

# Diversidad microbiana en estudios de fertilización mineral de larga duración en caña de azúcar

## Microbial diversity in studies of long-term mineral fertilization studies in sugarcane

Mónica Tamayo-Isaac<sup>1\*</sup>; Dolores del Rosario Piñón-Gómez<sup>2</sup>; Ignacio Ramos-Tapia<sup>3</sup>; Pablo D. Pablos-Reyes<sup>1</sup>; Yaquelin Puchades-Izaguirre<sup>1</sup>; Jorge Soto-Winckler<sup>3</sup>; René Barbosa-García<sup>1</sup>; Guillermo Reynosa-Rodríguez<sup>1</sup>; Manuel Paneque<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar de Santiago de Cuba, Santiago de Cuba, Cuba; e-mail: monica.tamayo@inicas.azcuba.cu; pablo.pablos@inicas.azcuba.cu; yaquelin.puchades@inicas.azcuba.cu; rene.barbosa@inicas.azcuba.cu guillermo.reynosa@inicas.azcuba.cu

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar de Cuba-INICA. La Habana, Cuba; e-mail: dolores.pinon@inica.azcuba.cu

<sup>3</sup>Agroenergía SA. San Miguel - Santiago, Chile; e-mail: iramos@bionostra.com; jsoto@bionostra.com; mpaneque@uchile.cl

\*autor de correspondencia: monica.tamayo@inicas.azcuba.cu

**Cómo citar:** Tamayo-Isaac, M.; Piñón-Gómez, D.D.R.; Ramos-Tapia, I.; Pablos-Reyes, P.D.; Puchades-Izaguirre, Y.; Soto-Winckler, J.; Barbosa-García, R.; Reynosa-Rodríguez, G.; Paneque, M. 2023. Diversidad microbiana en estudios de fertilización mineral de larga duración en caña de azúcar. Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 26(2):e2511. <http://doi.org/10.31910/rudca.v26.n2.2023.2511>

Artículo de acceso abierto publicado por Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, bajo una Licencia Creative Commons CC BY-NC 4.0

Publicación oficial de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, Institución de Educación Superior Acreditada de Alta Calidad por el Ministerio de Educación Nacional.

**Recibido:** agosto 17 de 2023

**Aceptado:** diciembre 11 de 2023

**Editado por:** Helber Adrián Arévalo Maldonado

### RESUMEN

Las comunidades microbianas son esenciales para la productividad de los agroecosistemas. En caña de azúcar, el uso de fertilizantes nitrogenados, como práctica de manejo común, mantiene los niveles de la productividad del cultivo e influye en la diversificación del microbioma, ocasionando cambios en la diversidad de los microorganismos involucrados en el ciclo del nitrógeno (N). El objetivo de este estudio consistió en analizar la influencia de diferentes regímenes de fertilización nitrogenada sobre la estructura y la composición de la comunidad microbiana rizosférica, en un experimento de larga duración. Esta investigación permitirá establecer un régimen de fertilización más preciso. Se demostró que no existen diferencias significativas en la composición y en la estructura de la comunidad bacteriana, al usar diferentes niveles de fertilización nitrogenada en caña de azúcar. Los Phylum Acidobacteria, Firmicutes y Mortierellomycota fueron los más relacionados con las dosis de nitrógeno recomendadas, para obtener altos rendimientos agrícolas, bajo las condiciones de Cuba; sin embargo, existieron variaciones en cuanto a composición y abundancias relativas de los Phylum de la microbiota respecto a las dosis de nitrógeno aplicadas, con predominio de los Phylum Ascomycota y Basidiomycota. Fueron detectadas diferencias significativas, a nivel de género y familia, debido a la presencia de organismos probióticos en las parcelas no tratadas.

**Palabras clave:** Ciclo del nitrógeno; Comunidades microbianas; Fertilización nitrogenada; Microbioma; Microbiota del suelo.

### ABSTRACT

Microbial communities are essential for the productivity of agroecosystems. In sugarcane, using nitrogen fertilizers as a common management practice to keep crop productivity influences the diversification of the microbiome, causing changes in the diversity of microorganisms involved in the nitrogen (N) cycle. In a long-term experiment, this study aimed to analyze the influence of different nitrogen fertilization levels on the structure and composition of the rhizospheric microbial community. This research will help to establish a more precise fertilization regime. There were no significant differences in the composition and structure of the bacterial community when using different levels of nitrogen fertilization in sugarcane. Significant differences were detected at the genus and family level due to the presence of probiotic organisms in the untreated plots. The Phylum *Acidobacteria*, *Firmicutes*, and *Mortierellomycota* were the most related to the recommended nitrogen doses to obtain high agricultural yields under the conditions of Cuba. However, there were variations in composition and relative abundances of the Phylum of the microbiota concerning the doses of nitrogen applied with a predominance of the Phylum Ascomycota and Basidiomycota. Significant differences were detected at the genus and family level due to the presence of probiotic organisms in the untreated plots.

**Keywords:** Microbial communities; Microbial diversity; Microbiome; Nitrogen fertilization; Soil microbiota.

## INTRODUCCIÓN

Las comunidades microbianas están involucradas en una serie de servicios ecosistémicos modulando el ciclo de nutrientes e interacciones simbióticas y patógenas con las plantas, por lo que su rol en la productividad de los agroecosistemas es esencial (Bahram *et al.* 2018). Varios tipos de bacterias y hongos mejoran la estructura del suelo al contribuir a la formación de agregados y poros y también juegan un papel clave en el aumento de la fertilidad del suelo (Rashid *et al.* 2016).

La diversidad microbiana del suelo es extremadamente sensible a la fertilización, que es una de las principales acciones antropogénicas asociadas con los cambios globales (Feng *et al.* 2022). El uso de fertilizantes es uno de los aspectos importantes para el logro de una agricultura sostenible, por lo que se presta mucha atención a la reacción de los parámetros del suelo y su componente microbiológico (Megyes *et al.* 2021).

La fertilización se ha utilizado ampliamente como una práctica de manejo común, para mantener la fertilidad del suelo y la productividad de los cultivos. El uso de fertilizantes minerales, en combinación con fertilizantes orgánicos a largo plazo, de fertilizantes minerales, en combinación con fertilizantes orgánicos, enriquece y diversifica el microbioma del suelo y aumenta la actividad de las enzimas del suelo (Li *et al.* 2018); sin embargo, hay informes sobre cambios en la diversidad de los microorganismos involucrados en el ciclo del nitrógeno (N) después de la fertilización a largo plazo con fertilizantes minerales y orgánicos de origen animal y vegetal (Lin *et al.* 2021).

La caña de azúcar es uno de los cultivos más rentables para la producción de azúcar y biomasa con altos requerimientos de nutrientes y un largo período de crecimiento. La aplicación adecuada de fertilizantes nitrogenados promueve el macollamiento, el crecimiento, el metabolismo del nitrógeno, la distribución de la materia seca y la acumulación de azúcar y, por lo tanto, mejora significativamente la productividad de caña y azúcar. En este contexto, el uso a largo plazo de diferentes sistemas de fertilización puede generar disímiles condiciones sobre la actividad vital de los principales grupos taxonómicos y fisiológicos de los microorganismos del suelo (Puzniak *et al.* 2022), sin que existan evidencias sobre este particular para agroecosistemas tropicales insulares.

La microbiota del suelo, especialmente, aquella que habita en la rizosfera y coloniza los tejidos vegetales son objeto de numerosas investigaciones científicas, con el fin de tener un mejor entendimiento de los procesos ecosistémicos y, de esta forma, desarrollar sistemas de agricultura sostenible. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue analizar la influencia de diferentes regímenes de fertilización mineral sobre la estructura y la composición de la comunidad microbiana rizosférica en un experimento de larga duración, en cultivos de la caña de azúcar.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Perfil natural del sitio experimental.** El experimento de larga duración con diferentes dosis de fertilización mineral se estableció en 1998, en la Estación Experimental del Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar en Santiago de Cuba (20° 22'06,97" N; -76°01'89,31" W), sobre suelo Pardo Sialítico (Hernández *et al.* 1999). El estudio reprodujo el sistema de cultivo tradicional de caña de azúcar utilizado en Cuba, con plantación y cosecha manual, así como ciclos de reposición, luego de cinco cortes. Al momento del presente estudio se encontraba en su tercer ciclo y cepa de segundo retoño, plantado en primavera con el cultivar C86-12.

**Diseño experimental.** El experimento de bloques completamente al azar incluyó cinco tratamientos: (i) N<sub>0</sub>P<sub>25</sub>K<sub>50</sub> nula aplicación de nitrógeno, (ii) N<sub>50</sub>P<sub>25</sub>K<sub>50</sub> baja aplicación de N, (iii) N<sub>100</sub>P<sub>25</sub>K<sub>50</sub> media aplicación de N, (iv) N<sub>150</sub>P<sub>25</sub>K<sub>50</sub>, alta aplicación de N, (v) N<sub>200</sub>P<sub>25</sub>K<sub>50</sub> muy alta aplicación de N, en Kg/ha<sup>-1</sup> de N. Cada tratamiento se repitió tres veces y cada réplica contó con 48 m<sup>2</sup>. Los fertilizantes químicos aplicados fueron urea (46 % N), superfosfato de calcio (12 % P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) y cloruro de potasio (60 % K<sub>2</sub>O). Todos Los fertilizantes se aplicaron en el fondo del surco previo a la plantación y en retoño 20 días post-cosecha, manualmente y sin fraccionar dosis (INICA, 1990).

**Muestreo de suelos.** La recolección de muestras de suelo rizosférico se realizó en los días de cosecha, según Edwards *et al.* (2015). Se extrajeron tres plantas con raíces, por tratamiento, el suelo en exceso se retiró manualmente y las plantas se colocaron sobre bandejas esterilizadas. Se tomó 1 g, del suelo rizosférico, sin raíces, pero lo más cercano posible a este, aproximadamente, 1mm y se depositó en tubos estériles de 15 ml, que se almacenaron en contenedor a -20°C, para su traslado al laboratorio. Las muestras se almacenaron a -80 °C, para la extracción de ADN.

**Extracción de ADN, PCR y secuenciación.** Para cada muestra, se extrajo el ADN genómico total de 0,5 g de suelo fresco, utilizando el kit de aislamiento de ADN DNeasy Powersoil® (Qiagen, Hilden, Alemania), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración y la pureza del ADN se comprobó con un kit Qubit dsDNA HS Assay y fluorómetro Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific). Se usó una alícuota de ADN (50 ng) de cada muestra, como molde para la amplificación.

Las regiones hipervariables V3-V4 de los ARNr 16S bacterianos se amplificaron usando los cebadores 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3' y 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3', mientras que para las regiones ITS1 e ITS2 fúngicas se utilizaron 5'-CTTG-GTCATTTAGAGGAAGTAA-3' y 5'-GCTGCGTTCTTCATC-GATGC-3' (Klindworth *et al.* 2013). La amplificación y la secuenciación masiva fueron realizadas con tecnología Illumina Miseq, servicio brindado en Austral-Omics, Universidad Austral de Chile. El proceso de secuenciación se realizó con el Kit Miseq Reagent v3 600-cycles (2x250 pair-end). Las secuencias fueron importadas mediante archivo "fastq", considerando dos archivos por muestra, según Orgiazzi *et al.* (2012).

**Análisis bioinformático.** Se aplicaron filtros de control de calidad, a los archivos fastqs procesados en DADA2, de 240 pb (Callahan *et al.* 2016), con lecturas establecidas, en PHRED 20. El alineamiento múltiple de las nuevas secuencias unificadas (ASV) se realizó, según Katoh & Standley (2013). El árbol filogenético de máxima verosimilitud (ML) se infirió con el FastTree (Price *et al.* 2010). Las abundancias, la taxonomía, la filogenia y los metadatos de ASV se integraron en un objeto Phyloseq y se analizaron con el paquete Phyloseq v1.38.0 (McMurdie & Holmes, 2013). La disimilitud de la diversidad-β (Jaccard, Bray-Curtis y UniFrac filogenético ponderado y no ponderado) para las muestras, se evaluó mediante el análisis de coordenadas componentes principales (ACP), para revelar las diferencias entre los diferentes tratamientos estudiados.

Cada índice se comparó mediante un análisis de varianza multivariante permutacional (PERMANOVA), en el paquete “vegan” v2.5-7 en R (Oksanen *et al.* 2007), mediante la función adonis2 basada en el algoritmo de Anderson (2001). Se determinó la importancia para 10,000 permutaciones.

Las asignaciones taxonómicas a nivel de 16S e ITS se realizaron para las categorías taxonómicas de Reino, Phylum, Clase, Orden,

Familia y Género (100,0 %). La clasificación por Phylum bacterianos se realizó, según los criterios de Brenner *et al.* (2005), Goodfellow *et al.* (2009) y Krieg *et al.* (2010) y la clasificación de los hongos se realizó, según Corsaro *et al.* (2014), Tedersoo *et al.* (2015) y Tedersoo *et al.* (2016).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Microbiota bacteriana.** En el análisis de las secuencias obtenidas a partir de ARNr 16S, se obtuvieron 2,722 ASVs identificadas post-filtros en 21 muestras, un promedio de 10,426 lecturas por muestra. La microbiota bacteriana de la rizosfera de la caña de azúcar estuvo principalmente compuesta por los Phylum, con abundancias relativas >1,0 %: Acidobacteriota (26,7 %), Actinobacteriota (19,1 %), Proteobacteria (16,2 %), Firmicutes (15,1 %), Myxococcota (5,3 %), Plantomycetota (4,7 %), Methyloimabilota (3,0 %), Gemmatimonadota (2,3 %), Chloroflexi (2,0 %) y Bacteroidota (1,6 %) (Figura 1), con abundancias relativas >1,0 %. Los cuatro primeros filos (>15,0 %) fueron dominantes en todas las muestras y representaron más del 70 % de la abundancia relativa de las comunidades bacterianas.

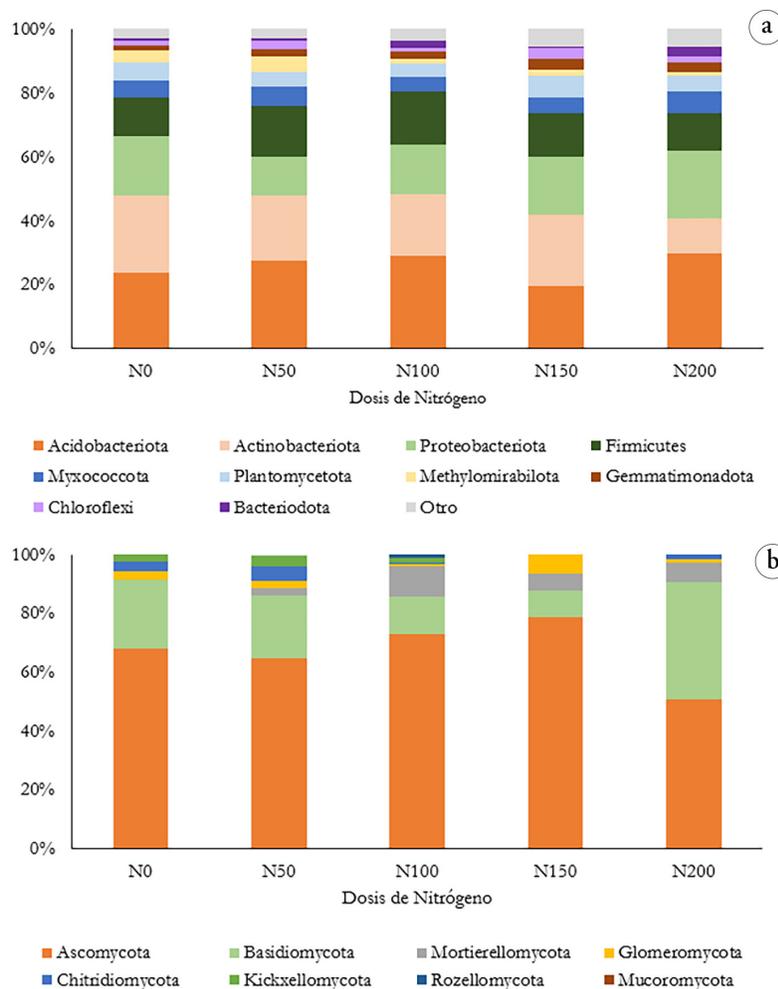


Figura 1. a) Composición de la microbiota bacteriana por Phylum asociada con a) Cada tratamiento (n= 5, con variación de las concentraciones de nitrógeno en el rango de 0 a 200 Kg/ ha<sup>-1</sup>. El gráfico de barras muestra los 10 Phylum bacterianos más abundantes y sus respectivas abundancias relativas; b) Composición de la micobiota de la caña de azúcar asociada a diferentes dosis de nitrógeno (n= 5, con variación de las concentraciones de nitrógeno en el rango de 0 a 200 Kg/ha<sup>-1</sup>).

En estudio realizado por Pedrinho *et al.* (2021), explica que las proteobacterias, acidobacterias y actinobacterias fueron los Phylum bacterianos más abundantes encontrados en suelos de campos de caña de azúcar, con quema previa a la cosecha y de bosques adyacentes, tanto en estaciones secas como húmedas, en el sureste de Brasil. El predominio de *Proteobacteria* en dichos ambientes se puede explicar por el hecho de que este Phylum comprende el grupo filogenéticamente más diverso en el dominio Bacteria, reconocido por ser metabólicamente versátil, incluyendo las bacterias aeróbicas y facultativas (Marin, 2014).

Según De Chaves *et al.* (2019), la presencia de Acidobacterias en el suelo puede indicar la presencia de genes relacionados con la síntesis de celulosa y proteínas y de la degradación del carbono, lo que sugiere características de resistencia a la desecación y potencial metabólico para degradación de carbono en suelo de caña de

azúcar. Russo *et al.* (2012) explican que Actinobacteria es una clase dominante en suelo arenoso, siendo la humedad un factor determinante para la abundancia de este filo, que aumenta en suelos áridos, debido a la resistencia de varias especies al estrés por sequía.

El análisis de correlación permitió constatar que a concentraciones crecientes de nitrógeno existe una tendencia a la disminución de los Phylum Actinobacteriota y MethyloMirabilota, así como un aumento de Gemmatimonadota y otros Phylum de menor representación (Tabla 1). De manera similar, Gu *et al.* (2021) encontraron un aumento en la abundancia relativa de *Proteobacterias* y Gemmatimonadetes, así como la disminución de Actinobacterias ( $P < 0,05$ ), en el suelo rizosférico de caña de azúcar, en la provincia de Guangdong, China, con la aplicación de fertilizantes nitrogenados, en un rango de dosis entre 375 y 560 kg/ha<sup>-1</sup>.

Tabla 1. Coeficiente correlación de Spearman entre diferentes concentraciones de nitrógeno y los Phylum de bacteria y hongos asociados a caña de azúcar ( $p < 0,05$ ).

Phylum de bacterias	$r_s$ ( $p < 0.05$ )
Acidobacteriota	0,4
Actinobacteriota	-0,7
Proteobacteriota	0,4
Firmicutes	-0,3
Myxococcota	0,2
Plantomycetota	0,1
Methylomirabilota	-0,8
Gemmatimonadota	0,8
Chloroflexi	0,3
Bacteriodota	0,3
Otros	1,0
Phylum de hongos	$r_s$ ( $p < 0.05$ )
Ascomycota	-0,10
Basidiomycota	0,00
Mortiereliomycota	0,40
Glomeromycota	-0,20
Chytridiomycota	-0,60
Kickxellomycota	-0,87
Rozellomycota	0,00
Mucoromycota	0,00

Los aportes de nitrógeno tienen múltiples efectos sobre el crecimiento, la composición y la función microbiana del suelo. Por una parte, se reducen las capacidades metabólicas de las comunidades bacterianas del suelo. El carbono de la biomasa microbiana disminuye después de la fertilización con nitrógeno, debido a la disminución del pH del suelo, lo que resulta en un mayor potencial osmótico y una mayor solubilidad del aluminio, que es tóxico para los microbios del suelo (Kearns *et al.* 2016).

Por otra parte, la aplicación de urea a largo plazo incrementa la diversidad de bacterias oxidantes de amoníaco (AOB), con un aumento significativo en la tasa de nitrificación potencial del suelo, por el enriquecimiento de los géneros con alta capacidad de oxidación de amoníaco (Pester *et al.* 2013). Además, se reduce significativamente la diversidad y la riqueza de las bacterias portadoras de nitrito oxidoreductasa (nxr) subunidad-alfa (nxrA), pero aumenta significativamente la diversidad y uniformidad de las bacterias portadoras de nxrB (subunidad-beta) (Zhang *et al.* 2023).

El análisis de componentes principales indica que existe un 72,2 % de la variación de los datos, en los dos componentes principales, de lo que se infiere, que los diferentes tratamientos de fertilización modifican la abundancia relativa de los grupos microbianos (Figura 2a); particularmente, en la dosis de N, correspondiente a 100 kg/ha<sup>-1</sup>, existe una mayor asociación con los Phylum Acidobacteria y Firmicutes. Esta dosis es la recomendada para obtener rendimientos agrícolas entre 90 – 100 ton ha<sup>-1</sup>, bajo las condiciones de Cuba (De León *et al.* 2013).

La rizosfera de la caña de azúcar es rica en actinobacterias, que promueven el crecimiento de las plantas y la mayoría tiene el potencial de antagonizar los patógenos de las plantas (Wang *et al.* 2021). Los firmicutes tienen capacidades metabólicas de amplio rango, capaces de usar varios azúcares, como únicas fuentes de carbono; algunos de ellos están asociados con el proceso de promoción del crecimiento en plantas, como los géneros *Bacillus* y *Rhizobium* (Patel *et al.* 2019); otros tienen rasgos específicos, como la fijación de nitrógeno (Liu *et al.* 2019), tolerancia a la salinidad (Vaishnav *et al.* 2020), producción de bioestimulantes, como péptidos de bajo peso molecular (Yakhin *et al.* 2017), fitohormonas y compuestos volátiles con actividad antimicrobiana (Cordovez *et al.* 2018) e incremento de biomasa (Wang *et al.* 2016).

**Micobiota.** Para ITS, se obtuvieron 931 ASVs identificados con post filtros en 21 muestras, para un promedio de 3,147 lecturas por muestra. Fueron identificados ocho Phylum de hongos con abundancias relativas superior al 1 % (Figura 1b). Se observó predominio de Ascomycota (66,2 %) y Basidiomycota (21,9 %), resultados que confirman los obtenidos por Liu *et al.* (2019). Los ocho Phylum asociados a caña de azúcar fueron informados anteriormente en suelos.

Autores, como Huang *et al.* (2021), mostraron predominio de los Phylum Ascomycota, Basidiomycota y Mucoromycota y reportan otros Phylum menos abundantes, tales como Mortierellomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Rozellomycota, y Kickxellomycota, en caña de azúcar, además de presentar variaciones en composición y en abundancias, cuando se aplican insecticidas y mezclas de fertilizantes.

Existe una ligera disminución en la abundancia relativa de Ascomycota en las condiciones naturales del cultivo de la caña de azúcar, sin fertilización, con relación a la dosis de 50 kg/ha<sup>-1</sup> de nitrógeno. Este Phylum es más abundante con incrementos en las dosis del elemento, hasta la aplicación de 150 kg/ha<sup>-1</sup>. Existe disminución en composición y abundancia al aplicar dosis de N, entre 150- 200 kg/ha<sup>-1</sup>; no existe la presencia de Kickxellomycota, Rozellomycota y Mucoromycota; se aprecia la sensibilidad de estos Phylum, a mayores concentraciones del elemento.

El Phylum Mortierellomycota se observa con la aplicación de 50 kg/ha<sup>-1</sup> de N, la abundancia relativa de este se favorece con la aplicación de dosis de 100 kg/ha<sup>-1</sup> y es precisamente, en esta dosis, donde se observa la mayor diversidad. *Mucoromycota* solo se muestra cuando se aplican 100 kg/ha<sup>-1</sup> de N; de forma general, los

ocho Phylum fungosos presentes se observaron con la aplicación de esta dosis (Figura 3).

Liu *et al.* (2019) estudiaron la dinámica de la comunidad de hongos del suelo en caña de azúcar durante diferentes etapas fenológicas del cultivo y encontraron que la micobiota estaba dominada por los Phylum Basidiomycota y Ascomycota, los que, a su vez, mostraron asociaciones más fuertes, cuando se presentaba un pH más alto, disponibilidad de nitrógeno y temperatura del suelo moderada.

Existieron variaciones en cuanto a composición y abundancias relativas de los Phylum respecto a las dosis de nitrógeno aplicadas. En la medida que se incrementan las dosis del elemento aumenta el número de Phylum presentes (composición), hasta la dosis de N<sub>100</sub>P<sub>25</sub>K<sub>50</sub>. A partir de la dosis de N<sub>150</sub>P<sub>25</sub>K<sub>50</sub> se observa una disminución en la composición. El análisis de correlación permitió constatar que a concentraciones crecientes de nitrógeno existe una tendencia a la disminución de los Phylum Kickxellomycota y Chytridiomycota, así como un aumento de Mortierellomycota (Tabla 1). El aumento de nitrógeno reduce la biomasa fúngica, a través de cambios en los exudados específicos de la planta y alteraciones en la competencia de nutrientes entre las plantas y los microbios de la rizosfera o directamente al inhibir el crecimiento de los hongos (Waldrop & Zak, 2006).

A nivel de género y familia se detectó abundancia diferencial, estadísticamente significativa, en el Phylum Ascomycota (Figura 4). La familia Saccharomycetaceae género *Issatchenkia* y se encontró enriquecida en el tratamiento con muy alta fertilización de nitrógeno (N<sub>200</sub>P<sub>25</sub>K<sub>50</sub>), con relación al control sin fertilización nitrogenada (N<sub>0</sub>P<sub>25</sub>K<sub>50</sub>). Los géneros *Groenewaldozyma* y *Zygoascus*, familia Trichomonascaceae, se encontraron en mayor abundancia en el tratamiento N<sub>0</sub>P<sub>25</sub>K<sub>50</sub>.

De manera general, se aprecia que en las parcelas no tratadas existen géneros que no se detectan con el incremento de las dosis de nitrógeno o solo se detectan en la concentración más alta evaluada. Consistente con este resultado, la mayoría de los hongos microscópicos son saprofitos y su tasa de crecimiento se correlaciona con la disponibilidad de Nitrógeno. Paungfoo-Lonhienne *et al.* (2015), al estudiar la relación entre las dosis de N y la comunidad fúngica en muestras de suelo y rizosfera de caña de azúcar, demostraron que los géneros afectados positivamente incluyeron fitopatógenos, mientras que los de relación negativa fueron relacionados con la salud del suelo y las plantas (biocontroladores, descomponedores).

El género *Issatchenkia* ha sido aislado de una variedad de ambientes que incluyen: granos de cacao, tallo de maíz y sorgo dulce, así como paja de arroz (Matsushika *et al.* 2016). Buddiwong *et al.* (2014) identificaron 19 aislados de levadura de los géneros *Candida* sp., *Pichia* sp. e *Issatchenkia* sp. a partir del suelo, hojas y bagazo de caña de azúcar. Estos autores seleccionaron estas cepas por su capacidad para producir altas concentraciones de etanol a elevadas temperaturas, entre 37 y 45 °C. Además, utilizaron azúcares de hexosa (glucosa, fructosa y sacarosa) y pentosa (xilosa y arabinosa), como fuentes de carbono. La presencia de este género de hongos

se relaciona con enfermedades en humanos y ganado (Centeno-Martínez *et al.* 2023), pero no se encuentra información como patógeno de plantas; sin embargo, *Issatchenkia terricola* se propone como potencial probiótico agrícola para promover la salud y el crecimiento de las plantas (Bright *et al.* 2022).

Shrestha *et al.* (2011) demostraron que 71 aislados fúngicos asociados a caña de azúcar, entre los que se encuentra *Zygoascus* sp., participan en la biodegradación de las paredes celulares de la planta huésped. Este proceso conduce a la liberación de oligosacarinas que, en bajas concentraciones, tienen actividad biológica y están involucradas en varios procesos de desarrollo en las plantas, como bioestimulantes o elicitores (Lara Acosta *et al.* 2018).

El género *Groenewaldozyma* fue uno de los propuestos a partir del reconocimiento de la fase telomorfa de algunas especies de *Candida*.

Se ha identificado como parte de la flora intestinal de artrópodos y en frutales con efectos beneficiosos *in vitro* con actividades probióticas y antioxidantes (Stefanini, 2018; Zullo & Ciafardini, 2020).

El análisis de componentes principales explicó que hay un 97,4 % de la variación de los datos, en las dos componentes, uno y dos. Estos resultados confirmaron que los diferentes tratamientos de fertilización alteran influyen sobre la abundancia relativa de la comunidad fúngica (Figura 2b). Particularmente, en la dosis de N 100 kg/ha<sup>-1</sup>, correspondiente a la recomendada para obtener rendimientos agrícolas entre 90 – 100 ton ha<sup>-1</sup>, bajo las condiciones de Cuba (De León *et al.* 2013), existe una mayor asociación con el Phylum Mortierellomycota.

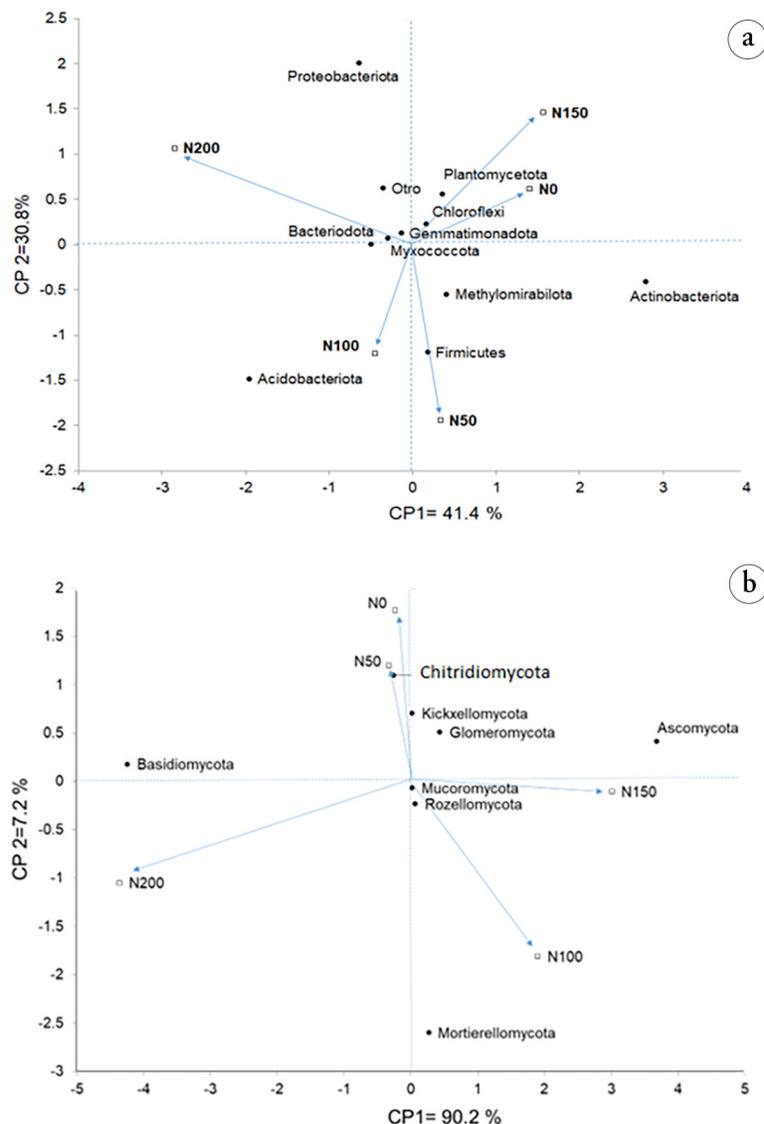


Figura 2. Análisis de componentes principales de muestras por tipo de tratamiento aplicaron 16 S. Análisis de varianza permutacional multivariado (Adonis) pr ( $>$ ) = 0.941; 10.000 permutaciones. a) Phylum de bacterias; b) Phylum de hongos.

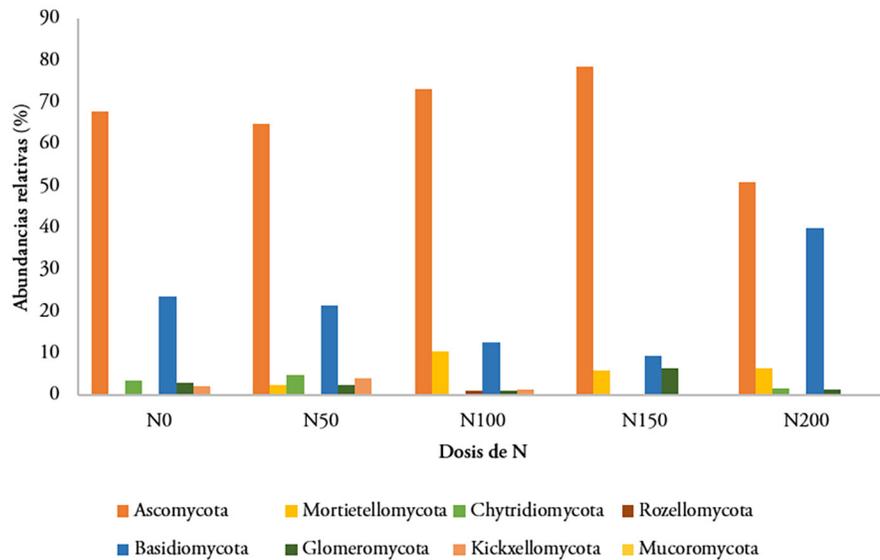


Figura 3. Abundancias relativas de los Phylum por dosis de nitrógeno.

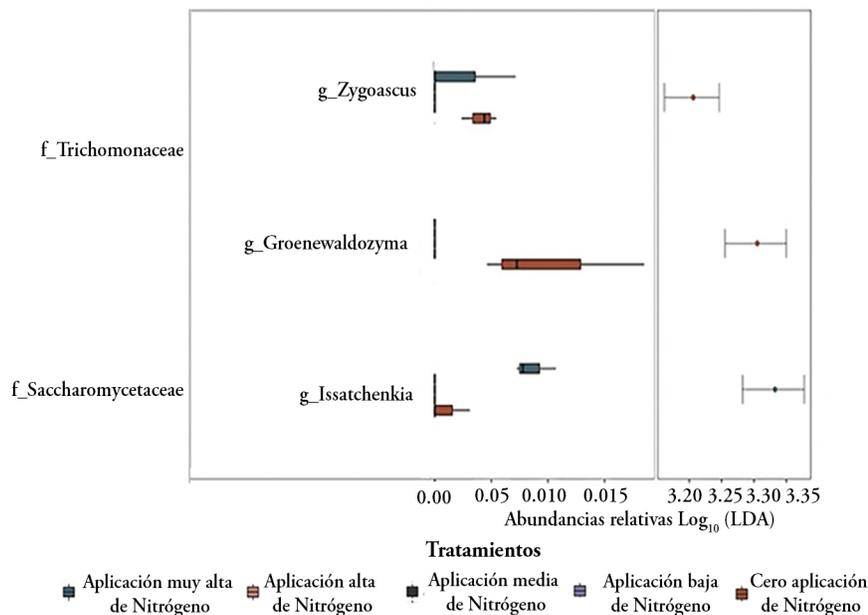


Figura 4. Hongos con abundancia diferencial entre tratamientos. Resultados de las pruebas a nivel de género y familia (Kruskal-Wallis;  $p > 0,01$ ).

El Phylum Mortierellomycota incluye, principalmente, microorganismos saprotrofitos ectomicorrízicos y ubicuos, con la capacidad de crecer en los suelos agrícolas y aumentar el rendimiento de los cultivos, al mejorar la disponibilidad de fósforo soluble y establecer simbiosis con las plantas (Grządziel & Gałazka, 2019). Wang *et al.* (2020) encontraron que pueden disolver el fósforo mineral en el suelo y aumentar el contenido de nutrientes al sintetizar y secretar ácido oxálico; este ácido orgánico también es un factor de patogenicidad potencial para los fitopatógenos, que inhibe el estallido oxidativo del hospedante y debilita las respuestas de defensa dependientes de  $Ca^{2+}$  (Sun *et al.* 2019). El Phylum Mortierellomycota también se ha identificado como Phylum predominante en suelos cultivados con pastos y caña de azúcar (Bahadori *et al.* 2022).

Las comunidades microbianas del suelo juegan un papel clave en la sostenibilidad del ecosistema al mantener funciones esenciales, a través de la renovación de carbono y nutrientes. Los resultados de este estudio se pueden utilizar para desarrollar prácticas de manejo más específicas, para mejorar la fertilidad biológica del suelo. Se requiere más investigación para profundizar en la evaluación de los efectos de las características geoquímicas y de la materia orgánica en la composición y estructura de la comunidad microbiana del suelo, en el funcionamiento y en la estabilidad del ecosistema, como respuesta a los cambios ambientales.

Este estudio demostró que la fertilización nitrogenada en caña de azúcar, en el rango estudiado, no induce diferencias significativas en la composición y en la estructura de la comunidad bacteriana, entre

diferentes niveles de fertilización nitrogenada en caña de azúcar. Las Acidobacterias, Firmicutes y Mortierellomycota estuvieron más relacionados con las dosis de nitrógeno recomendadas, para obtener altos rendimientos agrícolas, bajo las condiciones de Cuba.

Respecto a la micobiota, existieron variaciones en cuanto a la composición y abundancias relativas de los Phylum de la micobiota presentes, en relación con las dosis de nitrógeno aplicadas, con predominio de los Phylum Ascomycota y Basidiomycota, detectándose diferencias significativas, a nivel de género y familia, dadas por la presencia de organismos probióticos en las parcelas no tratadas.

**Agradecimientos.** Agradecemos al personal del Instituto de Investigaciones de la Caña de azúcar de Santiago de Cuba, por el apoyo en la realización de las actividades fundamentales, que muestran los resultados de esta investigación. Especial agradecimiento al personal del laboratorio de Bioenergía de Santiago de Chile, en la realización de los estudios del microbioma y el traslado de las muestras de suelo rizosférico. Conflictos de intereses: El manuscrito fue preparado y revisado con la participación de todos los autores, quienes declaramos que no existe ningún conflicto de intereses que ponga en riesgo la validez de los resultados presentados Financiación: Este estudio fue financiado por los siguientes proyectos: Contribución al conocimiento de las interacciones complejas suelo-caña de azúcar (*Saccharum* spp.) -microorganismos- ambiente con el código 02 PNCTI del programa, Desarrollo de la Agroindustria Azucarera y Contribución de la Biodiversidad Microbiana de los Suelos a la eficiencia de la fertilización de la Caña de Azúcar, en un escenario de cambio climático del Fondo Fiduciario Pérez Guerrero (FFPG), del Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD).

Contribución de los autores: Dolores del Rosario Piñón Gómez: conceptualización, adquisición de recursos, supervisión y administración del proyecto; Mónica Tamayo Isaac, Ignacio Ramos, Pablo Pablos Reyes, Yaquelin Puchades Izaguirre: condujeron el proceso de investigación, la curaduría y validación de los datos; Guillermo Reynosa Rodríguez René Barbosa García; Manuel Gilberto Paneque Corrales; Jorge Soto Winkler: obtención de los recursos y la supervisión y administración del proyecto.

## REFERENCIAS

- ANDERSON, M.J. 2001. A New method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*. 26(1):32-46. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x>.
- BAHADORI, M.; WANG, J.T.; SHEN, J.P.; LEWIS, S.; REZAEI RASHTI, M.; CHEN, C.H. 2022. Soil organic matter and geochemical characteristics shape microbial community composition and structure across different land uses in an Australian wet tropical catchment. *Land degradation & development*. Reino Unido. 33(6):817-831. <https://doi.org/10.1002/ldr.4174>
- BAHRAM, M.; HILDEBRAND, F.; FORSLUND, S.; ANDERSON, J.; SOUDZILOVSKAIA, N.; BODEGOM, P.; BENGTSSON-PALME, J.; ANSLAN, S.; COELHO, L.P.; HAREND, H.; HUERTA-CEPAS, J.; MEDEMA, M.H.; MALTZ, M.R.; MUNDRA, S.; OLSSON, P.A.; PENT, M.; PÓLME, S.; SUNAGAWA, S.; RYBERG, M.; TEDERSOO, L.; BORK, P. 2018. Structure and function of the global topsoil microbiome. *Nature*. 560(7717):233-237. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0386-6>
- BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T. 2005. *Bergey's manual® of systematic bacteriology*. Volume two: The roteobacteria (Part C). 2nd ed. Springer. US.
- BRIGHT, J.P.; KARUNANADHAM, K.; MAHESHWARI, H.S.; KARUPPIAH, E.A.A.; THANKAPPAN, S.; NATARAJ, R.; PANDIAN, D.; AMEEN, F.; POCZAI, P.; SAYYED, R.Z. 2022. Seed-borne probiotic yeasts foster plant growth and elicit health protection in black gram (*Vigna mungo* L.). *Sustainability*. Suiza. 14:e4618. <https://doi.org/10.3390/su14084618>
- BUDDIWONG, S.; THANONKEO, S.; PHETSOM, J.; JAISIL, P.; THANONKEO, P. 2014. Screening of thermotolerant yeast isolated from sugarcane plantations in Northeastern part of Thailand. *KHON KAEN University Research Journal*. 19(Supl. 1):217-223.
- 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):581-83. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- CENTENO-MARTÍNEZ, R.E.; MOHAN, S.; DAVIDSON, J.L.; SCHOONMAKER, J.P.; AULT, A.; VERMA M.S.; JOHNSON, T.A. 2023. The bovine nasal fungal community and associations with bovine respiratory disease. *Frontiers in Veterinary Science*. Suiza 10:1165994. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1165994>
- CORDOVEZ, V.; SCHOP, S.; HORDIJK, K.; DE BOULOIS, H.D.; COPPENS, E.; HANSEN, I.; RAAIJMAKERS, J.M.; CARRIÓN, V.J. 2018. Priming of plant growth promotion by volatiles of root associated *Microbacterium* spp. *Applied. Environmental. Microbiology*. Estados Unidos. p.84 <https://doi.org/10.1128/AEM.01865-18>
- CORSARO, D.; WALOCHNIK, J.; VENDITTI, D.; STEINMANN, J.; MÜLLER, K.D.; MICHEL, R. 2014. Microsporidia-like parasites of amoebae belong to the early fungal lineage Rozellomycota. *Parasitology Research*. 113(5):1909-18. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3838-4>
- DE CHAVES, M.G.; SILVA, G.G.Z.; ROSSETTO, R.; EDWARDS, R.A.; TSAI S.M.; NAVARRETE, A.A. 2019. Subgrupos de acidobacterias y su potencial

- metabólico para la degradación del carbono en suelos de caña de azúcar modificados con vinaza y fertilizantes nitrogenados. *Front. Microbiology*. Suiza. 10:1680. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01680>
12. DE LEÓN, M.; PÉREZ, H.; VILLEGAS, R.; PÉREZ, H.; SANTANA, I.; RODRÍGUEZ, I. 2013. Manejo sostenible de tierras en la producción de caña de azúcar. grupo azucarero AZCUBA. Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar. p.71-77
  13. EDWARDS, J.; JOHNSON, C.; SANTOS-MEDELLÍN, C.; LURIE E.; PODISHETTY, N.K.; EISEN, J.A.; SUNDARESAN. 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* Estados Unidos. 112(8):e911-20. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414592112>
  14. FENG, Y.; DELGADO-BAQUERIZO, M.; ZHU, Y.; HAN, X.; HAN, X.; XIN, X.; LI, W.; GUO, Z.; DANG, T.; LI, C. 2022. Responses of soil bacterial diversity to fertilization are driven by local environmental context across China. *Engineering*. 12:164-170. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.09.012>
  15. GOODFELLOW, M.; KÄMPFER, P.; BUSSE, H.J.; TRUJILLO, M.E.; SUZUKI, K.I.; LUDWIG, W.; WHITMAN, W.B. 2009. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Volume 5: The Actinobacteria. 2nd ed. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68233-4>
  16. GRZĄDZIEL, J.; GAŁĄZKA, A. 2019. Fungal biodiversity of the most common types of polish soil in a long-term microplot experiment. *Front. Microbiology*. 10:(6). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00006>
  17. GU, Y.; WANG, J.; CAI, W.; LI, G.; MEI, YANG, S. 2021. Different amounts of nitrogen fertilizer applications alter the bacterial diversity and community structure in the rhizosphere soil of sugarcane. *Front. Microbiology*. 12:e721441. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.721441>
  18. HERNÁNDEZ, A.; PÉREZ, J.; BOSCH, D.; CASTRO, N. 1999. Clasificación de los suelos de Cuba. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas e Instituto de Suelos. Mayabeque, Cuba. p.91
  19. HUANG, W.; LU, Y.; CHEN, L.; SUN, D.; AN, Y. 2021. Impact of pesticide/fertilizer mixtures on the rhizosphere microbial community of field-grown sugarcane. *3 Biotech*. 11(5):210. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02770-3>
  20. INSTITUCIÓN DE INVESTIGACIONES DE LA CAÑA DE AZÚCAR, INICA. 1990. Normas metodológicas del departamento de suelos y agroquímica. Tomo 1. p.100.
  21. KATOH, K.; STANDLEY, D.M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*. 30(4):772-80. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
  22. KEARNS, P.J.; ANGELL, J.H.; HOWARD, E.M.; DEEGAN, L.A.; STANLEY, R.H.; BOWEN, J.L. 2016. Nutrient enrichment induces dormancy and decreases diversity of active bacteria in salt marsh sediments. *Nature Communications*. 7:e12881. <https://doi.org/10.1038/ncomms12881>
  23. KLINDWORTH, A.; PRUESSE, E.; SCHWEER, T.; PEPLIES, J.; QUAST, C.; HORN, M.; GLÖCKNER, F.O. 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research*. 41(1):1 <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
  24. KRIEG, N.; STALEY, J.T.; BROWN, D.R.; HEDLUND, B.P.; PASTER, B.J.; WARD, N.L.; LUDWIG, W.; WHITMAN, W.B. 2010. *Bergey's manual of systematic bacteriology Volume 4: The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes*. 2nd ed. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68572-4>
  25. LARAACOSTA, D.; COSTALES MENÉNDEZ, D.; FALCÓN RODRÍGUEZ, A. 2018. Los oligogalacturónidos en el crecimiento y desarrollo de las plantas. *Cultivos Tropicales*. 39 (2):127-134.
  26. LI, C.X.; MA, S.C.; SHAO, Y.; MA, S.T.; ZHANG, L.L. 2018. Effects of long-term organic fertilization on soil microbiologic characteristics, yield and sustainable production of winter wheat. *Journal of Integrative Agriculture*. 17:210-219. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61740-4](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61740-4)
  27. LIN, Y.; YE, G.; LUO, J.; DI, H.J.; LINDSEY, S.; FAN, J.; LIU, D.; DING, W. 2021. Long-term organic fertilization regulates the abundance of major nitrogen-cycling-related genes in aggregates from an acidic Ultisol. *APPLIED Soil Ecology*. 165:e104014. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104014>
  28. LIU, X.; LI, Q.; LI, Y.; GUAN, G.; CHEN, S. 2019. *Paenibacillus* strains with nitrogen fixation and multiple beneficial properties for promoting plant growth. *PeerJ*. 7:e7445. <https://doi.org/10.7717/peerj.7445>
  29. MARIN, I. 2014. Proteobacteria. En: Amils, R. (ed.) *Encyclopedia of astrobiology*. Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-27833-4\\_1288-2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-27833-4_1288-2)

30. MATSUSHIKA, A.; NEGI, K.; SUZUKI, T.; GOSHIMA, T.; HOSHINO, T. 2016. Identification and characterization of a novel *Issatchenkia orientalis* GPI-Anchored protein, IoGas1, required for resistance to low pH and salt stress. *PLoS One*. 11(9):e0161888. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161888>
31. MCMURDIE, P.J.; HOLMES, S. 2013. Phyloseq and 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>
32. MEGYES, M.; BORSODI, A.K.; ÁRENDÁS, T.; MÁRIALIGETI, K. 2021. Variations in the diversity of soil bacterial and archaeal communities in response to different long-term fertilization regimes in maize fields. *Applied Soil Ecology*. 168:e104120. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104120>
33. OKSANEN, J.; KINDT, P.; LEGENDRE, P.; O'HARA, B.; SIMPSON, G.L.; SOLYMOS, P.; H. STEVENS, H.H.; WAGNER, H. 2007. The vegan package. *community ecology*.
34. ORGIAZZI, A.; LUMINI, E.; NILSSON, R.H.; GIRLANDA, M.; VIZZINI, A.; BONFANTE, P.; VALERIA, B. 2012. Unravelling soil fungal communities from different mediterranean land-use backgrounds. *PLoS ONE Estados Unidos*. 7(4):e34847. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034847>
35. PATEL, C.B.; SINGH, V.K.; SINGH, A.P.; MEENA, M.; MUPADHYAY, R.S.S. 2019. Chapter 10 - Microbial genes involved in interaction with plants. En: Singh, H.B.; Gupta, V.K.; Jogaiah, S. *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering. Microbial Genes Biochemistry and Applications*. Elsevier. p.171-180. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63503-7.00010-3>
36. PAUNGFUO-LONHIENNE, C.; YUN KIT, Y.; PINAKI KASINADHUNI, N.R.; LONHIENNE, T.G.A.; ROBINSON, N.; HUGENHOLTZ, P.; RAGAN, M.A.; SUSANNE, S. 2015. Nitrogen fertilizer dose alters fungal communities in sugarcane soil and rhizosphere. *Scientific Reports*. 5(1):8678. <https://doi.org/10.1038/srep08678>
37. PEDRINHO, E.A.N.; NAVARRETE, A.A.; KISHI, L.T.; CESÁRIO, C.; ROMANCINI, V.; FÉLIX, R.C.; DE SOUZA, E.; NASCIMENTO, L.; MUI, S., DE MACEDO, E.L. 2021. Taxonomic and nitrogen-cycling microbial community functional profiles of sugarcane and adjacent forest soils in Southeast Brazil. *MOJ Eco-Environment Sciencie*. 6(4):119-125. <https://doi.org/10.15406/mojes.2021.06.00224>
38. PESTER, M.; MAIXNER, F.; BERRY, D.; RATTEI, T.; KOCH, H.; LÜCKER, S.; NOWKA, B.; RICHTER, A.; SPIECK, E.; LEBEDEVA, E.; LOY, A.; WAGNER, M.; DAIMS, H. 2013. Nxr Bencoding the beta subunit of nitrite oxidoreductase as functional and phylogenetic marker for nitrite-oxidizing Nitrospira. *Environmental Microbiology*. 16(10):3055-3071. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12300>
39. PRICE, M.N.; DEHAL, P.S.; ARKIN, A.P. 2010. FastTree 2: árboles de probabilidad máxima aproximada para alineaciones grandes. *PLoS ONE*. 5(3):9490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
40. PUZNIAK, O.; HRYNCHYSHYN, N.; DATSKO, T.; ANDRUSZCZAK, S.; HULKO, B. 2022. Consequences of the long-term fertilization system use on physical and microbiological soil status in the Western Polissia of Ukraine. *Agriculture*. 12:1955. <https://doi.org/10.3390/agriculture12111955>
41. RASHID, M.I.; MUJAWAR, L.H.; SHAHZAD, T.; ALMEELBI, T.; ISMAIL, I.M.I.; OVES, M. 2016. Bacteria and fungi can contribute to nutrients bioavailability and aggregate formation in degraded soils. *Microbiology Research*. 183:26-41.
42. RUSSO, S.E.; LEGGE, R.; WEBER, K.; BRODIE, E.L.; GOLDFARB, K.C.; BENSON, A.K.; TAN, S. 2012. Bacterial community structure of contrasting soils underlying Bornean rain forests: inferences from microarray and next-generation sequencing methods. *Soil Biology and Biochemistry*. 55:48-59. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.05.021>
43. SHRESTHA, P.; SZARO, T.M.; BRUNS, T.D.; TAYLOR, J.W. 2011. Systematic search for cultivatable fungi that best deconstruct cell walls of miscanthus and sugarcane in the field. *Applied and Environmental Microbiology*. 77(15):5490-5504. <https://doi.org/10.1128/AEM.02996-10>
44. STEFANINI, I. 2018. Yeast-insect associations: It takes guts. *Yeast*. 35(4):315-330. <https://doi.org/10.1002/yea.3309>
45. SUN, Q.; LI, J.; FINLAY, R.D.; LIAN, B. 2019. Oxalotrophic bacterial assemblage in the ectomycorrhizosphere of forest trees and their effects on oxalate degradation and carbon fixation potential. *Chemical Geology*. 514:54-64. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2019.03.023>
46. TEDERSOO, L.; ANSLAN, S.; BAHRAM, M.; PÓLME, S.; RIIT, T.; LIIV, I.; KÓLJALG, U.; KISAND, V.; NILSSON, R.H.; HILDEBRAND, F.; BORK, P.; ABARENKOV, K. 2015. Shotgun metagenomes and multiple primer pair-barcode combinations of amplicons reveal biases in metabarcoding analyses of fungi. *MycKeys*. 10:1-43. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.10.4852>

47. TEDERSOO, L.; LIIV, I.; KIVISTIK, P.A.; ANSLAN, S.; KÖLJALG, U.; BAHRAM, M. 2016. Genomics and metagenomics technologies to recover ribosomal DNA and single-copy genes from old fruit-body and ectomycorrhizal specimens. *MycKeys*. 13:1-20. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.13.8140>
48. VAISHNAV, A.; SINGH, J.; SINGH P; RAJPUT, R.S.; SINGH, H.B.; SARMA, B.K. 2020. *Sphingobacterium* sp. BHU-AV3 induces salt tolerance in tomato by enhancing antioxidant activities and energy metabolism. *Frontiers Microbiol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00443>
49. WALDROP, M.P.; ZAK, D.R. 2006. Response of oxidative enzyme activities to nitrogen deposition affects soil concentrations of dissolved organic carbon. *Ecosystems*. 9:921-33. <https://doi.org/10.1007/s10021-004-0149-0>
50. WANG, Q.; CHEN, L.; HE, L.Y.; SHENG, X.F. 2016. Increased biomass and reduced heavy metal accumulation of edible tissues of vegetable crops in the presence of plant growth-promoting *Neorhizobium huautlense* T1-17 and biochar. *Agriculture, Ecosystem & Environmental*. 228:9-18. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.05.006>
51. WANG, S.; CHENG, J.; LI, T.; LIAO, Y. 2020. Response of soil fungal communities to continuous cropping of flue-cured tobacco. *Scientific Reports*. 10:19911. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77044-8>
52. WANG, Z.; SOLANKI, M.K.; YU, Z.X.; ANAS, M.; DONG, D.F.; XING, Y.X.; MALVIYA, M.K.; PANG, F.; LI, Y.R. 2021. Genome characteristics reveal the biocontrol potential of Actinobacteria isolated from sugarcane rhizosphere. *Frontiers Microbiology*. 12:797889. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.797889>
53. YAKHIN, O.I.; LUBYANOV, A.A.; YAKHIN, I.A.; BROWN, P.H. 2017. Biostimulants in plant science: a global perspective. *Frontiers in Plant Science*. 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02049>
54. ZHANG, W.; MA, Y.; YANG, X.; XU, X.; NI, B.; LIU, R.; MENG, F. 2023. Investigation of soil microbial communities involved in N cycling as affected by the long-term use of the N stabilizers DMPP and NBPT. *Agronomy*. 13(3):659. <https://doi.org/10.3390/agronomy13030659>
55. ZULLO, B.A.; CIAFARDINI, G. 2020. Virgin olive oil quality is affected by the microbiota that comprise the biotic fraction of the oil. *Microorganisms*. 8(5):663. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050663>