazando a los eficientes Methanocellales, y se reduce la producción de metano (Conrad et al., 2008). La velocidad de producción de metano parece entonces depender de la abundancia y tipo de población de metanogénicos activos colonizadores de las raíces. Por otra parte, para que se produzca metano a partir de exudados en las raíces, es necesario que estén asociadas bacterias fermentadoras secundarias porque los principales compuestos de los exudados no son sustratos directos de las metanogénicas. Estas bacterias fermentan los compuestos de los exudados, como ácidos orgánicos dicarboxílicos de cadena corta, y transfieren directamente acetato, H₂ y CO₂, a las archaeas metanogénicas. Sin embargo, se desconoce cuál es el comportamiento de las poblaciones rizosféricas a las distintas variedades de arroz que producen diferentes exudados con potencial metanogénico (Aulakh et al. 2001b), tienen ciclos y biomasa radicular diferente. Poco se sabe también sobre el comportamiento de estas poblaciones en suelos con composición o con uso previo del suelo diferentes, aunque se ha reportado que la siembra directa puede aumentar las emisiones de metano (Kim et al. 2016).

La ecología microbiana ha experimentado un gran impulso a partir del desarrollo de técnicas moleculares que permiten estudiar los microorganismos presentes en un ambiente sin las limitaciones que imprime el cultivo en el laboratorio. En la última década las posibilidades se han ampliado aún más desde la implementación de técnicas de secuenciación masiva relativamente accesibles. La información disponible también ha incrementado sustancialmente a partir de la aplicación de estas técnicas (Alphana et al. 2017). La profundidad de los datos de secuenciación masiva de genes es tal que permite recuperar del orden de decenas de miles de secuencias (con valor taxonómico equivalente a especie) y detectar pequeños cambios en la comunidad microbiana por input de algún sustrato limitante.

En este proyecto se plantea utilizar estas técnicas nuevas y poderosas para comprender los factores que regulan la emisión de metano asociada a diferentes condiciones de cultivo de arroz.

Metodología/diseño del estudio

MUESTREO

Se muestrearon plantas en floración y suelo rizosférico de 5 condiciones de cultivo de arroz disponibles en nuestro país que responden a 3 variables (variedad, tipo de suelo, uso previo del suelo). Se realizó el muestreo en febrero de 2019, de tres bloques completamente al azar de 5 tratamientos: suelos del este y del norte, variedades Olimar y Parao, en los 4 casos habiendo tenido pasturas para alimentación de ganado como cultivo previo al arroz. Además, se obtuvieron muestras de un 5to tratamiento con la variedad Olimar, en suelos del Este, y con soja como cultivo previo. Los suelos del Este corresponden a la estación experimental de INIA de Paso de la Laguna, experimento de rotaciones del Ing. José Terra y de riego del Ing. Álvaro Roel. Los suelos y plantas del Norte son de Tacuarembó, facilitados por la Ing. Claudia Marchesi de INIA.

Las incubaciones se realizan con suelo fresco, mantenido a temperatura de refrigeración. Los análisis moleculares se realizan sobre suelos congelados a -20C. Los análisis fisicoquímicos se realizan sobre suelo secado a 30C. Las plantas se mantienen con humedad hasta 48hs, se retira el suelo, se lavan sus raíces reiteradamente para proceder a la incubación con iluminación y extracción de exudados.

DETERMINACIÓN DE PARÁMETRO FÍSICOQUÍMICOS DEL SUELO RIZOSFÉRICO.

Se realizaron en el laboratorio de Facultad de Química y en el Laboratorio de análisis de suelos de INIA

COLECTA Y ANÁLISIS DE EXUDADOS RADICULARES

Inmediatamente después de remover todo el suelo, las raíces se enjuagaron con agua destilada y se colocaron dentro de una bolsa doble de polietileno con 500 mL de agua destilada estéril. Se cerró la bolsa y se protegió de la luz en macetas negras cubiertas. La planta con las raíces sumergidas en agua se colocaron en incubadora de clima BJPXA-A500 a 25 °C y 80% de humedad a máxima intensidad de luz durante 3 hs. Finalizada la incubación la solución obtenida se filtró con papel de filtro Whatman n° 42 y luego con membrana de acetato de celulosa de 0.45 micras. La solución conteniendo los exudados se mantuvo a -20 °C hasta su uso. La solución de exudados se concentró 240 veces por liofilización.

Se determinó la materia total oxidable (DQO) utilizando el kit comercial Spectroquant®, los azúcares totales con el método colorimétrico de la antrona descrito por Brink et al, 1960, y los ácidos orgánicos por HPLC/UV y por HPLC Dionex Ultimate 3000 Thermo Scientific®. La identidad de los ácidos cuantificados se confirmó mediante coincidencia de los tiempos de retención con estándares en ambos métodos y mediante HPLC-MS.

Se determinó el potencial bioquímico de producción de metano a partir de cada exudado al séptimo día de incubación con inóculo de suelo, mediante la medida de metano acumulado por GC-FID.

INCUBACIONES EN MICROCOSMOS Y VELOCIDAD DE PRODUCCIÓN DE METANO

Se realizaron incubaciones de suelo rizosférico con agua en condiciones anaerobias en viales gaseados con N₂ y sellados con tapones de butilo.

Se incubó a 30C sin agitación. Los ensayos se realizaron por duplicado o triplicado a partir de las muestras de suelo rizosférico de cada uno de tres bloques de cada tratamiento (combinación: variedad-suelo-cultivo previo).

Se realizaron incubaciones de suelo con agua, y con suplemento de sustratos presentes en los exudados (acetato, tartrato, succinato y málico) radicales. Se realizaron periódicamente medidas de metano acumulado por GC-FID y se calculó el flujo de producción de metano.

ANÁLISIS DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS

El análisis de comunidades microbianas de suelo rizosférico sin incubar (15 muestras) e incubado con tres de los ácidos orgánicos (succínico, málico y tartárico, 45 muestras) se realizó mediante secuenciación masiva de los genes 16S rRNA de Bacteria y Archaea. Se extrajo ADN con el kit comercial Fast DNA Spin Kit for Soil, se cuantificó utilizando el kit dsDNA HS de Qubit®. Los análisis se realizaron sobre 20 uL de ADN concentración 20 ng/uL en la empresa Microbiome Insights con Illumina Miseq con el kit pair-end v.3 300pb. Los genes 16S rRNA del dominio Archaea se amplificaron según Raymann et al. (2017). Los genes 16S rRNA del dominio Bacteria se amplificaron según el protocolo de Kozich et al. (2013).

El procesamiento bioinformático de los datos se realizó en el software RStudio v 1.2.5001 (RStudio Team, 2015, R versión 3.6.1) con el paquete DADA2 (Callahan, B. et al, 2016) según el procedimiento recomendado (https://benjjneb.github.io/dada2/tutorial_1_8.html; acceso Abril 2020). Se realizó el filtrado de las secuencias para seleccionar las de buena calidad. Las comparaciones de la estructura de las comunidades microbianas se realizaron utilizando el test PERMANOVA con distancia Bray-Curtis, con la función adonis en el mismo software.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos para comparar las velocidades de producción de metano y propiedades fisicoquímicas del suelo se realizaron mediante ANOVA, verificando los supuestos del análisis en el software RStudio v 1.2.5001 (RStudio Team, 2015, R versión 3.6.1). Para la producción de metano endógena se compararon las variables "Región" y "Variedad de planta" utilizando el set de datos de los cuatro tratamientos con pasturas previo al cultivo de arroz. Luego se realizó una prueba t de student para comparar el tratamiento con soja con su tratamiento homólogo de pasturas. Para comparar las incubaciones con sustratos, se realizó un ANOVA utilizando el test de Dunnet para comparar los suelos rizosféricos de cada tratamiento incubados con sustratos con el control sin incubar y el test de Tuckey para comparar entre suelos de distintos tratamientos.

Resultados, análisis y discusión

CARACTERIZACIÓN DE EXUDADOS. Los exudados radicales no fueron significativamente diferentes para los 5 tratamientos de combinaciones (variedad-suelo-uso previo del suelo) ensayados. Los principales componentes

identificados son azúcares y ácidos carboxílicos (Málico, Succínico, Tartárico, Cítrico y Láctico). Del orden de la mitad de la materia orgánica oxidable en los exudados es convertible a metano al cabo de 7 días de incubación anaerobia.

PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS DEL SUELO. Los dos suelos, uno proveniente del Norte y otro del Este del país, tienen propiedades fisicoquímicas significativamente diferentes. Los suelos del Norte tienen más alto pH, mayor contenido de materia orgánica, fósforo, calcio, magnesio y potasio, con mayor capacidad de intercambio iónico que los del Este.

FLUJO DE METANO (medido en ensayos de laboratorio). La microbiota del suelo del Este que se asocia a las raíces de la variedad Olimar es la que produce metano más lentamente. Este comportamiento se observó cuando el sustrato orgánico a degradar estaba en el propio suelo o cuando se agregaron compuestos que están presentes en los exudados radiculares (acetato y tartrato). Este comportamiento es consistente y se observa, también si el arroz estaba en rotación con pasturas como si estaba en rotación con soja.

ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD DE BACTERIAS Y DE ARCHAEAS METANOGÉNICAS. El tipo de suelo determina la estructura de la comunidad tanto de bacterias como de archaeas metanogénicas. Se observó que el factor tipo de suelo explica el 55 % de la variabilidad observada en las secuencias del dominio Bacteria. En las secuencias del dominio Archaea es aún mayor (70%) la variabilidad explicada por el tipo de suelo. Dentro de las Archaeas, hay tres géneros metanogénicos que tienen diferente proporción en suelos rizosféricos del Este y del Norte, independientemente de cuál es la variedad a la que se asocian. La abundancia del género *Methanocella* es mayor (unas 11 veces) en suelos del Este, mientras que la abundancia de los géneros, *Methanosarcina* y *Methanobacterium*, es menor (1,5 y 2 veces, respectivamente) en estos suelos. Sólo en los suelos del Este se observó que la variedad influye en la estructura de la comunidad tanto de Bacterias como de Archaeas metanogénicas.

Conclusiones y recomendaciones

Las variedades Olimar y Parao no se distinguen por los compuestos exudados en la etapa de floración. Esto indicaría que el potencial de emisión de metano depende en mayor medida de la microbiota asociada a las raíces que del sustrato suministrado como exudado radicular del cultivo.

La variedad Olimar cultivada en los suelos del Este parece seleccionar una microbiota asociada a las raíces de *O. sativa* que es capaz de ralentizar la producción de metano comparado con otras condiciones de variedad-suelo, y por tanto reducir la emisión de metano en la etapa de floración, donde se ha verificado que la emisión es máxima. Esta información generada permite seleccionar condiciones de cultivo de arroz que tienen, potencialmente, la menor capacidad de emisión de metano, y por tanto de mayor sustentabilidad desde el punto de vista de la emisión de GEI.

Este comportamiento puede explicarse por la estructura de la comunidad de Bacterias y Archaeas. Particularmente, el incremento relativo del género *Methanocella* está asociado a la menor emisión. La abundancia relativa de estos microorganismos podría constituirse en un buen indicador para predecir el comportamiento de los cultivos de arroz respecto a la emisión de metano.

Referencias bibliográficas

- ACA, 2012. El arroz en Uruguay. Disponible en <http://www.aca.com.uy/> (octubre 2014).
- Allison & Martiny, 2008 Allison SD, Martiny JBH. (2008). Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 11512–11519.
- Alpana S, P. Vishwakarma, T.K. Adhya, K. Inubushi, S.K. Dubey. 2017. Molecular ecological perspective of methanogenic archaeal community in rice agroecosystem. *Science of the Total Environment* 596–597: 136–146
- Aulakh MS, Wassmann R, Bueno C, Rennenberg H. 2001a . Impact of root exudates of different cultivars and plant development stages of rice (*Oryza sativa* L.) on methane production in a paddy soil. *Plant and Soil* 230: 77–86
- Aulakh, MS, Wassmann R, Bueno C, Kreuzwieser J, Rennenberg, H (2001b) Characterization of root exudates at different growth stages of ten rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Plant Biology* 3: 139-148
- Bellini, M.I.; Gutiérrez, L.; Tarlera, S.; Fernández Scavino, A. 2013. Isolation and functional analysis of denitrifiers in an aquifer with high potential for denitrification. *Syst. Appl. Microbiol.* 36:505-516
- Boone et al. 1993. En: *Methanogenesis* (Ferry, J.G. ed), pp 35-80. Chapman and Hall, NY
- Botton S, Heusden M, parsons, JR, Smidt, H, Straalen N. 2006. Resilience of Microbial Systems Towards Disturbances. *Critic Rev Microbiol* 32:101-112
- Chauhan A, Ogram, A. 2006. Fatty Acid-Oxidizing Consortia along a Nutrient Gradient in the Florida Everglades. *Appl Environm Microbiol* 72: 24002406
- Chin KJ, Lueders T, Friedrich MW, Klose M & Conrad R. 2004. Archaeal community structure and pathway of methane formation on rice roots. *Microb Ecol* 47: 59–67.
- Conrad R, Klose, M., Noll, M., Kemnitz, D., Bodelier, P. L. E. 2008. Soil type links microbial colonization of rice roots to methane emission. *Global Change Biol.* 14, 657-669
- Conrad, R. 2009. The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environm Microbiol Reports* 1:285-292
- Conrad, R., Erkel, C., and Liesack, W. 2006. Rice Cluster I methanogens, an important group of Archaea producing greenhouse gas in soil. *Curr Opin Biotechnol* 17: 262–267.
- Coyotzi S, J Pratscher, J Colin Murrell, Josh D Neufeld. 2016. Targeted metagenomics of active microbial populations with stable-isotope probing *Current Opinion in Biotechnology* 2016, 41:1–8
- Deambrosi et al. Arroz: Resultados experimentales 2001-2002. INIA Treinta y Tres. Informe 292 del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Cap 3
- Erkel C, Kube M, Reinhardt R & Liesack W. 2006. Genome of Rice Cluster I archaea - the key methane producers in the rice rhizosphere. *Science* 313: 370–372.
- Eusufzai MK, et al. 2010. Methane emission from rice fields as affected by land use change. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 139:742–748
- Fernández et al. 1999. How stable is stable: Function versus community composition. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:3697-3704.
- Fernández et al. 2000. Flexible community structure correlates with stable community function in methanogenic bioreactor communities perturbed by glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4058-4067.
- Fernández et al. 2013. Structure and function of the methanogenic microbial communities in Uruguayan soils shifted between pasture and irrigated rice fields. *Environm. Microbiol.* 15:2588-2602.
- Fetzer et al., 1993. Sensitivity of methanogenic bacteria from paddy soil to oxygen and desiccation. *FEMS Microbiol Ecol*, 12:107 ? 115
- Friederich, MW. 2011. Trophic interactions in microbial communities and food webbs traced by stable isotope probing of nucleic acids. In: JC Murrell and AS Whiteley, *Stable isotope probing and related technologies*, ASM Press, Washington, pp203-232
- García F & Oyhantçabal W. 2016. Importancia y evolución de las emisiones de gases de efecto invernadero del sector agricultura. www.mgap.gub.uy/opypa. Consultado en abril 2017
- Grosskopf et al., 1998. Novel euryarcheotal lineages detected in rice roots and in the anoxic bulk soil of flooded rice microcosms. *Appl Environ Micorbiol* 64: 4983-4989
- Haichar Z F, Heulin , Guyonnet, Achouak.2016. Stable isotope probing of carbon flow in the plant holobiont.

Current Opinion in Biotechnology 41:9–13

Hashsham et al. 2000. Parallel processing of substrate correlates with greater functional stability in methanogenic bioreactor communities perturbed by glucose. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:4050–4057.

Hernández M, Dumont M, Yuan Q, Conrad R. 2015. Different Bacterial Populations Associated with the Roots and Rhizosphere of Rice Incorporate Plant-Derived Carbon *Appl Environ Microbiol* 81: 2243–2253

Irisarri et al. 2012. Emisiones de CH₄ y N₂O en un arrozal: primeras medidas en el sistema productivo uruguayo. *Agrociencia Uruguay*, 16, 2:1-10

Ji Y, Fernandez Scavino A, Klose M, Claus P, Conrad R. 2015. Functional and structural responses of methanogenic microbial communities in Uruguayan soils to intermittent drainage. *Soil Biology & Biochemistry* 89: 238–247

Kerdchoechuen O. 2005. Methane emission in four rice varieties as related to sugars and organic acids of roots and root exudates and biomass yield. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 108: 155–163

Kim SY, Jessie Gutierrez, Pil Joo Kim.. 2016. Unexpected stimulation of CH₄ emissions under continuous no-tillage system in mono-rice paddy soils during cultivation. *Geoderma* 267 : 34–40

Lu Y, and Conrad R. 2005. In situ stable isotope probing of methanogenic archaea in the rice rhizosphere. *Science* 309: 1088–1090

Lueders et al. 2001. Molecular analyses of methyl-coenzyme M reductase-subunit (mcr A) genes in rice field soil and enrichment cultures reveal the methanogenic phenotype of a novel archaeal lineage. *Environ Microbiol* 3:194–204

Lueders T, Pommerenke B, Friederich MW. 2004. Stable-Isotope Probing of Microorganisms Thriving at Thermodynamic Limits: Syntrophic Propionate Oxidation in Flooded Soil. *Appl Environ Microbiol* 70: 5778–5786

MGAP, 2016 (<http://www.mgap.gub.uy/estadisticas-y-documentos/cambio-climatico>) Consultado en abril 2017

Neufeld JD, Vohra J, Dumont MG, Lueders T, Manefield M, Friedrich MW, Murrell JC. 2007. DNA stable-isotope probing. *Nat Protoc* 2:860–866.

Pump J, Pratscher J, Conrad R. 2014. Colonization of rice roots with methanogenic archaea controls photosynthesis-derived methane emission. *Environmental Microbiology* doi:10.1111/1462-2920.12675

Ramakrishnan B, Lueders T, Dunfield PF, Conrad R & Friedrich MW. 2001. Archaeal community structures in rice soils from different geographical regions before and after initiation of methane production. *FEMS Microbiol Ecol* 37: 175–186.

Sakai et al. 2007. Isolation of key methanogens for global methane emission from rice paddy fields: a novel isolate affiliated with the clone Rice Cluster I. *Appl Environ Microbiol* 73:4326–4331

Sakai, S., H. Imachi, S. Hanada, A. Ohashi, H. Harada, and Y. Kamagata. 2008. *Methanocella paludicola* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon, the first isolate of the lineage “rice cluster I,” and proposal of the new archaeal order Methanocellales ord. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:929–936

Schmidt, E. L., and L. W. Belser. 1982. En: A. L. Page, R. H. Miller, and D. R. Keeney (ed.), *Methods of soil analysis, part 2: chemical and microbiological properties*. Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wis. p.1027–1042.

Schutz et al. 1989. Processes involved in formation and emission of methane in rice paddies. *Biogeochem* 7:33–53

Shade et al. 2012. Fundamental of microbial community resistance and resilience. *Frontiers in Microbiology*, 3: 417

Soubes et al. 1994. Inhibition of methanogenesis from acetate by Cr⁺³ and ammonia. *Biotechnol. Lett.* 16:195–200.

Tarlera et al. 2014. Yield-scaled global warming potential of two irrigation managements in a highly productive rice system in Uruguay. Aceptado en *Journal Paddy and Water Environment*

Watanabe, A., Takeda, T., and Kimura, M. (1999) Evaluation of origins of CH₄ carbon emitted from rice paddies. *J Geophys Res* 104: 23623–23629

Watanabe, A., Takeda, T., Kimura, M., 1999, Evaluation of origins of CH₄ carbon emitted from rice paddies. *J. Geophys. Res.* 104, 23623–23629.

Wu L, Ma K, Li Q, Ke X & Lu Y. 2009. Composition of archaeal community in a paddy field as affected by rice cultivar and N fertilizer. *Microb Ecol* 58: 819–826.

Yuan, Q., Pump, J., and Conrad, R. (2012) Partitioning of CH₄ and CO₂ production originating from rice

straw, soil and root organic carbon in rice microcosms. PLoS ONE 7: e49073.

doi:10.1371/journal.pone.0049073.

Zehnder y Stumm. 1988. Geochemistry and biogeochemistry of anaerobic habitats. En: (Zehnder, A., ed) Biology of anaerobic microorganisms, pp:1-38. Wiley & Sons. Canada

Licenciamiento

Reconocimiento 4.0 Internacional. (CC BY)