

Análisis del microbioma de suelos en sistemas agrícolas y ganaderos de Uruguay

Tesis de Doctorado en Biología

Sub-área Microbiología

PEDECIBA – Facultad de Ciencias

Mag. Matías Giménez Martínez

Laboratorio de Genómica Microbiana

Institut Pasteur de Montevideo

Director: Dr. Gregorio Iraola

Co-director: Dr. Gervasio Piñeiro

Tribunal

Presidenta: Dra. Cecilia Taulé

Vocal: Dra. Lucía Ferrando

Vocal: Dra. Patricia Vaz

Instituciones participantes



Instituciones financiadoras



Diciembre 2025

Índice de contenidos

| | |
|--|----|
| Resumen | 4 |
| CAPITULO I | 6 |
| Introducción | 6 |
| 1.1 Importancia de pastizales templados a nivel global..... | 6 |
| 1.2 Servicios ecosistémicos de los pastizales templados..... | 8 |
| 1.3 Importancia de los Pastizales del Río de la Plata | 9 |
| 1.4 Intensificación en el uso del suelo en sistemas basados en campo natural..... | 10 |
| 1.5 Composición e importancia del suelo en pastizales templados | 12 |
| 1.6 Procesos de formación de la materia orgánica del suelo..... | 14 |
| 1.7 Estructura y función del microbioma de suelos en pastizales templados. | 15 |
| 1.8 Metodologías de análisis del microbioma de suelos | 18 |
| 1.9 Objetivo general | 20 |
| 1.10 Objetivos específicos..... | 21 |
| CAPITULO II | 22 |
| Cambios en el microbioma del suelo asociados al remplazo del campo natural por rotaciones agrícolas | 22 |
| 2. 1 Introducción..... | 23 |
| 2.2 Metodología | 25 |
| 2.2.1 Muestreo de suelos y extracción de ADN | 26 |
| 2.2.2 Análisis de las comunidades bacterianas | 27 |
| 2.2.3 Análisis de las comunidades fúngicas | 28 |
| 2.2.4 Análisis de metagenomas shotgun..... | 29 |
| 2.3 Resultados..... | 31 |
| 2.3.1. Análisis de las comunidades fúngicas | 31 |
| 2.3.2. Estructura y diversidad de las comunidades bacterianas..... | 32 |
| 2.3.3. Análisis funcional de metagenomas | 34 |
| 2.4 Discusión..... | 38 |
| 2.5 Conclusiones | 42 |

| | |
|--|----|
| 2.6 Disponibilidad de datos y materiales..... | 43 |
| CAPITULO III | 44 |
| Cambios en comunidades microbianas de suelos asociados a diferentes opciones de intensificación del campo natural en sistemas ganaderos..... | 44 |
| 3.1 Introducción..... | 44 |
| 3.2 Metodología | 49 |
| 3.2.1 Descripción de los Ensayos a Largo Plazo de campo natural muestreados. | 49 |
| 3.2.1.1 Ensayos de fertilización de Campo Natural | 49 |
| 3.2.1.2 Ensayos de sobresiembra de leguminosas y adición de fósforo al campo natural | 50 |
| 3.2.1.3 Ensayos de remplazo del Campo Natural por pasturas perennes | 51 |
| 3.2.2 Procesamiento de Muestras y extracción de ADN microbiano | 53 |
| 3.2.3 Análisis Bioinformático de secuencias | 54 |
| 3.2.3.1 Resolución de ASVs y obtención de tablas de conteo | 54 |
| 3.2.3.2 Análisis de composición y diversidad del microbioma | 55 |
| 3.2.3.3 Análisis de redes a partir de datos de microbioma..... | 56 |
| 3.3 Resultados..... | 57 |
| 3.3.1 Fertilización de campo natural..... | 58 |
| 3.3.1.1 Análisis de comunidades fúngicas en campo natural fertilizado | 58 |
| 3.3.1.2 Análisis de comunidades bacterianas en campo natural fertilizado | 60 |
| 3.3.1.3 Análisis de redes de correlación a partir de datos de microbioma en campo natural fertilizado | 64 |
| 3.3.2 Sobresiembra de leguminosas y adición de fósforo | 65 |
| 3.3.2.1 Comunidades fúngicas de suelo luego de la sobresiembra de leguminosas y adición de fósforo | 66 |
| 3.3.2.2 Comunidades bacterianas de suelo luego de la sobresiembra de leguminosas y adición de fósforo | 69 |
| 3.3.2.3 Análisis de redes de correlación a partir de datos de microbioma de suelo luego de la sobresiembra de leguminosas y adición de fósforo..... | 72 |
| 3.3.3 Implantación de pasturas perennes | 74 |

| | |
|---|-----|
| 3.3.3.1 Comunidades Fúngicas del suelo luego de la implantación de pasturas perennes..... | 74 |
| 3.3.3.2 Comunidades Bacterianas del suelo luego de la implantación de pasturas perennes..... | 77 |
| 3.3.3 Análisis de redes de correlación a partir de datos de microbioma de suelo luego de la implantación de pasturas perennes | 79 |
| 3.4 Discusión | 82 |
| 3.4.1 Efectos de la fertilización del campo natural..... | 82 |
| 3.4.1.1 Efectos de la fertilización sobre comunidades fúngicas de suelos | 82 |
| 3.4.1.2 Efectos de la fertilización sobre comunidades bacterianas del suelo | 85 |
| 3.4.1.3 Efectos de la fertilización sobre las redes de correlación | 86 |
| 3.4.2 Efectos de la sobresiembra de leguminosas y adición de fósforo en campo natural | 87 |
| 3.4.2.1 Efectos de la sobresiembra de leguminosas y adición de fósforo sobre las comunidades fúngicas del suelo..... | 88 |
| 3.4.2.2 Efectos de la sobresiembra de leguminosas y adición de fósforo sobre las comunidades bacterianas del suelo..... | 89 |
| 3.4.2.3 Análisis de redes bipartitas de suelos con sobresiembra de leguminosas y adición de fósforo | 90 |
| 3.4.3 Efectos de implantación de pasturas perennes en campo natural | 92 |
| 3.4.3.1 Efectos de la implantación de pasturas perennes sobre las comunidades fúngicas del suelo..... | 92 |
| 3.4.3.2 Efectos de la implantación de pasturas sobre las comunidades bacterianas del suelo | 94 |
| 3.4.3.3 Análisis de redes bipartitas de suelos a partir de la implantación pasturas perennes..... | 96 |
| 3.5 Conclusiones | 97 |
| CAPITULO IV | 100 |
| Análisis del metagenoma edáfico en un gradiente de intensificación del uso del suelo .. | 100 |
| 4.1 Introducción..... | 100 |
| 4.1.1 Aplicaciones de la metagenómica al análisis funcional de suelos | 101 |
| 4.1.2 Ciclo del carbono en suelos y su regulación microbiana | 101 |

| | |
|---|-----|
| 4.1.3 Ciclo del nitrógeno y el rol de los microorganismos | 102 |
| 4.1.4 Ciclo del fósforo y su relación con el microbioma del suelo | 102 |
| 4.1.5 Cambios en los ciclos biogeoquímicos ante la intensificación del uso del suelo | 103 |
| 4.2 Metodología | 103 |
| 4.2.1 Generación de datos, procesamiento inicial y filtrado de lecturas | 104 |
| 4.2.2 Detección de genomas representativos y determinación de abundancia | 104 |
| 4.2.3 Caracterización del plasmidoma | 106 |
| 4.2.4 Análisis de genes vinculados a los ciclos de nutrientes..... | 106 |
| 4.3 Resultados..... | 108 |
| 4.3.1 Análisis de abundancia de genes codificantes de CAZymes en metagenomas de suelos..... | 109 |
| 4.3.2 Análisis de abundancia de genes vinculados al ciclo del nitrógeno en metagenomas de suelo | 111 |
| 4.3.3 Análisis de abundancia de genes vinculados al ciclo del fósforo en metagenomas de suelo | 113 |
| 4.3.4 Análisis de plasmidoma en metagenomas de suelos | 115 |
| 4.3.5 Análisis de genomas representativos de especies en datos metagenómicos.. | 117 |
| 4.4. Discusión..... | 120 |
| 4.5 Conclusión | 126 |
| CAPITULO V..... | 127 |
| Discusión | 127 |
| 5.1 Alcances y limitaciones de los métodos utilizados. | 128 |
| 5.2 Caracterización del microbioma de campo natural | 130 |
| 5.3 Impacto de la intensificación en el uso del suelo sobre el microbioma de campo natural. | 133 |
| 5.3.1 Impacto de la intensificación en el uso del suelo en funciones microbianas vinculadas al ciclado de carbono | 135 |
| 5.3.2 Impacto de la intensificación en el uso del suelo en funciones microbianas vinculadas al ciclado de nitrógeno y fósforo | 137 |
| 5.4 Estrategias sostenibles para la intensificación en sistemas agrícola-ganaderos... | 139 |

| | |
|--------------------------|-----|
| 6. Conclusiones | 141 |
| 7. Bibliografía | 143 |
| 8. Anexos..... | 178 |
| 9. Agradecimientos | 184 |

Resumen

Los pastizales templados del Río de la Plata constituyen uno de los biomas más relevantes para la producción agropecuaria y la conservación de la biodiversidad a nivel global. Sin embargo, su intensificación mediante prácticas como la fertilización, la sobresiembra de leguminosas o el reemplazo por pasturas sembradas y cultivos agrícolas ha generado incertidumbre sobre los impactos en el microbioma del suelo, un componente clave para la sostenibilidad de procesos ecosistémicos. En esta tesis se caracterizó de manera exhaustiva la estructura y función de comunidades bacterianas y fúngicas de suelos de campo natural y sus distintas formas de intensificación. Se utilizaron aproximaciones de secuenciación masiva (16S, ITS y metagenómica *shotgun*) y análisis de redes microbianas para comprender los cambios en diversidad, composición y potencial funcional. Los resultados muestran que la conversión del campo natural en sistemas agrícolas conlleva una pérdida significativa de diversidad fúngica y una alteración en los ensamblajes de comunidades bacterianas, acompañada por una reducción en genes asociados al reciclado de necromasa microbiana y al metabolismo del carbono. En sistemas ganaderos, la fertilización inorgánica del campo natural redujo la conectividad de las redes de correlación entre hongos micorrícicos arbusculares y bacterias, favoreciendo géneros nitrificantes y patógenos, mientras que la sobresiembra de leguminosas (fertilizadas con fósforo) sobre el campo natural y el reemplazo de este por pasturas mostraron efectos menores e intermedios a los de la fertilización. En conjunto, los hallazgos evidencian un gradiente de simplificación ecológica y pérdida de mutualismos microbianos a medida que aumenta la intensificación del uso del suelo. Este trabajo constituye una caracterización exhaustiva del microbioma de campo natural en Uruguay y aporta evidencia sobre cómo las prácticas de manejo modifican la estructura de las comunidades microbianas y las funciones biogeoquímicas del suelo, con implicancias para la resiliencia y el manejo sostenible de los sistemas pastoriles de nuestro país.

CAPITULO I

Introducción

1.1 Importancia de pastizales templados a nivel global

Los pastizales o praderas templadas constituyen uno de los biomas más importantes a nivel mundial, destacándose por su vastedad, diversidad biológica y por el conjunto de servicios ecosistémicos que ofrecen. En el ámbito global, los pastizales templados son reconocidas no solo por su capacidad de sostener la producción de alimentos y fibras, sino también por su rol determinante en la regulación del clima, el almacenamiento de carbono y el mantenimiento de la biodiversidad (Zhao, et al 2020). Estudios recientes han destacado que la diversidad biológica de estos ambientes es fundamental para sostener múltiples servicios ecosistémicos, tales como el ciclo de nutrientes, la descomposición de materia orgánica y la retención de agua (Soussana, et al 2004; Hanisch, et al 2020; Zhang, et al 2023). Esta capacidad multifuncional de los pastizales templados las convierte en ecosistemas de alto valor ecológico y socioeconómico, especialmente en regiones donde la agricultura y la ganadería representan pilares importantes de la economía.

Los pastizales templados se definen como extensos ecosistemas dominados por gramíneas, presentando climas caracterizados por temperaturas moderadas y precipitaciones repartidas de manera relativamente uniforme a lo largo del año, aunque con marcada variabilidad interanual en algunas regiones (Sala, et al 2001). Diversos estudios han puesto de manifiesto que los pastizales o praderas son el escenario donde se llevan a cabo procesos esenciales que permiten almacenar carbono, regular el clima, proporcionar hábitat a una gran diversidad de especies y sustentar actividades humanas de gran importancia económica como la agricultura y la ganadería (Bai, et al 2022; Peterman & Buzhdygan 2021; Liu, et al 2022). En particular, la multifuncionalidad de estos ecosistemas se evidencia a través de su contribución en procesos fundamentales como la descomposición de materia orgánica, la retención y reciclaje de nutrientes y la regulación de los ciclos hidrológicos, todos los cuales tienen repercusiones directas en la salud de los suelos y en la productividad agropecuaria (Richter, et al 2024).

La diversidad biológica, que incluye tanto la diversidad de plantas como la microbiana en el suelo y también la macro y mesofauna, es crucial para mantener estas funciones ecosistémicas. Por ejemplo, investigaciones han demostrado que la diversidad microbiana tiene un efecto significativo en la capacidad del sistema para mantener funciones del ecosistema a niveles moderados y altos de rendimiento (Zhai, et al 2024). Además, la pérdida de biodiversidad, debida a cambios en el uso del suelo, compromete la capacidad de estos ecosistemas para sostener servicios vitales y, por ende, la resiliencia de los procesos naturales (Prangel, et al 2023).

A pesar de todo esto, múltiples factores amenazan la conservación de este tipo de biomas, donde destacan el cambio climático, los cambios en el uso del suelo y la erosión de los procesos que han dado forma a estos ecosistemas herbáceos durante milenios (Stevens, et al 2022). Los efectos de los factores mencionados son acumulativos y en cascada, lo cual se suma a la escasa protección que tienen a nivel global este tipo de paisaje, donde se estima que solamente el 4% de los pastizales a nivel mundial se encuentran dentro de áreas protegidas (Henwood, 2010). La descripción de los mecanismos a través de los cuales los pastizales templados ayudan a cumplir los mencionados servicios ecosistémicos puede ser un aporte a su conservación y valorización en un contexto de cambios en el uso del suelo.

1.2 Servicios ecosistémicos de los pastizales templados

Los pastizales templados constituyen un componente estratégico de los sistemas agropecuarios al proveer servicios de aprovisionamiento que sostienen la productividad y garantizan la provisión de bienes. Entre estos, la producción de forraje es el más relevante, ya que representa la base alimenticia de los sistemas ganaderos de pastoreo (Boval & Dixon 2012). Este recurso posibilita la obtención de productos como carne, leche y derivados que son esenciales para la seguridad alimentaria global y para las economías nacionales dependientes de la agroexportación. A su vez, el pastoreo estructura las comunidades y aumenta las tasas de ciclado de nutrientes. A partir de los cambios generados en los pastizales por el pastoreo, su manejo se ha convertido en un pilar para mantener altos valores de productividad, mientras se proveen otros servicios ecosistémicos (Cezimbra et al., 2021; Silva et al., 2019).

Los servicios de regulación que proveen las praderas templadas están estrechamente asociados al ciclado de nutrientes y a la regulación hidrológica. Estos procesos dependen de múltiples factores

abióticos, como la estructura del suelo, pero también de la diversidad biológica a múltiples escalas, como la cobertura vegetal, macrofauna del suelo y microorganismos (Le Provost et al., 2023). La biodiversidad de estos organismos se encuentra estructurada por la heterogeneidad de ambientes que se encuentran en los pastizales y por las múltiples respuestas de los organismos a estos gradientes ambientales (Lengyel, et al 2016). A su vez, las praderas templadas tienen la capacidad de mantener la infiltración hídrica de los suelos lo cual permite reducir la dependencia de fertilizantes químicos y prevenir la erosión, a la vez que favorece la recarga de acuíferos y la regulación de caudales (Robinson, et al 2022). Así, los pastizales no sólo sostienen la producción primaria, sino que también desempeñan un papel central en la estabilidad ambiental y en la eficiencia de los sistemas agroecológicos.

La diversidad microbiana edáfica se ha identificado como un factor clave en la preservación de varias de las funciones mencionadas anteriormente, dado que la complejidad de las comunidades del suelo determina la capacidad del sistema para mantener simultáneamente múltiples procesos (multifuncionalidad) (Delgado-Baquerizo, et al 2016). Investigaciones recientes evidencian que la pérdida de diversidad conduce a consecuencias negativas en cascada, incluyendo la aceleración de pérdidas de nutrientes por lixiviación y el incremento de emisiones de gases de efecto invernadero como el N_2O . Por ejemplo, la simplificación de comunidades microbianas ha mostrado aumentar la lixiviación de fósforo, comprometiendo tanto la fertilidad del suelo como la calidad del agua en zonas adyacentes (Bender, et al 2023). Estos procesos han sido vinculados a la pérdida en abundancia de genes de ciclado de nutrientes y reflejan la vulnerabilidad de los sistemas de baja diversidad, resaltando la necesidad de conservar la integridad biológica de los suelos para sostener los servicios ecosistémicos.

Por último, los pastizales cumplen un rol decisivo en los flujos de Gases de Efecto Invernadero (GEI) al actuar como sumideros de carbono, almacenando grandes cantidades de carbono orgánico principalmente en el suelo (Barneze, et al 2022; Gomez-Casanovas, et al 2021). Este servicio resulta crítico frente al avance del cambio climático, dado que la conversión de pastizales a sistemas intensivos de cultivo o forestación puede alterar profundamente los balances de carbono y reducir la capacidad de mitigación climática. En conjunto, la multifuncionalidad de los pastizales integra la provisión de bienes, la regulación de procesos biofísicos y la conservación de la biodiversidad, constituyendo la base de sistemas productivos sostenibles a escala regional y global.

Estudios que integran gran cantidad de datos reportan que la intensificación y el cambio en el uso del suelo contribuyen a la pérdida de la multifuncionalidad en praderas templadas (Schils, et al 2022).

1.3 Importancia de los Pastizales del Río de la Plata

Dentro del territorio latinoamericano, los pastizales templados constituyen ecosistemas clave para el desarrollo agropecuario y la conservación de la biodiversidad. Los pastizales del Río de la Plata, una de las mayores áreas de pastizales naturales en el mundo, se extienden sobre aproximadamente 70 millones de hectáreas, abarcando zonas del litoral este de Argentina, sur de Brasil y prácticamente todo el territorio uruguayo (Soriano et al., 1991; Paruelo et al., 2007; Baeza & Paruelo, 2020). Esta escala los posiciona como uno de los biomas de pastizales nativos más extensos y biodiversos de América del Sur (Andrade et al., 2018). La región que incluye los pastizales del Río de la Plata se caracteriza por un clima templado con precipitaciones anuales que varían entre 400 y 1600 mm, condiciones que permiten la existencia de una vegetación diversificada y resiliente (Soriano et al., 1991; Lezama et al., 2019). La biodiversidad de estos ecosistemas es notable, albergando hasta 385 especies de aves y alrededor de 90 especies de mamíferos terrestres, factores que contribuyen a una alta provisión de servicios ecosistémicos, algunos de los cuales fueron descriptos anteriormente (Paruelo et al., 2016; Andrade et al., 2018).

Ecológicamente, los pastizales de esta región presentan una estructura y funcionalidad compleja. Estos ecosistemas han formado parte integral de la cultura y economía regionales durante siglos, constituyendo en Uruguay aproximadamente el 55-70% del territorio nacional y las bases productivas para la ganadería extensiva, principalmente de carne, cuero y lana (Baeza et al., 2022; Gutiérrez et al., 2020). Más allá del impacto del pastoreo, estos sistemas productivos en Uruguay se conocen como sistemas ganaderos sobre campo natural. Sin embargo, los pastizales enfrentan desafíos derivados de la expansión agrícola, la forestación y el cambio climático, lo que amenaza su conservación y la continuidad de los servicios ecosistémicos que proveen (Baldi & Paruelo, 2008; Modernel et al., 2016). Estos factores resaltan la necesidad de estrategias integradas que permitan armonizar la producción agrícola y ganadera con la conservación de la biodiversidad y la funcionalidad ecosistémica en los pastizales del Río de la Plata (Carvalho & Batello, 2009; Michelson, 2009).

1.4 Intensificación en el uso del suelo en sistemas basados en campo natural.

Uno de los desafíos más críticos que enfrentan los pastizales templados en el Uruguay es el cambio en el uso del suelo. En las últimas décadas, se ha registrado una transformación marcada por la conversión de pastizales naturales a sistemas agrícolas intensivos y plantaciones forestales, impulsada principalmente por la expansión de cultivos comerciales como la soja y la demanda global de alimentos (Baeza y Paruelo, 2020; Gallego et al., 2023). Esta conversión conlleva importantes consecuencias ecológicas y socioeconómicas. Se reduce la biodiversidad del suelo y disminuye la capacidad de estos ecosistemas para mantener servicios ecosistémicos clave, como la retención de nutrientes y la mitigación de emisiones de gases de efecto invernadero. Además, esta pérdida debilita la resiliencia ecológica y afecta la continuidad de prácticas ganaderas tradicionales que son esenciales para la identidad y economía regional (Paruelo et al., 2016; Baeza et al., 2022).

En Uruguay, por ejemplo, entre 2004 y 2010 la superficie dedicada a cultivos de verano creció un 36%, impulsada sobre todo por la soja. Este cambio altera la estructura del paisaje y afecta procesos importantes como el balance de carbono y la regulación del ciclo hídrico, comprometiendo la funcionalidad ecosistémica a largo plazo (Gallego et al., 2023; Redo et al., 2012). Por su parte, en Uruguay las plantaciones forestales aumentaron su superficie en un 100% en el período 2003-2018 (Baeza et al., 2022). Aunque las plantaciones forestales pueden aumentar la captura neta de CO₂, también conllevan la pérdida de biodiversidad y servicios ecosistémicos vinculados a los pastizales (Baeza y Paruelo, 2020).

Por otra parte, el pastoreo por ganado bovino tiene un impacto importante en la ecología de especies vegetales, pero también en el ciclado de carbono y la formación de materia orgánica en praderas nativas (Abrigo et al., 2024). En estos sistemas ganaderos, sobre campo natural, se utilizan diferentes manejos para aumentar la productividad, cuyos valores se encuentra en el entorno de 70 kgPV/há anuales. Uno de los manejos utilizados con este propósito es la fertilización con Nitrógeno y/o fósforo (Rodríguez-Palma & Rodríguez, 2017). Se ha reportado que esto mejora la productividad primaria y la calidad del forraje, lo cual repercute en mejoras en la producción secundaria (Jaurena et al., 2014). Otro de los manejos utilizados es la sobresiembra de leguminosas

y adición de fósforo en campo natural. Se ha observado que esta práctica mejora la productividad de pastizales templados, debido a múltiples factores entre los que se incluyen cambios en la estacionalidad generada por las especies introducidas (Rama et al., 2022). Sin embargo, esta práctica tiene efectos en la composición y diversidad de especies vegetales (Lezama et al., 2024) y también en comunidades microbianas de suelos (Azziz et al., 2023). Por último, la siembra de pasturas perennes, como variedades de *Festuca sp.*, *Lotus sp.* y/o *Trifolium sp.*, es otro manejo de intensificación que permite aumentar el rendimiento en el corto plazo y al cual se recurre en sistema ganaderos sobre campo natural (Jaurena et al., 2021).

La implementación de procesos y tecnologías de intensificación sostenible resulta indispensable para preservar este patrimonio natural para futuras generaciones (Michelson, 2009; Carvalho y Batello, 2009). En un contexto de cambio climático, el lograr entender los cambios generados a partir de los diferentes manejos de intensificación en los suelos, puede ser útil para evaluar su impacto en este ecosistema. En este sentido, el estudio de comunidades microbianas puede ser una buena aproximación para entender el impacto generado a partir de estos manejos.

1.5 Composición e importancia del suelo en pastizales templados

El suelo es un sistema complejo y dinámico compuesto por una fracción mineral, materia orgánica, agua, aire y una gran diversidad de organismos vivos que forman la pedosfera, la capa biológicamente activa que sostiene la vida terrestre. Se define no solo como un medio físico para el crecimiento de las plantas, sino como un ecosistema integral que regula procesos biogeoquímicos esenciales (Brady & Weil, 2017). Los suelos actúan como soporte físico, reservorio de agua y nutrientes, y plataforma donde interactúan procesos ecológicos fundamentales que condicionan la productividad primaria y la biodiversidad (Kopittke et al., 2024).

Los servicios ecosistémicos que proveen los suelos son múltiples y críticos para la sostenibilidad ambiental y la seguridad alimentaria. Entre ellos destacan el soporte para la productividad primaria mediante la provisión y reciclaje de nutrientes, la regulación climática por el secuestro y emisión controlada de gases de efecto invernadero, y la moderación del ciclo hidrológico al retener y filtrar el agua (Schmidt, et al 2011). Además, los suelos contribuyen al control de plagas y enfermedades, y al mantenimiento de la biodiversidad, asegurando la estabilidad funcional de los ecosistemas agrícolas y naturales (FAO, 2020).

En cuanto a la composición mineral, los suelos están formados principalmente por partículas minerales de distinta granulometría: arena, limo y arcilla. Esta composición determina la textura y estructura del suelo, que a su vez influye en propiedades físicas como la porosidad, la capacidad de retención de agua y aire, y la disponibilidad de nutrientes (Hillel, 2004). La estructura del suelo es el resultado de la agregación de partículas minerales y materia orgánica, clave para promover la estabilidad del suelo y la generación de una heterogeneidad estructural que permite la diversificación de nichos en este ambiente (Bronick & Lal, 2005). La fracción orgánica de los suelos, generalmente conocida como materia orgánica del suelo (MOS) se encuentra constituida por restos vegetales, animales y también por productos microbianos. La versatilidad química del carbono permite formar una gran diversidad de estructura químicas con diferente grado de recalcitrancia en los suelos (Hayes et al., 2007). A partir del avance en técnicas de Resonancia Magnética Nuclear se ha observado que estas estructuras se forman principalmente a partir de productos de descomposición de moléculas orgánicas de mayor tamaño como polímeros de origen vegetal o microbiano (Nelson & Baldock, 2005; Huang et al., 2023).

La fracción biológica del suelo está conformada por comunidades complejas de macrofauna como lombrices, insectos y nematodos, y microorganismos incluyendo bacterias, hongos, arqueas y protozoos. Esta biodiversidad se explica por la heterogeneidad espacial y química del suelo, la disponibilidad de diversos sustratos y gradientes ecológicos de oxígeno, humedad y pH. A su vez, la actividad e interacción entre organismos crea microhábitats y nichos funcionales que dan lugar a procesos fundamentales como la descomposición, formación de agregados y ciclo de nutrientes, contribuyendo a la resiliencia y estabilidad del ecosistema suelo (Bardgett & van der Putten, 2014). Las comunidades biológicas del suelo actúan de manera sinérgica, y en muchos casos asociada a hospederos, regenerando moléculas simples, que pueden ser utilizadas como nutrientes, a partir de componentes estructurales formados por moléculas de mayor tamaño y complejidad (de Jonge et al., 2023). Esta capacidad de reciclado de nutrientes es fundamental para mantener la funcionalidad de los suelos.

En conjunto, la comprensión detallada de la función, composición y biodiversidad del suelo proporciona una base científica sólida para valorar y preservar los servicios ecosistémicos que sostiene (Guerra et al., 2021). Entender los mecanismos que subyacen a estos procesos permite preservar los suelos y diseñar manejos desde una perspectiva sostenible, para mantener la

productividad agrícola, mitigar el cambio climático y conservar la biodiversidad, desafíos fundamentales en la actualidad y futuro cercano (Lal, 2020; Geisen, et al 2020).

1.6 Procesos de formación de la materia orgánica del suelo

La formación de la materia orgánica del suelo (MOS) es un proceso impulsado fundamentalmente por la transformación microbiana de residuos vegetales y animales. La principal forma de ingreso de carbono al suelo es a través de residuos vegetales. La producción primaria por parte de la cobertura vegetal asegura el ingreso de Carbono como restos de tejidos vegetales ya sean aéreos o radiculares, pero también como compuestos orgánicos que son exudados directamente al suelo a través de las raíces (Feng, et al 2024). Los microorganismos del suelo, especialmente hongos y bacterias, descomponen compuestos orgánicos complejos y sus productos metabólicos contribuyen a la formación de diferentes fracciones de MOS con propiedades químicas y funcionales diversas. Por ejemplo, ciertos hongos con rasgos multifuncionales son capaces de promover la formación y estabilidad de materia orgánica, influyendo en su cantidad, complejidad molecular y capacidad de retención de carbono (Whalen, et al 2024). Este proceso además está regulado por factores físico-químicos del suelo como la mineralogía y la estructura agregada que protegen la materia orgánica de la descomposición microbiana a corto plazo (Cotrufo & Lavallee, 2022)

Las fracciones de la materia orgánica en el suelo pueden agruparse en materia orgánica particulada (POM), que consiste en partículas mayores a 63 micrómetros, con menor densidad y tasas de descomposición relativamente rápida (Leuthold, et al 2024). Además, encontramos la materia orgánica asociada a minerales (MAOM), que es más estable y se adhiere a partículas finas de limo y arcilla, favoreciendo el almacenamiento de carbono a largo plazo (Robertson, et al 2019). Estas fracciones tienen diferentes roles en el ciclo de nutrientes y la fertilidad del suelo, y el estudio detallado de sus propiedades permite comprender mejor la dinámica y persistencia del carbono en los ecosistemas terrestres.

El microbioma del suelo es central no solo en la formación, sino en la estabilización y dinámica de la materia orgánica del suelo (Wang, et al 2024). Los productos de desecho microbianos y la biomasa microbiana muerta, conocida como necromasa microbiana, constituyen una fuente significativa de materia orgánica persistente en el suelo, la asimilación de compuestos orgánicos

y formación de biomasa microbiana se conoce como ruta *in vivo* de formación de MOS. Sin embargo, la actividad de exoenzimas microbianas contribuye a la degradación de restos vegetales complejos, a partir de lo cual se forman las sustancias húmicas y otras moléculas orgánicas de estructura compleja. A esta vía de formación de materia orgánica se la conoce como vía *ex-vivo*, ya que no implica la asimilación de los compuestos carbonados y su acumulación como biomasa microbiana (Robertson, et al 2019). La diversidad y funcionalidad del microbioma influyen en procesos ecológicos clave como el ciclo del carbono y nitrógeno, la formación de estructuras del suelo y el mantenimiento de la fertilidad. El microbioma reacciona y se adapta ante cambios ambientales, afectando la resiliencia y funcionamiento del ecosistema suelo-planta (Jansson & Hofmockel, 2020; Zeng et al., 2025). En este sentido también se ha reportado la existencia del efecto *priming*: un cambio en la tasa de mineralización del carbono de la MOS por microorganismos, inducido por la entrada de materia orgánica fresca, que puede acelerar o reducir la descomposición de la MOS, afectando así la acumulación o pérdida de carbono en el suelo y su fertilidad (Bernard et al., 2022).

La necromasa microbiana, formada por los restos celulares de microorganismos muertos, incluye componentes resistentes como paredes celulares, proteínas y lípidos, que contribuyen a la estabilización del carbono en el suelo (Kastner et al., 2021). Una de las particularidades de la necromasa es que tiende a agregarse y ocluir poros del suelo generando puntos con impedimentos estéricos para la degradación de estas partículas orgánicas (Chi, et al 2022). Estudios recientes destacan que la cantidad y distribución de la necromasa dependen de las características del suelo, como textura y contenidos de minerales, y pueden variar bajo condiciones de cambio climático, como el calentamiento del suelo (Zhao et al., 2025; Mitchell et al., 2022). Esta fracción microbiana es un componente crítico en la formación y conservación de la materia orgánica y en la mitigación de pérdidas de carbono.

1.7 Estructura y función del microbioma de suelos en pastizales templados.

La diversidad microbiana del suelo es sorprendentemente alta y determinada por múltiples variables, donde la interacción entre propiedades físico-químicas del suelo y gradientes ambientales como el pH, la textura y la disponibilidad de nutrientes juegan un papel fundamental.

La escala de tamaño de las células microbianas determina que la formación de micro y macro agregados genera una diversidad de nichos ecológicos que permiten el establecimiento de distintos microorganismos (Bach et al., 2018). Esto impacta particularmente en la diversidad de bacterias que pueden establecerse en los diferentes microhábitats disponibles en el suelo (Seaton et al., 2020; Curd et al., 2018). Algunos estudios a escala continental han demostrado que las comunidades bacterianas tienden a ser más sensibles a las características edáficas, mientras que las comunidades fúngicas responden a la cobertura vegetal y a la estructura física del suelo, mostrando patrones complementarios de diversidad y distribución (Labouyrie et al., 2023; Li et al., 2024).

Como se ejemplificó anteriormente, el microbioma del suelo cumple un rol fundamental en el reciclado de nutrientes y energía. Diferentes procesos microbianos, algunos vinculados a su metabolismo, como pueden ser la respiración anaerobia, generan la transformación oxidativa de nutrientes y su ciclado en el suelo (Neemisha et al., 2022). Estos procesos son catalizados por enzimas codificadas en genomas microbianos. Las tasas de recambio de poblaciones microbianas son mayores que el de otras propiedades fisicoquímicas del suelo. Debido a esto el estudio de actividades enzimáticas del suelo ha sido utilizado históricamente como una aproximación a la capacidad de ciclado de nutrientes en este ambiente (Nannipieri et al., 2017; Adetunji et al., 2020). En este sentido, tanto bacterias como hongos contribuyen activamente a la movilización de fósforo, a través de procesos como meteorización, mineralización y solubilización (Pang et al., 2024). Pero también pueden favorecer la inmovilización, mediante la asimilación o la precipitación de compuestos. Además, contribuyen a mejorar la adquisición de fósforo por parte de las plantas al estimular el crecimiento radicular y extender el alcance del sistema de raíces gracias a las simbiosis con Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMAs). Entre los microorganismos capaces de solubilizar fosfatos se encuentran bacterias y hongos de géneros como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Penicillium* y *Aspergillus*, aunque continuamente se identifican nuevas especies con esta capacidad (Li et al., 2021). En el caso particular de los hongos micorrízicos arbusculares, como *Rhizophagus*, estos absorben el fósforo disponible en el suelo y lo transfieren de manera directa a la planta hospedera (Kobae, 2019).

El microbioma del suelo también desempeña múltiples funciones clave en el ciclo del nitrógeno, participando en procesos como la fijación biológica donde el Nitrógeno gaseoso queda disponible para el ingreso a la cadena trófica por la acción de bacterias fijadoras (Hirsch, et al 2015). Este

proceso no genera energía a la célula, pero disponibiliza este macronutriente limitante. El amonio que se genera a partir de la fijación y de la mineralización puede ser absorbido directamente por las plantas; sin embargo, en suelos bien aireados y de pH neutro, este compuesto es transformado rápidamente a nitrato gracias a la acción de bacterias y arqueas oxidantes de amonio y nitrito, como *Nitrosospira*, *Nitrosomonas*, *Nitrospira* y *Nitrobacter* (Hayatsu, et al 2021; Clark, et al 2021). En este mismo sentido, la desnitrificación contribuye a la pérdida de nitrógeno del suelo a través del pasaje de nitrato a formas gaseosas más reducidas de este nutriente que incluyen el óxido nitroso (Hu, et al 2015). A su vez, se han descripto algunos grupos microbianos que codifican múltiples vías para el ciclado de nitrógeno, es el caso de algunas delta-proteobacterias, mientras que otros grupos filogenéticos se especializan en algunas pocas vías de transformación de nitrógeno (Nelson et al., 2016). Estos procesos catalizan la transformación de uno de los nutrientes más importantes en el ecosistema suelo impactando directamente la fertilidad y la emisión de gases de efecto invernadero.

Los microorganismos del suelo mantienen interacciones estrechas con las plantas que favorecen su crecimiento y mejoran la tolerancia frente a diferentes tipos de estrés abiótico. Cada vez hay más evidencia de que las raíces liberan compuestos como azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos y fenoles que actúan como señales químicas para atraer a microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPM) (Compant et al., 2019). Una vez establecidos en la rizósfera o en el interior de las raíces, estos microorganismos no solo contribuyen a la transformación y transporte de nutrientes, sino que también influyen en el desarrollo de la planta mediante la producción y regulación de fitohormonas como auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno (Oyedele et al., 2024). Estas moléculas cumplen funciones clave en la regulación del desarrollo de plantas. Diversos grupos microbianos participan de estos mecanismos. Entre las bacterias se destacan géneros como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter* y *Azospirillum*, mientras que entre los hongos se encuentran *Trichoderma* y *Laccaria*, capaces de modificar los niveles hormonales en la rizosfera y dentro de los tejidos vegetales, modulando así el crecimiento y la respuesta al estrés de sus hospederos (Eichmann et al., 2021).

Las interacciones beneficiosas entre plantas y microorganismos adquieren especial relevancia en condiciones de estrés abiótico, como la limitación de nutrientes, la sequía, el anegamiento, las temperaturas extremas, la salinidad elevada o la presencia de contaminantes. Cuando las plantas

atraviesan estas situaciones, pueden atraer desde el suelo circundante a microorganismos promotores del crecimiento (PGPM) mediante la liberación de señales químicas, con el fin de mejorar su capacidad de adaptación frente a dichos estreses (Rolfe et al., 2019). Un ejemplo destacado son los HMAs, que favorecen tanto el crecimiento como la tolerancia al estrés a través de varios mecanismos: incrementan la disponibilidad de agua y nutrientes gracias a su red de hifas y a la estimulación del desarrollo de pelos radicales; regulan la conductividad hidráulica de las raíces mediante la modulación de acuaporinas; contribuyen a mantener la turgencia celular a través de ajustes osmóticos; y participan en la detoxificación del exceso de especies reactivas de oxígeno mediante enzimas antioxidantes en los tejidos vegetales (Le Pioufle, et al 2019; Begum, et al 2019).

Por otra parte, el microbioma asociado al sistema suelo-planta también puede actuar en procesos de enfermedad, donde se perjudica el crecimiento y el desarrollo vegetal. En pasturas se han reportado diversos hongos patógenos, que también tienen un impacto significativo en cultivos y ecosistemas naturales, entre ellos *Pyrenophora tritici-repentis*, causante de enfermedades en trigo y pastos nativos; *Fusarium graminearum*, responsable del tizón de la espiga en trigo y cebada y productor de micotoxinas carcinogénicas; *Bipolaris sorokiniana*, altamente adaptable y con amplia variabilidad patogénica; y *Colletotrichum graminicola*, que provoca antracnosis en maíz, entre otros (Karunarathna et al., 2021). Aunque no existen estimaciones directas de pérdidas en pastizales naturales, se reconoce que estos patógenos reducen la productividad en pasturas y cultivos. Su dinámica está influenciada por la baja diversidad vegetal, los rasgos funcionales de las plantas, la fertilidad del suelo donde los suelos con alta disponibilidad de nutrientes favorecen el establecimiento de patógenos, las condiciones climáticas y la estructura de la comunidad vegetal, lo que determina la propagación y severidad de enfermedades, con efectos particularmente marcados en sistemas de monocultivo (Semchenko et al., 2021).

1.8 Metodologías de análisis del microbioma de suelos

El estudio de los microorganismos del suelo puede abordarse mediante una amplia gama de metodologías, que van desde técnicas tradicionales hasta herramientas ómicas avanzadas. Cada una de ellas presenta ventajas y limitaciones que condicionan el tipo de información obtenida y su aplicabilidad. Los métodos clásicos basados en el cultivo en medios selectivos han sido el punto de partida de la microbiología, pero presentan limitaciones importantes: la gran mayoría de los microorganismos del suelo no pueden cultivarse en condiciones de laboratorio, por lo que la

diversidad real ha sido históricamente subestimada. De hecho, existen avances en técnicas de cultivo que buscan mejorar la recuperación de microorganismos desde diferentes ambientes (Li et al., 2023; Ji et al., 2024).

Otros métodos, como los perfiles fisiológicos (ej. sistema Biolog®), aportan información valiosa sobre la respuesta de las comunidades microbianas a la disponibilidad de diferentes nutrientes mediante el uso de diferentes fuentes de carbono acoplados a indicadores de crecimiento (Ge et al., 2018). Por otro lado, la medición de actividades enzimáticas permite evaluar el potencial funcional de los microorganismos, a través de la medición de los productos generados por la actividad de alguna enzima en particular. Si bien estos ensayos no permiten caracterizar la diversidad taxonómica, ofrecen una aproximación a funciones ecológicas clave como la actividad potencial de degradación de compuestos orgánicos (de Almeida et al., 2015). Estos indicadores biológicos tienden a ser más sensibles a perturbaciones, por lo cual son utilizados para tener una aproximación a la calidad del suelo, así como para evaluar el efecto de perturbaciones en este ambiente (Alkorta et al., 2003; Hagemann et al., 2015).

A partir de los últimos años y con la disminución de costos algunas técnicas basadas en secuenciación masiva como el *metabarcoding*, o perfilado taxonómico de comunidades, han revolucionado el campo de la ecología microbiana. Estas metodologías, dentro del campo de la ecología molecular, permiten identificar grupos microbianos a partir de marcadores genéticos específicos, como el gen 16S rDNA en bacterias o la región intergénica ITS en hongos, entre otros organismos del suelo (Valentini et al., 2009). Estas técnicas ofrecen rapidez, capacidad de procesar múltiples muestras y gran resolución en la detección de variantes, aunque enfrentan problemas derivados de sesgos en la extracción y amplificación de ADN, dificultades para distinguir organismos vivos de muertos y alta dependencia con bases de datos específicas. Sin embargo, la capacidad de detectar secuencias de microorganismos sin importar su fisiología, distribución o características particulares, han hecho que esta técnica sea el método de preferencia para el estudio de estructura y diversidad de comunidades microbianas en diferentes ambientes (Semenov et al., 2021; Labouyrie et al., 2023). Debido a esto, diferentes proyectos de impacto internacional utilizan esta técnica para la caracterización de comunidades microbianas de suelo (<https://earthmicrobiome.org/>; <https://www.spun.earth/es>; <https://soilbon.org/>).

La secuenciación *shotgun* o metagenómica, que secuencia todo el ADN presente en una muestra sin enfocarse en un marcador específico, ha revolucionado el estudio de los ecosistemas edáficos. Este tipo de análisis permite caracterizar de manera exhaustiva la diversidad microbiana y su papel en los procesos biogeoquímicos que sostienen la fertilidad y la salud del suelo (Fierer et al., 2017). La utilización de metagenómica comparativa permite evaluar estadísticamente cambios en la abundancia relativa de genes funcionales, esta aproximación ha sido utilizada para detectar cambios en microbiomas de suelos muestreados en diseños experimentales comparativos (Fierer et al., 2012). En este sentido, se ha establecido que los cambios en la abundancia de genes funcionales, detectados a través de sus secuencias de ADN, correlacionan de manera lineal con cambios en la actividad enzimática que codifican (Trivedi et al., 2016). Esto da cuenta del potencial de la metagenómica para revelar cambios en el potencial funcional de las comunidades microbianas, con la ventaja de permitir comparar cambios en múltiples funciones al mismo tiempo.

El campo de la bioinformática ha avanzado de manera vertiginosa en los últimos años, desarrollando algoritmos que permiten inclusive recomponer genomas a partir de secuencias metagenómicas (Qayyum et al., 2025). Esto representa un gran avance en la reconstrucción de comunidades microbianas complejas, permitiendo la caracterización taxonómica y funcional de microorganismos clave en diferentes procesos del suelo (Wu et al., 2022). A su vez, a través de estas técnicas, se han identificado relaciones clave entre comunidades microbianas y funciones ecológicas, como el ciclo del carbono y el nitrógeno, además de su resiliencia frente a perturbaciones antrópicas y climáticas (Delgado-Baquerizo et al., 2016; Jansson & Hofmockel, 2020).

En este sentido, estudios recientes han demostrado que las técnicas de secuenciación masiva posibilitan evaluar con alta resolución los impactos del cambio en el uso del suelo y las prácticas agrícolas sobre la estructura y estabilidad de las comunidades microbianas (Bahram et al., 2018; Berkelmann et al., 2020). De este modo, la integración de datos de secuenciación masiva en la ecología microbiana de suelos no solo amplía nuestro entendimiento sobre los mecanismos que determinan la capacidad funcional del suelo, sino que también proporcionan herramientas valiosas para diseñar estrategias de manejo sostenible y mitigar los efectos del cambio global (Hartmann et al., 2015; Louca et al., 2018).

1.9 Objetivo general

Esta tesis tiene como objetivo general caracterizar el microbioma de los suelos en sistemas agrícolas y ganaderos sobre campo natural en Uruguay, a través del análisis de la composición, estructura y diversidad de comunidades bacterianas y fúngicas en distintos sitios representativos del país. Se busca evaluar cómo varían estas comunidades a lo largo de un gradiente de intensificación en el uso del suelo, identificando patrones de cambio asociados a las prácticas de manejo. Asimismo, se propone analizar la diversidad funcional de los microorganismos del suelo, con especial énfasis en la abundancia y distribución de genes involucrados en el ciclado de nutrientes esenciales para la productividad del sistema, tales como el carbono, nitrógeno y fósforo.

1.10 Objetivos específicos

- I) Identificar los cambios en la composición microbiana y en las funciones metabólicas asociados a la conversión de pastizales naturales en sistemas agrícolas. Comparar la estructura taxonómica, diversidad y potencial funcional del microbioma de suelos de campo natural y agricultura en Uruguay (Capítulo 2).
- II) Evaluar las diferencias en la estructura taxonómica y la diversidad del microbioma de suelos entre sistemas ganaderos sobre campo natural y sistemas ganaderos sobre campo natural intensificado o pasturas implantadas. Identificar los cambios en la composición de comunidades microbianas asociados a los distintos manejos de intensificación, que incluyen la fertilización con nitrógeno y fósforo, la sobresiembra de leguminosas con adición de fósforo y la sustitución por pasturas perennes (Capítulo 3).
- III) Evaluar los cambios en el potencial funcional del microbioma del suelo asociados a los ciclos del carbono, nitrógeno y fósforo a lo largo de un gradiente de intensificación del uso del campo natural que incluye sistemas ganaderos y agrícolas. Identificar las funciones metabólicas diferenciales vinculadas a la intensificación del uso del suelo y su impacto sobre los procesos biogeoquímicos esenciales para la sostenibilidad de los ecosistemas pastoriles (Capítulo 4).

CAPITULO II

Cambios en el microbioma del suelo asociados al remplazo del campo natural por rotaciones agrícolas

2. 1 Introducción

Los pastizales templados son cruciales para el equilibrio ecológico y la productividad agrícola, se estima que en el pasado llegaron a cubrir alrededor del 8% de la superficie terrestre del planeta. Sin embargo, actualmente solo cerca del 4,6% de estos pastizales se encuentra bajo protección. Por lo tanto, se considera que este tipo de ecosistema es uno de los ambientes terrestres más alterados (Carbutt et al., 2017). En Uruguay, se ha registrado una pérdida neta de 0,9 millones de hectáreas de pastizales en el período comprendido entre 2001 y 2019 (Baeza et al., 2022). Factores económicos y el aumento de los precios de los productos agrícolas han impulsado la conversión de pastizales nativos en tierras cultivables (Modernel et al., 2016). Este cambio en el uso del suelo introduce prácticas de manejo como el laboreo de suelos y la fertilización, que pueden alterar drásticamente el microbioma nativo del suelo. El microbioma del suelo es esencial para el ciclado de nutrientes, la descomposición de la materia orgánica y la salud general del ecosistema (Sokol et al., 2022), siendo la necromasa microbiana un componente clave en la dinámica del carbono del suelo (Cotrufo et al., 2013). Sin embargo, aún se sabe poco sobre el impacto que tiene la sustitución de pastizales nativos sudamericanos por cultivos agrícolas en el microbioma del suelo y su capacidad para el reciclaje de nutrientes.

Los microbiomas del suelo son fundamentales en la dinámica del carbono orgánico del suelo (COS), actuando como impulsores clave tanto en su protección como en su descomposición. Estas comunidades microbianas influyen en la formación y estabilización del COS mediante diversos mecanismos. Descomponen la materia orgánica, degradando compuestos complejos en formas más simples que pueden ser inmovilizadas por los propios microorganismos o asimiladas por plantas y otros organismos del suelo, impulsando así el ciclo de nutrientes y el flujo de energía en los ecosistemas (Kästner et al., 2021). Se han descrito funciones distintas entre comunidades

bacterianas y fúngicas, donde las bacterias utilizan predominantemente restos vegetales ricos en nitrógeno (Soares & Rousk, 2019). Por otra parte, la interacción entre microorganismos y fauna del suelo favorece la incorporación de residuos orgánicos en fracciones estables del COS (Ma et al., 2022). La actividad microbiana también contribuye a la protección del COS mediante la formación de agregados, promovida por la producción de proteínas anfipáticas, la precipitación de minerales y otras interacciones físicas con la materia orgánica, protegiendo así el carbono de una descomposición rápida (Kravchenko et al., 2019; Philippot et al., 2023; Leifheit et al., 2014). Además, la necromasa microbiana —una proporción significativa del COS— desempeña un papel crítico en la formación de MOAM, un componente clave del almacenamiento de carbono a largo plazo en los suelos (Li et al., 2024; Buckeridge et al., 2020). A pesar de estos avances, los mecanismos mediante los cuales las prácticas agrícolas influyen sobre la diversidad microbiana, la formación y el reciclaje de necromasa, y el control microbiano sobre la formación de la MOS siguen sin comprenderse completamente, lo que dificulta predecir los efectos del cambio en el uso del suelo sobre la salud del suelo y la productividad agrícola (Delgado-Baquerizo et al., 2020; Das et al., 2024). Superar estas brechas de conocimiento es esencial para avanzar hacia un manejo sostenible del suelo y mantener los servicios ecosistémicos.

Los avances metodológicos en tecnologías de secuenciación y bioinformática ofrecen un conjunto de herramientas para el análisis en profundidad de estas comunidades complejas, evitando los sesgos generados por las técnicas de cultivo (Fierer, 2017). Se pueden utilizar distintos enfoques para analizar la estructura y el potencial funcional de los microbiomas del suelo. A través de la secuenciación de amplicones dirigidos, como el gen 16S rRNA para bacterias y la región ITS para hongos, es posible dilucidar la composición y diversidad de estas comunidades con alta especificidad (Labouyrie et al., 2023; Mikryukov et al., 2023). Además, mediante la secuenciación metagenómica *shotgun* es posible capturar el repertorio genético completo del microbioma del suelo, lo cual permite identificar y cuantificar genes funcionales, tales como aquellos que codifican enzimas activas sobre carbohidratos (CAZymes). El análisis comparativo del microbioma puede revelar cambios pasados por alto en componentes microbianos que contribuyen a la formación y el reciclaje de necromasa microbiana como resultado del cambio en el uso del suelo.

En este capítulo, comparamos comunidades microbianas del suelo de cuatro predios productivos en Uruguay, que han sido sometidos a rotaciones agrícolas durante al menos una década, con

pastizales nativos adyacentes bajo pastoreo. Uruguay está cubierto por pastizales nativos, que aún representan cerca del 50% del territorio, pero que han sido rápidamente reemplazados en las últimas décadas por otros usos del suelo como los cultivos agrícolas. Utilizando secuenciación metagenómica, caracterizamos la diversidad y los atributos funcionales de comunidades bacterianas y fúngicas, con un enfoque particular en sus roles en los ciclos del carbono, nitrógeno y fósforo. Para comprender la contribución microbiana a la formación de COS, se evaluaron específicamente los rasgos de reciclaje de necromasa microbiana mediante la detección y cuantificación de genes que codifican enzimas que actúan exclusivamente sobre peptidoglicano y/o quitina. Este capítulo busca contribuir a cerrar la brecha de conocimiento en ecología microbiana del suelo en relación con los impactos a largo plazo de las rotaciones agrícolas sobre las comunidades microbianas del suelo, ofreciendo información que puede guiar prácticas de manejo sostenible para preservar la salud del suelo y garantizar la productividad agrícola a largo plazo.

2.2 Metodología

Uruguay es un país situado en la zona templada de Sudamérica, se caracteriza por sus llanuras onduladas y sus suelos fértiles, con un clima propicio para extensos ecosistemas de pastizales. Estas praderas, conocidas localmente como "pampas" o "campos", están dentro de los denominados Pastizales del Río de la Plata (Soriano et al., 1991), y son un rasgo predominante del paisaje uruguayo cubriendo todo su territorio. Los suelos de los Pastizales del Río de la Plata son principalmente Molisoles, conocidos por un horizonte superficial rico en materia orgánica, que contribuye a su alta fertilidad y los convierte en algunos de los suelos agrícolas más productivos del mundo (Durán et al., 2011). El clima de Uruguay se clasifica como subtropical húmedo, con veranos cálidos, inviernos frescos y precipitaciones relativamente uniformes a lo largo del año, condiciones que históricamente han sustentado tanto los ecosistemas de pastizales naturales como la productividad agrícola (Gutiérrez et al., 2020).

Los pastizales de Uruguay han estado sometidos a actividades agrícolas extensivas, con pastoreo de ganado a largo plazo y rotaciones agrícolas (forestaciones y cultivos) que han alterado significativamente sus propiedades edáficas y comunidades biológicas. Los pastizales nativos están dominados por especies como las herbáceas *Paspalum notatum* y *Stipa*, estos pastizales

naturales albergan una flora diversa que está adaptada a las condiciones climáticas y edáficas locales (Rodríguez et al., 2003). El ecosistema de pastizales nativos sustenta una variada fauna y sirve como recurso natural para el pastoreo de ganado, que es un componente tradicional de la cultura y la economía uruguayas (Jaurena et al., 2021). Las rotaciones agrícolas en Uruguay suelen incluir una secuencia de cultivos de verano como la soja (*Glycine max*) y el maíz (*Zea mays*), seguidos de cultivos de invierno como el trigo (*Triticum aestivum*) y la cebada (*Hordeum vulgare*). Los cultivos suelen abonarse con nitrógeno, en forma de urea, y fósforo. Estas rotaciones suelen incluir periodos en los que la tierra se deja en barbecho o se utiliza para el pastoreo del ganado, integrando los sistemas de producción agrícola y ganadera (Modernel et al., 2019). Esta mezcla de agricultura y ganadería, conocida como agricultura mixta, ha moldeado el uso de la tierra y el manejo de los recursos edáficos en Uruguay (García-Préchac et al., 2022), donde las tierras de cultivo suelen encontrarse cerca de praderas nativas pastoreadas por ganado, bajo suelos similares, y sólo separadas por cercos.

2.2.1 Muestreo de suelos y extracción de ADN

Los sitios fueron muestreados durante otoño y primavera de 2020 y 2021. Seleccionamos cuatro potreros de diferentes establecimientos agropecuarios en la región agrícola de Uruguay con una historia de al menos diez años de rotaciones agrícolas, que tuvieran potreros adyacentes con pastizales naturales pastoreados por el ganado. Los sitios muestreados están ubicados en el oeste de Uruguay (Figura Suplementaria S1), que se considera la principal región agrícola del país, abarcando cuatro departamentos (Florida, Soriano, San José y Salto). En cada potrero, se delimitó un área de 20 por 20 metros dentro del potrero con pastizales y del potrero adyacente con rotaciones agrícolas, separados por un alambrado. Previo al muestreo se tomaron muestras con calador para comprobar la similitud entre los suelos (profundidad de los horizontes, colores, etc.) y se evitaron las zonas de descanso de animales o de compactación por maquinaria. También se realizaron análisis de la textura del suelo y de los nutrientes para comprobar que los suelos eran comparables (Tabla suplementaria S1). Para hacer una muestra compuesta en cada parcela de uso del suelo se utilizó un calador tomando aleatoriamente 10 testigos de suelo de 15 cm de profundidad, dentro de la zona delimitada. Se obtuvieron tres muestras compuestas por cada lugar y uso del suelo muestreado, lo que supuso un total de 24 muestras compuestas. El suelo se conservó a $\sim 4^{\circ}\text{C}$ para su transporte al laboratorio y se mantuvo a -20°C hasta su posterior procesamiento.

Las muestras compuestas de suelo se secaron al aire a temperatura ambiente durante 4 días. A continuación, se trituraron con un mortero de tierra manual y se mezclaron. Las muestras molidas se tamizaron con una malla de 2 mm para eliminar los restos vegetales y otros componentes de mayor tamaño que no eran partículas de suelo. Las muestras de suelo molidas y tamizadas se mezclaron nuevamente y se procesaron para la extracción de ADN, que se realizó utilizando el kit PowerSoil Lyzer (Qiagen). Se utilizaron 300 mg de cada muestra de suelo y se siguieron las instrucciones del fabricante utilizando un método combinado mecánico y químico para lisar las células bacterianas y fúngicas. Para lograr la ruptura mecánica de las células se utilizó un ciclo en el equipo FastPrep-24 5G (MP Biomedicals) a 6 m/s durante 40 segundos.

La calidad de las extracciones de ADN se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,5%. La cuantificación del ADN se realizó con un fluorómetro Qubit 2.0 (Invitrogen). Se generaron pools equimolares de extracciones de ADN del mismo lugar y uso del suelo para la secuenciación shotgun, mientras que se utilizaron diluciones de muestras de ADN total para la secuenciación de marcadores moleculares bacterianos y fúngicos en las instalaciones de BGI Americas (San José, EE.UU.). La secuenciación se realizó con la tecnología DNBseq utilizando lecturas pareadas de 100 pb de longitud para las muestras metagenómica *shotgun*, obteniéndose $12,04 \pm 0,03$ Gb de datos crudos por muestra. Por otra parte, para el análisis de comunidades bacterianas se generaron lecturas de 300 pb de longitud para las regiones V3-V4 de los genes 16S rRNA, obteniéndose 78673 ± 4230 lecturas pareadas por muestra. Para el análisis de las comunidades fúngicas, se amplificó la región ITS1 con los cebadores ITS1f-ITS2 y se secuenció obteniendo 67765 ± 933 lecturas pareadas por muestra.

2.2.2 Análisis de las comunidades bacterianas

Las secuencias crudas se sometieron a un filtrado de calidad, se dereplicaron y se resolvieron las *Amplicon Sequence Variants* (ASV) mediante el paquete de R DADA2 (v1.26.0) (Callahan et al., 2016). Para comparar secuencias y asignar taxonomía a las ASV se utilizó la base de datos SILVA-138 (Quast et al., 2012). A continuación, se utilizó el paquete de R Phyloseq (v1.5.0) para continuar con el análisis a partir de la tabla de recuentos obtenida (McMurdie & Holmes, 2013). Brevemente, las tablas de conteo de ASVs se filtraron para obtener ASVs presentes en al menos el 10% de las muestras y se clasificaron en los 10 phyla más abundantes. La diversidad alfa se calculó como una medida de las ASV observadas en cada muestra, para detectar diferencias

estadísticas se utilizó el método ANOVA unidireccional con una prueba T *post-hoc* y se visualizó con el paquete de R `ggplot2` (v3.5.2) (Wickham, 2016). Para el análisis de la diversidad beta, se calculó el índice de disimilitud de Bray-Curtis a partir de los perfiles normalizados de las comunidades. Se utilizó el análisis multivariado permutacional de la varianza (PERMANOVA), implementado en la función `adonis` del paquete `vegan`, para comprobar las diferencias en la distribución de los taxones bacterianos de las distintas muestras (Dixon, 2003). Posteriormente, un análisis de escalado multidimensional no métrico (NMDS) permitió visualizar la agrupación de las muestras en un espacio bidimensional, y se ajustaron los metadatos ambientales utilizando el paquete `vegan` (v2.6-8). El análisis del microbioma *core* se realizó mediante el paquete de R `Microbiome` (Lahti et al., 2014).

Para detectar la abundancia diferencial de ASV para cada tratamiento de uso del suelo, se utilizaron modelos lineales generalizados, implementados en el paquete `Maaslin2` (v1.22.0) (Mallick et al., 2021). Los datos del microbioma a nivel de género se transformaron para tener en cuenta el sesgo composicional de los datos de secuenciación, esto se realizó utilizando la transformación *log-ratio* centrada (CLR). El lugar de muestreo, el pH del suelo y la temporada de muestreo se utilizaron como variables de efecto aleatorio en este análisis.

2.2.3 Análisis de las comunidades fúngicas

El análisis de ITS fue similar al de 16S, pero con algunas variaciones para los marcadores moleculares específicos de hongos. Las secuencias se filtraron, desreplicaron y las ASV se resolvieron utilizando el paquete `DADA2` (v1.26.0) (Callahan et al., 2016). En este caso utilizó la base de datos UNITE para comparar secuencias y asignar taxonomía a las ASV (Abarenkov et al., 2024). Tras la creación de la tabla de recuento de ASV se utilizó el paquete `Phyloseq` (v1.5.0) para continuar con el análisis de las comunidades aguas abajo (McMurdie & Holmes, 2013). Las medidas de diversidad alfa para cada muestra se calcularon a través de los ASV observados, con un umbral de prevalencia mínimo del 10% y transformados a recuentos por millón teniendo en cuenta las variaciones de profundidad de secuenciación. Para el análisis de la diversidad beta solo se utilizaron las ASV clasificadas en los 10 filos más abundantes. Se utilizó un análisis de escalado multidimensional no métrico para visualizar la ordenación de las muestras en un espacio bidimensional, los metadatos ambientales se ajustaron utilizando la función `envfit`

del paquete *vegan* (v2.6-8) (Dixon, 2003), el gráfico construido se visualizó con el paquete de R *ggplot2* (v3.5.2). Para detectar diferencias significativas entre la distribución de especies obtenidas de comunidades fúngicas de diferentes usos del suelo, se implementó un análisis multivariado permutacional de varianzas utilizando la función *adonis* con la matriz de distancias Bray-Curtis.

Con el fin de detectar la abundancia diferencial de taxones para cada uso del suelo, primero se colapsaron las tablas de ASV en tablas de conteo a nivel de género, luego aplicamos el análisis de modelos lineales generalizados, implementado en el paquete *Maaslin2* (v1.22.0) (Mallick et al., 2021). Los datos del microbioma se transformaron para tener en cuenta el sesgo composicional de los datos de secuenciación, esta transformación se realizó utilizando el método de *log-ratio* centrado (CLR). El lugar de muestreo, el pH y la estación de muestreo se indicaron como variables de efecto aleatorio. Además, los géneros fúngicos detectados se clasificaron en gremios utilizando el software *FUNGuild* (v1.1). Este software utiliza referencias bibliográficas de diferentes géneros y los clasifica en gremios fúngicos en función de su modo trófico y utilización del sustrato (Nguyen et al., 2016). Las tablas de abundancia de los modos tróficos fueron colapsadas y se utilizaron Modelos Lineales Generalizados implementados en el paquete *Maaslin2* (v1.22.0) para detectar diferencias en la abundancia entre los diferentes usos del suelo, como se explicó anteriormente.

2.2.4 Análisis de metagenomas *shotgun*

Se realizó un análisis metagenómico *shotgun* para evaluar la presencia de enzimas relacionadas con los ciclos del carbono, el nitrógeno y el fósforo. También se utilizaron estos datos para detectar y cuantificar la presencia de bacteriófagos como elementos del microbioma vinculados a la formación de necromasa bacteriana. Se secuenciaron metagenomas *shotgun* a partir de un conjunto de tres muestras de ADN en cantidades equimolares obtenidas para cada lugar y tratamiento. Las lecturas crudas se filtraron utilizando el software *Trimmomatic* (v0.29) con las opciones `SLIDINGWINDOW:10:20 LEADING:25 TRAILING:25 MINLEN:75` (Bolger et al., 2014). Las lecturas pareadas obtenidas se utilizaron como entrada para el software *Megahit* (v1.2.9), con las opciones preestablecidas *-meta_large*, para ensamblar las lecturas en contigs (Li et al., 2015).

La calidad del ensamblaje se comprobó con el software metaQUAST (v5.3.0) (Mikheenko et al., 2016).

La caracterización funcional de los microbiomas de suelo de las diferentes muestras se implementó en un *pipeline* customizado. En primer lugar, se predijeron los ORF metagenómicos utilizando el software Prodigal (v2.6.3) (Hyatt et al., 2010). Para detectar enzimas activas en carbohidratos (CAZymes) que son responsables del ensamblaje, descomposición y modificación de carbohidratos y glicoconjugados, se utilizó el software dbCAN-seq, que depende de una base de datos actualizada de modelos ocultos de Markov de familias de CAZymes para comparar con los ORFs anotados (Zheng et al., 2023). Luego de esto, se utilizó el software MMseqs2 para agrupar ORF idénticos y obtener un catálogo de genes de CAZymes dereplicadas (Steinegger & Söding, 2017). Posteriormente, se utilizó el software MMseqs2 para mapear las lecturas de cada muestra contra el catálogo de genes CAZymes generado. Estas abundancias específicas de genes codificantes de CAZymes se normalizaron con los tamaños totales de las bibliotecas y el largo del ORF y se expresaron en FPKM para cada gen y muestra. Las tablas de abundancia de CAZymes se utilizaron para calcular el índice de Shannon con el paquete vegan (v2.6-8) (Dixon, 2003), como medida de la diversidad alfa. Además, las familias de CAZymas degradativas con abundancias diferenciales detectadas entre usos del suelo se utilizaron para el mapeo de sustratos utilizando la información disponible en Zheng, et al. (2023).

Por otra parte, se utilizó un enfoque similar de catálogo de genes para cuantificar los genes vinculados al ciclo del nitrógeno. Se utilizó la base de datos NCycdb con el software diamond (v2.1.2) para detectar genes relevantes para el ciclo del nitrógeno con un *E-value* de $10e^{-5}$ y valores límite de inclusión del 70 % de identidad y cobertura de la secuencia *query* (Tu et al., 2019). Luego se utilizó MMseqs2 para dereplicar y mapear las lecturas filtradas contra el catálogo de genes. Se utilizó el software R para obtener la abundancia normalizada de cada gen, que se resumió en una tabla de recuento expresada en FPKM. Posteriormente, se utilizó el software Maaslin2 (v1.22.0) para detectar abundancias diferenciales para cada gen entre muestras de diferentes usos del suelo (Mallick et al., 2021), utilizando un umbral de FDR de 0,25 y ajustando los valores *p* con el método Benjamini-Hochberg.

Además, se utilizó la base de datos PCycdb para detectar y cuantificar los genes implicados en el ciclo del fósforo. Se utilizaron los ORFs detectados por Prodigal (v2.6.3) (Hyatt et al., 2010) como entrada y se compararon contra PCycdb utilizando el software diamond (Zeng et al., 2022). Los valores límite de filtrado utilizados fueron $10e^{-5}$ e-value y 70% de identidad y cobertura de la secuencia *query*. Después, se utilizaron los mismos pipelines personalizados para mapear lecturas y cuantificar la variación de FPKM a través de las diferentes muestras. En este caso, las abundancias diferenciales se detectaron utilizando el software Maaslin2 (v1.22.0) (Mallick et al., 2021). Los genes diferencialmente abundantes se agruparon en los procesos metabólicos descritos en las bases de datos y se visualizaron utilizando el paquete ggplot2 (v3.5.2) (Wickham, 2016). Para la detección de contigs de fagos se utilizó el software PhaBOX (Shang et al., 2023), diseñado para la detección y clasificación de secuencias derivadas de fagos. Las abundancias de contigs se obtuvieron mapeando lecturas metagenómicas filtradas con el software MMseqs2 contra contigs de fagos. El número de lecturas mapeadas se normalizó por la longitud del contig y el total de lecturas generadas para cada biblioteca metagenómica.

2.3 Resultados

2.3.1. Análisis de las comunidades fúngicas

En este análisis detectamos una notable disminución de la diversidad fúngica en las rotaciones agrícolas en comparación con el campo natural (Figura 2.1, Panel B). La secuenciación de la región ITS1 reveló un total de 1715 ASV fúngicas, con un microbioma *core* dominado por *Fusarium spp.* (Figura Suplementaria S2) que refleja el dominio general del filo *Ascomycota* en estos ecosistemas, seguido por los filos *Basidiomycota* y *Mortierellomycota* (Figura 2.1, Panel A). Los patrones de diversidad beta, representados mediante el análisis NMDS, distinguieron aún más entre las comunidades fúngicas de diferentes usos del suelo, con una separación clara a lo largo del eje NMDS1, el cual correlaciona con las variaciones de carbono orgánico del suelo (SOC) y contenido de fósforo disponible (Figura 2.1, Panel C). Esta distinción es indicativa del impacto medioambiental en la estructura de la comunidad fúngica, con prácticas agrícolas que conducen a una composición microbiana distinta. Además, nuestro análisis identificó 22 géneros fúngicos significativamente asociados con las comunidades de pastizales naturales, incluyendo géneros

como *Cephalophora* y *Collarina*, que mostraron los cambios de abundancia más pronunciados (Figura 2.1, Panel D).

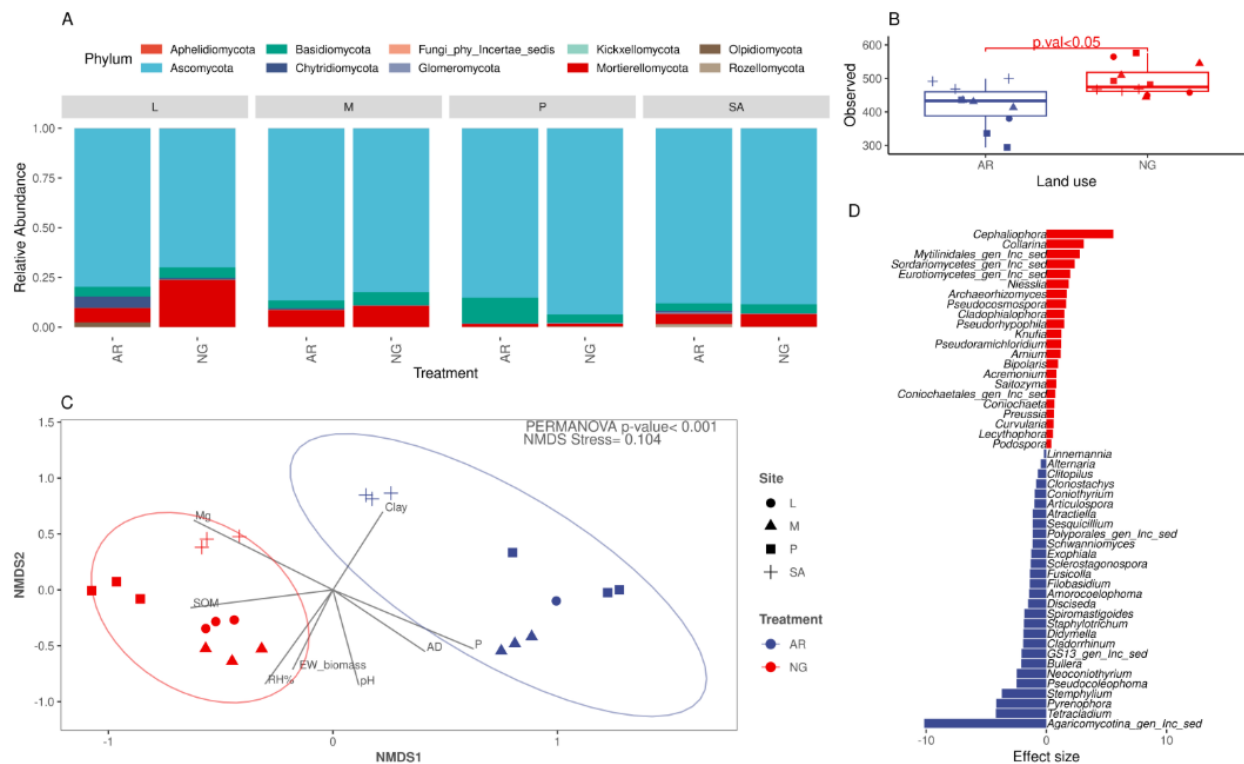


Figura 2.1. Diversidad y estructura de las comunidades fúngicas en campo natural y suelos agrícolas. Panel A: Abundancias relativas de los diez Phylum fúngicos más abundantes en rotaciones agrícolas (RA) frente a pastizales naturales (NG) para cada sitio. Panel B: Boxplots de diversidad alfa de las comunidades fúngicas, mostrando la riqueza de géneros observada. El gráfico de barras ilustra una pérdida comparativa de diversidad fúngica en AR frente a NG. Panel C: Diversidad Beta de las comunidades fúngicas representada por un gráfico NMDS, destacando la clara separación de las comunidades microbianas según el uso del suelo. El gráfico demuestra diferencias significativas en la composición y abundancia de ASV entre las muestras AR y NG. Panel D: Abundancias diferenciales de géneros fúngicos entre usos del suelo, los gráficos de barras apilados muestran géneros significativamente asociados con las comunidades de suelo NG (rojo) o AR (azul), los cambios entre usos del suelo se expresan como el logaritmo del cambio entre usos del suelo (log2FC). Las clasificaciones taxonómicas inciertas a nivel de género se indican como *gen_Inc_sed*.

Por el contrario, géneros como *Alternaria* y *Stemphylium* se asociaron significativamente con suelos agrícolas, sugiriendo condiciones del suelo que favorecen a los patógenos (FDR<0,15) (Figura Suplementaria S4). Por el contrario, los pastizales naturales mostraron una tendencia no significativa con una mayor abundancia relativa de géneros simbióticos (FDR<0,15). Este cambio

en la composición y diversidad de la comunidad fúngica subraya la profunda influencia de las prácticas de gestión agrícola en las comunidades fúngicas del suelo.

2.3.2. Estructura y diversidad de las comunidades bacterianas

A diferencia de las comunidades fúngicas, no pudimos detectar diferencias en la riqueza de ASV bacterianas ni en los índices de diversidad alfa entre los distintos usos del suelo, aunque encontramos grandes diferencias en la composición e identidad de las comunidades bacterianas en los pastizales naturales en comparación con las tierras de cultivo (Figura 2.2, Panel B). Hubo una mayor riqueza bacteriana global en comparación con las ASV de hongos, ya que las comunidades bacterianas de los suelos naturales y agrícolas detectaron un total de 2.941 ASV bacterianas dentro de los 10 filos más dominantes (Figura 2.2, Panel A). Sorprendentemente, el microbioma central, formado por 38 taxones presentes en todas las muestras, era rico en géneros como *Bradyrhizobium*, *Streptomyces* y *Bacillus*, reconocidos por su papel beneficioso en el funcionamiento de los ecosistemas (Figura suplementaria S3). Sin embargo, las evaluaciones de diversidad beta indicaron pronunciadas disimilitudes en la composición de la comunidad bacteriana, con la ordenación NMDS separando los perfiles bacterianos de las rotaciones agrícolas de los suelos de pastizales naturales. Los factores ambientales, incluyendo el contenido de fósforo del suelo y la humedad relativa, fueron identificados como influyentes en la estructuración de estas comunidades, lo que sugiere que las prácticas de uso del suelo remodelan la biodiversidad bacteriana con implicaciones potenciales para los servicios de los ecosistemas (Figura 2, Panel C). Al centrarnos en los géneros bacterianos, se encontró que 58 de ellos estaban significativamente asociados con pastizales naturales o rotaciones agrícolas ($FDR < 0,15$). Entre ellos, los géneros pertenecientes al orden *Azospirillales*, *Bacillus* y *Candidatus Udaeobacter*, conocidos por su papel en el ciclado de nutrientes y reciclado de necromasa microbiana, fueron más abundantes en muestras de campo natural. En cambio, géneros como *Microthiobacter*, *Methylocystis* y *Rubrobacter* fueron más frecuentes en los suelos agrícolas, lo que indica un posible cambio en las funciones del suelo debido a la gestión agrícola, como la fertilización (Figura 2, Panel D).

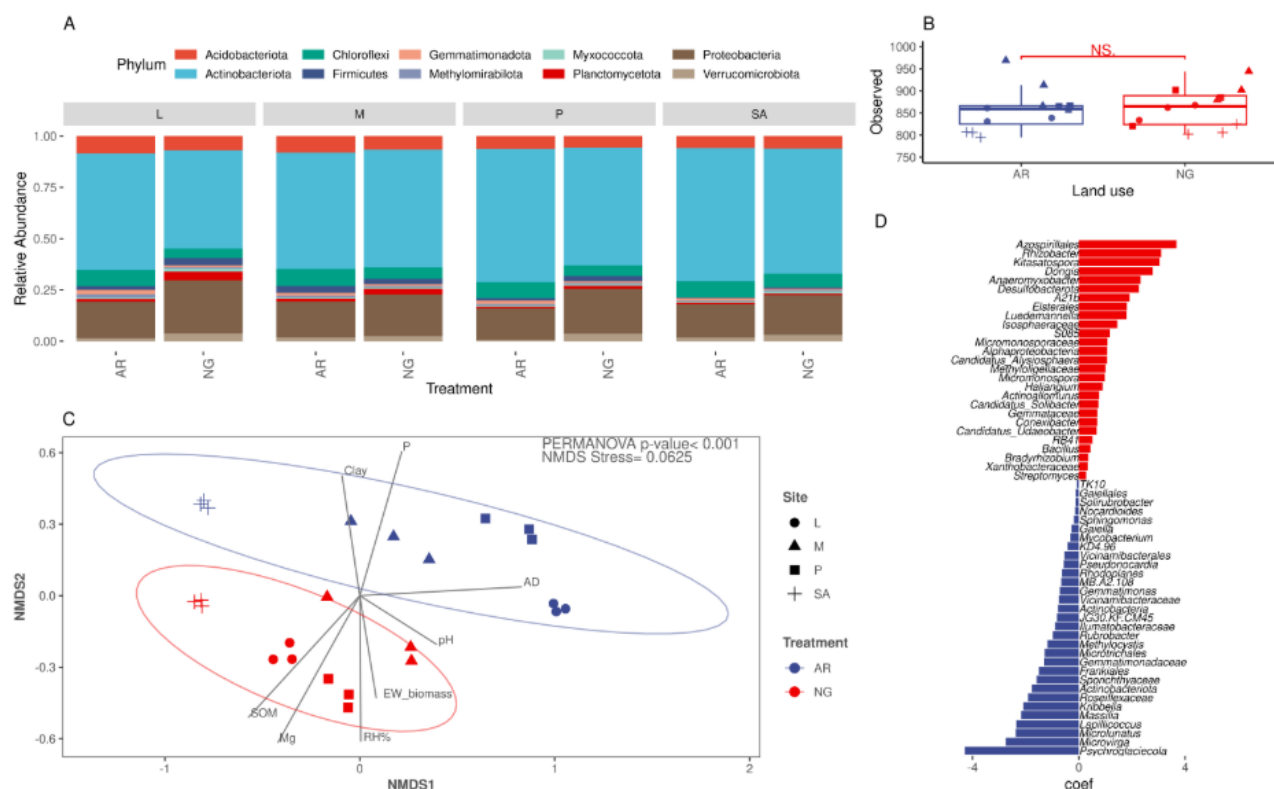


Figura 2.2. Composición y diversidad beta de las comunidades bacterianas en pastizales y suelos agrícolas. A) Abundancias relativas de los diez Phylum bacterianos más abundantes en suelos agrícolas (AR) frente a pastizales naturales (NG). B) Gráfico de cajas de diversidad alfa de las comunidades bacterianas, mostrando la riqueza ASV observada en NG frente a AR. C) Análisis de ordenación NMDS de las comunidades bacterianas y sus variables ambientales asociadas. D) Abundancia diferencial de géneros bacterianos entre usos del suelo, con un gráfico de barras apiladas que muestra los géneros significativamente asociados con las comunidades del suelo NG o AR, los cambios entre usos del suelo se expresan como el logaritmo del cambio en ambos usos (log2FC).

2.3.3. Análisis funcional de metagenomas

Nuestro análisis de genes funcionales en los metagenomas de suelo, utilizando secuenciación *shotgun*, mostró diferencias significativas en la abundancia de genes vinculados a procesos mediados por el microbioma del suelo en rotaciones agrícolas comparados con los pastizales naturales (Figura 3). En el caso de las enzimas relacionadas con el carbono, pudimos observar que no hay cambios en las medidas de diversidad alfa de las CAZymes en suelos bajo diferentes usos de la tierra. Sin embargo, pudimos revelar que el cambio de uso del suelo genera un patrón de abundancias diferente de familias de CAZymes, lo cual conlleva a cambios significativos en los genes que codifican enzimas que se encuentran en mayor abundancia en uno de los tratamientos (FDR<0,25) (Figura 3A). En concreto, 64 familias de CAZymes se encontraron en mayor abundancia en las comunidades de pastizales, lo que subraya un robusto conjunto de herramientas

enzimáticas para la biotransformación de carbohidratos complejos. De hecho, un subconjunto de estas enzimas, incluyendo 38 glucósido hidrolasas (GH), 3 carboxilesterasas (CE) y 3 polisacárido liasas (PL), juegan un papel importante en la descomposición de polisacáridos complejos, componentes de la pared celular y otros componentes críticos de la materia orgánica.

En el caso de las rotaciones agrícolas, 55 familias de CAZymes fueron significativamente más abundantes en comparación con los suelos de campo natural. Esto incluyó 36 GHs, 1 CE y 1 PL, que están implicadas en la degradación de polímeros de carbono complejos. El análisis de sustratos enzimáticos permitió dilucidar que, aunque existe un cambio importante en las familias de enzimas predominantes, los polímeros de carbono que utilizan como sustrato se conservan en general en ambos usos del suelo, lo que puede considerarse una forma de redundancia funcional (Figura 3B). Cuando nos centramos en los rasgos del microbioma relacionados con la necromasa microbiana, detectamos que los suelos de pastizal tienen una abundancia significativamente mayor de contigs derivados de bacteriófagos, que juegan un papel importante en la dinámica de la comunidad bacteriana como impulsores de la formación de necromasa bacteriana (Figura Suplementaria S5). Además, detectamos que la abundancia relativa acumulada de genes que codifican enzimas que utilizan peptidoglicano o quitina como sustrato es significativamente mayor en las comunidades microbianas obtenidas de NG (Figura 3C), estos resultados dan evidencia sobre los cambios potenciales en la dinámica del carbono en relación con la necromasa microbiana a partir el cambio de uso del suelo.

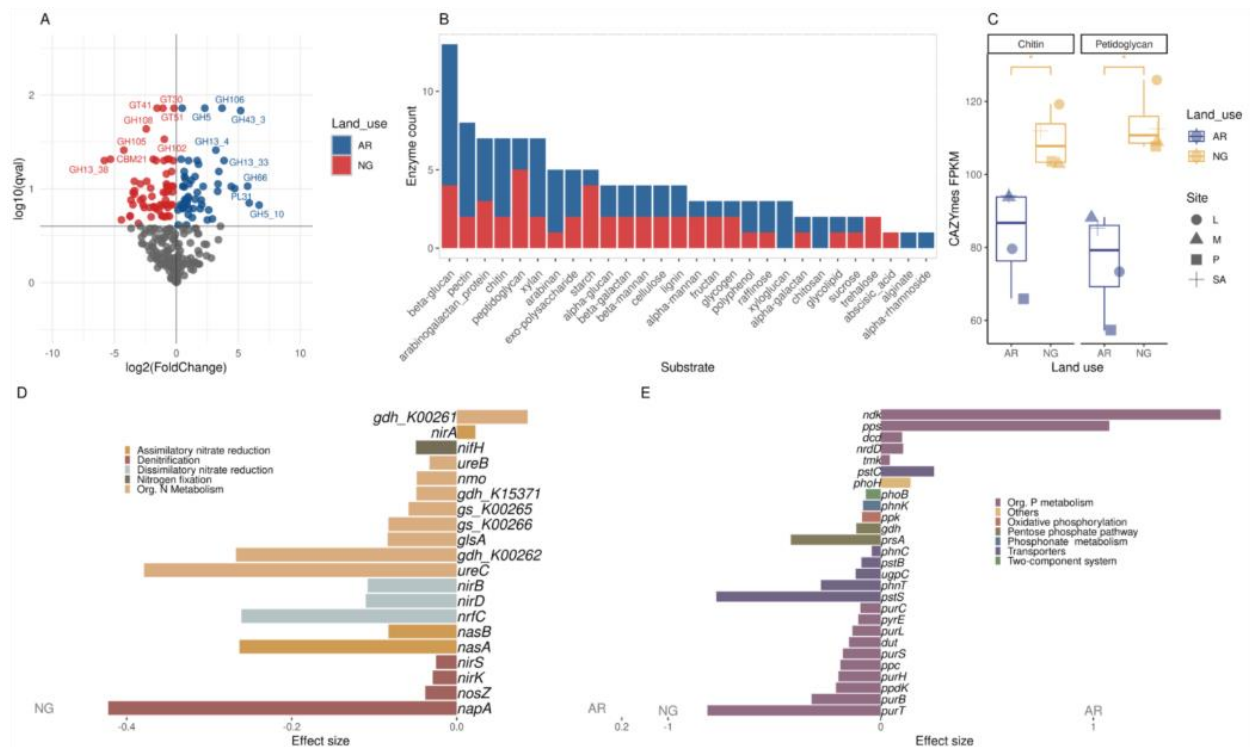


Figura 2.3. Análisis de genes funcionales en metagenomas de suelo. A) Diagrama de volcán que muestra las abundancias diferenciales de las familias CAZyme a través de las comunidades microbianas, los puntos en rojo representan las familias CAZyme con abundancia diferencial en AR, mientras que los puntos en azul representan las familias CAZyme significativamente más abundantes en NG ($FDR < 0.25$). B) Análisis de sustratos de las familias de enzimas con abundancia diferencial en rotaciones agrícolas (Azul) y campo natural (Rojo). C) Gráfico de cajas con la abundancia relativa de todas las enzimas degradadoras de Peptidoglicano y quitina. D) Gráfico de barras del tamaño del efecto de los genes del ciclo del nitrógeno con abundancia diferencial en comunidades microbianas en rotaciones agrícolas (RA) y praderas naturales (NG) ($FDR < 0.25$). E) Diagrama de barras del tamaño de efecto de los genes del metabolismo del fósforo con abundancia diferencial ($FDR > 0.25$) en diferentes usos del suelo. Los tamaños de efecto positivos se muestran para AR mientras que los valores negativos son para NG.

Además, nuestros análisis muestran una marcada disminución de la abundancia de algunos genes que codifican enzimas implicadas en el ciclo del nitrógeno en suelos agrícolas (Figura 3D). Dieciocho genes implicados en diferentes procesos del ciclo del nitrógeno presentaron una mayor abundancia en los suelos NG, mientras que sólo dos se vieron favorecidos en las rotaciones agrícolas. Los genes implicados en la reducción de nitratos a nitrito, la fijación de nitrógeno y la desnitrificación, como *nirB*, *nifH* y *nirS*, fueron más abundantes en los suelos de pastizales, lo que indica un potencial de ciclado del nitrógeno que podría contribuir a la alta disponibilidad de este nutriente en suelos de campo natural. Este resultado sugiere que los pastizales naturales poseen

una comunidad microbiana capaz de participar en el ciclo de nutrientes nitrogenados, lo cual es esencial para sostener el crecimiento de las plantas y la fertilidad del suelo. Sin embargo, la siembra y el manejo sucesivo de cultivos anuales han mermado estas capacidades, lo que podría afectar al rendimiento de los cultivos en ausencia de aportes externos de N.

Paralelamente, el estudio del metabolismo del fósforo desveló una abundancia diferencial de genes implicados en el ciclo del fósforo entre los pastizales naturales y los suelos agrícolas. Veinte genes fueron significativamente más abundantes en NG, mientras que sólo siete fueron más abundantes en AR (Figura 3E). Los genes relacionados con el metabolismo del fosfonato y el fosfinato, incluyendo la C-P liasa *phnK* y el transportador *phnT*, fueron significativamente más abundantes en pastizales naturales. Aparte de eso, pudimos detectar un cambio en el metabolismo del fósforo orgánico que incluye genes del metabolismo de la purina, la pirimidina y el piruvato. También hubo una diferencia en los transportadores, donde se detectaron cinco genes diferencialmente abundantes en NG, mientras que sólo *pstC* fue más abundante en AR. Esta abundancia refleja una capacidad diversificada de absorción de fósforo, facilitando potencialmente una utilización y reciclaje más eficientes del fósforo en los suelos de pastizales. Una comprensión tan completa de los mecanismos del ciclo del fósforo subraya el papel crítico de las comunidades microbianas en el mantenimiento del equilibrio de nutrientes esenciales, destacando además el impacto del uso de la tierra en el potencial funcional de los microbiomas del suelo.

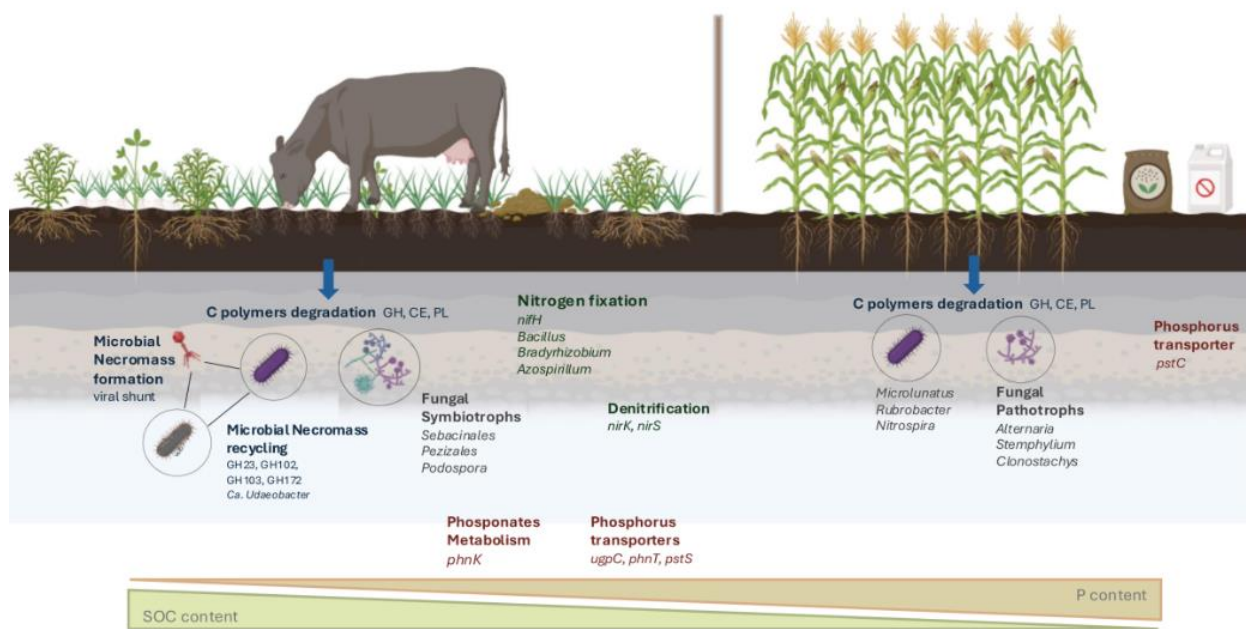


Figura 2.4. Representación esquemática de las principales diferencias obtenidas al comparar los datos del microbioma de praderas naturales y rotaciones agrícolas. Los rasgos microbianos implicados en diferentes procesos del suelo, que son significativamente más abundantes bajo cada uso del suelo, se describen bajo la superficie del suelo para cada rotación. Los procesos mediados por microorganismos y los gremios fúngicos se muestran en negrita, mientras que el género microbiano y los genes funcionales implicados se muestran en cursiva. Los procesos del ciclo del carbono se muestran en azul, los del nitrógeno en verde y los del fósforo en rojo.

2.4 Discusión

La sustitución de pastizales por rotaciones agrícolas ejerce una influencia significativa en múltiples procesos ecológicos (Figura 4). Estos efectos pueden atribuirse a distintas prácticas de manejo, como la sustitución de diversas especies vegetales autóctonas por monocultivos exóticos, la introducción del laboreo del suelo o también a alteraciones inducidas por cambios en la utilización de insumos, como el uso de herbicidas, fungicidas y fertilizantes. Encontramos una fuerte disminución de la diversidad fúngica en las rotaciones agrícolas, que puede explicarse por el uso intensivo de fungicidas que se aplican a los cultivos y semillas para controlar los hongos patógenos

en los sistemas agrícolas de Uruguay (Palladino et al., 2023; Ernst et al., 2018). Se ha reportado que la diversidad fúngica del suelo es importante para mantener la estabilidad del ecosistema y la productividad de las plantas a escala global (Liu et al., 2022). Existen pruebas sobre el fuerte impacto de diferentes fungicidas en la diversidad, la estructura y el funcionamiento del microbioma del suelo (Han et al., 2022; Ma et al., 2022). Además, en un artículo reciente se demostró que la adición combinada y única de pesticidas afectaba negativamente a las tasas de descomposición de broza en microcosmos de suelo (Meidl et al., 2024). Aparte de esto, al agrupar los géneros fúngicos por modos tróficos, detectamos un aumento de la abundancia relativa de patótrofos y un descenso de simbiótros en suelos agrícolas. Este efecto también ha sido observado en otros estudios y ha sido fuertemente vinculado a la fertilización fosfatada y nitrogenada (Lekberg et al., 2021), que son parte de los insumos externos en las rotaciones agrícolas de nuestro país. De hecho, la reducción de la fertilización nitrogenada ha sido propuesta como un mecanismo de prevención de enfermedades de las plantas basado en los efectos de este tipo de fertilización sobre la fisiología de las plantas y las comunidades fúngicas del suelo (Bi et al., 2022; Shen et al., 2022). En contraste, no observamos una disminución de la diversidad bacteriana en los suelos de rotaciones agrícolas, pero las comunidades bacterianas fueron muy disímiles bajo ambos usos del suelo estudiados. Pudimos detectar un descenso en la abundancia de géneros emblemáticos como *Bacillus* y *Streptomyces* en suelos agrícolas, cuya diversidad metabólica y genética ha sido estudiada desde hace tiempo. *Bacillus* se ha relacionado con la fijación de nitrógeno en la rizosfera de los cultivos, así como con la solubilización de P, la producción de fitohormonas e incluso el control de hongos e insectos patógenos, proporcionando una importante cantidad de servicios ecosistémicos que podrían mejorar la productividad de las plantas (Saxena et al., 2020)

Otro género importante cuya abundancia relativa ha disminuido en las rotaciones agrícolas es *Ca. Udaeobacter*, que se ha descrito como un heterótrofo del suelo de tamaño genómico reducido y con múltiples auxotrofías (Brewer et al., 2016). Se ha propuesto que esta bacteria ubicua del suelo adquiere aminoácidos y vitaminas esenciales a partir de la absorción de metabolitos microbianos disponibles en el suelo (Willms et al., 2020), un proceso vinculado al reciclaje de necromasa microbiana, que es muy importante para la estabilización del carbono. La necromasa microbiana es una fracción importante del carbono del suelo que contribuye a la fracción de materia orgánica asociada a minerales, representando hasta la mitad de su contenido en carbono (Chang et al., 2024).

También pudimos detectar que la abundancia de bacteriófagos en los metagenomas de NG es mayor que en sus homólogos agrícolas. Los virus bacterianos se han descrito como los principales contribuyentes a la liberación de C y metabolitos microbianos fácilmente disponibles en un proceso denominado "desvío viral" que puede tener diferentes efectos en la dinámica del SOC (Kuznyakov & Mason-Jones, 2018; Wang et al., 2021; Wu et al., 2024). Las vías de muerte microbiana se han descrito recientemente como importantes impulsores de la composición de la necromasa microbiana (Camenzind et al., 2023). Aquí aportamos pruebas de que el cambio en el uso del suelo puede conducir a una alteración en las vías de muerte microbiana, reflejada por una variación en la abundancia relativa de bacteriófagos. Se necesita más investigación para entender si la necromasa microbiana generada en el proceso de desvío viral, o como resultado de la depredación microbiana, conduce a una mayor eficiencia en el uso del Carbono en comparación con las vías de muerte gobernadas por la la adición de pesticidas y senescencia.

Los suelos albergan una increíble diversidad de microorganismos, que se rige principalmente por estructuras agregadas; esto plantea un reto para su estudio y caracterización (Fierer, 2017). Aunque la regulación de la actividad microbiana en las comunidades ambientales puede ser impulsada por interacciones complejas y dinámicas de factores ambientales y biológicos, la cuantificación de los genes funcionales del ciclo del carbono en las comunidades microbianas puede utilizarse como un indicador indirecto de la actividad enzimática potencial (Trivedi et al., 2016). Al analizar los cambios en las abundancias de las familias de CAZyme, detectamos que las comunidades microbianas de los pastizales naturales tienen una mayor abundancia relativa de cuarenta y cuatro familias de CAZyme degradativas. Mediante el análisis de sustratos detectamos que cuatro de ellas están exclusivamente relacionadas con la hidrólisis de peptidoglicano o quitina. Las familias GH102, GH103, GH171 y GH23 utilizan exclusivamente polisacáridos de la pared celular bacteriana y fúngica como sustratos. La disminución de la abundancia de estas enzimas implica una disminución del potencial de reciclaje de la necromasa microbiana en los suelos agrícolas. Si tenemos en cuenta que los contenidos de SOC medidos en rotaciones agrícolas se reducen en comparación con los pastizales naturales, una posible explicación de estas observaciones podría ser que la reducción de las reservas de carbono de la necromasa microbiana podría conducir a una disminución de los componentes del microbioma relacionados con el reciclaje de la necromasa microbiana (Cao et al., 2023). Existen pruebas de que las fracciones de SOC con diferente labilidad se ven afectadas de forma diferencial por el cambio en el uso de la tierra y los aportes de carbono

al suelo (Liu et al., 2020; Zhang et al., 2022). El carbono de necromasa microbiana puede constituir una fracción importante de la materia orgánica del suelo; tradicionalmente se ha relacionado con la materia orgánica asociada a minerales (Cotrufo et al., 2013; Verrone et al., 2024). Nuestros análisis metagenómicos indican una alteración en los componentes del microbioma que regulan los flujos de carbono de necromasa microbiana tras el cambio de uso del suelo.

El nitrógeno es otro macronutriente importante para la función del suelo que se ve afectado por las prácticas agrícolas. El análisis metagenómico reveló que algunos genes relacionados con los procesos del ciclo del nitrógeno presentaban una mayor abundancia en los suelos de pastizales naturales, como el gen *NifH*, responsable de la fijación del nitrógeno. Mediante el análisis del perfilado de la comunidad también detectamos una mayor abundancia de un género perteneciente al orden *Azospirillales*, junto con otro clasificado en el género *Bradyrhizobium*, ambos podrían estar contribuyendo a una mayor abundancia del gen *NifH* en el microbioma de suelos de pastizal. Una alta tasa de fijación biológica de nitrógeno por organismos de vida libre ha sido previamente reportada en asociación con pastos C₄ en pastizales naturales de Sudamérica, particularmente con géneros bacterianos colonizadores de la rizósfera. Adicionalmente, se ha reportado que la colonización de pastos por bacterias fijadoras de nitrógeno es afectada negativamente por la fertilización (Marques et al., 2017). Aparte de esto, los genes responsables de los procesos de pérdida de nitrógeno en los suelos también se encontraron en una mayor abundancia relativa en los pastizales naturales. Este es el caso de los genes de desnitrificación *nirK* y *nirS* y los genes de reducción desasimilatoria de nitratos. Una alta abundancia relativa de genes relacionados con el ciclo del Nitrógeno puede ser responsable de la alta concentración de Nitrógeno en suelos NG sin necesidad de aportes externos. Si tenemos en cuenta que la producción y el uso de fertilizantes nitrogenados se estima que representan el 5% de las emisiones globales de gases de efecto invernadero (GEI), la sustitución de estos insumos externos por productos de base microbiana es una estrategia de gestión sostenible a considerar para la producción agrícola (Gao & Cabrera-Serrenho, 2023).

Por último, llama la atención que, aunque los suelos agrícolas tenían mayores contenidos de fósforo (P), sus respectivas comunidades microbianas tenían una menor abundancia relativa de enzimas relacionadas con procesos metabólicos del P, como los genes relacionados con el metabolismo de las purinas (*purBC* y *purHKLS*). En este uso del suelo se obtuvo una mayor

abundancia de una subunidad del complejo multienzimático C-P liasa (*phnK*), que son las enzimas que disponibilizan el P presente en fosfonatos para las bacterias del suelo (Quinn et al., 1989). Estudios previos han propuesto que el fosfonato y el fosfinato podrían ser una fuente importante de P para las comunidades microbianas en suelos con baja disponibilidad de P (Oliverio et al., 2020). Es probable que la aplicación de fertilizantes contribuya a elevar los niveles de fósforo en los suelos agrícolas, provocando simultáneamente una disminución de la abundancia de numerosos transportadores de P en las comunidades microbianas. En el caso de suelos de rotaciones agrícolas pudimos detectar una mayor abundancia del género *Microtholunatus* que contiene especies reportadas como organismos acumuladores de polifosfato (PAO), en condiciones aeróbicas, utilizados para la biorremediación de fósforo en aguas residuales y asociados con una alta disponibilidad de P en tierras de cultivo (Akar et al., 2006; J. Liu et al., 2022). La alta abundancia de PAO en las tierras de cultivo puede conducir a una menor eficiencia en el uso de fósforo (PUE) por la adaptación del microbioma al exceso de P en los suelos. Además, la única fosfatasa encontrada en este conjunto de datos fue *phoD*, sin abundancia diferencial entre los usos del suelo, este ha sido descrito como un gen predominante en un estudio reciente de las comunidades globales de suelo de pastizales (Garaycochea et al., 2023). El efecto positivo sobre la abundancia de genes microbianos del ciclo del fósforo que pudimos observar en pastizales naturales ya se ha descrito en estudios anteriores sobre pastizales, y se ha relacionado específicamente con el pastoreo de ganado (Liu et al., 2023).

2.5 Conclusiones

En este análisis ponemos en evidencia el profundo impacto de las rotaciones agrícolas en las comunidades microbianas del suelo, lo que señala la necesidad crítica de prácticas agrícolas sostenibles. La evidente disminución de la diversidad fúngica y el cambio hacia una dominancia patotrófica, junto con la reducción de los géneros bacterianos beneficiosos y la disminución de los procesos mediados por el microbioma del suelo, pueden comprometer la salud del suelo y los servicios ecosistémicos, como el ciclo de nutrientes y la supresión de enfermedades. Estos hallazgos subrayan la importancia de desarrollar estrategias de gestión que favorezcan la diversidad microbiana, mejorando potencialmente el secuestro de carbono del suelo y contribuyendo a la mitigación del cambio climático, como el aumento de la diversidad de cultivos comerciales y el uso de un conjunto diverso de especies de cultivos de servicio (Piazza et al., 2024) y la sustitución de pesticidas por insumos biológicos (Elnahal, et al., 2022). Para garantizar la

productividad agrícola y la salud medioambiental a largo plazo, los marcos políticos deben integrar estos conocimientos y abogar por prácticas que mantengan la funcionalidad microbiana.

2.6 Disponibilidad de datos y materiales

Las secuencias generadas de los genes 16S rRNA, la región ITS y los datos metagenómicos de escopeta están disponibles en los repositorios públicos del NCBI bajo la accesión BioProject PRJNA1037557. Los programas R para el análisis de datos están disponibles en (https://github.com/mgimenez720/Gimenez_etal_soil_microbiome) con sus correspondientes archivos de datos.

Este capítulo ha sido publicado en la revista arbitrada *Environmental Microbiome* y constituye la publicación requerida para culminar el programa de Doctorado en Ciencias Biológicas de PEDECIBA biología.

Giménez, M., Berenstecher, P., Ligrone, A. *et al.* Soil microbiome analysis of Uruguayan grasslands and croplands reveals losses of microbial diversity and necromass recycling traits. *Environmental Microbiome* **20**, 96 (2025). <https://doi.org/10.1186/s40793-025-00696-4>

CAPITULO III

Cambios en comunidades microbianas de suelos asociados a diferentes opciones de intensificación del campo natural en sistemas ganaderos

3.1 Introducción

Los sistemas ganaderos sobre campo natural han permanecido por más de 300 años proporcionando proteína animal de alto valor con un bajo uso de insumos externos. La mayoría de estas explotaciones se hace de manera extensiva con una baja carga de animales por hectárea. Esto posiciona a la ganadería sobre campo natural como una opción productiva con bajo impacto ambiental. Estos sistemas también proporcionan valiosos servicios ecosistémicos, como el mantenimiento de la biodiversidad, el control de la erosión del suelo, el almacenamiento de carbono y la regulación del ciclo de nutrientes (Modernel, et al. 2018). De hecho, algunas investigaciones sugieren que los pastizales nativos pueden ser una fuente para mejorar la riqueza bioquímica de la carne y la leche, así como la salud ambiental (Dawson, et al; 2011). Sin embargo, la creciente demanda por proteína animal amenaza estos sistemas para su conversión en explotaciones agrícolas intensivas.

Existen desafíos importantes para la sustentabilidad de la producción ganadera sobre campo natural del Uruguay, como lo es su relativamente baja productividad (~70 kg de carne/há por año) lo cual es un factor que impulsa su conversión hacia la agricultura o la silvicultura (Carvalho, et al, 2006). Esta conversión amenaza la extensión de los pastizales nativos y los servicios ecosistémicos que brindan. Además, en economías con pocos subsidios y sin pago por servicios ecosistémicos, la baja rentabilidad comparativa de la producción ganadera extensiva puede llevar a una degradación del campo natural debido a tasas de carga animal por encima de lo óptimo, especialmente en pequeñas explotaciones. Esto crea un ciclo vicioso de degradación, baja productividad y aún menor rentabilidad (Tiscornia, et al. 2019). Por último, la productividad de los pastizales naturales es altamente dependiente del clima, especialmente de la variabilidad de las precipitaciones, lo que causa grandes fluctuaciones en la producción de forraje y su valor nutricional (Guido, et al 2014).

En la región, las investigaciones vinculadas al aumento de productividad del campo natural han seguido diferentes caminos. Por un lado, la intensificación tradicional implica el uso de insumos externos como la adición de nutrientes a través de fertilizantes sintéticos, y/o el agregado a través de la sobresiembra de leguminosas (Plantureux, et al 2005; Rama, et al 2022). Por otro lado, la intensificación sostenible busca mejorar la productividad a través de tecnología de procesos como

el manejo de la intensidad del pastoreo o la subdivisión de las áreas disponibles al ganado (Tittonell, 2021; Ruggia, et al. 2021).

Dentro de las opciones de intensificación convencional se encuentra la fertilización del campo natural. Es ampliamente reconocido que la Productividad Primaria Neta Aérea (PPNA) está limitada por la disponibilidad de nutrientes (Chapin et al., 2011). Diversos experimentos han demostrado que la escasez de nitrógeno y fósforo limita la productividad primaria de los ecosistemas terrestres (Elser et al., 2007). De hecho, se ha observado que en algunos sistemas existe una co-limitación por nutrientes, donde la respuesta es sinérgica cuando se agregan ambos elementos: la respuesta conjunta a nitrógeno y fósforo es mayor que la suma de las respuestas individuales (Harpole et al., 2011). La aplicación de fertilizantes sintéticos mejora la productividad de los pastizales nativos y aumenta el valor nutricional del forraje, lo que conlleva a un incremento en la producción animal de entre un 60 % y un 200 % en comparación con pastizales no fertilizados (Dindová et al., 2019).

Se ha observado que la adición de nutrientes puede generar cambios en la composición de la vegetación. La homogeneización en la disponibilidad de nutrientes en pastizales altera la competencia por los recursos, actuando como un filtro ambiental que reduce la influencia de procesos estocásticos en el ensamblaje de comunidades (Harpole et al., 2016). Diversos estudios, incluidos los resultados del experimento ecológico de mayor duración registrado hasta la fecha, han demostrado que la fertilización de pasturas reduce la riqueza y diversidad de especies vegetales, favoreciendo el reemplazo de especies por aquellas con mayor capacidad competitiva por la luz (Hautier et al., 2009, Gross & Mittelbach, 2017; Silvertown et al., 2006, Bobbink et al., 2017). Asimismo, se ha determinado que la reducción de la competencia y el aumento en la disponibilidad de recursos hacen que el sistema se vuelva más susceptible a la invasión por especies exóticas (Davis et al., 2000). Sin embargo, pocos estudios han evaluado cómo la fertilización modifica la composición, diversidad y funciones del microbioma del suelo en pastizales naturales, y cuáles son las consecuencias de estos cambios para el sostenimiento de los servicios ecosistémicos.

Otra de las opciones de intensificación que se han utilizado en pastizales nativos es la sobre siembra de leguminosas y adición de fósforo inorgánico. Se ha documentado que la fijación biológica de nitrógeno (FBN), facilitada por la simbiosis con leguminosas, permite la incorporación de nitrógeno al sistema sin necesidad de fertilización nitrogenada. En combinación

con la mayor disponibilidad de fósforo inorgánico, debida la fertilización, permiten la mejora en la producción de forraje en pastizales templados (Rama et al., 2022). A su vez, se ha documentado que este manejo de intensificación genera cambios en la distribución de COS y NOS en el suelo, sin embargo, no se han determinado cambios significativos respecto al campo natural, donde los manejos de pastoreo podrían resultar determinantes para generar cambios entre tratamientos (Bondaruk, et al 2020). Por otro lado, existen evidencias contrarias en cuanto al cambio en comunidades vegetales generado a partir de la intensificación de diferentes suelos con sobresiembra de leguminosas y fósforo. Algunos estudios no reportan cambios significativos en la riqueza de especies vegetales (Oliveira, et al. 2015), sin embargo, otros detectan pérdida de especies nativas y sugieren la necesidad de desarrollar índices específicos para evaluar el impacto de este tipo de manejos en la cobertura vegetal (Lezama et al., 2024). Nuevamente, pocos estudios han evaluado los cambios en la estructura y diversidad de comunidades microbianas del suelo a partir de la sobresiembra de leguminosas y adición de fósforo en campo natural, más allá de estudios recientes vinculados a hongos micorrízicos arbusculares y cambios en la cobertura vegetal (García et al., 2025).

La implantación de pasturas sembradas es otra de las formas de intensificación de pastizales. Este manejo conlleva la eliminación de la cobertura vegetal y la siembra de especies perennes que tienen una buena producción forrajera. Esta forma de intensificación permite mantener el stock de Carbono de los suelos y aumentar la productividad vegetal (Dietz, et al. 2024). Dentro de las especies comúnmente sembradas se encuentra *Festuca arundinaceae*, muy utilizada en Uruguay por presentar una buena producción en climas templados. A su vez, se ha descrito su asociación con endófitos específicos, como *Epichloe* que pueden mejorar su resiliencia frente a cambios en el clima como eventos de sequía (Mahmud et al., 2021). A su vez, se ha visto que la mezcla de esta especie con otras gramíneas como *Lolium perenne* permiten mejorar los rendimientos productivos, especialmente en suelos con baja disponibilidad de fósforo (Velasco-Sánchez et al., 2024). También se ha determinado que la integración de diversas especies sembradas en pasturas polifíticas permite complementar características productivas y de uso de nutrientes de forma de aumentar la productividad y sostenibilidad de este tipo de pasturas.

En este sentido, la integración de leguminosas con gramíneas es una práctica común con mejoras en resultados productivos, pero también con cambios en el perfil de nutrientes utilizados, donde

las leguminosas aportan N a través del proceso de fijación biológica (Crème et al., 2016). Las especies *Trifolium repens* y *Lotus corniculatus* son muy utilizadas en el diseño de pasturas polifíticas, se ha observado que una adecuada mezcla de las especies sembradas en las pasturas permite, a través de la rizodeposición y otros mecanismos, mantener altos niveles de carbono en el suelo (Mortensen et al., 2025). A su vez, las mezclas correctas en pasturas polifíticas permiten aumentar su productividad y reducir la dependencia respecto a fertilizantes sintéticos (Carswell et al., 2022)

Existe bastante información sobre el impacto de las distintas opciones de intensificación de pastizales nativos a nivel de la comunidad vegetal (Jaurena et al., 2021; Dorrough et al., 2007) o sobre su efecto en la dinámica de nutrientes del suelo (Fornara et al., 2016). Sin embargo, el conocimiento acerca de los cambios que estas prácticas generan en el microbioma del suelo sigue siendo muy limitado. En el caso de Uruguay, los estudios científicos son aún más escasos en comparación con otras regiones del mundo, a pesar de contar con diversas plataformas de Experimentos de Largo Plazo (ELPs) que ofrecen un marco metodológico sólido para evaluar diferentes estrategias de intensificación ganadera (Leoni, 2024). Una de las principales ventajas de los ELPs es que permiten analizar el efecto acumulado de manejos estandarizados a lo largo del tiempo. Aunque existe evidencia sobre los efectos de legado del microbioma en sistemas agrícolas, este conocimiento es considerablemente menor en sistemas ganaderos. Muchas veces el efecto observado sobre el microbioma en suelos cultivados se debe a los efectos generados por prácticas anteriores (Jing et al., 2022; Dang et al., 2024). Se ha determinado que este efecto puede durar hasta 6 meses en el caso de hongos y que también puede condicionar el establecimiento del microbioma endofítico de las plantas, condicionando su productividad posterior (Hannula et al., 2021). La utilización de ELPs para evaluar el efecto de diferentes manejos en el microbioma de suelos permite, entre otras cosas, normalizar este efecto legado, realizando comparaciones de manejos similares en distintos sitios experimentales.

En este capítulo se plantea como objetivo estudiar el efecto de diferentes opciones de intensificación de sistemas ganaderos sobre campo natural en el microbioma de suelos. Para esto se utilizaron técnicas de secuenciación masiva de genes marcadores de comunidades bacterianas (ARNr 16S) y fúngicas (ITS1). Las diferentes opciones de intensificación incluyeron la fertilización del campo natural, la sobresiembra de leguminosas y fósforo y la implantación de

pasturas perennes. A partir de esto se analizaron cambios en diversidad alfa y beta para comunidades de bacterias y hongos, también se determinó el microbioma *core* de campo natural y los cambios en abundancia relativa de microorganismos asociados a las diferentes opciones de intensificación.

3.2 Metodología

3.2.1 Descripción de los Ensayos a Largo Plazo de campo natural muestreados.

3.2.1.1 *Ensayos de fertilización de Campo Natural*

Se realizaron muestreos de suelo en experimentos de largo plazo (ELP) que incluían un tratamiento de Campo Natural y otro con adición de nitrógeno y fósforo. El primero de estos ensayos se encuentra en la Estación Experimental Mario A. Cassinoni (EEMAC), en el departamento de Paysandú. Este experimento, ubicado en el Potrero 18, cuenta con distintos manejos de campo natural y tenía una antigüedad de seis años al momento del muestreo (primavera de 2020). El ELP en EEMAC evalúa dos dosis de nitrógeno; en este estudio, se muestreó únicamente el tratamiento con la dosis más alta ($60 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$), que incluye además la adición de $40 \text{ kg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ de fósforo (P_2O_5). Se muestrearon los bloques 1 y 2, obteniendo un total de 12 muestras compuestas.

Además, se obtuvieron muestras de un experimento en INIA Glencoe, el ELP más antiguo con este tratamiento en el país, con 26 años de implementación al momento del muestreo. Ambos tratamientos en este sitio incluyen pastoreo bovino, pero difieren en la adición de $100 \text{ kg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ de nitrógeno y $46 \text{ kg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ de fósforo. Este ensayo cuenta con dos repeticiones ubicadas en bloques distanciados, y ambas fueron muestreadas, generando un total de 12 muestras compuestas dentro de un área delimitada de 400 m^2 por parcela.

Por último, se tomaron muestras de un ELP en un predio experimental de INIA Tacuarembó, situado en la localidad de Tambores. A diferencia de los otros ensayos, este experimento no es pastoreado por ganado, sino cosechado manualmente. Al momento del muestreo, tenía una antigüedad de nueve años, y sus parcelas eran de menor tamaño que en los demás experimentos ($6 \times 8 \text{ m}$ por unidad experimental). Debido a estas dimensiones, las repeticiones fueron tomadas en

distintas unidades experimentales. Se muestrearon los tratamientos 3 (80 kg ha⁻¹ año⁻¹ de fósforo y 100 kg ha⁻¹ año⁻¹ de nitrógeno) y 5 (control de campo natural, sin adición de fertilizantes).

El muestreo de suelo se realizó con calador. En cada parcela se tomaron tres muestras compuestas, cada una integrada por diez piques distribuidos aleatoriamente dentro del área seleccionada, con una profundidad máxima de 15 cm. En EEMAC y Tambores, las muestras compuestas representaron la totalidad de la parcela, mientras que en Glencoe se delimitó un área representativa de 400 m² por unidad experimental, asegurando la proximidad entre ambos tratamientos. Se evitó la toma de muestras a menos de dos metros del alambrado para minimizar el efecto borde. En Tambores, dado el menor tamaño de las parcelas, se obtuvo una única muestra compuesta por parcela. Todas las muestras fueron transportadas en condiciones refrigeradas para preservar la composición del microbioma.

3.2.1.2 Ensayos de sobresiembra de leguminosas y adición de fósforo al campo natural

Para evaluar los efectos de la adición de leguminosas y fósforo sobre las comunidades microbianas en el suelo de campo natural bajo pastoreo, se muestrearon tres experimentos de largo plazo (ELP) en Uruguay: EEMAC (Potrero 18), INIA Treinta y Tres (Banco Mundial) y CIEDAG-SUL. La sobresiembra de leguminosas junto con la adición de fósforo al suelo es utilizada para aumentar la productividad del campo natural, dada la capacidad de las leguminosas de establecer simbiosis con rizobios fijadores de nitrógeno, a este manejo se lo conoce como mejoramiento del campo natural.

Uno de los experimentos muestreados corresponde al mismo ensayo descrito en el tratamiento de fertilización, ubicado en el Potrero 18 de EEMAC, en el departamento de Paysandú. Este ensayo también incluye un tratamiento con adición de leguminosas y fósforo, por lo que se muestrearon dos bloques de este tratamiento. Para la comparación, se utilizaron como control de campo natural las mismas muestras del tratamiento de fertilización, dado que provienen del mismo experimento. En este tratamiento, se adicionaron 40 kg ha⁻¹ año⁻¹ de fósforo y se sembraron *Trifolium pratense* y *Lotus tenuis* como leguminosas forrajeras 6 años antes del momento de muestreo (Caram et al., 2021).

Además, se muestreó un experimento en el Centro de Investigación Agropecuaria Alejandro Gallinal (CIEDAG), ubicado en el kilómetro 140 de la Ruta 7, en la localidad de Cerro Colorado,

departamento de Florida, perteneciente al Secretariado Uruguayo de la Lana (SUL). En este caso, el tratamiento muestreado corresponde a una pastura con *Lotus pedunculatus* (Lotus maku) como leguminosa forrajera, fertilizada con fósforo. La pastura fue sembrada en 2009 y, al momento del muestreo, presentaba cobertura de campo natural junto con Lotus maku. Este ensayo es de carácter irrigado y no cuenta con un tratamiento específico de campo natural. No obstante, se identificó un potrero contiguo al experimento con campo natural en secano bajo pastoreo desde antes del inicio del ensayo, por lo que se delimitó un área de 400 m² en dicho potrero para utilizarlo como control de campo natural. La antigüedad del experimento era de 12 años al momento del muestreo. Tanto el ensayo como el control fueron pastoreados por ganado ovino.

Por último, se muestreó un ELP en INIA Treinta y Tres, específicamente en la Unidad Experimental Palo a Pique (UEPP), establecida en 1996. Este experimento incluye la sobresiembra de *Trifolium repens* y *Lotus corniculatus*, junto con la adición de fósforo a una dosis de 13,2 kg ha⁻¹ año⁻¹. El ensayo es pastoreado por ganado bovino y constituye el ELP de mayor antigüedad con este tratamiento en el país. Se tomaron muestras de un único bloque correspondiente al tratamiento con dosis intermedia de fósforo, así como del testigo de campo natural pastoreado.

El muestreo de suelo se realizó con calador, recolectando tres muestras compuestas por parcela. Cada muestra compuesta se conformó a partir de diez piques distribuidos aleatoriamente dentro de un área de 400 m², separados al menos 2m entre sí. Los piques se realizaron con una profundidad máxima de 15 cm, obteniendo un total de 24 muestras compuestas.

3.2.1.3 Ensayos de remplazo del Campo Natural por pasturas perennes

Como última opción de intensificación se evaluó el efecto de la siembra de pasturas sobre el campo natural. En todos los casos, la introducción de especies forrajeras exóticas implicó la sustitución del campo natural al momento de la siembra, eliminando las especies nativas de plantas. Sin embargo, al momento de muestreo en todos los casos se encontraron mezclas de especies nativas del campo natural con aquellas especies exóticas que fueron sembradas al momento de implantación de las pasturas.

Para la comparación, se incluyó un potrero en INIA Glencoe, donde se sembró *Festuca Arundinacea* hace más de 10 años. Al momento del muestreo, este ensayo se encontraba bajo

pastoreo, representando un caso de restauración de campo natural, en el que aún persistían plantas de festuca provenientes de la etapa de pastura. El control de campo natural utilizado correspondió al ensayo de fertilización muestreado en el mismo campo experimental de INIA Glencoe. Además, se muestreó el ELP de Palo a Pique (UEPP) en INIA Treinta y Tres. Este experimento incluye rotaciones de cultivos con diferentes intensidades y ha pasado por distintas fases a lo largo del tiempo. Para este estudio, se seleccionaron dos potreros: el potrero 12, con pasturas polifíticas permanentes (*Lolium perenne*, *Lotus corniculatus* y *Trifolium repens*), y un área de campo natural cercana, utilizada como soporte para las rotaciones dentro del experimento. En este caso, las pasturas fueron fertilizadas con 20 kg ha⁻¹ de urea y 50 kg ha⁻¹ de P₂O₅ al momento de la siembra, y posteriormente fertilizadas anualmente con P₂O₅. Estas pasturas son resembradas cada cinco años (Rovira et al., 2020).

Por último, se incluyó como comparación la sobresiembra de festuca en el experimento de CIEDAG-SUL, esta parcela es fertilizada con una dosis de 100 kg ha⁻¹ año⁻¹ de fosfato di amónico el cual aporta nitrógeno y fósforo. Esta pastura es de tipo irrigado y se comparó con un potrero de campo natural adyacente, el mismo utilizado para la comparación de la sobresiembra de leguminosas y adición de fósforo. En todos los casos, el tratamiento control de campo natural no se encontraba adyacente al tratamiento de pasturas, pero sí se encontraba sobre el mismo tipo de suelo.

Para el muestreo de suelos, se delimitó un área de 400 m² y se recolectaron tres muestras compuestas, cada una conformada por diez piques distribuidos aleatoriamente con calador, a una profundidad máxima de 15 cm. Las muestras fueron transportadas en condiciones refrigeradas para preservar la composición del microbioma y posteriormente procesadas en el laboratorio.

Tabla 1. Descripción de ensayos a largo plazo muestreados

| Ensayo | Departamento | Uso del suelo | Muestras | Antigüedad | Fecha de muestreo |
|---------------------|--------------|---------------|----------|------------|-------------------|
| EEMAC P18 | Paysandú | CN* | 6 | 6 | Oct. 2020 |
| | | Fertilización | 6 | 6 | Oct. 2020 |
| | | Leg y P** | 6 | 6 | Oct. 2020 |
| INIA Glencoe | Paysandú | CN | 6 | 26 | Mayo 2022 |
| | | Fertilización | 6 | 26 | Mayo 2022 |
| | | Pasturas | 3 | >10 | Mayo 2022 |

| | | | | | |
|--------------------------------------|----------------|---------------|---|----|-----------|
| INIA Tambores | Tacuarembó | CN | 4 | 9 | Mayo 2022 |
| | | Fertilización | 4 | 9 | Mayo 2022 |
| INIA 33 Banco Mundial | Treinta y tres | CN | 3 | 26 | Oct. 2022 |
| | | Leg y P | 3 | 26 | Oct. 2022 |
| INIA 33 UEPP | Treinta y tres | CN | 4 | 27 | Oct. 2022 |
| | | Pasturas | 4 | 27 | Oct. 2022 |
| CIEDAG- SUL | Florida | CN | 3 | 11 | Mayo 2022 |
| | | Leg y P | 3 | 11 | Mayo 2022 |
| | | Fertilización | 3 | 11 | Mayo 2022 |

* Campo Natural

** Sobresiembra de leguminosas y adición de fósforo

3.2.2 Procesamiento de Muestras y extracción de ADN microbiano

Las muestras fueron transportadas en condiciones refrigeradas con el objetivo de preservar la composición del microbioma. Una vez en el laboratorio, las muestras fueron procesadas siguiendo los siguientes pasos: Las muestras fueron secadas a temperatura ambiente para evitar la degradación del ADN debido al calor. Posteriormente, fueron trituradas utilizando un mortero manual para reducir el tamaño de las partículas y agregados, y se tamizaron (tamíz de 2 mm) con el objetivo de obtener una textura homogénea separando restos vegetales y piedras. Para la caracterización fisicoquímica de los suelos analizados se generó un conjunto de metadatos a partir de muestras compuestas de 100 g de suelo por sitio, las cuales fueron remitidas al Laboratorio de Suelos de la Facultad de Agronomía para su procesamiento. En dicho laboratorio se determinaron los principales indicadores edáficos mediante metodologías estandarizadas: el pH en agua se midió según los procedimientos de van Lierop (1990) y Thomas (1996), utilizando una relación suelo/agua 1:1; el contenido de carbono orgánico (C.O.) se cuantificó por el método de Dumas mediante combustión seca, de acuerdo con Nelson y Sommers (1996), y a partir de este valor se estimó la materia orgánica (M.O.) empleando un factor empírico de 1,724, asumiendo que el 58% de la M.O. corresponde a C.O.; el nitrógeno total se determinó igualmente por el método de Dumas; el nitrógeno nítrico (N-NO_3^-) se evaluó mediante un método colorimétrico siguiendo a Mulvaney (1996); el nitrógeno amoniacal (N-NH_4^+) se cuantificó por un método colorimétrico

con phenylphenol según Rhine et al. (1998); y el fósforo asimilable se midió mediante el método de Bray y Kurtz (1945).

A partir de las muestras mezcladas de manera homogénea se utilizaron 300 mg de muestra para realizar la extracción de ADN utilizando un kit comercial adecuado para suelos (PowerLyzer Soil DNA Kit, Qiagen). Se determinó la integridad y concentración del ADN extraído a través de electroforesis en gel de agarosa al 1% y utilizando Nanodrop. El ADN extraído fue enviado a BGI Genomics para su secuenciación. Específicamente se secuenciaron los genes ARNr16S para bacterias, abarcando específicamente las regiones hipervariables V3-V4 a través de los cebadores reportados en Klindworth, et al (2013). A su vez, para describir las comunidades de hongos se secuenció la región intergénica ITS1, utilizando los cebadores (ITS1f-ITS2) especificados en la sección de protocolos estandarizados del proyecto Earth Microbiome Project (<https://earthmicrobiome.org/protocols-and-standards/>). Estos marcadores permiten identificar las comunidades microbianas presentes en las muestras de manera abarcativa y tienen la ventaja de ser comparables con múltiples estudios.

3.2.3 Análisis Bioinformático de secuencias

3.2.3.1 Resolución de ASVs y obtención de tablas de conteo

Luego de obtener las secuencias para cada muestra, se procedió al análisis bioinformático siguiendo los siguientes pasos. A partir de los archivos FASTQ obtenidos, se realizó el filtrado de calidad de las secuencias utilizando el pipeline de DADA2 en el software R (Callahan et al. 2016). En este paso, se descartaron las lecturas menores a 250 pares de bases y aquellas con un error esperado (EE) de 2. Además, se eliminaron las lecturas que contenían bases asignadas como "N" en cualquier posición.

Posteriormente, a través de la función `learnErrors()`, el paquete permitió estimar los errores de secuenciación (transiciones entre nucleótidos) en función del score de calidad del conjunto de datos. Este paso es fundamental para distinguir artefactos generados por errores en la secuenciación de secuencias biológicas reales. La función `dada()`, utilizada a continuación, empleó la estimación de errores generada en el paso anterior y las secuencias dereplicadas

obtenidas con la función `derepFastq()`, lo que permitió identificar y corregir errores observados en las secuencias.

A continuación, se realizó la unión de las lecturas forward y reverse mediante la función `mergePairs()`, estableciendo un solapamiento mínimo de 10 nucleótidos. Luego, se eliminaron las secuencias quiméricas utilizando la función `removeBimeraDenovo()`. Las Amplicon Sequence Variants (ASVs) obtenidas proporcionaron una alta resolución para la caracterización taxonómica de las comunidades microbianas.

Finalmente, la identificación taxonómica de las ASVs se llevó a cabo con la función `assignTaxonomy()`, utilizando dos bases de datos de referencia: SILVA-138 para las secuencias bacterianas (Quast et al. 2013) y UNITE para las secuencias fúngicas (Abarenkov et al. 2023), asegurando así una clasificación precisa de los microorganismos presentes en cada muestra.

3.2.3.2 Análisis de composición y diversidad del microbioma

Para el análisis del microbioma *core* de los sitios pareados se utilizó el paquete `microbiome` (Lahti et al., 2014). A través de la función `core()` se detectaron las ASVs con una prevalencia mínima del 99% y una abundancia mayor a 10 conteos por millón (CPM), estos valores implican la presencia de los taxa seleccionados en todas las muestras. Para la visualización de estos resultados se utilizó la función `plot.core()` donde se grafica la prevalencia de cada ASV presente en el microbioma *core* según el límite de detección, lo cual tiene en cuenta la abundancia relativa de cada ASV en unidades porcentuales en todo el conjunto de datos.

Los análisis posteriores se realizaron utilizando principalmente funciones implementadas en los paquetes `phyloseq` y `vegan` (v 2.6-8) (McMurdie & Holmes, 2013; Dixon, 2003). En primer lugar, se estudió la composición microbiana a través del cálculo de la abundancia de los diferentes grupos taxonómicos a nivel de Phylum en cada sitio y tratamiento. Para la visualización de estos datos se utilizó el paquete `ggplot2` (Wickham, 2011), teniendo en cuenta los diez Phyla más abundantes en cada muestra. Para evaluar la diversidad alfa, se tuvieron en cuenta los géneros presentes en al menos 10% de las muestras, este filtro de prevalencia permite evitar sesgos generados por taxas raros que no reflejen la comunidad estable presente en cada muestra secuenciada. Se calculó la riqueza de géneros observados en cada muestra, a través de la función

`estimate_richness()`, obteniendo una medida de la diversidad para cada muestra. La visualización se realizó agrupando las observaciones por tratamientos y se evaluó la significancia estadística entre grupos a través de un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, utilizando el test de Wilcoxon como prueba *post-hoc*, lo cual se encuentra implementado en la función `ggsignif()` (Ahlmann-Eltze & Patil, 2021).

Por otra parte, para evaluar la diversidad beta entre las muestras se construyó una matriz de distancias de Bray-Curtis, a través de la función `ordinate()`, y se visualizó la disimilitud entre muestras en dos dimensiones mediante un análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS). Para evaluar la significancia estadística de los diferentes tratamientos en la distribución de las muestras se utilizó un análisis de varianza multivariado con permutaciones (PERMANOVA), implementado en la función `adonis()`. Por último, se realizó un análisis de abundancia diferencial donde se utilizó el paquete `Maaslin2` (Mallick et al., 2021), que implementa modelos lineales generalizados (GLMs), para detectar los géneros que presentaban cambios en su abundancia relativa entre los distintos tratamientos. En este análisis, se incluyeron como variables aleatorias el sitio y la temporada de muestreo, lo que permitió corregir la variabilidad natural y estacional de las comunidades microbianas. A su vez, este paquete permite tener en cuenta que los datos de secuenciación son composicionales, para lo cual se utilizó el método *centered-log ratio* (CLR), donde se busca que el logaritmo de las relaciones entre las diferentes ASVs se mantenga constante al momento de normalizar la tabla de conteos. A su vez, esta implementación también permite ajustar el p-valor por múltiples comparaciones, para lo cual se utilizó como valor límite para este análisis un FDR menor a 0.15.

Por otra parte, en el caso de comunidades fúngicas se utilizó el programa FUNGuilds, el cual se basa en referencias bibliográficas de una gran diversidad de géneros fúngicos para su clasificación en gremios (Nguyen et al., 2016). Para esto se utiliza la información de sustratos y modos tróficos reportados para los distintos géneros logrando clasificar una gran diversidad de géneros. En este análisis clasificamos los géneros detectados en modos tróficos y colapsamos las tablas de conteos para cada muestra. Posteriormente, utilizamos el paquete `Maaslin2` para detectar diferencias significativas en la abundancia de estos modos tróficos para los diferentes tratamientos evaluados.

3.2.3.3 Análisis de redes a partir de datos de microbioma

Los análisis de microbioma utilizando redes de correlación tuvieron como objetivo detectar cambios en el microbioma asociado a hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en los distintos tratamientos. Para esto se construyeron redes de correlación para cada tratamiento, utilizando las tablas de conteo a nivel de género. Se utilizaron como datos de entrada las tablas de conteo normalizadas a nivel de género, incluyendo hongos y bacterias, y se calculó el coeficiente de correlación de Spearman a través de la función `rcorr()` del paquete `HMisc` (v5.2.2) (Harrell, 2019). A su vez, se ajustó el p-valor por múltiples comparaciones utilizando la función `p.adjust()` con el método Benjamini-Hochberg (Benjamini & Hochberg, 1995). Para la construcción y manipulación de las redes de correlación se utilizaron las funciones implementadas en el paquete `Igraph` (v2.1.3) (Csardi & Nepusz, 2006). En primer lugar, se utilizó la función `graph_from_adjacency_matrix()` donde se definieron como nodos en la red todos los géneros fúngicos y bacterianos presentes en más del 5% de las muestras. A su vez, se definió un valor límite de correlación (r) mayor a 0.75 y con un FDR mayor a 0.05 para la existencia de aristas entre los distintos nodos. Esto resultó en la obtención de redes unipartitas, no dirigidas. A partir de estas redes, se aislaron los nodos pertenecientes a géneros de HMAs y se creó una red bipartita manteniendo únicamente las aristas que unieran nodos bacterianos con nodos HMAs. Luego se utilizaron las funciones `vcount()`, `ecount()`, `diameter()`, `mean_distance()` y `modularity()`, para calcular parámetros de las redes que nos permitieran detectar diferencias en la complejidad estructural de las redes generadas a partir de los distintos tratamientos. Para continuar caracterizando las redes de correlación, se clasificaron los diferentes nodos bacterianos a partir de una revisión bibliográfica donde se buscó si existían reportes de los géneros asociados a AMFs como endófitos vegetales, las tablas de clasificación de endófitos con sus referencias bibliográficas se encuentran disponibles como material suplementario (Tabla suplementaria S3). Por último, la visualización de las redes se realizó a través de la función `plot()` del paquete `Igraph` (v2.1.3).

3.3 Resultados

3.3.1 Fertilización de campo natural

3.3.1.1 *Análisis de comunidades fúngicas en campo natural fertilizado*

Las comunidades fúngicas de las 32 muestras obtenidas en los ELP que evalúan el efecto de la fertilización del campo natural estuvieron dominadas por hongos del Phylum *Ascomycota*, seguidos de *Mortierellomycota* y *Basidiomycota*. La variación principal observada en la estructura de las comunidades fue mayor entre los tres ELP analizados que entre los tratamientos de fertilización y el testigo de campo natural sin fertilizar, aunque estos también difirieron dentro de cada ELP (Figura 3.1 A). A su vez, la alfa diversidad no presentó diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 3.1 B), con una cantidad de géneros observados que oscila entre 400 y 650 por muestra. Estos resultados sugieren que, aunque existieron diferencias en la identidad de las especies de las comunidades, la riqueza de géneros permaneció similar entre ambos tratamientos, aunque tendió a ser mayor en los tratamientos de campo natural sin fertilización.

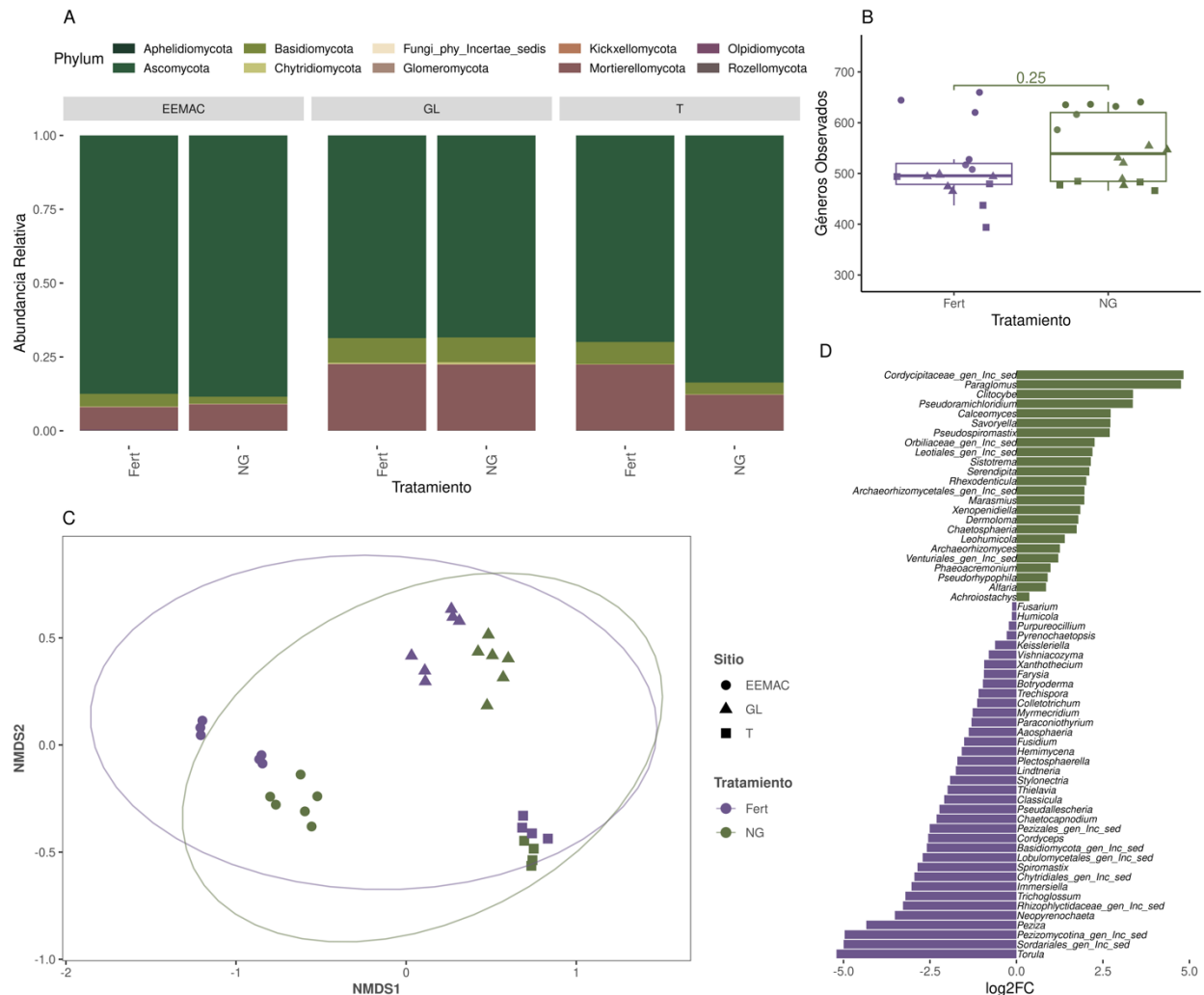


Figura 3.1. Composición y diversidad de las comunidades fúngicas. **A)** Composición de la comunidad fúngica a nivel de Phylum, se muestran promedios de abundancia relativa por ELP y tratamiento, donde NG corresponde a campo natural y Fert a suelos fertilizados. **B)** Gráfico de cajas de Alfa diversidad de las comunidades fúngicas expresada como la riqueza de géneros en cada muestra y agrupada por tratamiento de fertilización. **C)** Análisis de Beta diversidad de las comunidades de hongos, se observa un NMDS obtenido a partir de las distancias de Bray-Curtis para la composición de las comunidades microbianas de cada el color de los puntos indica el tratamiento y la forma el ELP. Además, las elipses representan una confianza del 95% en la distribución de los puntos **D)** Gráfico de barras mostrando el cambio relativo en abundancia de géneros con abundancia diferencial (FDR<0.15) donde el color violeta indica géneros en mayor abundancia en suelos fertilizados, mientras que verde indica mayor abundancia en campo natural.

El análisis de beta diversidad, basado en distancias de Bray-Curtis, mostró una agrupación clara de las muestras provenientes de cada ELP. A su vez, dentro de cada grupo se observó una separación menor por tratamientos y también se detectó que los triplicados, que corresponden a muestras que provienen de las mismas parcelas, se encuentran agrupados entre sí. Sin embargo, el análisis de PERMANOVA no arrojó diferencias significativas entre muestras de campo natural y de fertilización. En el caso de las muestras obtenidas del ELP de Tambores (T) se observa una menor dispersión en general entre todos los puntos. Por otra parte, el análisis de abundancia

diferencial evidenció que en el campo natural (NG) se favorecieron géneros de hongos micorrícicos arbusculares como *Paraglomus* (*Glomeromycota*), además de otros endófitos de raíz como *Serendipita*, perteneciente al orden *Sebacinales* (Figura 3.1 D). A su vez, el género saprófito *Clitocybe*, fue uno de los que presentó mayor abundancia en campo natural comparado con suelos fertilizados. Por otro lado, en suelos fertilizados se encontró una abundancia mayor de géneros como *Fusarium*, *Colletotrichum* y *Cordyceps*, asociados a patogenicidad en plantas e insectos respectivamente (Figura 3.1 D). El agrupamiento de géneros fúngicos según sus modos tróficos permitió detectar una sobre-representación de géneros saprótrofos y simbiótrosos obligados en campo natural, mientras que en suelos fertilizados se observó una mayor abundancia de patótrofos facultativos (Figura 3.2).

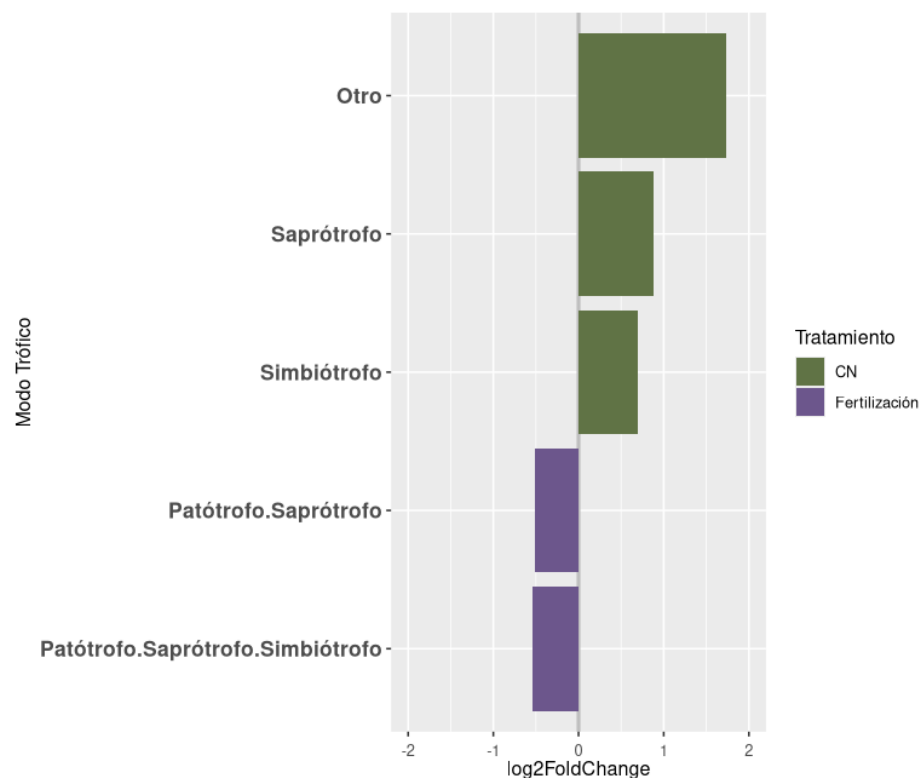


Figura 3.2. Gráfico de barras con el cambio relativo en la abundancia de gremios fúngicos agrupados en modos tróficos utilizando la base de datos FUNGuilds. Las barras violetas muestran mayor abundancia en suelos Fertilizados, mientras que las verdes muestran mayor abundancia en campo natural (FDR<0.25).

3.3.1.2 Análisis de comunidades bacterianas en campo natural fertilizado

A diferencia del análisis de la comunidad fúngica, para los datos de comunidades de bacterias se realizó el análisis de la comunidad *core*. Los resultados indican que varias ASVs con alta prevalencia no se logran clasificar a nivel de género, como es el caso de la familia

Xanthobacteraceae, a la cual se asignaron tres ASVs distintas (Figura 3.3). Además, se encontraron bacterias del género *Bradyrhizobium* con alta prevalencia en estos suelos, y se identificaron otras bacterias con funciones vinculadas a la promoción del crecimiento vegetal, como *Bacillus*, con tres ASVs reportadas que se detectaron en todas las muestras. A su vez, también se detectó que uno de los ASVs con mayor prevalencia pertenece al grupo de los rizobios, específicamente al género *Mesorhizobium*.

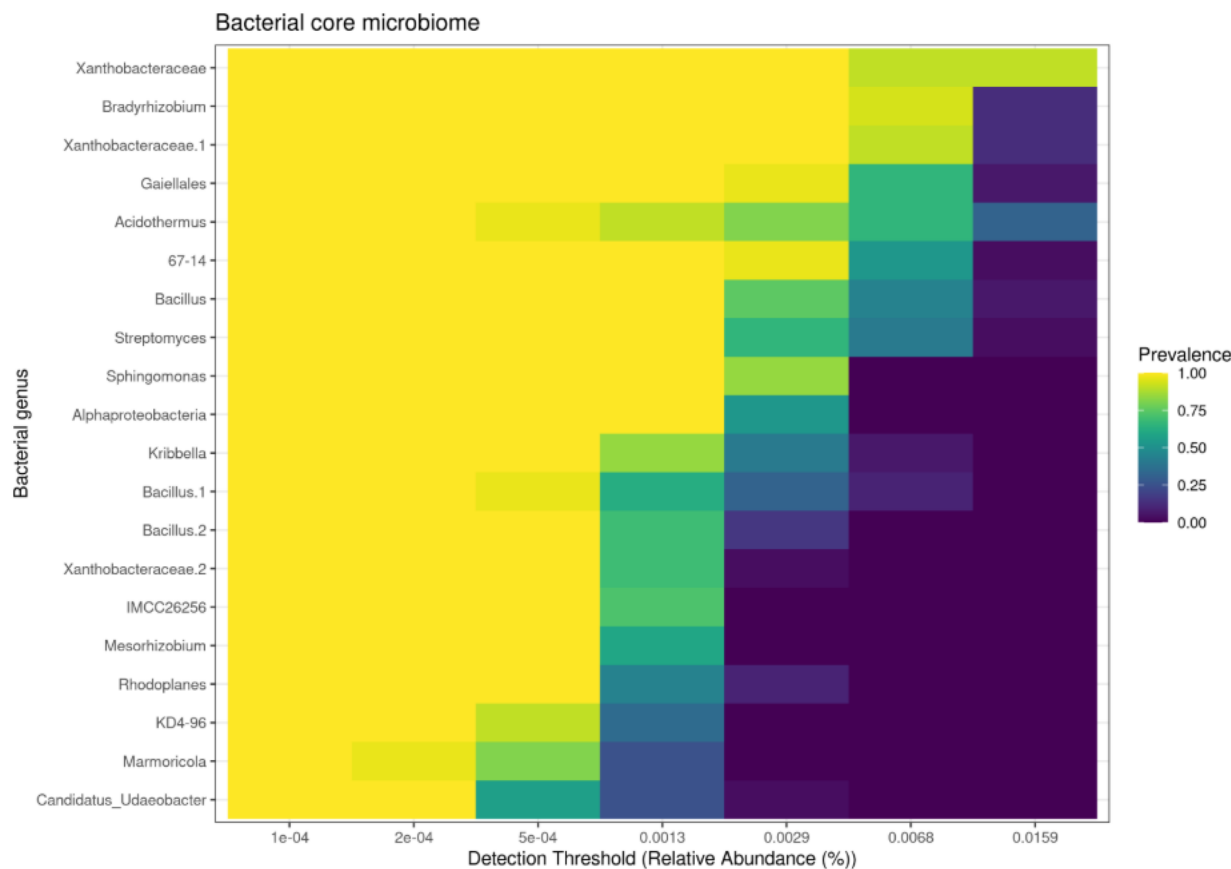
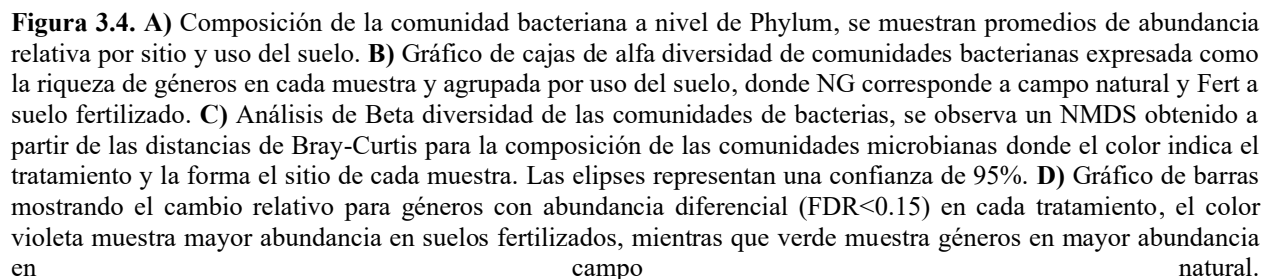


Figura 3.3. Análisis de géneros *core* en las comunidades bacterianas de suelos. El análisis se realizó utilizando datos de todas las muestras fertilizadas y sus controles pareados de campo natural. En el eje de abscisas se muestran diferentes abundancias relativas a las cuales se puede detectar cada taxón, mientras que el color de la celda indica la prevalencia obtenida con cada valor límite de abundancia.

Al analizar la estructura de las comunidades bacterianas presentes en muestras obtenidas en los ELPs de fertilización, se observó que las comunidades de suelo se encontraron dominadas por bacterias del Phylum *Actinobacteriota*, seguidas por el Phylum *Proteobacteria* y *Acidobacteriota* (Figura 3.4 A). La diversidad alfa computada como el número de géneros observados en cada

muestra permitió observar diferencias significativas entre tratamientos ($pval < 0.05$) (Figura 3.4 B). En este caso, se contabilizaron entre 27000 y 29000 secuencias por muestra lo cual podría ser un número de observaciones muy bajo para obtener diferencias en el número de géneros observados. Tanto en el análisis de diversidad alfa como en la visualización de los resultados de beta-diversidad se puede observar un claro agrupamiento por ELP, pero también agrupamientos menores debidos al tratamiento de fertilización. En el caso de las muestras obtenidas del ELP situado en EEMAC encontramos que las muestras correspondientes al Bloque 1 se encuentran distantes respecto al resto de las muestras (Figura 3.4 C). Esto se debe a que al filtrar las muestras por prevalencia de géneros (géneros presentes en al menos el 10% de las muestras) se perdieron géneros que se encuentran presentes de manera consistente, pero únicamente, en este bloque-sitio-tratamiento (Bloque1-EEMAC-Fertilización), este efecto generó una disminución de la riqueza de géneros como una medida de la diversidad alfa (Figura 3.4 A) y aumentó la dispersión de estas repeticiones visualizadas en el análisis NMDS (Figura 3.4 B). Nuevamente, en el análisis de PERMANOVA no se detectó un cambio significativo en la estructura de comunidades microbianas provenientes de campo natural y de campo natural fertilizado (Figura 3.4 C).



65

fósforo se observó un aumento de los géneros *Nitrospira* y *Rubrivivax*, los cuales están asociados a la oxidación de amonio y a procesos de desnitrificación. Otro de los taxones favorecidos en suelos fertilizados fue clasificado como *Planctomycetes*.

3.3.1.3 Análisis de redes de correlación a partir de datos de microbioma en campo natural fertilizado

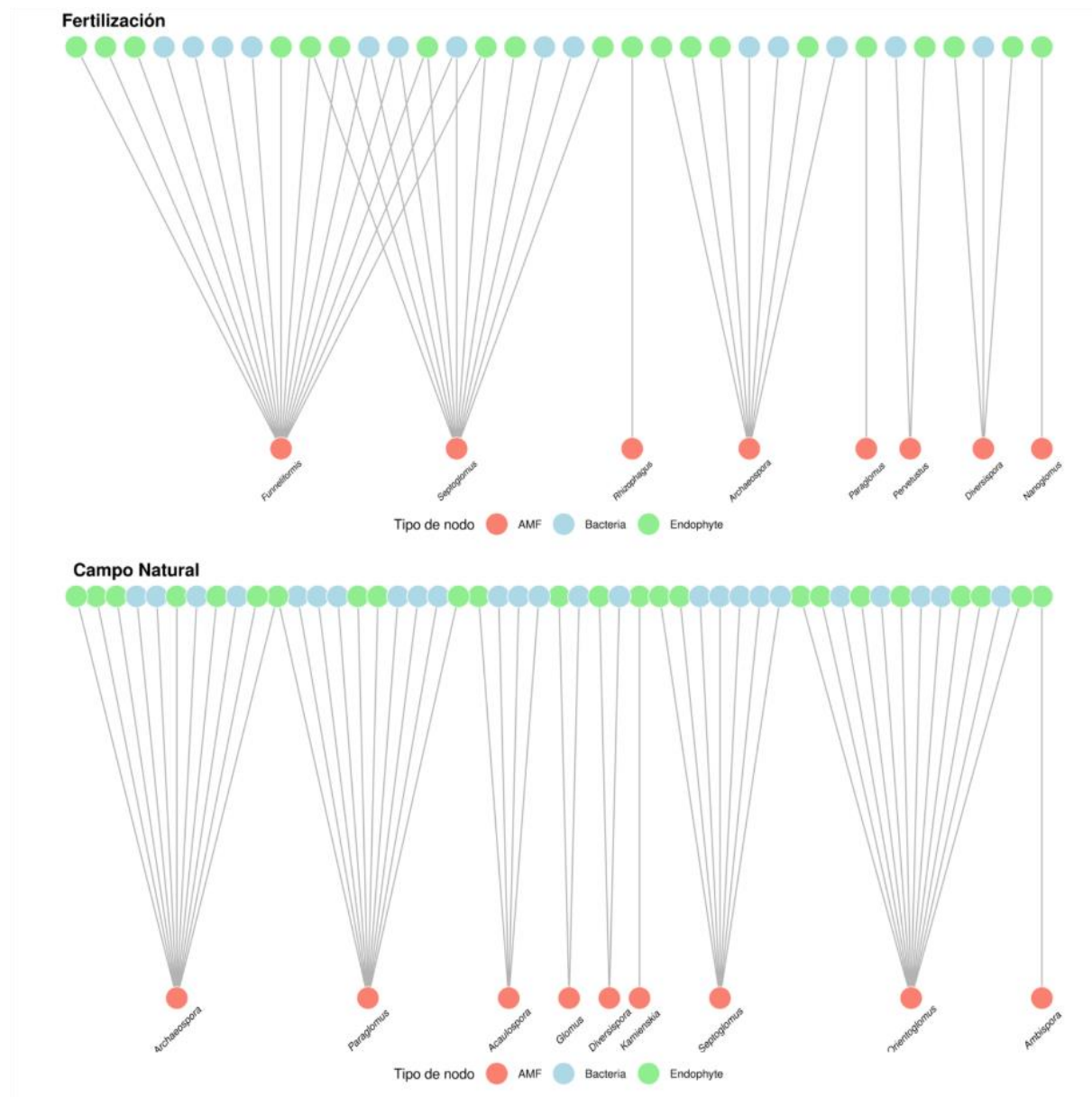


Figura 3.5. Red bipartita de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y bacterias correlacionadas ($S > 0.75$, $\text{adj-}p < 0.05$) en las muestras obtenidas del tratamiento de Fertilización y de Campo Natural. Los nodos que representan HMAs se muestran en rojo en el inferior de la red, mientras que los nodos bacterianos se disponen en la parte superior,

aquellas bacterias asociadas al suelo se muestran en color celeste y los géneros que presentan reportes de endofitismo se muestran en color verde claro.

El análisis de redes de correlación de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y bacterias detectó una pérdida de correlación de la abundancia de géneros bacterianos asociados a HMAs. Al considerar solo los datos obtenidos de tratamientos de fertilización de los diferentes ELPs se logró reconstruir una red con un total de 42 nodos, unidos por 41 aristas, a su vez el paso medio de esta red fue de 2.14 y su modularidad de 0.58 (Figura 3.5). Dentro de los nodos detectados, ocho correspondieron a géneros de HMAs, entre los cuales destacan *Funneliformis*, *Septoglomus* y *Archaeospora*, los cuales correlacionan de manera significativa con 13, 8 y 7 géneros bacterianos respectivamente. A su vez, 24 nodos bacterianos en esta red tienen reportes de establecimiento como endófitos vegetales, esto constituyó el 58,5% de los nodos de la red. Dentro de estos, destacan los nodos clasificados como *Steroidobacter*, *Agromyces*, PLTA13, *Sutterellaceae*, *Steroidobacteraceae* y 67-14 los cuales correlacionaron tanto con el género *Septoglomus* como *Funneliformis*, por lo cual el valor de grado de estos nodos es 2 y actúan como nodos conectores entre ambos géneros de HMA (Figura 3.5).

Por otra parte, al evaluar la red de correlación de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y bacterias, generada con los mismos criterios para las muestras de campo natural (sin fertilización) se obtuvieron 58 nodos conectados por 50 aristas, lo cual generó una red bipartita con un paso medio de 2.42 y una modularidad de 0.8. Nueve de los nodos que componen la red corresponden a géneros de hongos micorrícicos. Dentro de estos, destacan los géneros *Paraglomus*, *Archaeospora*, *Orientoglomus* y *Septoglomus* los cuales correlacionan con 11, 11, 10 y 7 géneros bacterianos respectivamente. A su vez, veinticinco nodos bacterianos tienen reportes de establecimiento endofítico, algunos de estos géneros han sido muy estudiados, como *Bacillus*, el cual correlaciona con el género de HMA *Archaeospora*. Además, nuevamente el nodo clasificado dentro del orden *Solirubrobacterales* destaca por su rol de conector dentro de la red, ya que correlaciona con los géneros de HMAs *Paraglomus* y *Archaeospora*.

3.3.2 Sobresiembra de leguminosas y adición de fósforo

3.3.2.1 Comunidades fúngicas de suelo luego de la sobresiembra de leguminosas y adición de fósforo

El análisis de la composición de las comunidades fúngicas de suelos en ELPs de sobresiembra de leguminosas y adición de fósforo de campo natural reveló que el Phylum *Ascomycota* predominó en todas las muestras, seguido por *Mortierellomycota* y *Basidiomycota*. Estos grupos fúngicos fueron consistentes en ambos tratamientos (campo natural y mejoramiento), sugiriendo una estructura de comunidades fúngicas que se mantiene a nivel de Phylum independientemente de la adición de leguminosas y fósforo. En cuanto a la diversidad alfa, el análisis de géneros fúngicos observados indicó que no hubo diferencias significativas en la riqueza de géneros entre los usos del suelo analizados. Este resultado sugiere que la sobre siembra de leguminosas y la fertilización con fósforo no alteraron significativamente la riqueza de géneros fúngicos en los sitios estudiados, donde los géneros observados oscilaron entre 370 y 700 por muestra. A su vez, las muestras provenientes de EEMAC tuvieron mayor riqueza de géneros en ambos usos del suelo.

Por otro lado, el análisis de diversidad beta mostró una clara agrupación de las muestras por sitio, evidenciando que las condiciones locales del suelo tienen un impacto determinante en la estructura del microbioma fúngico (Figura 3.6 C). Este patrón de agrupamiento de las comunidades fúngicas sugiere que, aunque los tratamientos pueden alterar la composición microbiana del suelo, las condiciones intrínsecas del suelo y las variables locales tienen un papel crucial en la estructuración de estas comunidades. En este análisis también se observa que las muestras provenientes de BM muestran las menores diferencia en identidad entre tratamientos, y que las del SUL son las que tienen mayor separación entre tratamientos. En estas últimas, las diferencias pueden deberse a la aplicación de riego suplementario en las parcelas del tratamiento de mejoramiento con leguminosas y adición de fósforo. De hecho, las muestras de campo natural de SUL se dispusieron más cercanas a las muestras del ELP de Banco Mundial (INIA Treinta y Tres) que a las provenientes del tratamiento de mejoramiento en el mismo ELP (Figura 3.6 C).

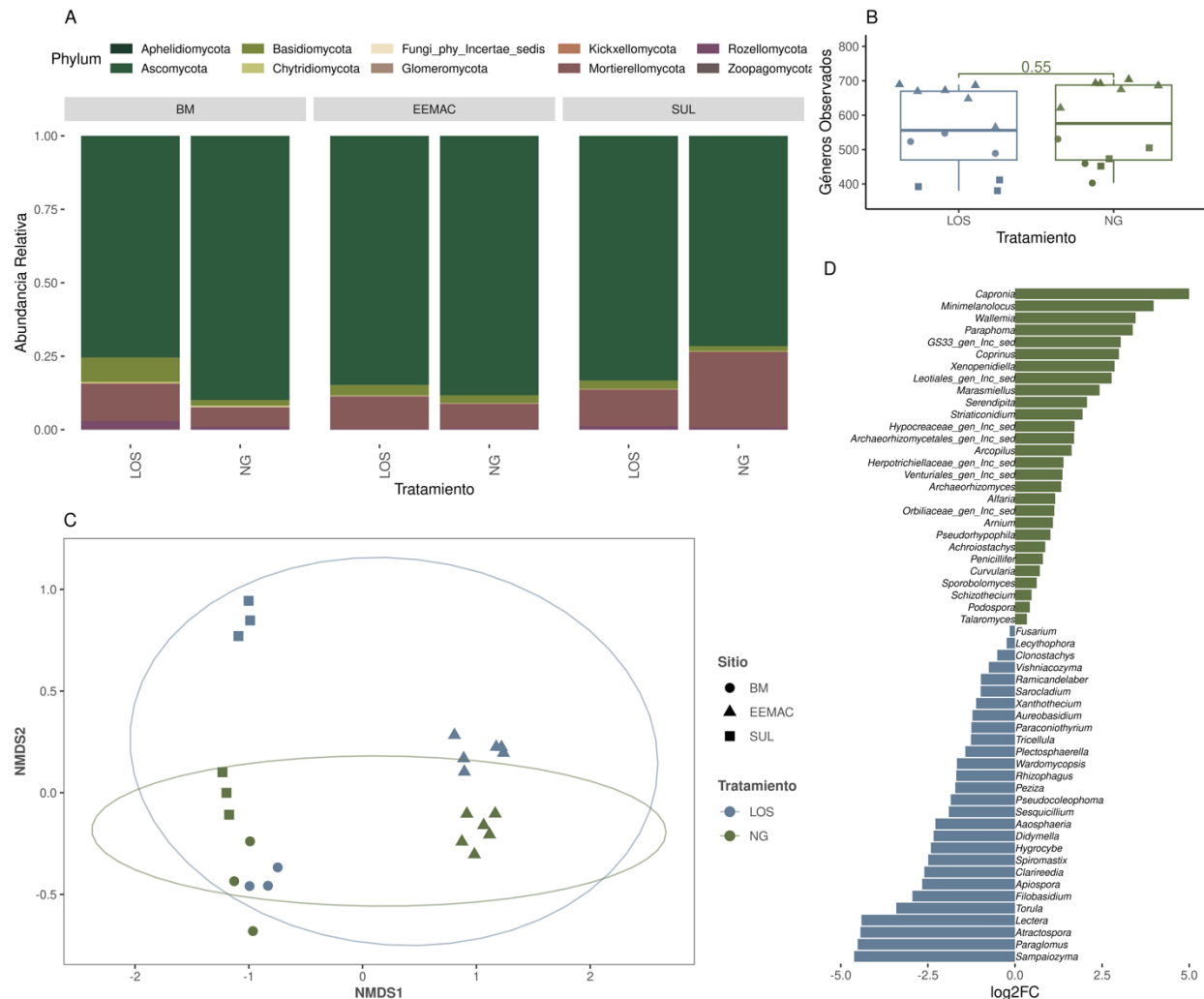


Figura 3.6. **A)** Composición de la comunidad fúngica a nivel de Phylum, se muestran promedios de abundancia relativa por sitio y uso del suelo. **B)** Gráfico de cajas de Alfa diversidad de comunidades fúngicas expresada como la riqueza de géneros en cada muestra y agrupada por uso del suelo, donde NG corresponde a campo natural y LOS a sobresiembra de leguminosas y adición de P. **C)** Análisis de Beta diversidad de las comunidades de hongos, se observa un NMDS obtenido a partir de las distancias de Bray-Curtis para la composición de las comunidades microbianas de cada el color indica el tratamiento y la forma el sitio de cada muestra. **D)** Gráfico de barras mostrando el cambio relativo para géneros con abundancia diferencial ($FDR < 0.15$) en cada tratamiento.

Al analizar los géneros con abundancia diferencial en estos usos de la tierra, encontramos que el campo natural mostró una mayor abundancia de géneros asociados a plantas, especialmente endosimbiontes de raíz, como *Serendipita* y *Archaeorhizomyces*. En el caso del tratamiento con sobresiembra de leguminosas, se detectaron géneros como *Fusarium*, *Sarocladium* y *Didymella*, que contienen especies patógenas de plantas, así como *Lectera*, la cual fue recientemente asociada a patogenicidad en leguminosas (Figura 3.6 D). También se identificó una mayor abundancia de géneros de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) en este tratamiento como *Paraglomus* y

Rhizophagus, que pueden promover el crecimiento de plantas al mejorar la eficiencia de uso de fósforo y la absorción de nutrientes del suelo.

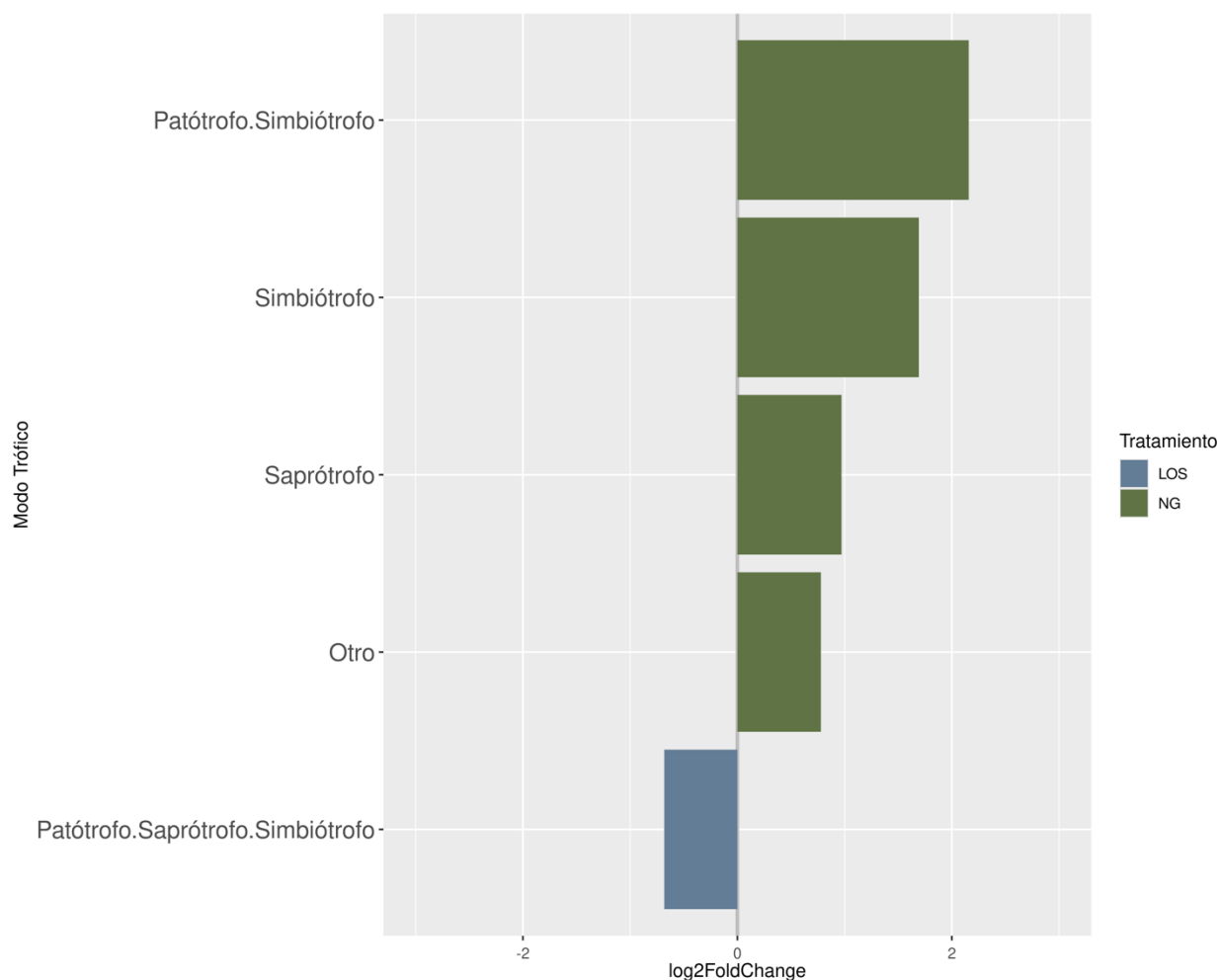


Figura 3.7. Gráfico de barras mostrando el cambio relativo en la abundancia de gremios fúngicos agrupados en modos tróficos utilizando la base de datos FUNGuilds. Las barras azules representan modos tróficos con mayor abundancia en suelos de campo natural con sobresiembra de leguminosas y adición de fósforo, mientras que las verdes muestran mayor abundancia en campo natural (FDR<0.25).

Al analizar el agrupamiento de géneros fúngicos según su modo trófico, se pudo observar que existe un cambio en la abundancia relativa de géneros simbiótrofos, donde se detectó una mayor abundancia en el tratamiento de campo natural. Es interesante observar que este resultado parece ser contrario a la observación de la Figura 3.6, donde algunos géneros simbiótrofos obligados tuvieron mayor abundancia en el tratamiento de sobresiembra de leguminosas y adición de fósforo, es el caso de los géneros de HMAs mencionados anteriormente. Sin embargo, otros géneros pertenecientes al mismo modo trófico, como *Serendipita* y *Archaeorhizomyces*, se encuentran en

mayor abundancia en CN. Por otro lado, también se detectó una mayor abundancia de hongos saprótrofos en suelos de campo natural.

3.3.2.2 Comunidades bacterianas de suelo luego de la sobresiembra de leguminosas y adición de fósforo

Por otra parte, el análisis de la comunidad bacteriana *core* reveló la presencia de 19 ASVs compartidas en las 24 muestras colectadas, estas incluyeron géneros bacterianos comúnmente presentes en muestras de campo natural. Entre ellas, se detectó nuevamente una alta prevalencia del género *Bradyrhizobium*, un género conocido por la capacidad de fijar nitrógeno en asociación con leguminosas. También se encontraron diferentes ASVs pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Candidatus Udaeobacter*, estos tienen descriptos roles importantes en la interacción con plantas y en la dinámica de nutrientes en el suelo respectivamente (Figura 3.8).

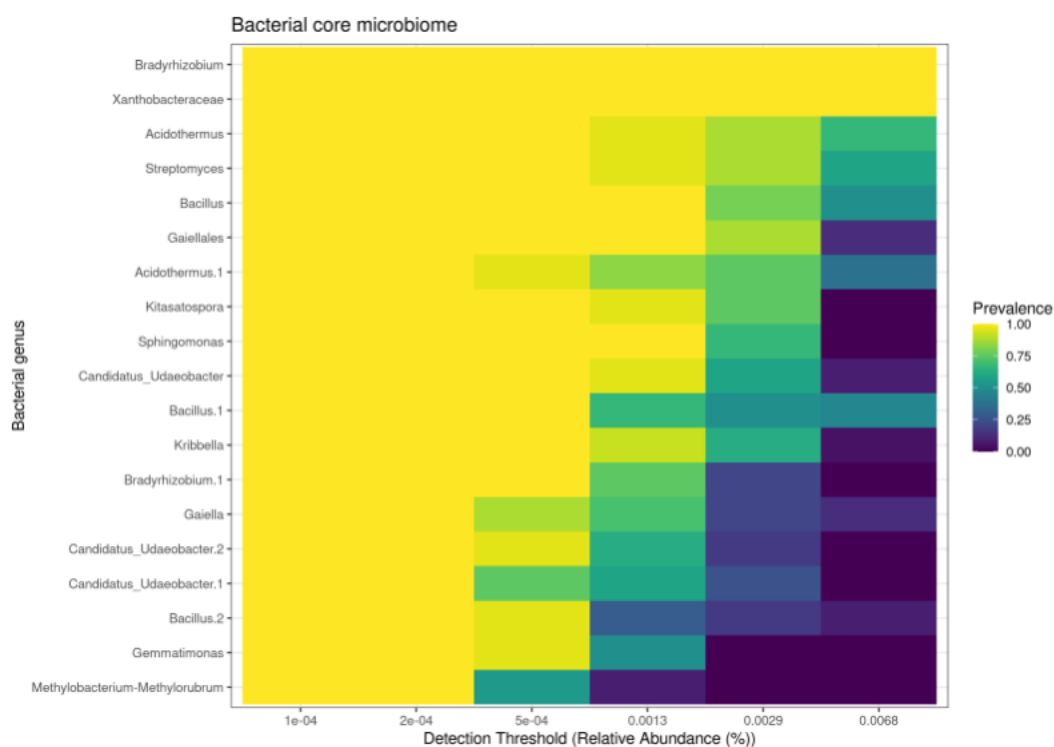


Figura 3.8. Análisis de géneros *core* en las comunidades bacterianas de suelos. El análisis se realizó utilizando datos de todas las muestras pareadas de mejoramiento de campo natural. En el eje de abscisas se muestran diferentes abundancias relativas a las cuales se puede detectar cada taxón, mientras que el color de la celda indica la prevalencia obtenida con cada valor límite de abundancia.

A nivel de Phylum, en este conjunto de datos se observó una mayor proporción de *Actinobacteriota*, seguido por *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Acidobacteria* (Figura 3.9). Al evaluar la diversidad alfa

de las distintas comunidades bacterianas no se detectaron diferencias significativas en la riqueza de géneros bacterianos entre los tratamientos de campo natural y sobresiembra de leguminosas fertilizadas con fósforo, se observaron entre 700 y 900 géneros por muestra. En cuanto a la diversidad beta, el ordenamiento por NMDS mostró una tendencia al agrupamiento de muestras provenientes de cada ELP, con las muestras de EEMAC claramente separadas de las de SUL y BM, y una mayor dispersión de muestras provenientes del ELP de SUL, lo cual podría estar vinculado a variables no estandarizadas entre tratamientos como puede ser el riego, el cual se encuentra implementado únicamente en el tratamiento de mejoramiento de campo natural. A su vez, en las muestras obtenidas de EEMAC se observa un efecto de bloques muy leve donde las muestras del campo natural mejorado se encuentran más cerca de las muestras de campo natural de su propio bloque que de las muestras del otro bloque y mismo tratamiento. Es interesante destacar que, dada la disposición de las muestras en el espacio bidimensional, las comunidades de campo natural parecen tener una composición más homogénea que aquellas obtenidas de suelos con sobre siembra de leguminosas y adición de fósforo.

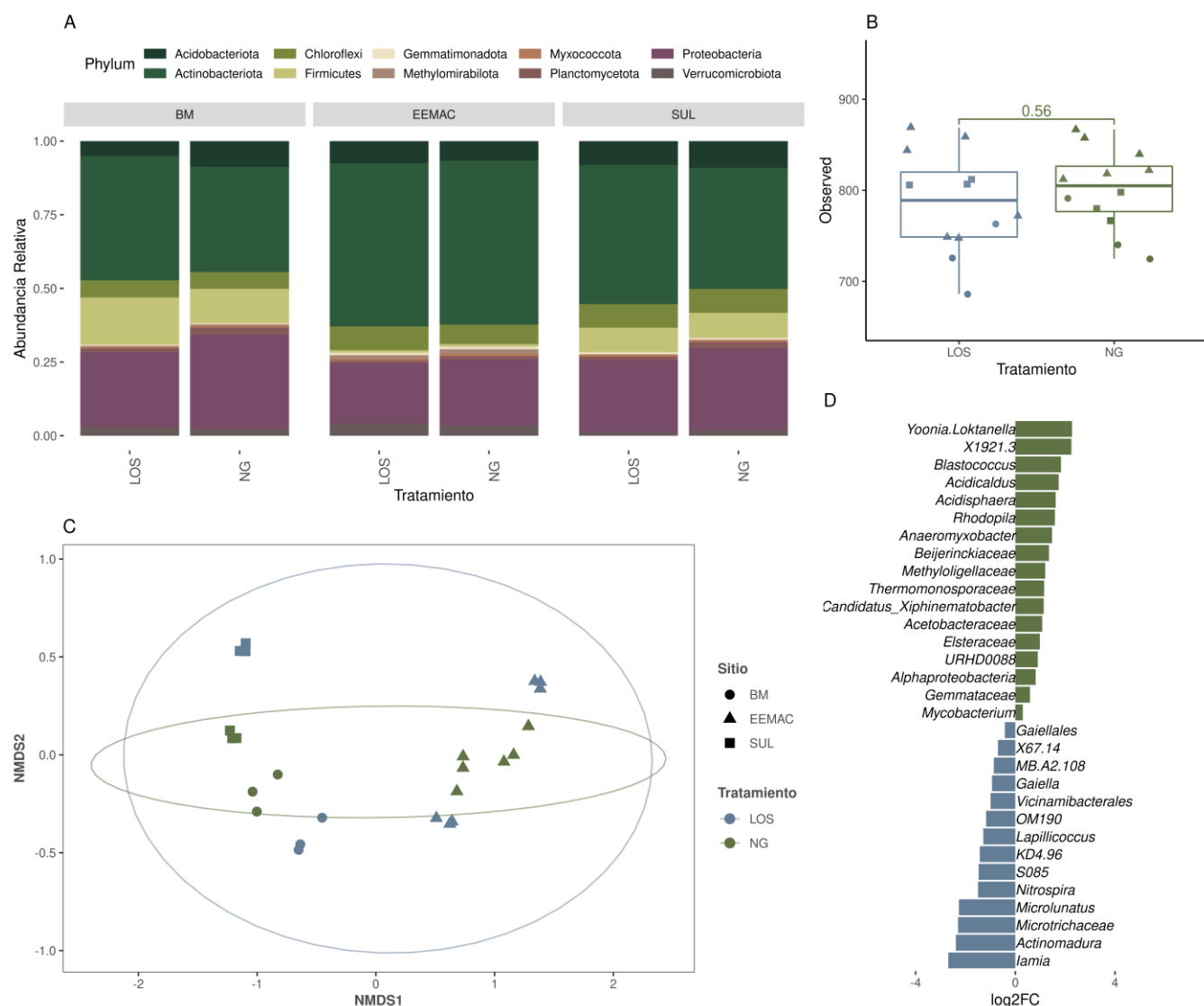


Figura 3.9. **A)** Composición de la comunidad bacteriana a nivel de Phylum, se muestran promedios de abundancia relativa por sitio y uso del suelo. **B)** Gráfico de cajas de Alfa diversidad de comunidades bacterianas expresada como la riqueza de géneros en cada muestra y agrupada por uso del suelo, donde NG corresponde a campo natural y LOS a sobresiembra de leguminosas y adición de P. **C)** Análisis de Beta diversidad de las comunidades de bacterias, se observa un NMDS obtenido a partir de las distancias de Bray-Curtis para la composición de las comunidades microbianas de cada el color indica el tratamiento y la forma el sitio de cada muestra. **D)** Gráfico de barras mostrando el cambio relativo para géneros con abundancia diferencial (FDR<0.15) en cada tratamiento.

Al analizar los resultados de abundancia diferencial de géneros bacterianos observamos que 17 ASVs mostraron una abundancia mayor en los suelos de campo natural, dentro de estos se encontraron ASVs pertenecientes a *Methyloiligellaceae*, *Beijerinckiaceae* y *Anaeromixobacter*, los cuales tienen capacidades metabólicas vinculadas al ciclado de nutrientes. Por otro lado, en el campo natural mejorado se observó una mayor abundancia relativa de 14 géneros, los cuales

incluyeron algunos géneros que cumplen procesos en el ciclo de Nitrógeno, como *Nitrospira*, y otros vinculados a la acumulación de fósforo, como *Microtrichaceae* y *Microthricum*.

3.3.2.3 Análisis de redes de correlación a partir de datos de microbioma de suelo luego de la sobresiembra de leguminosas y adición de fósforo

A partir de los datos de microbioma obtenidos de estos ELPs, que evalúan el efecto de la sobresiembra de leguminosas y adición de fósforo, se construyeron redes de correlación, en particular se buscó determinar qué géneros bacterianos se encuentran asociados a géneros HMA correlacionando en su abundancia a través de las diferentes muestras obtenidas para estos ELPs. La red bipartita generada a partir de los datos de campo natural contó con un total de 152 nodos y 200 aristas, con un diámetro de 8 y un paso medio de 2.93, lo cual da cuenta de la estructura compleja de esta red. Para este tratamiento se lograron detectar 11 géneros pertenecientes a HMAs dentro de los cuales se destacan *Rhizophagus*, *Nanoglomus*, *Archaeospora* y *Kamienskia* como los nodos con mayor grado dentro de la red (Figura 3.10).

A su vez, dentro los géneros bacterianos que correlacionaron significativamente con hongos micorrízicos detectamos algunos clasificados como *Azospirillales*, *Azohydromonas* y *Mesorhizobium*, los cuales son conocidos por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. Al analizar otras características de los géneros bacterianos correlacionados con HMAs, detectamos que un 56% de estos géneros han sido reportados como endófitos de plantas, esto se encuentra descrito en mayor detalle en la Tabla Suplementaria S3 (ver Anexos). Además, se puede observar que 53 nodos bacterianos tienen un grado mayor a uno en esta red, por lo cual correlacionan con más de un nodo HMA, aumentando la conectividad de la red generada a partir de los datos de campo natural. Dentro de estos nodos se encuentran géneros estudiados por su capacidad de mejorar el crecimiento vegetal como *Azohydromonas* y *Mesorhizobium*.

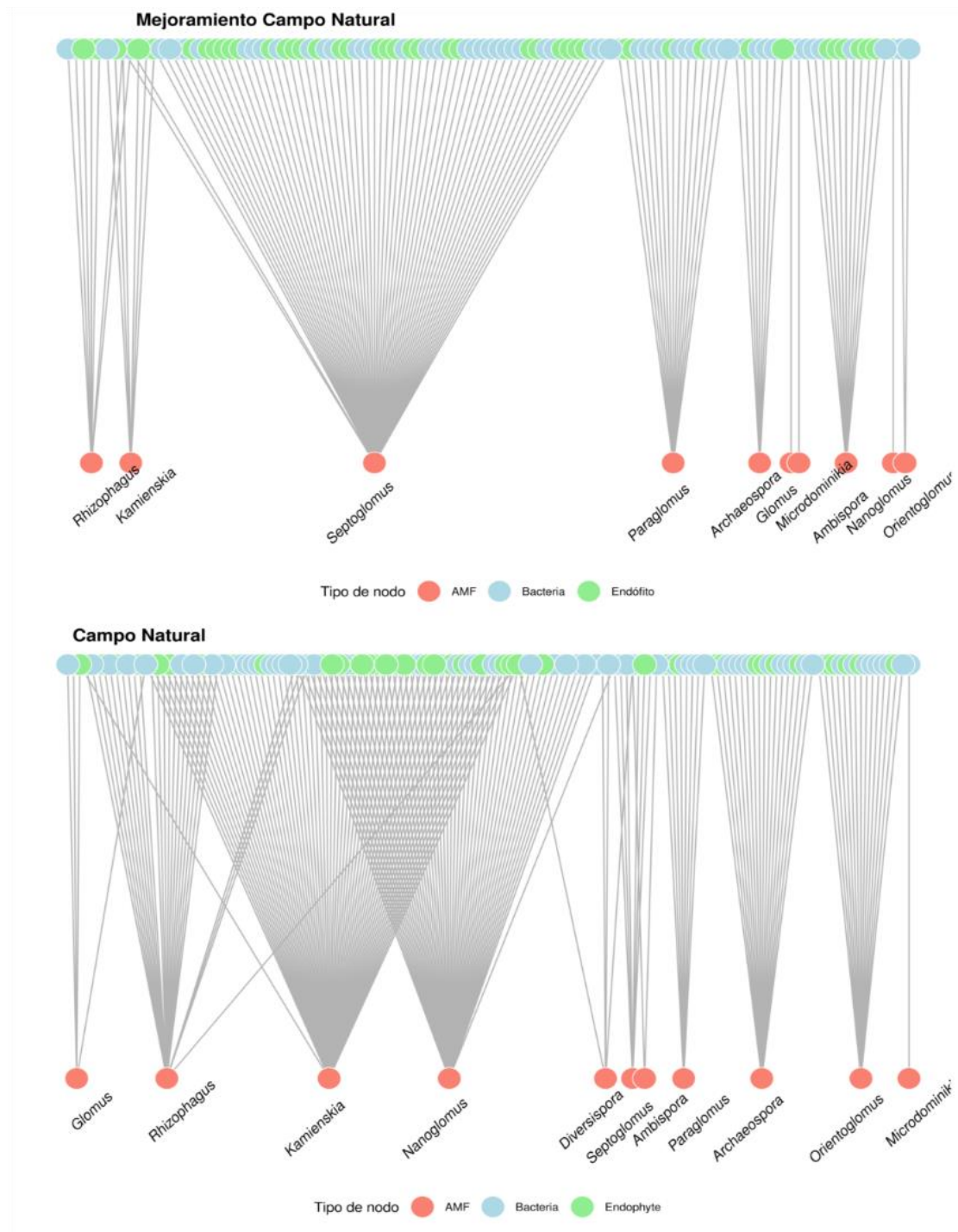


Figura 3.10. Redes bipartitas de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y bacterias correlacionadas en las muestras obtenidas del tratamiento de sobresiembra de leguminosas y adición de fósforo en el campo natural y de campo natural. Los nodos HMA se muestran en rojo, los nodos bacterianos en azul y los nodos de géneros endófitos en color verde claro.

Por otra parte, al observar la red generada utilizando datos de microbioma de suelos bajo mejoramiento de campo natural, por sobresiembra de leguminosas y adición de fósforo, se detectó que la complejidad estructural de la red es menor que la obtenida para campo natural (Figura 3.10). La red generada cuenta con 118 nodos unidos a través de 112 aristas, tiene un diámetro de 4 y un paso medio de 2.39. Dentro de los nodos pertenecientes a HMAs se destacaron los géneros *Septoglomus*, *Paraglomus* y *Ambispora*, los cuales se encuentran unidos con 61, 15 y 11 nodos bacterianos respectivamente. A pesar de que existe cierta similitud estructural entre las redes generadas para ambos tratamientos, detectamos que únicamente se mantuvieron 6 conexiones entre nodos bacterianos y de HMAs, lo cual sugiere un importante cambio en la identidad y funcionalidad de estas asociaciones simbióticas. En el caso de la red de sobresiembra de leguminosas y adición de fósforo 38% de los géneros bacterianos tuvieron algún reporte como endófito de plantas, un número sensiblemente menor comparado a la red generada con datos de campo natural.

3.3.3 Implantación de pasturas perennes

3.3.3.1 Comunidades Fúngicas del suelo luego de la implantación de pasturas perennes

Al analizar el microbioma de las muestras obtenidas de ELPs que incluyeron sustitución de campo natural por pasturas perennes se logró observar que la composición de las comunidades fúngicas se encuentra dominada por el Phylum *Ascomycota*, seguida por *Mortierellomycota* los cuales son comúnmente encontrados en suelos (Figura 3.11). Dentro de estos Phylum los géneros con mayor prevalencia, obtenidos a partir del análisis de microbioma *core*, fueron *Fusarium*, *Purpureocillium*, *Alternaria* y *Clonostachys*. La estructura observada de las comunidades fúngicas, a nivel de Phylum, se mantuvo consistente entre los diferentes sitios y tratamientos. Por su parte, las medidas de diversidad alfa mostraron diferencias significativas entre tratamientos, se observó que las muestras obtenidas de pasturas en Glencoe mostraron una riqueza de géneros menor en comparación con otras muestras. Este efecto, consistente para todas las muestras tomadas del mismo sitio y tratamiento, podría estar dado por variables no atribuidas a la implantación de pasturas, dado que esta parcela no pertenece a un ELP, por lo cual tiene algunas variables no estandarizadas respecto a su control de campo natural, como puede ser la intensidad de pastoreo.

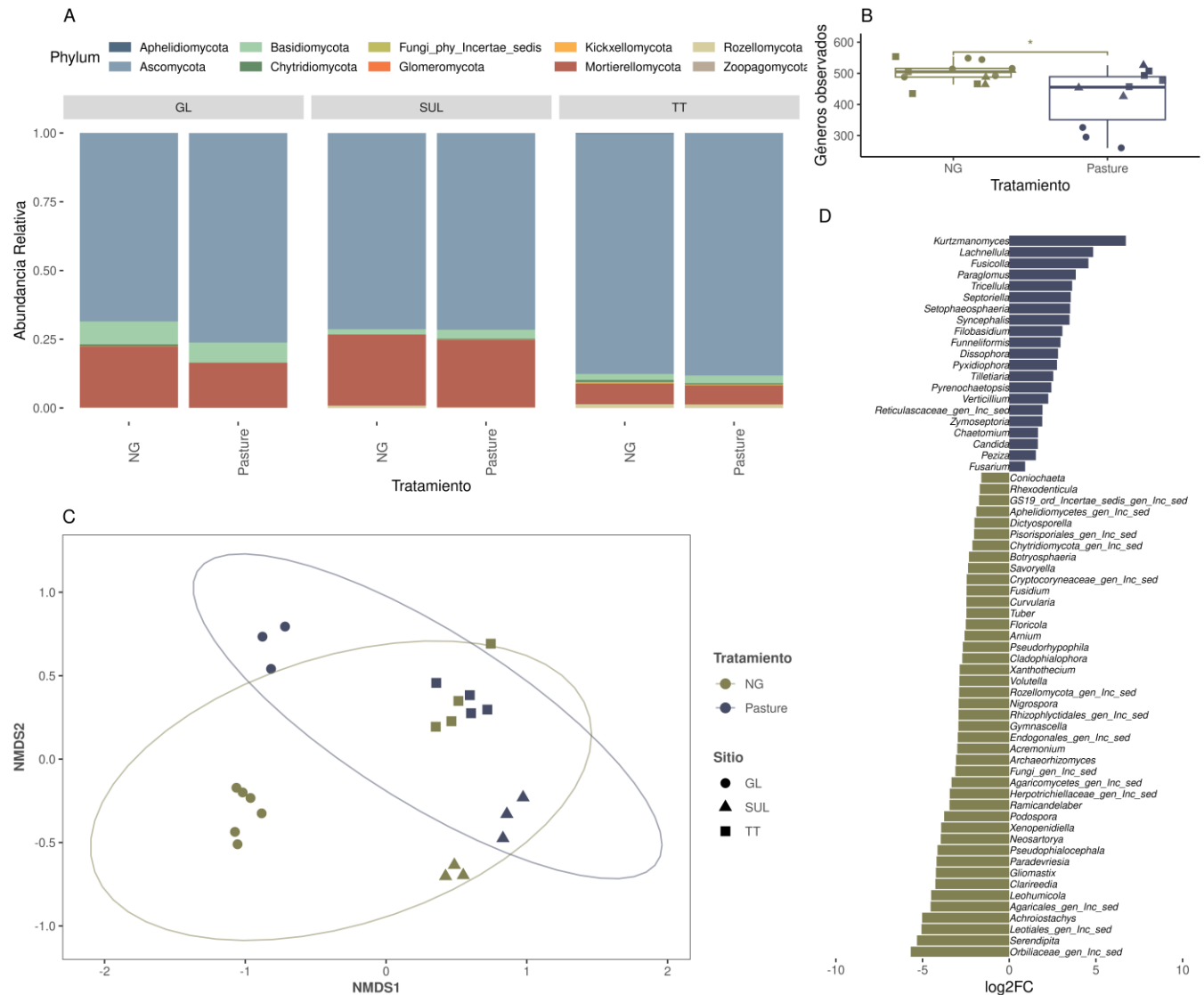


Figura 3.11. A) Composición de la comunidad fúngica a nivel de Phylum, se muestran promedios de abundancia relativa por sitio y uso del suelo. **B)** Gráfico de cajas de Alfa diversidad de comunidades fúngicas expresada como la riqueza de géneros en cada muestra y agrupada por usos del suelo evaluados, donde NG corresponde a campo natural y Pasture a pasturas perennes. **C)** Análisis de Beta diversidad de las comunidades de hongos, se observa un NMDS obtenido a partir de las distancias de Bray-Curtis para la composición de las comunidades fúngicas de cada el color indica el tratamiento y la forma el sitio de cada muestra. **D)** Gráfico de barras mostrando el cambio relativo para géneros con abundancia diferencial (FDR<0.15) en cada tratamiento.

En el análisis de diversidad beta, se observaron agrupamientos en los ELPs de INIA Treinta y Tres y SUL, con una menor influencia del uso del suelo. En Glencoe, sin embargo, las muestras de pasturas se distanciaron de las de campo natural, lo que también sugiere una diferencia estructural significativa entre estos tratamientos y que puede vincularse con los cambios observados en alfa diversidad.

Al comparar la abundancia diferencial de géneros, se evidenció que en el campo natural más de 40 géneros fúngicos tuvieron una abundancia relativa mayor comparado a las muestras obtenidas de pasturas perennes (Figura 3.11 D). Dentro de estos, destacaron los géneros *Serendipita*, *Tuber* y *Archaeorhizomyces* los cuales se asocian a hospederos vegetales y podrían ser afectados por cambios en la cobertura vegetal del suelo. En las pasturas fertilizadas, se detectaron abundancias relativas menores de estos géneros, con una disminución particularmente notable del género *Serendipita*. Además, las comunidades fúngicas secuenciadas a partir de suelos con cobertura de pasturas perennes presentaron una mayor abundancia de algunos hongos micorrícicos arbusculares como *Funneliformis* y *Paraglomus*. Estos hongos simbióticos han sido asociados a la mejora en la eficiencia de uso de fósforo y en la adaptación a estrés abiótico por parte de sus hospederos vegetales. Al analizar el agrupamiento de géneros fúngicos en modos tróficos, se observó una mayor abundancia de simbióticos facultativos en el tratamiento de campo natural, ejemplos de este tipo de hongos son los géneros *Serendipita* y *Archaeorhizomyces* nombrados anteriormente (Figura 3.12).

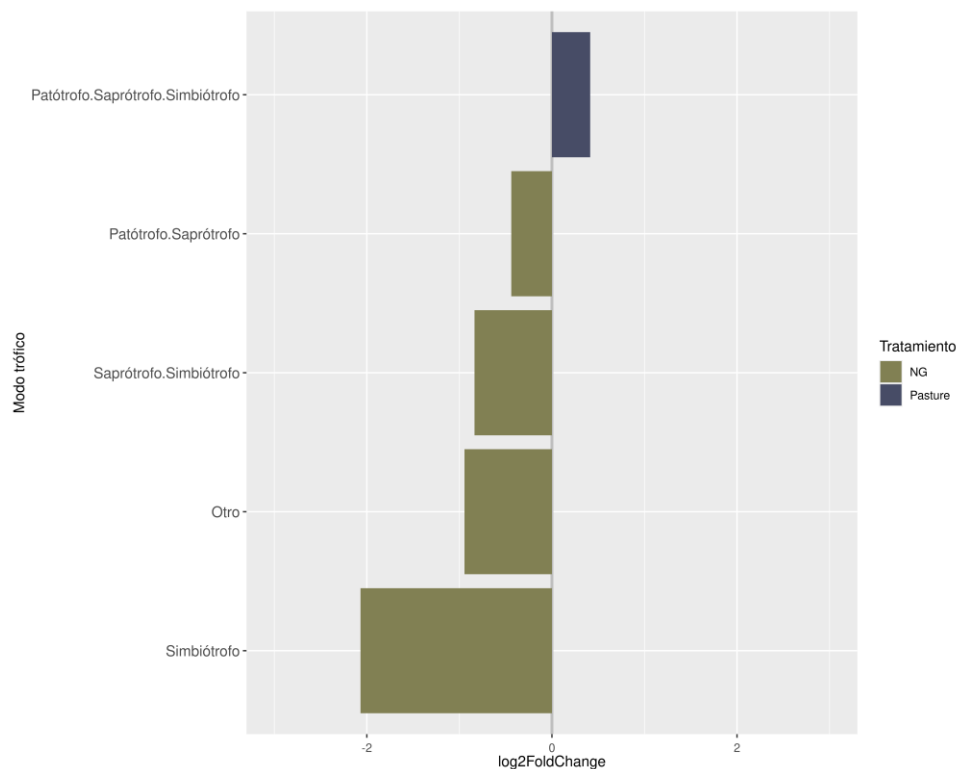


Figura 3.12. Gráfico de barras con el cambio relativo en la abundancia de gremios fúngicos agrupados en modos tróficos utilizando la base de datos FUNGuilds. Las barras azules muestran mayor abundancia en suelos de pasturas sembradas, mientras que las verdes muestran mayor abundancia en campo natural (FDR<0.25).

3.3.3.2 Comunidades Bacterianas del suelo luego de la implantación de pasturas perennes

El análisis de bacterioma *core* de los ELPs que se utilizaron para evaluar los cambios generados por la implantación de pasturas perennes mostró 30 ASVs presentes en todas las muestras, incluyendo tres del género *Bacillus*, así como ASVs pertenecientes a los géneros *Bradyrhizobium* y *Acidothermus* (Figura 3.13). Los géneros que aparecen con mayor prevalencia se repiten también en otros sitios y tratamientos analizados.

En el análisis de composición de comunidades bacterianas, se encontró que los Phylum dominantes son *Actinobacteriota*, seguidos de *Proteobacteria* y *Firmicutes*. La mayor variación entre tratamientos fue la disminución de *Proteobacteria* en las pasturas de Glencoe, aunque no se detectaron cambios significativos en la diversidad alfa, con valores de riqueza que oscilaron entre 700 y 900 géneros por muestra (Figura 3.14 B).

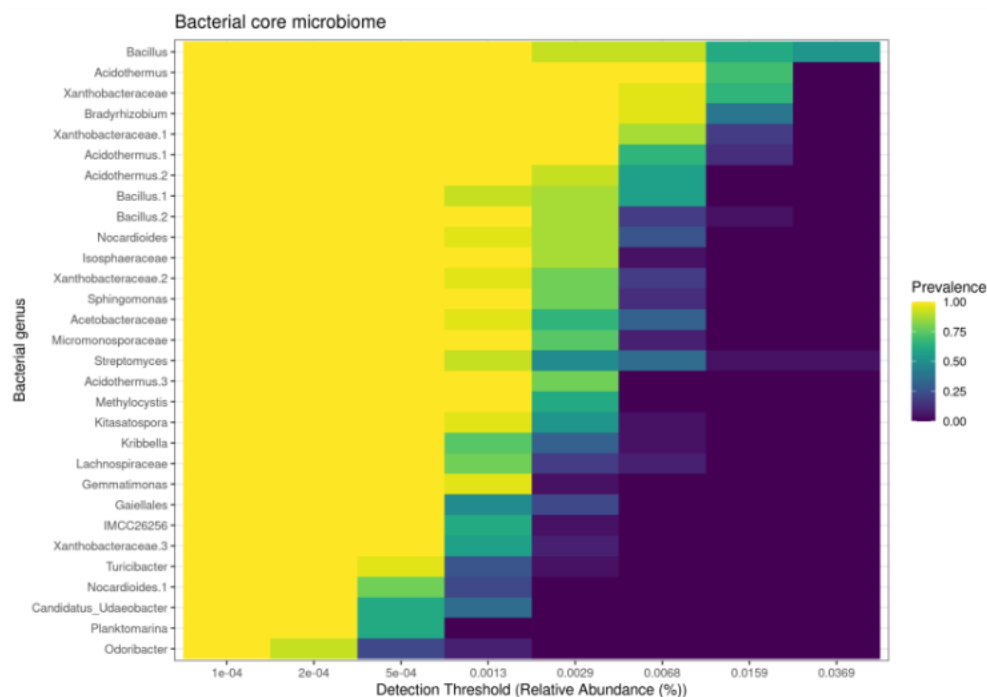


Figura 3.13. Análisis de géneros *core* en las comunidades bacterianas de suelos. El análisis se realizó utilizando datos de todas las muestras. En el eje de abscisas se muestran diferentes abundancias relativas a las cuales se puede detectar cada taxón, mientras que el color de la celda indica la prevalencia obtenida con cada valor límite de abundancia.

En el panel C de la Figura 3.14 se observa el análisis de la diversidad beta a través de un NMDS, el cual mostró agrupamientos de las muestras por ELP. A su vez, las muestras obtenidas del ELP establecido en INIA Treinta y tres (TT) mostraron una mayor dispersión que las muestras obtenidas de los otros ELPs. Por otra parte, las muestras provenientes de suelos con pasturas implantadas se encuentran más cercanas entre sí que las de campo natural. Este efecto podría estar vinculado a la implantación de pasturas lo cual podría generar una homogeneización de las comunidades microbianas. En muestras obtenidas de campo natural, los géneros *Dokdonella*, *Pseudoarthrobacter* y algunos miembros del Phylum *Actinobacteriota* como *Nakamurella*, *Terrabacter*, *Kribbella* y *Lamia* presentaron una mayor abundancia relativa. En las pasturas, se detectó una mayor abundancia de géneros degradadores de compuestos orgánicos complejos como *Alistipes*, *Dactylosporangium*, y ASVs correspondientes a familias como *Pseudonocardiaceae*. La presencia de *Methyloligellaceae*, *Thermoleophilaceae*, y otros géneros anaerobios como *Anaeroplasma* y *Desulfobacterota* sugiere una posible actividad de metilotrofia y ciclo activo de nutrientes bajo condiciones de anoxia.

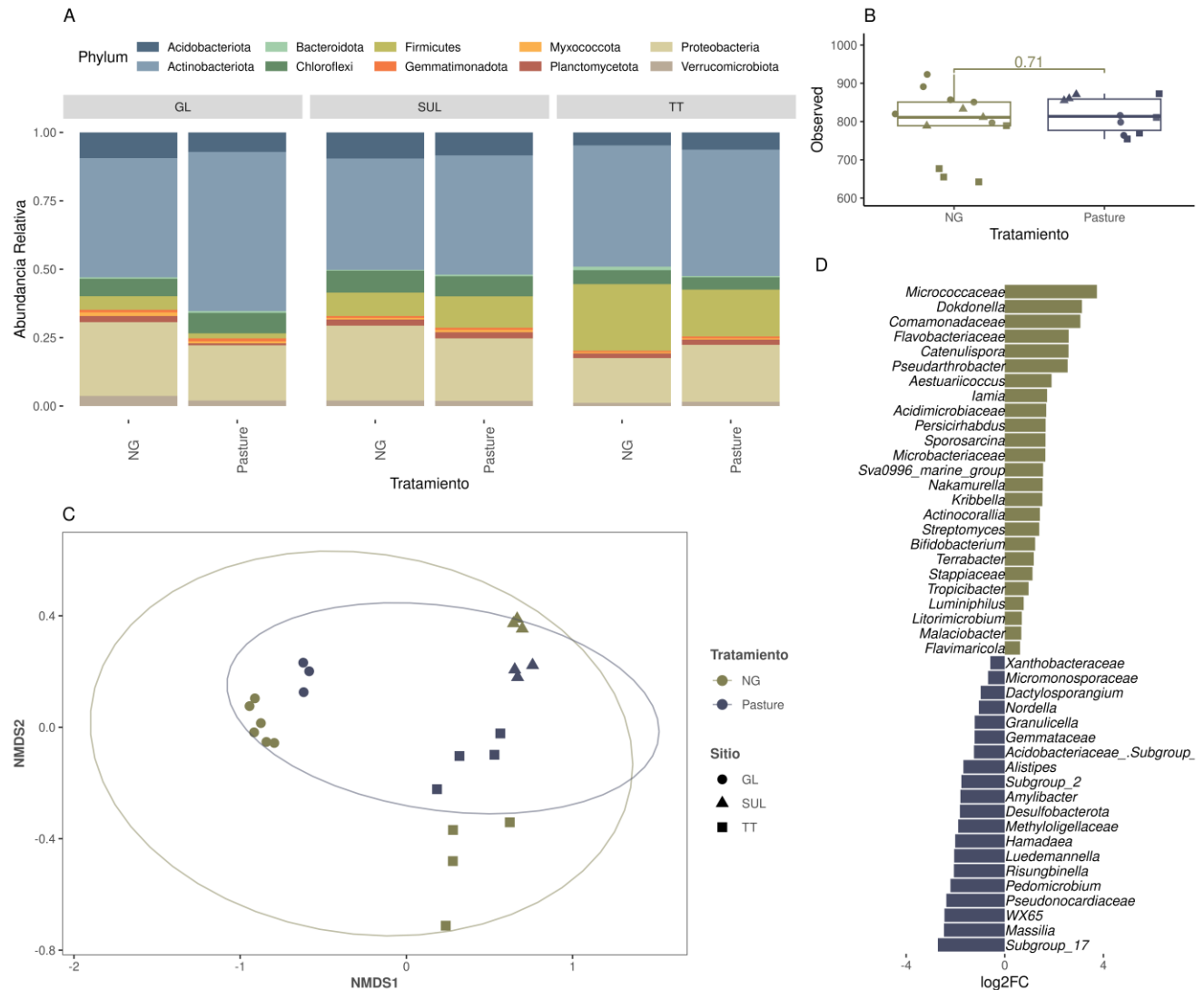


Figura 3.14. **A)** Composición de la comunidad bacteriana a nivel de Phylum, se muestran promedios de abundancia relativa por sitio y uso del suelo. **B)** Gráfico de cajas de Alfa diversidad de comunidades bacterianas expresada como la riqueza de géneros en cada muestra y agrupada por uso del suelo, donde NG corresponde a campo natural y Pasture a pasturas permanentes. **C)** Análisis de Beta diversidad de las comunidades de bacterias, se observa un NMDS obtenido a partir de las distancias de Bray-Curtis para la composición de las comunidades microbianas de cada el color indica el tratamiento y la forma el sitio de cada muestra. **D)** Gráfico de barras mostrando el cambio relativo para géneros con abundancia diferencial (FDR<0.15) en cada tratamiento.

3.3.3 Análisis de redes de correlación a partir de datos de microbioma de suelo luego de la implantación de pasturas perennes

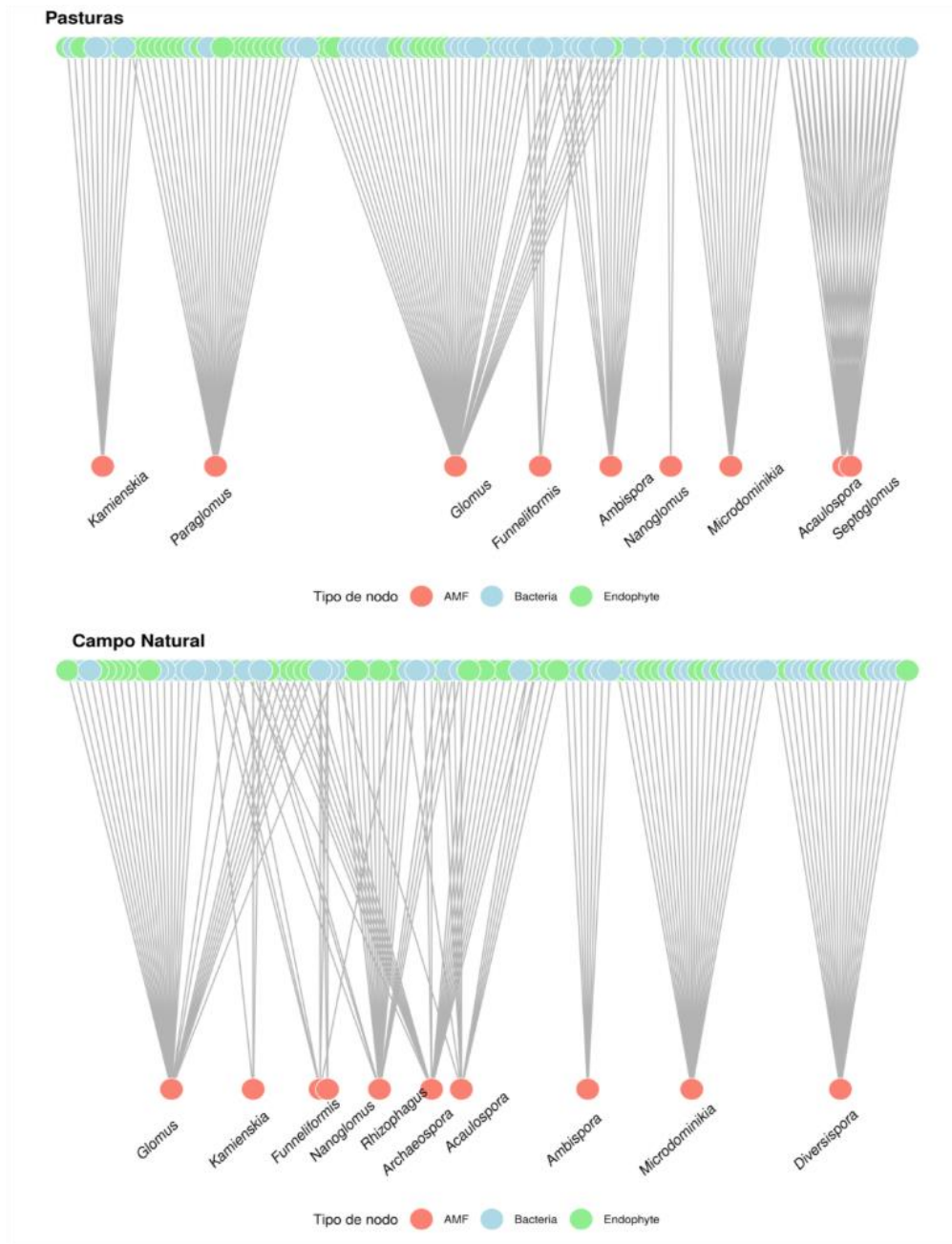


Figura 3.15. Redes bipartita de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y bacterias correlacionadas en las muestras obtenidas del tratamiento de implantación de pasturas perennes y de campo natural. Los nodos HMA se muestran en rojo, los nodos bacterianos en azul y los nodos de géneros endófitos en color verde claro.

El análisis de redes bipartitas de las comunidades microbianas presentes en pasturas sembradas mostró que el grafo generado contó con un total de 129 nodos, de los cuales 9 pertenecieron a hongos micorrícicos y 120 a diferentes géneros bacterianos (Figura 3.15). Estos géneros correlacionan de manera positiva en su abundancia relativa con los diferentes HMAs a los que se encuentran conectados. Dentro de los nodos de HMAs destaca el género *Glomus*, el cual correlacionó con 43 géneros bacterianos, esto da cuenta de su amplia distribución e importancia en este tipo de ambientes. A su vez, el nodo correspondiente al género *Paraglomus* presentó un valor de grado de 25 en esta red, indicando una correlación positiva en su abundancia con 25 géneros bacterianos, dentro de los cuales 21 presentaron reportes de establecimiento como endófitos vegetales. Además, resulta interesante analizar que los géneros *Acaulospora* y *Septoglomus* tuvieron el mismo grado en la red, pero también correlacionaron con los mismos 18 géneros bacterianos, sería interesante conocer si existen reportes de co-habitación de estos hongos en un mismo hospedero vegetal, lo cual podría dar cuenta de esta estrecha relación entre HMAs y su microbioma asociado. En el total de los nodos que componen la red 59 nodos bacterianos corresponden a géneros que se han reportado como endófitos, esto da cuenta de un importante tropismo de este tipo de bacterias por la asociación con HMAs.

Por otro lado, al analizar las redes de correlación bipartitas generadas con la misma metodología a partir de las muestras de campo natural obtenemos una red con un total de 124 nodos unidos por 137 aristas. Dentro de los 10 nodos pertenecientes a HMAs se encontró una distribución del grado más uniforme con el género *Glomus* como nodo con mayor grado, el cual correlacionó con 29 géneros bacterianos. A su vez, el género HMA *Microdominikia* correlacionó de manera significativa con 21 géneros bacterianos. Dentro de esta red, 7 de los 10 géneros de HMAs se encontraron conectados compartiendo uniones con al menos un nodo bacteriano esto impacta en la estructura de la red generando un valor de diámetro de 8, comparado con un valor de diámetro de 6 en la red generada con datos de pasturas. A su vez, para esta red se encontró que algunos géneros bacterianos llegaron a correlacionar con 3 géneros HMA diferentes, es el caso de *Rhodomicrobium* y *Hamadaea* los cuales tienen un grado de 3 y mayor *betweenness* que el resto de los géneros bacterianos encontrado en esta red. Por último, un 54% de los nodos bacterianos cuentan con reportes de endofitismo en plantas, de hecho, todos los nodos de esta red cuentan con alguna correlación con endófitos salvo el género de HMA *Nanoglomus* el cual tiene un grado de

2 y se encuentra asociado a las bacterias *mle1-17* y *Pedospaeraceae* que habitan el suelo rizosférico.

3.4 Discusión

3.4.1 Efectos de la fertilización del campo natural

3.4.1.1 Efectos de la fertilización sobre comunidades fúngicas de suelos

La prevalencia del Phylum *Ascomycota* en suelos de campo natural, tanto en presencia como ausencia de fertilización, es coherente con estudios previos que describen la adaptabilidad de este grupo a diferentes condiciones ambientales (Chao, et al 2022). Por otro lado, algunos trabajos publicados muestran al Phylum *Mortierellomycota* como uno de los más abundantes en pasturas lo cual ha sido vinculado con estrategias de adaptación a condiciones ambientales cambiantes, como la sequía (Lavallee, et al 2024), en nuestro conjunto de datos observamos que este Phylum también tiene una alta abundancia en pasturas incluso mayor a la del Phylum *Basidiomycota*. A su vez, se ha descrito que diferentes Phyla codifican repertorios de enzimas diferentes donde *Ascomycota* destaca por su capacidad de degradar una amplia variedad de compuestos lo cual mejora su adaptabilidad metabólica respecto a otros Phyla (Manici, et al 2024). Dentro de *Ascomycota* hemos encontrado una alta prevalencia de ASVs pertenecientes a los géneros *Fusarium*, *Alternaria* y *Cladosporium* en el microbioma *core* de los ELPs que comparan la fertilización del campo natural. Dichos géneros han sido clasificados previamente dentro de los filotipos con mayor prevalencia en suelos a nivel global. Se ha demostrado que la amplia distribución de estos filotipos se encuentra dada por un amplio repertorio de determinantes de tolerancia a diferentes tipos de estrés y su gran capacidad de dispersión, siendo comúnmente encontrado en muestras aéreas (Egidi, et al 2019).

Por otra parte, en campo natural observamos una abundancia mayor del género *Clitocybe*, el cual se encuentra dentro del Phylum *Basidiomycota*, este saprófito tiene la capacidad de degradar selectivamente la lignina, un polímero recalcitrante en restos vegetales parcialmente descompuestos, lo cual se puede vincular a un proceso de sucesión en la descomposición de material vegetal (Osono, et al 2011). Este resultado se condice con la mayor abundancia relativa

de géneros saprófitos en campo natural sin fertilización inorgánica, reportadas en este estudio y que pueden aportar al reciclado activo de carbono en el suelo.

Por otra parte, la presencia de géneros que pueden establecer asociaciones micorrícicas con plantas, como *Paraglomus* y *Serendipita*, en las muestras obtenidas de campo natural confirman la tendencia observada en estudios previos, donde la disponibilidad de nutrientes, particularmente el fósforo, modulan el establecimiento de estas asociaciones simbióticas con raíces de plantas (Treseder, 2015; Leff et al., 2015). Se ha determinado que en este sistema participa la vía de respuesta a carencia de fosfatos (PSR: *Phosphate Starvation Response*), la cual, entre otros efectos, regula la inmunidad de la planta permitiendo la colonización radicular por hongos simbióticos (Zhang, et al 2024). En este caso, la mayor abundancia de géneros HMA determinados en campo natural podría estar dado por una menor concentración de fósforo disponible en el suelo. El establecimiento de la simbiosis planta-HMA permite un mayor desarrollo de micelio de este tipo de hongos, dado que son simbióticos obligados, y por lo tanto aumenta la abundancia de estos géneros en este uso del suelo. Esta observación se condice con los resultados obtenidos en este trabajo al utilizar la base de datos FUNguilds, que agrupa los diferentes géneros en modos tróficos.

En este sentido, utilizando muestras obtenidas de pastizales en Uruguay y sur de Brasil, Michelini, et al. (2025) han descripto que el establecimiento de este tipo de asociaciones toma un rol fundamental como estrategia de adquisición de fósforo, sin embargo, la prevalencia de esta estrategia es dependiente de la concentración de P disponible en suelos. A su vez, en dicho trabajo se identificaron las familias de plantas *Poaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae* y *Apiaceae* como hospederos de micorrizas en pastizales. Dentro de estas familias se destacan las especies *Setaria parviflora*, *Paspalum notatum*, *Axonopus fissifolium* y *Symphiotricum squamatum* las cuales han sido reportadas con alta micorrización en campo natural (Michelini, et al 2025).

Por su parte, en esta tesis se reporta la presencia de hongos que también pueden formar asociaciones con plantas y establecerse como endófito de raíz, como el género *Serendipita*. Este género se encuentra dentro del orden *Sebacinales*, la especie más estudiada dentro del género es *Serendipita indica* (Ex. *Piriformospora indica*), la cual fue aislada del desierto Rajasthan (Verma, et al 1998) y ha sido encontrada como endófito de raíz de una amplia diversidad de hospederos (Weib, et al 2016). Sin embargo, se ha determinado que la especie *Serendipita herbamans* es

prevalente en pasturas y cultivos (Riess, et al 2014). Este género endófito ha sido descrito como promotor del crecimiento vegetal a través de la captación y transporte de fósforo a sus hospederos, especialmente en condiciones de baja disponibilidad de Fósforo (Rong, et al 2023). Los suelos de pastizales en Uruguay, y los muestreados en este trabajo en particular, tienen bajo contenido de P disponible (Bray1), por lo cual hongos del género *Serendipita* parecen tener éxito en estos ambientes y podrían ser otra de las estrategias utilizadas por las plantas para la captación de fósforo en campo natural.

En este sentido, también se han determinado los mecanismos a través de los cuales la colonización por *Serendipita* induce la tolerancia al estrés por sequía, en este caso la modulación de fitohormonas y la inducción de sistemas antioxidantes en la planta hospedera disminuye los daños causados por ROS en dichas condiciones (Jangir, et al 2021), este mecanismo puede ser importante en un contexto de cambio climático, donde las sequías han sido prevalentes en Uruguay durante los últimos años (Goyenola, G. 2023). A su vez, se ha determinado que la inoculación de este género en combinación con micorrizas induce resistencia al *damping-off* causado por *Fusarium spp.*, lo cual puede ser determinante en nuestros suelos, dada la alta prevalencia de *Fusarium* en todos los suelos y condiciones muestreados (Hallasgo, et al., 2022). Dados los mecanismos mencionados, este género es promisorio y estudiado como principio activo para el desarrollo de bioestimulantes de cultivos agrícolas, pero también podría ser tenido en cuenta en intentos de regeneración de pasturas degradadas (Saleem, et al., 2022).

Por otra parte, la abundancia de géneros patógenos como *Fusarium* y *Colletotrichum* en suelos fertilizados sugiere un cambio funcional en la comunidad fúngica, alineándose con reportes que documentan un aumento de patógenos en suelos fertilizados (Semenov, et al., 2022; Karunarathna et al, 2021). El género *Colletotrichum* ha sido estudiado como patógeno en pasturas, varias especies de este género logran infectar diferentes órganos vegetales utilizando las raíces como punto de entrada. Este hongo también logra establecerse de manera saprofítica en tejido vegetal muerto lo cual constituye una ventaja al permitir una mayor persistencia en suelos (Bhunjun, et al. 2021).

El cambio en la abundancia relativa de patótrofos y simbiótrofos también concuerda con estudios globales sobre praderas, que evidencian la disminución de hongos micorrízicos en suelos

fertilizados y un aumento de patótrofos. Dicho cambio en grupos funcionales puede afectar la productividad vegetal a largo plazo (Isbell et al., 2013), pero también podría estar involucrado en el desacople entre diversidad vegetal y estabilidad productiva observado en pastizales fertilizados (Hautier, et al., 2020). Este podría ser uno de los mecanismos que explican lo observado en análisis que utilizan pastizales de nuestra región, donde reportan que la adición de fósforo no tuvo un gran incremento en la productividad primaria neta de las mismas (Cardozo, et al 2024). De la misma forma, algunos estudios utilizando especies patógenas del género *Fusarium* han permitido demostrar el rol de los hongos patógenos en disminuir la biomasa de algunas especies vegetales, como *Lolium perenne* o *Trifolium repens*, en pasturas sembradas y el rol benéfico que pueden llegar a cumplir los HMA y el microbioma benéfico en la supresión de patógenos fúngicos y en el aumento en la productividad final de pasturas (Zhang, et al. 2023).

3.4.1.2 Efectos de la fertilización sobre comunidades bacterianas del suelo

Al analizar las comunidades bacterianas de campo natural y sus pares fertilizados se observa una alta prevalencia del género *Bradyrhizobium* en campo natural. Este género podría estar implicado en la simbiosis con leguminosas nativas como *Desmodium incanum*, lo cual ha sido reportado a partir de muestras tomadas en Brasil (Silva et al., 2020) y recientemente también en África (Adan, et al. 2024). A su vez, existen indicios de que esto podría ocurrir también en plantas tomadas en Uruguay (Crosa, et al. 1999). El género *Bradyrhizobium* ha tenido gran prevalencia en todo el conjunto de datos generado en esta tesis. También, la presencia de *Mesorhizobium* abre la posibilidad de interacciones simbióticas con otras leguminosas, como se sugiere en Laranjo et al. (2014). Sería de interés ahondar en la colección de nódulos y aislamiento de cepas bacterianas, para lograr constatar la participación de estos géneros de rizobios en la nodulación de leguminosas nativas presentes en campo natural.

La disminución de géneros fijadores de nitrógeno como *Azospirillales* y *Anaeromyxobacter* en suelos fertilizados coincide con observaciones previas donde se reporta que la fijación biológica de nitrógeno disminuye en presencia de fuentes externas de nitrógeno (Marques et al., 2017; Smercina et al., 2019). Para este proceso, la forma en que se encuentra el nitrógeno en el suelo juega un rol importante, se conoce que el amonio (NH_4^+), como producto directo de la fijación biológica, inhibe la síntesis de la nitrogenasa dado el alto costo metabólico del proceso de FBN

(Smercina et al., 2019). Por otro lado, el aumento de géneros como *Nitrospira* y *Rubrivivax* implica una mayor conversión de NH_4^+ a NO_3^{-2} , lo cual puede reducir la eficiencia en el uso de nitrógeno, favoreciendo la pérdida de este nutriente en suelos fertilizados. La utilización de urea supone un aumento en la disponibilidad de amonio en el suelo, esto podría implicar que aquellos géneros que utilizan amonio aumenten su abundancia. El rápido pasaje de NH_4^+ a NO_3^{-2} ha sido documentado en suelos agrícolas (Quan, et al 2017), donde hemos observado que también existe un aumento diferencial del género *Nitrospira*. Una fracción importante del N agregado al suelo a través de fertilizantes tiene como destino final los cursos de agua, por lo cual, la transformación de amonio en nitrato, el cual tiene una gran solubilidad en agua, puede tener un impacto ambiental considerable (Sebilo, et al. 2013).

Por último, a nivel bacteriano, el agregado de fósforo inorgánico al suelo podría desencadenar la acumulación de polifosfatos como gránulos de polifosfatos en el citoplasma. El aumento en la abundancia relativa de miembros de la familia Gematimonadaceae, sugiere una posible implicación en la eficiencia de uso de fósforo en estos suelos (Zhang et al., 2003).

3.4.1.3 Efectos de la fertilización sobre las redes de correlación

Las redes de correlación entre HMAs y bacterias podrían ser utilizadas para detectar asociaciones específicas entre bacterias y hongos micorrícicos. Las interacciones entre HMAs y bacterias del suelo pueden influir significativamente en la simbiosis micorrícica, modulando tanto la colonización fúngica como la respuesta de la planta hospedera. Se ha documentado que ciertas bacterias asociadas a HMA, conocidas como *Mycorrhiza Helper Bacteria* (MHB), pueden mejorar la germinación de esporas y la formación de micelio extrarradical, facilitando la colonización de la raíz por los hongos (Frey-Klett et al., 2007). Además, se ha observado que estas bacterias pueden inducir respuestas inmunológicas en las plantas que favorecen la estabilidad de la simbiosis micorrícica bajo condiciones de estrés (Calonne et al., 2022). Estas interacciones también pueden estar mediadas por la producción de hormonas y compuestos señalizadores como ácido indolacético y sideróforos, que favorecen la comunicación entre los microorganismos y la planta (Turrini et al., 2018).

En este trabajo, logramos utilizar redes de correlación como herramientas analíticas que permiten capturar cambios en el ensamblaje de comunidades microbianas a través de cambios en la

abundancia de bacterias y hongos del suelo. En este sentido, es importante tener en cuenta la metodología utilizada para el cálculo de las redes bipartitas de forma de no introducir sesgos en las comparaciones realizadas. En este análisis se estableció un valor límite fijo de correlación para determinar la unión entre dos nodos. Por lo tanto, el número de muestras utilizadas para calcular el ranking de correlación de Spearman, entre los tratamientos que se buscan comparar, debe ser constante, de lo contrario se incurre en sesgos analíticos. Por ejemplo, un menor número de muestras puede generar valores de correlación (S) mayores y por tanto redes con mayor número de nodos y links, aunque los cambios en la abundancia de taxones sean similares. Es por esto, que las redes del conjunto de datos de fertilización presentan un menor número de nodos y links que las de sobresiembra de leguminosas y adición de P sobre campo natural o la implantación de pasturas perennes. Esto se debe a que el número de muestras utilizadas para los ELPs de fertilización en campo natural es mayor. Otra aproximación utilizada muy recientemente, para disminuir este tipo de sesgos, incluye la utilización de un rango de valores límite de correlación para la generación de links entre nodos. Esto permite generar múltiples redes para cada tratamiento y estudiar si los patrones estructurales de dichas redes son consistentes dentro del rango de valores límite estudiados (Markfeld, et al., 2025).

Dentro de los resultados del análisis de redes bipartitas se observa que los datos de campo natural generan redes más complejas que los datos de campo natural fertilizado. Esto se observó en el número de nodos que componen la red, donde se encuentra mayor número de nodos que corresponden a HMAs, pero también mayor número de nodos bacterianos. A su vez, el paso medio de la red y la modularidad calculada fueron mayores para la red de campo natural. Sería interesante determinar si al disminuir la diversidad y riqueza del bacterioma asociado a HMAs disminuye la funcionalidad de la simbiosis establecida con plantas. Algunos de los géneros asociados a HMAs en datos de campo natural han sido estudiados por su capacidad de promover el crecimiento vegetal, incluso vinculados a la mejora en la absorción de nutrientes poco móviles en el suelo como el fósforo (Saeid, et al 2018; Gomez-Ramirez, et al 2021; Vitorino, et al. 2024). En el caso de los géneros *Lysinibacillus* y *Bacillus* ambos pierden su correlación con HMAs a partir de la fertilización del suelo. Este último género ha sido reportado como MHB en múltiples estudios y es uno de los géneros que nos aporta evidencias de estar detectando asociaciones específicas entre HMAs y MHBs a partir del análisis de redes (Frey-Klett, et al 2007).

3.4.2 Efectos de la sobresiembra de leguminosas y adición de fósforo en campo natural

3.4.2.1 Efectos de la sobresiembra de leguminosas y adición de fósforo sobre las comunidades fúngicas del suelo

La predominancia de *Ascomycota* en todas las muestras del tratamiento de campo natural mejorado con leguminosas y fósforo es consistente con estudios previos que indican que este Phylum es común en suelos. Esto fue discutido en la sección anterior y parece repetirse en diferentes usos del suelo. Por otra parte, la detección de géneros de hongos como *Archaeorhizomyces* y *Serendipita* en mayor abundancia en el campo natural coincide con investigaciones que destacan su rol como endófitos de raíz y promotores de resistencia al estrés abiótico (Baba, et al. 2024; Jangir et al., 2021). En particular, por los resultados obtenidos en la sección anterior observamos que el género *Serendipita* parece responder negativamente a la fertilización, esto sugiere que la adición de fósforo que ocurre en el mejoramiento de CN podría limitar su abundancia. Detrás de esta observación podrían estar actuando los mismos mecanismos reportados que para la simbiosis con HMAs, donde la respuesta a escasez de P actúa a nivel de plantas, a través del sistema PSR, facilitando el establecimiento de simbiosis con la raíz del hospedero vegetal (Zhang, et al. 2024).

Por otro lado, se detectó la presencia de mayor abundancia relativa de algunos géneros patógenos de plantas como *Fusarium*, *Sarocladium* y *Didymella* en el tratamiento con sobresiembra de leguminosas, esto podría reducir el crecimiento vegetal, especialmente en contextos de estrés para las plantas (Bigirimana et al., 2015; Luo et al., 2024; Nikitin et al., 2023). Por otra parte, el aumento en la abundancia relativa de los géneros micorrícicos *Paraglomus* y *Rhizophagus* llama la atención, debido a que en comparaciones anteriores hemos discutido que la eficiencia de establecimiento de la simbiosis depende de la disponibilidad de fósforo en el suelo. En este caso, los tratamientos con leguminosas son suplementados con fósforo lo cual indicaría *a priori* una disminución en el establecimiento de la simbiosis planta-HMA. Sin embargo, el aumento en la abundancia de este tipo de hongos podría estar asociado a la sobresiembra de algunas especies de leguminosas en este tratamiento. Se ha documentado que géneros como *Trifolium repens* son buenos hospederos de HMAs lo cual permitiría mantener la abundancia de estos hongos en suelos mejorados (Zaixing, et al. 2024). A su vez, *Lotus tenuis* también ha sido reportado como un muy buen hospedero de HMAs, manteniendo una gran diversidad más allá de cambios en propiedades del suelo (García,

et al. 2023). De la misma forma, la especie *Lotus corniculatus* ha sido estudiado como hospedero de HMAs (Zhang, Q. et al 2024), por lo cual vemos la gran capacidad de formar asociaciones micorrícicas que tienen estas leguminosas. Esto indicaría que las especies de HMAs que tengan la capacidad de establecer asociaciones simbióticas con estas leguminosas lograrán aumentar su abundancia en suelos bajo mejoramiento de campo natural. A su vez, esta simbiosis podría ser beneficiosa, favoreciendo el uso eficiente de fósforo y mejorando la retención de carbono en el suelo, como se ha visto en estudios que implican al género *Rhizophagus* y sus asociaciones en ambientes manejados (Fornara et al., 2020; García I. et al., 2023; Boldt-Burisch et al., 2017).

Sin embargo, el incremento de géneros específicos de HMAs contrasta con la disminución en la abundancia de simbiótros reportada en el tratamiento de campo natural mejorado. Si bien los HMAs no son los únicos géneros simbiótros existentes, esta observación está alineada con otros estudios en los que se reporta, a través del análisis de ácidos grasos de fosfolípidos en suelos, que el mejoramiento de campo natural disminuye la abundancia de HMAs (Azziz et al., 2023). Incorporando esta información se podría especular que el aumento de géneros HMAs en suelos bajo mejoramiento corresponde a aquellos capaces de establecer simbiosis con las leguminosas sobresembradas, sin embargo, la adición de fósforo en este tratamiento genera una regulación negativa a nivel de hospedero vegetal en la formación de este tipo de simbiosis y por tanto se observa una disminución generalizada en la abundancia de hongos simbiótros de raíz. Por otra parte, la mayor abundancia de géneros saprótrofos registrados en suelos de campo natural podría estar vinculada a un mayor contenido de materia orgánica en estos suelos, lo cual sustenta el papel de la comunidad fúngica en la descomposición y reciclaje de compuestos carbonados, especialmente aquellos considerados recalcitrantes (Gryndler, et al. 2003).

3.4.2.2 Efectos de la sobresiembra de leguminosas y adición de fósforo sobre las comunidades bacterianas del suelo

Al analizar las comunidades bacterianas se detectó una alta prevalencia de *Bradyrhizobium* en suelos de campo natural, nuevamente sugiere una posible simbiosis con leguminosas nativas, similar a lo reportado para *Desmodium incanum* en el sur de Brasil (Silva, et al., 2020). Este hallazgo subraya la importancia de las leguminosas en el campo natural y plantea la posibilidad de una relación simbiótica que permite el ingreso de nitrógeno a estos suelos a través de la fijación biológica. El patrón de abundancia diferencial de géneros bacterianos entre tratamientos refleja

cómo el manejo del suelo y la fertilización influyen en la comunidad bacteriana. La mayor presencia de géneros como *Anaeromyxobacter* en el campo natural podría estar relacionada con la necesidad de una mayor fijación de nitrógeno en suelos no fertilizados (Masuda Y. et al., 2020). Por otro lado, la abundancia de *Nitrospira* en suelos mejorados coincide con estudios que relacionan la actividad de este género con la nitrificación completa en presencia de amonio elevado, típico en suelos fertilizados (Feng, et al., 2024). En este caso, la fertilización no es nitrogenada, sería interesante conocer si la disponibilización de nitrógeno a partir del proceso de FBN, también determina una mayor abundancia del género *Nitrospira* mediante aumento en la concentración de NH_4^+ . La actividad de oxidación completa de amonio a nitrato por este género es particularmente relevante en contextos agrícolas, donde la disponibilidad de nitrógeno afecta el rendimiento de cultivos.

La identificación de la familia *Microtrichaceae* y el género *Microtholunatus* en suelos de campo natural mejorado, ambos conocidos por su capacidad de acumular polifosfatos, es muy relevante en el contexto de eficiencia de uso de este nutriente (Kawakoshi et al, 2012). Los organismos que acumulan este nutriente en microgránulos se denominan PAO (*Polyphosphate accumulating organism*), estos acumulan polifosfato inorgánico para utilizarlo como donador de electrones posteriormente en la cadena respiratoria (Chen, et al. 2024). Se han reportado bacterias que cumplen esta función en suelos, principalmente del género *Pseudomonas*, y se ha estudiado su capacidad para aliviar el estrés salino en plantas (Srivastava, et al. 2022). Sin embargo, el fosfato inmovilizado deja de estar disponible temporalmente como nutriente para las plantas, por lo cual dichas bacterias podrían estar contribuyendo a la retención de fósforo en el suelo, un factor importante para la eficiencia de uso de fósforo (PUE) en suelos mejorados (Akbari, et al. 2021). De hecho, este mecanismo podría vincularse a la baja eficiencia productiva reportada al suplementar P al campo natural (Cardozo, et al. 2024). En este trabajo reportamos al género *Microtholunatus* como uno de los representantes de este gremio funcional en suelos de campo natural mejorado. Sería interesante determinar la cantidad de este nutriente que puede ser inmovilizado a través de este mecanismo, de forma de poder cuantificar el efecto de la presencia de estos microorganismos en el suelo. La actividad de este tipo de bacterias da cuenta de que el mejoramiento de campo natural no solo afecta el microbioma directamente, sino también los ciclos de nutrientes clave para el crecimiento vegetal.

3.4.2.3 Análisis de redes bipartitas de suelos con sobresiembra de leguminosas y adición de fósforo

Al observar los resultados presentados en redes bipartitas de correlación para bacterias y hongos observamos que ambos usos del suelo generan redes que tienen una gran cantidad de nodos. La red bipartita generada a partir de datos de campo natural contiene 152 nodos conectados por 200 aristas, 11 de los cuales corresponden a HMAs, mientras que la red generada a partir de datos de mejoramiento de campo natural contiene 118 nodos unidos por 112 aristas, de los cuales 10 corresponden a HMAs. De esta forma, el paso medio de la red de campo natural es del doble del campo natural mejorado. Todo esto da cuenta de que la red de correlación de HMAs en campo natural tiene una estructura de mayor complejidad que la de mejoramiento. El empobrecimiento de las comunidades micorrícicas en campo natural con sobresiembra de leguminosas y P, ya ha sido reportado para Uruguay y condicen con los resultados obtenidos en análisis previos (Azziz, et al 2023). Uno de los mecanismos que podrían explicar este efecto sería el cambio en las comunidades vegetales generados por el tratamiento de sobresiembra de leguminosas y fósforo, este ha sido ampliamente reportado para nuestro país (Lezama, et al. 2024). En particular, la invasión de especies vegetales exóticas, que no establecen simbiosis con HMAs, podría tener un efecto importante en la interrupción de redes micorrícicas en el suelo de campo natural mejorado (García, et al. 2025). Este puede ser el caso de *Cynodon dactylon*, la cual ha sido reportada como especie exótica invasora en este tipo de manejos de intensificación del campo natural (Pañella, et al. 2022). A pesar de que ambas redes presentan nodos HMAs similares entre sí, solamente 6 asociaciones se mantienen incambiadas en ambas redes generadas, esto sugiere una remodelación del microbioma asociado a HMAs y por tanto de su funcionalidad. Dentro de las asociaciones que se mantienen encontramos la correlación entre *Azospirillales* y *Rhizophagus*, la complementariedad en la disponibilización de nutrientes por parte de estos microorganismos tiene una implicancia importante en la productividad y estructura vegetal de los pastizales (Bauer, et al. 2012). Esto ha sido demostrado en particular para leguminosas en microcosmos donde la productividad vegetal aumenta cuando participan en la simbiosis hongos HMA y bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Van der Heijden, et al. 2016)

Por otra parte, es importante destacar que en ambas redes más del 40% de los nodos bacterianos tienen reportes de establecimiento como endófitos vegetales. Esto podría indicar un tropismo de

las bacterias endófitas por su asociación con hifas de HMA. Existe basta evidencia en diferentes modelos vegetales sobre el efecto que ejerce la inoculación con HMAs en el microbioma endofítico de las plantas (Han, et al. 2023; Ujvári, et al. 2021; Lastovetsky, et al. 2022). Sin embargo, las primeras publicaciones que discuten mecanismos a través de los cuales la colonización de plantas por HMAs podría alterar el microbioma endofítico de plantas son muy recientes (Ujvári, et al. 2024). En este trabajo se detectó que el microbioma endofítico de plantas colonizadas por HMAs es similar al microbioma asociado a los hongos HMAs que participan en la simbiosis. A su vez, se discute que el microbioma asociado a esporas de hongos HMA podría migrar a través de las hifas y de esta forma lograr establecerse de manera endofítica en plantas. Otro de los mecanismos discutidos establece que los exudados producidos por hifas de HMA favorecen el crecimiento de un microbioma específico, el cual tendría ventajas para la colonización endofítica de los tejidos vegetales. Por último, los exudados de plantas e hifas podrían cambiar la fisiología de las raíces y atraer un microbioma específico durante el proceso de micorrización por HMAs. En este trabajo pudimos determinar que la utilización de redes de correlación bipartitas generadas a partir de datos de suelo permite detectar componentes del microbioma asociado a HMAs y que algunos de estos géneros ya se han reportado previamente asociados a HMAs. Estos muestreos surgen directamente del suelo y continúan reforzando la teoría de que las asociaciones micorrícicas también incluyen bacterias y que a su vez estas son importantes en ambos extremos de las hifas. Por un lado, aportan funciones asociadas a la solubilización de nutrientes del suelo, pero también aportan funciones dentro de la planta al establecerse como endófitas, entre las cuales se encuentra la resistencia a enfermedades (Devi, et al. 2022), la fijación de nitrógeno (Soumare, et al 2015) y la producción de fitohormonas que modulan el crecimiento vegetal (Qian, et al 2024).

3.4.3 Efectos de implantación de pasturas perennes en campo natural

3.4.3.1 Efectos de la implantación de pasturas perennes sobre las comunidades fúngicas del suelo

Al analizar las comunidades fúngicas de suelos con pasturas perennes y sus pares de campo natural observamos algunas particularidades. En primer lugar, las diferencias observadas en la diversidad alfa, medida a través de la riqueza de géneros fúngicos en los distintos tratamientos, podrían vincularse a la homogeneización de los residuos vegetales que entran al suelo en el tratamiento de

pasturas. Las comunidades fúngicas han sido reportadas como particularmente susceptibles a la composición de los restos vegetales que ingresan al suelo (Habtewold, et al 2020). Sin embargo, debido a que algunos sitios de estos tratamientos no tenían algunas variables completamente controladas no podemos atribuir únicamente a este factor los resultados obtenidos. Al observar los resultados de beta diversidad entre tratamientos se observa que el sitio Glencoe muestra diferencias importantes entre ambos tratamientos, en este caso el pastoreo entre tratamientos no se encuentra estandarizado, y este factor ha sido reportado como muy influyente para las comunidades fúngicas (Wu, et al. 2022).

Por otro lado, al analizar la abundancia diferencial de hongos entre tratamientos obtenemos que más de 40 géneros tienen mayor abundancia en campo natural, y solo 17 géneros se encuentran en mayor abundancia en pasturas, esto en cierta forma se corresponde con los resultados obtenidos para el análisis de alfa diversidad donde se encuentra menor riqueza en las muestras obtenidas de pasturas. Dentro de los géneros que tienen cambios significativos en su abundancia destaca la disminución del género *Serendipita*, un hongo endófito de raíces con un amplio espectro de hospederos, este cambio se ha visto repetido en los tratamientos con adición de fósforo, lo cual a su vez es consistente con otros estudios que han documentado efectos negativos del fósforo disponible en suelos sobre hongos que establecen simbiosis con raíces vegetales (Rong et al., 2023). Dentro del grupo de los endófitos de raíz también detectamos mayor abundancia del género *Archaeorhizomyces* en campo natural, el cual ha sido descrito como endófito de raíz. De hecho, se discute si la simbiosis formada entre algunas especies vegetales y especies dentro del género *Archaeorhizomyces* se podría categorizar como una micorriza ericoide (Baba, et al 2024). En estas asociaciones se forman estructuras particulares como los rollos de hifas (coils) dentro de las células de la raíz, que cumplen funciones similares a los arbuscúlos en micorrizas arbusculares.

Por otro lado, estas asociaciones se forman únicamente con especies vegetales pertenecientes a la familia *Ericaceae*, aunque se ha discutido la especificidad y exclusividad de estas asociaciones por parte de los hongos simbioses (Perotto, et al 2002), se encuentra ampliamente documentada la mejora en la productividad de los simbioses vegetales, esto ha hecho que se evalúe su uso como bioestimulantes en la producción de este tipo de plantas (Wei, et al 2022). El cambio en la cobertura vegetal del campo natural debido a la sustitución por pasturas sembradas puede haber afectado a estos simbioses. En este mismo sentido, otro de los géneros fúngicos que tienen mayor

abundancia en campo natural es el género *Tuber*, estos se conocen por su alto valor culinario y el primer reporte para nuestro país es bastante reciente del año 2021, donde se encontraron trufas blancas, de la especie *Tuber maculatum*, asociadas a montes de Pecán (Kuhar, et al 2024). A pesar de que restaría conocer cuál es su hospedero vegetal en campo natural, la detección de hongos de este género podría ser un valor agregado para este ecosistema en nuestro país. Al analizar los datos de campo natural hemos detectado diferentes hongos formadores de ectomicorrizas, este tipo de simbiosis se encuentra ampliamente documentada en bosques y montes de diferentes especies arbóreas. Algunos de los sitios muestreados contienen cortinas de árboles que podrían ser hospederos de estos hongos. Sin embargo, se ha estudiado que los niveles de colonización por este tipo de hongos decaen rápidamente a escala de metros en paisajes de transición entre bosques y pasturas (Dickie & Reich, 2005). Sería interesante determinar si especies arbustivas presentes en campo natural podrían actuar como hospederos de este tipo de hongos, lo cual ha sido reportado previamente en otros contextos. En este sentido, América del Sur ha sido descrito como uno de los continentes donde la diversidad de hospederos de ectomicorrizas se encuentra submuestreada (Nara & Hogetsu, 2004; Tedersoo, et al., 2010).

El aumento en la abundancia de hongos micorrícicos arbusculares en pasturas sembradas, como *Funneliformis* y *Paraglomus*, podría estar relacionado con especies introducidas de plantas como *Trifolium repens* y/o *Festuca arundinaceae*, conocidas por su capacidad de establecer simbiosis beneficiosas con estos hongos (Liu et al., 2023; Zhang et al., 2018, Xu et al., 2024). Este hallazgo es consistente con estudios que documentan la mejora en la eficiencia de uso de fósforo mediante la colonización por hongos micorrícicos (Thioub et al., 2019). Sin embargo, el aumento en la abundancia de estos géneros micorrícicos no genera un aumento en la abundancia de todos los simbiótros presentes en pasturas, respecto a los existentes en campo natural. De hecho, se detectó una mayor abundancia de simbiótros facultativos en campo natural respecto a las pasturas sembradas.

3.4.3.2 Efectos de la implantación de pasturas sobre las comunidades bacterianas del suelo

Las comunidades bacterianas de todo el conjunto de datos, estuvieron dominadas por especies del género *Bacillus* y *Bradyrhizobium*, con tres ASVs de cada género, esto coincide con estudios que sugieren la adaptación de estos géneros a suelos con pasturas y su asociación con leguminosas

nativas (Silva et al., 2020). La alta prevalencia de tres ASVs que corresponden al género *Acidothermus*, donde *Acidothermus cellulolyticus* es su principal representante, y su capacidad de degradar celulosa contribuye al reciclaje de carbono en suelos, lo cual refuerza la importancia de estos microorganismos en el reciclado de materia orgánica (Barabote et al., 2009). En el caso de comunidades bacterianas no se detectaron cambios significativos en alfa diversidad. En el caso del análisis de beta-diversidad se observa que las muestras se agrupan por sitio, y que existe una homogeneización de la composición de las comunidades microbianas a partir de la implantación de pasturas, dado que las muestras provenientes de este uso del suelo se encuentran hacia el centro del espacio bidimensional. Este efecto ya ha sido reportado para la conversión de campo natural a agricultura (Peng, et al. 2024). Se podría discutir que la suplantación del campo natural por pasturas sembradas conlleva manejos similares a la agricultura, dado que incluye el agregado de fertilizantes y el cambio en la cobertura vegetal por la implantación de monocultivos o de unas pocas especies en las pasturas. Sin embargo, en el caso de pasturas no se utilizan fungicidas, insecticidas o herbicidas, insumos que también impactan en las comunidades microbianas del suelo (Walder, et al. 2022; Maharana, et al. 2024).

Los géneros más abundantes en campo natural, como *Dokdonella*, podrían estar implicados en la desnitrificación aerobia, contribuyendo a la regulación del ciclo del nitrógeno en suelos de campo natural (Pishgar et al., 2019; Wang et al., 2019). Además, el género *Pseudarthrobacter*, que contiene especies que han sido reportadas como promotoras del crecimiento vegetal, demuestra la función crítica que algunas bacterias nativas tienen en el soporte de la productividad vegetal (Ham et al., 2022; Issifu et al., 2022). La abundancia de *Actinobacteriota*, con géneros como *Nakamurella* y *Terrabacter*, que son conocidos por su capacidad de degradar compuestos complejos y por producir compuestos antimicrobianos, podrían cumplir un rol estructurador en la comunidad bacteriana del suelo (Yoshimi et al., 1996; Dai et al., 2023). La alta abundancia de estos géneros en el campo natural se correlaciona con la mayor diversidad de compuestos en suelos no perturbados, lo cual podría tener aplicaciones en biotecnología y conservación de suelos. A su vez, también encontramos al género *Streptomyces* con mayor abundancia en campo natural lo cual también puede tener un efecto estructurador de la comunidad microbiana de suelos, el cual ha sido asociado a un servicio ecosistémico clave como la supresión de enfermedades en suelos (Cordovez, et al., 2015). El potencial biotecnológico de los metabolitos secundarios producidos por representantes de este género bacteriano ha sido ampliamente documentado, sin embargo, los

representantes de este género que se establecen en suelos de campo natural constituyen un recurso genético que se encuentra subexplorado (Vaz-Jauri, et al., 2016).

En las pasturas, el predominio de géneros capaces de degradar compuestos orgánicos complejos como *Alistipes* y *Dactylosporangium* sugiere una resiliencia funcional, donde la comunidad bacteriana mantiene su rol en la degradación de compuestos orgánicos a pesar de los cambios taxonómicos y el remplazo de la vegetación natural (Moureu et al., 2021). A su vez, la presencia de géneros metilotróficos como *Methylobacteriaceae* destaca el posible rol de las bacterias del suelo en la mitigación de emisiones de metano, un aspecto relevante en ambientes pastoreados.

3.4.3.3 Análisis de redes bipartitas de suelos a partir de la implantación pasturas perennes

Al analizar las redes de correlación de bacterias asociadas a pasturas, detectamos re-arreglos en la estructura de estas redes. Por un lado, el grafo obtenido a partir de datos de pasturas sembradas tiene 129 nodos, de los cuales 9 pertenecen a HMAs, a su vez la distribución del grado muestra que el nodo perteneciente al género *Glomus* tiene un grado muy superior al resto. Se conoce que el género *Glomus* es el que abarca más especies dentro del Phylum Glomeromycota, también se sabe que este es polifilético dado que no se ha podido determinar el ancestro común a todos los miembros de este género (Rodrigues, et al 2020). A su vez, se han detectado distintos filotipos dentro del género *Glomus* con capacidad de formar simbiosis con distintas especies de herbáceas, tanto anuales como perennes (Torrecillas, et al. 2012). La detección de un grado tan alto en este nodo podría estar dado por la capacidad de este género de formar simbiosis con diferentes hospederos vegetales y por lo tanto interactuar con bacterias asociadas a distintos hospederos.

Por otra parte, los géneros *Funneliformis* y *Paraglomus* fueron detectados en mayor abundancia en pasturas que en campo natural, el primero de ellos tiene un grado de 5 y el segundo de 25. Por otro lado, en este grafo detectamos la particularidad de dos nodos correspondientes a géneros AMF con exactamente el mismo microbioma asociado, se trata de los géneros *Acaulospora* y *Septoglomus*. Sería interesante detectar si este efecto se da por la colonización de los mismos hospederos vegetales o si se trata de un artefacto del análisis. A su vez, sería interesante determinar si un mayor grado en la red podría vincularse a un mayor número de hospederos vegetales y por tanto a una mayor interacción con bacterias rizosféricas en la red de correlación. Se ha determinado

que la presencia de algunas variantes de genes simbióticos genera cambios en el establecimiento de estas simbiosis multi-reino (Thiergart, et al. 2019). El lograr caracterizar las especies vegetales que participan podría ayudar a definir variaciones en el ensamblaje de esta simbiosis multi-reino. De esta forma, la detección de una especie vegetal y la caracterización de su microbioma asociado ayudaría a entender y predecir el comportamiento de la planta frente a distintos tipos de estrés (Mesny, et al. 2023).

Al analizar las redes generadas a partir de datos de campo natural detectamos la presencia de 11 géneros HMAs, esto termina de confirmar que en todos los tratamientos de intensificación de campo natural las redes bipartitas perdieron nodos HMAs. En este caso, el número total de nodos de la red es de 124, algo menor a la red generada con datos de pasturas sembradas y es el único caso en el que se observan más nodos totales en la opción de intensificación. Además de esto, se observa una remodelación importante de la estructura de la red. En el caso de campo natural 7 de los 10 nodos HMAs se encuentran conectados compartiendo uno o más nodos bacterianos con los que correlacionan, esto genera que el diámetro de la red de campo natural sea el doble que la red de pasturas sembradas. En este sentido, especulamos que una red con mayor número de conectores y con mayor cantidad de uniones es más resiliente a perturbaciones, como la pérdida de nodos o links en su estructura. La detección de cambios estructurales en las redes de correlación parece ser más sensible que el análisis de composición de las comunidades microbianas. En este caso se logra detectar la pérdida de algunos nodos HMAs, junto con la pérdida de nodos conectores en la red. La detección de este tipo de efectos en el análisis de redes ya ha sido reportada previamente para redes bipartitas de microbioma en condiciones de estrés por sequía (Gao, et al. 2022)

3.5 Conclusiones

La comparación de los tres tratamientos de intensificación del campo natural, la fertilización mineral, sobresiembra de leguminosas con P y sustitución por pasturas perennes, reveló que, pese a mantener un “núcleo” microbiano dominado *Ascomycota* y *Mortierellomycota* en hongos y *Actinobacteriota* y *Proteobacteria* en bacterias, cada manejo reconfigura la identidad y la arquitectura de las comunidades respecto al campo natural (CN). En todos los casos se observó una reducción de la complejidad de las redes hongos micorrícicos arbusculares (HMA)-bacterias y un corrimiento funcional desde simbiótrofos y saprótrofos típicos de CN hacia taxones asociados

a ciclos rápidos de nutrientes y, en ocasiones, patogenicidad vegetal, lo que sugiere un gradiente de simplificación ecológica conforme aumenta la intervención sobre el pastizal.

La adición anual de N y P fue el tratamiento más disruptivo: disminuyó la riqueza de simbiótrofos (p. ej., *Paraglomus* y *Serendipita*) y de bacterias fijadoras de N₂ (*Azospirillales*, *Burkholderia*), aumentó la representación de patógenos (*Fusarium*, *Colletotrichum*) y de géneros ligados a nitrificación-desnitrificación (*Nitrospira*, *Rubrivivax*) y simplificó la red HMA-bacterias (42 nodos frente a 58 en CN). Esta pérdida de conectividad biológica coincide con la sustitución de mutualismos por flujos inorgánicos de nutrientes, confirmando que la fertilización intensiva compromete la interacción planta-microbio clave para la sostenibilidad del sistema.

El mejoramiento vía leguminosas y P mostró un efecto intermedio. Aunque se incorporaron HMAs compatibles con las leguminosas (*Rhizophagus*, *Paraglomus*), la abundancia total de simbiótrofos se redujo y emergieron géneros patógenos como *Fusarium* y *Lectera*. A nivel bacteriano aumentó la abundancia de géneros que favorecen un fenotipo nitrificante y acumulador de P (*Nitrospira*, *Microtholunatus*), mientras que el porcentaje de bacterias endofíticas en la red HMA-bacterias cayó del 56 % en CN al 38 % en el sistema mejorado, acompañado de una red más pequeña (118 nodos) y de menor paso medio. Estos resultados sugieren que la fijación biológica de N por las leguminosas no compensa completamente la alteración que produce la fertilización fosfatada sobre la biota edáfica.

La implantación de pasturas perennes—con manejos de fertilización más moderados pero un reemplazo casi total de la flora nativa—generó cambios marcados en la comunidad fúngica: disminuyó la abundancia de endófitos de raíz (*Serendipita*, *Archaeorhizomyces*) y aumentó la de HMAs asociados a gramíneas introducidas (*Funneliformis*, *Paraglomus*). En bacterias se observó una “homogeneización” comunitaria y el ascenso de degradadores de materia orgánica compleja (*Alistipes*, *Dactylosporangium*) junto con familias metilotróficas. La red HMA-bacterias fue numéricamente grande (129 nodos) pero menos modular que en CN, indicando que, aun con nuevas asociaciones, la sustitución de especies vegetales reduce la diversidad de interacciones microbianas. En síntesis, los tres caminos de intensificación mejoran el suministro de nutrientes y la productividad forrajera, pero lo hacen a costa de simplificar los vínculos simbióticos y saprótrofos que sostienen la resiliencia biogeoquímica del campo natural.

Más allá de sus particularidades, las tres opciones de intensificación comparten dos rasgos: (i) simplifican las redes simbióticas HMA-bacterias que sostienen la resiliencia biogeoquímica del CN, y (ii) desplazan el microbioma hacia taxones oportunistas asociados a flujos inorgánicos de nutrientes y, potencialmente, a mayor incidencia de patógenos. Estos hallazgos refuerzan la idea de que la productividad a corto plazo obtenida con insumos externos o con cambios drásticos de vegetación puede comprometer la estabilidad ecológica a largo plazo. Diseñar estrategias de manejo que restablezcan mutualismos claves (leguminosas nativas, inoculación selectiva de rizobios y HMA) y que modulen la dosis y la forma de los fertilizantes se perfila como una vía para compatibilizar intensificación con la salud microbiana del suelo.

CAPITULO IV

Análisis del metagenoma edáfico en un gradiente de intensificación del uso del suelo

4.1 Introducción

4.1.1 Aplicaciones de la metagenómica al análisis funcional de suelos

El estudio de comunidades microbianas mediante metagenómica ha revolucionado nuestra comprensión de los procesos ecosistémicos que tienen lugar en el suelo (Vieira, et al 2021). A diferencia de los enfoques tradicionales basados en cultivo, la metagenómica *shotgun* permite explorar de forma no sesgada la composición y la funcionalidad del microbioma del suelo, tanto a través de la cuantificación de genes funcionales como del ensamblaje de genomas metagenómicos (MAGs) (Wu, et al 2022). Estas herramientas permiten detectar rutas metabólicas completas, evaluar la diversidad funcional, y asignar funciones a grupos microbianos específicos, proporcionando un amplio panorama al potencial metabólico que estructura a los ciclos biogeoquímicos en respuesta a distintos usos o manejos del suelo. En particular, el uso de metagenómica para cuantificar genes relacionados con el ciclo del carbono, nitrógeno y fósforo es clave para entender la capacidad de los suelos para sostener la fertilidad a largo plazo y mitigar los efectos del cambio ambiental global (Hu et al, 2025).

4.1.2 Ciclo del carbono en suelos y su regulación microbiana

Los microorganismos del suelo juegan un papel central en la transformación y almacenamiento del carbono orgánico, participando en procesos como la descomposición de residuos vegetales, la formación de materia orgánica y la emisión de CO₂ hacia la atmósfera. A través de estos procesos, el microbioma edáfico regula el balance entre la captura y la liberación de carbono en el suelo (Tao, et al. 2023). La diversidad y composición microbiana influyen en la eficiencia de estos procesos, y por tanto, en el potencial de los suelos para actuar como sumideros de carbono. Diversos estudios han demostrado que el uso intensivo del suelo puede alterar estas funciones, reduciendo la capacidad del suelo para acumular carbono debido a cambios en la actividad microbiana, la disponibilidad de sustratos y la estabilidad de la materia orgánica (Xue et al, 2022; Romdhane et al, 2022). Así, las comunidades microbianas responden de forma sensible a la intensificación en el uso del suelo, afectando los mecanismos de secuestro de carbono en el suelo.

Se ha descrito que una vía importante de estabilización de carbono en el suelo se da a través de la absorción de compuestos orgánicos por microorganismos, su crecimiento y formación de biomasa y posterior muerte celular. Como resultado de este proceso se da la formación de necromasa microbiana a partir del carbono inmovilizado previamente por la comunidad microbiana. A este proceso se lo ha llamado vía de degradación *in vivo*, ya que involucra la inmovilización de compuestos carbonados y formación de biomasa por microorganismos (Manzoni, et al 2024). También se han descrito vías de degradación *ex vivo* que involucran la actividad de enzimas hidrolíticas extracelulares para la degradación de compuestos orgánicos complejos (Calabrese, et al., 2022).

4.1.3 Ciclo del nitrógeno y el rol de los microorganismos

El ciclo del nitrógeno está fuertemente mediado por la acción de microorganismos que transforman el nitrógeno entre sus distintas formas químicas, regulando su disponibilidad para las plantas y sus posibles pérdidas al ambiente (Kuusemets, et al., 2025). La diversidad funcional del microbioma del suelo determina la capacidad de los sistemas edáficos para retener nitrógeno y minimizar emisiones contaminantes como óxidos de nitrógeno (Klimasmith, et al., 2022). Prácticas como la fertilización nitrogenada o la sustitución del campo natural por cultivos afectan la composición de las comunidades microbianas y su capacidad para transformar el nitrógeno, generando desequilibrios que pueden comprometer la eficiencia del uso de este nutriente (García, et al., 2022). La metagenómica ofrece una herramienta poderosa para detectar cambios en los perfiles funcionales microbianos vinculados al nitrógeno, y evaluar su relación con las presiones del manejo agrícola.

4.1.4 Ciclo del fósforo y su relación con el microbioma del suelo

A diferencia del carbono y el nitrógeno, el fósforo no tiene una fase gaseosa significativa y su disponibilidad en el suelo depende fuertemente de procesos microbianos que movilizan y mineralizan sus formas inorgánicas, orgánicas e incluso compuestos como los fosfonatos (Helfenstein, et al 2024). Estos últimos representan una fuente alternativa de fósforo que puede ser aprovechada por ciertos grupos microbianos capaces de degradarlos mediante rutas específicas, como las reguladas por el operón C-P lyase. La actividad microbiana influye directamente en la disponibilidad de fósforo para las plantas, especialmente en suelos donde este nutriente se

encuentra en formas poco solubles (Tian, et al 2021). Cambios en el uso del suelo pueden modificar la composición de la comunidad microbiana, afectando su capacidad para solubilizar, reciclar o explotar fuentes alternativas de fósforo. Prácticas como la fertilización excesiva pueden disminuir la diversidad funcional de microorganismos movilizadores, mientras que sistemas más biodiversos tienden a mantener una mayor funcionalidad microbiana para la movilización de este nutriente (Siles, et al 2022). La metagenómica permite evaluar estos cambios y comprender cómo las comunidades microbianas responden a las presiones de manejo y regulan el ciclo del fósforo.

4.1.5 Cambios en los ciclos biogeoquímicos ante la intensificación del uso del suelo

La intensificación del uso del suelo ya sea mediante la fertilización del campo natural, la sobresiembra de especies exóticas o el reemplazo de los pastizales por cultivos anuales, genera impactos profundos sobre la estructura y funcionalidad del microbioma edáfico. Estas transformaciones pueden modificar la abundancia y diversidad de genes funcionales relacionados con el ciclaje de nutrientes, afectando la sostenibilidad del sistema a largo plazo (Hartmann, et al 2023). En pastizales nativos, donde las comunidades microbianas han co-evolucionado con una vegetación diversa y poco intervenida, la intensificación puede inducir una pérdida de servicios clave como la retención de nitrógeno, el secuestro de carbono o la movilización de fósforo (Cole et al 2024). El uso de enfoques metagenómicos permite cuantificar estos cambios y establecer relaciones entre las prácticas de manejo y la capacidad funcional del suelo. Comprender estas relaciones es esencial para diseñar estrategias de manejo que conserven la funcionalidad del suelo y mitiguen los impactos ambientales asociados a la agricultura intensiva.

Este capítulo explora los cambios funcionales detectados en el microbioma de suelos a través de estrategias de metagenómica centrada en genes, donde se exploran los cambios en la abundancia de genes vinculados a los ciclos de Carbono, Nitrógeno y Fósforo y su respuesta en el gradiente de intensificación muestreado. A su vez, se utiliza una estrategia de reconstrucción de los genomas que se encuentran en mayor abundancia, de forma de lograr identificar grupos taxonómicos asociados a diferentes funciones en los sitios y usos del suelo muestreados.

4.2 Metodología

4.2.1 Generación de datos, procesamiento inicial y filtrado de lecturas

A partir de las muestras de suelo obtenidas en los dos capítulos anteriores, que incluyeron cuatro predios comerciales con rotaciones agrícolas y campo natural, así como cinco sitios experimentales de largo plazo (ELPs), se construyeron pools equimolares de ADN a partir de las extracciones correspondientes a un mismo sitio y uso del suelo, con el objetivo de realizar la secuenciación metagenómica tipo *shotgun*. Este procedimiento permitió generar un total de 24 muestras representativas de los principales sistemas evaluados: rotaciones agrícolas, campo natural intensificado (incluyendo tratamientos de fertilización, sobresiembra de leguminosas y adición de fósforo e implantación de pasturas) y campo natural como uso del suelo de referencia. Las extracciones de ADN fueron enviadas a las instalaciones de BGI Americas (San José, EE.UU.), donde se llevó a cabo la secuenciación metagenómica utilizando la plataforma DNBseq con lecturas pareadas de 100 pb de longitud, obteniéndose una profundidad aproximada de 12 Gb de datos crudos por muestra, lo que garantizó una cobertura suficiente para la caracterización funcional y taxonómica de las comunidades microbianas del suelo.

A partir de las secuencias (*reads*) obtenidas para cada muestra y se realizó un control de calidad y filtrado utilizando Trimmomatic v0.39 con los parámetros predeterminados (Bolger et al., 2014). Posteriormente, se exploraron diversas estrategias de ensamblaje de novo para optimizar la longitud de los contigs obtenidos. Se empleó SPAdes v3.15.3, optimizando los parámetros específicos para metagenomas con alta diversidad a través de metaSPAdes v3.15.3 (Nurk et al., 2017). Adicionalmente, se utilizó MEGAHIT v1.2.1 con la opción `--meta_large`, diseñada para ensamblar metagenomas de gran tamaño (Li et al., 2015). Finalmente, se evaluó una estrategia de co-ensamblaje por sitio, combinando las lecturas de diferentes tratamientos correspondientes a la misma ubicación geográfica. Para los análisis posteriores, se utilizaron exclusivamente los ensamblados individuales generados con el software MEGAHIT, y se evaluó la calidad de estos ensamblados mediante MetaQUAST v5.2.0 (Mikheenko et al., 2016).

4.2.2 Detección de genomas representativos y determinación de abundancia

Para la reconstrucción de genomas representativos de especies (Species Representative Genomes, SRGs) y la determinación de su abundancia relativa en las distintas muestras, se implementó un enfoque basado en el pipeline `metaWRAP v1.3.2` (Uritskiy et al., 2018). Esta herramienta integra los resultados de múltiples algoritmos de binning metagenómico, incluyendo `CONCOCT v1.1.0` (Alneberg et al., 2014) y `MaxBin2 v2.2.7` (Wu et al., 2016), para mejorar la integridad (completeness) y reducir la contaminación de los bins mediante un paso de refinamiento. A partir de estos resultados, se seleccionaron únicamente aquellos bins clasificados como de calidad media y alta, utilizando los criterios de integridad superior al 50% y contaminación inferior al 10% definidos por Bowers et al. (2017).

Con este conjunto de bins de alta calidad, se procedió a la dereplicación para obtener un conjunto no redundante de genomas representativos a nivel de especie, utilizando `dRep v3.2.2` (Olm et al., 2017). `dRep` aplica umbrales de similitud genómica (ANI, Average Nucleotide Identity) y considera métricas de calidad del ensamblado para seleccionar el genoma con la mejor combinación de integridad y baja contaminación como representante de cada especie. Posteriormente, se empleó `InStrain v1.6.1` (Olm et al., 2021), el cual utiliza la medida de "*breadth of coverage*" (fracción del genoma cubierta por las lecturas mapeadas de cada muestra) para determinar la presencia y abundancia relativa de cada SRG en la comunidad secuenciada. Esta medida se ajusta en función de la similitud esperada entre genomas de la misma especie y la integridad del genoma representativo, estableciendo umbrales específicos para cada SRG. Con base en los datos de presencia/ausencia y la abundancia relativa de estos genomas en cada muestra, se calculó la prevalencia de cada SRG en los diferentes tratamientos.

Por otra parte, para caracterizar funcionalmente estos genomas se utilizó el software `Prodigal (v2.6.3)` para anotar los ORFs de cada proteína (Hyatt et al., 2010), posteriormente las secuencias aminoacídicas predichas se compararon con los modelos de la base de datos `dbCAN-seq v7.0` (Zhang et al., 2018). Esta contiene modelos ocultos de Markov y reglas asociadas para la detección de CAZymes y su clasificación en familias funcionales. A partir de esta clasificación

se utilizó la información presente en este mismo software para asociar los sustratos que utiliza cada familia y su categorización según su origen microbiano o vegetal. Por otra parte, para detectar la presencia del Clusters de Genes Biosintéticos (BGCs) que pueden aportar a la estructuración de estas comunidades microbianas se utilizó el software **Antismash** (v7.0) (Blin et al, 2023) agregando la opción **--KnownClusterBlast**, la cual compara los resultados obtenidos con la base de datos MIBiG, que contiene información de BGCs acoplados a estructuras moleculares y su actividad biológica caracterizada (Terlouw et al, 2023). De esta forma, se reportaron como resultados únicamente los BGCs que coincidieran con alguna de las entradas de la base de datos MIBiG.

4.2.3 Caracterización del plasmidoma

Para explorar la composición de plásmidos asociados a las comunidades microbianas de las muestras, se analizó el plasmidoma utilizando el pipeline **plaSquid** (Giménez, 2022; disponible en <https://github.com/mgimenez720/plaSquid>). Este pipeline integra dos estrategias complementarias para la identificación de secuencias plasmídicas a partir de los ensamblados metagenómicos. En primer lugar, se buscan genes asociados a plásmidos como proteínas iniciadoras de la replicación (RIP), o relaxasas, a través de dominios conservados en estas proteínas. Por otro lado, se realiza una búsqueda por homología contra la base de datos **PLSDB** (Plasmid Sequence DataBase), cuya última versión (**PLSDB v2023_11_14**) contiene más de 76,000 secuencias plasmídicas completas (Galata et al., 2019). En este enfoque, los contigs metagenómicos se fragmentan en secuencias solapantes de 1,500 pares de bases (pb) con una ventana deslizante de 250 pb. El subconjunto resultante de fragmentos se alinea contra **PLSDB** utilizando **Minimap2 v2.26** (Li, 2018). A partir de los resultados del alineamiento, se calcula la identidad y la cobertura promedio para determinar una distancia de similitud (S). Se aplica un umbral de similitud del 45% para clasificar un *contig* como plasmídico y asignarle el plásmido de referencia correspondiente. Adicionalmente, el hospedero potencial de cada plásmido se infiere a partir del hospedero reportado para el plásmido de referencia en **PLSDB**. Los resultados de este análisis se visualizan mediante una red bipartita que conecta los nodos de los plásmidos identificados con sus posibles hospederos bacterianos.

4.2.4 Análisis de genes vinculados a los ciclos de nutrientes

Para evaluar las variaciones en la abundancia de genes asociados a los ciclos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno y fósforo en respuesta a los tratamientos, se emplearon diversas bases de datos funcionales específicas. En el caso de genes involucrados en el ciclo del carbono, se utilizó la base de datos CAZy (Carbohydrate-Active Enzymes) (Lombard et al., 2014), que clasifica familias de enzimas relacionadas con la síntesis y degradación de carbohidratos. La herramienta dbCAN-seq v7.0 (Zhang et al., 2018) se empleó para identificar las enzimas correspondientes a cada familia CAZy dentro de las proteínas predichas en los metagenomas, utilizando modelos ocultos de Markov (HMMs). En este análisis, se conservaron únicamente las familias de enzimas degradativas, específicamente las glicosil hidrolasas (GH), las carboxil esterasas (CE) y las polisacárido liasas (PL), que participan en la ruptura de enlaces glicosídicos, éster y en la degradación de polisacáridos, respectivamente. Una vez identificados los genes codificantes de CAZymes, se construyó un catálogo de genes no redundante a un 95% de identidad utilizando MMseqs2 v13.1 (Steinegger & Söding, 2017). Este catálogo de genes dereplicado se utilizó como referencia para cuantificar la abundancia de cada gen en los metagenomas individuales mediante el mapeo de las lecturas nuevamente con MMseqs2 v13.1. La abundancia relativa de cada gen en cada muestra se calculó y se normalizó a fragmentos por kilobase de gen por millón de lecturas mapeadas (FPKM). Estos valores de abundancia se organizaron en una tabla de conteos, que posteriormente se colapsó a nivel de familia CAZy. Finalmente, para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas en la abundancia de estas familias de enzimas entre los tratamientos, se empleó el software MaAsLin2 v1.8.0 (Mallick et al., 2021). En los modelos lineales generalizados implementados en MaAsLin2, se incluyó el tratamiento de Campo Natural como nivel de referencia y los sitios y las temporadas de muestreo se consideraron como variables de efecto aleatorio para controlar la variabilidad inherente al diseño experimental pareado.

Para el análisis de genes involucrados en el ciclo del nitrógeno, se utilizó la base de datos NCycdb (Nitrogen Cycling genes database) (Tu et al., 2019). Esta base de datos comprende un total de 84,759 secuencias representativas, clasificadas en 68 subfamilias funcionales que se asocian a 8 procesos clave del ciclo del nitrógeno. NCycdb también proporciona herramientas para la búsqueda de estos genes en datos metagenómicos. En este estudio, se empleó el software DIAMOND v2.0.13 (Buchfink et al., 2015) para detectar la presencia de genes del ciclo del nitrógeno en las

secuencias proteicas predichas de los metagenomas, utilizando los valores de corte predeterminados implementados en la herramienta ($Evalue < 10^{-5}$). De manera similar al análisis de las enzimas CAZy, se construyó un catálogo de genes no redundante a un 95% de identidad utilizando MMseqs2 v13.1 (Steinegger & Söding, 2017). Este catálogo se empleó como referencia para mapear las lecturas de cada metagenoma utilizando el mismo software. Los resultados del mapeo se colapsaron a nivel de subfamilia de genes del ciclo del nitrógeno, y nuevamente se utilizó el software MaAsLin2 para identificar diferencias significativas en la abundancia relativa de estas subfamilias entre los tratamientos, utilizando la misma estrategia de modelado que para las enzimas CAZy.

Por último, para el análisis de genes relacionados con el ciclo del fósforo, se utilizó la base de datos PcycDB (Phosphorus cycling genes database) (Zeng et al., 2022). Esta base de datos contiene 320,183 secuencias, agrupadas en 139 familias de genes involucradas en el ciclo del fósforo, las cuales se vinculan a 9 procesos metabólicos del fósforo en bacterias. Para la búsqueda de proteínas anotadas en los metagenomas contra la base de datos de referencia PcycDB, se utilizó el software DIAMOND, descartando aquellos alineamientos con una identidad o cobertura inferior al 70%. Posteriormente, se generó un catálogo de genes no redundante dereplicando las secuencias que presentaron una identidad y cobertura del 90% o superior, utilizando MMseqs2. A continuación, se realizó el mapeo de estas secuencias representativas contra las lecturas de cada metagenoma utilizando el mismo software. A partir de estos datos de mapeo, se sumaron los conteos de lecturas que se alinearon con genes pertenecientes a la misma familia de genes del ciclo del fósforo, y se calculó la abundancia relativa en FPKM, siguiendo la metodología descrita anteriormente. Finalmente, se empleó el software MaAsLin2 para determinar la significancia estadística de los cambios en la abundancia de las familias de genes del ciclo del fósforo entre los diferentes tratamientos, utilizando la misma estructura de modelos lineales generalizados con el tratamiento de Campo Natural como referencia y los sitios y temporadas como variables de efectos aleatorios.

4.3 Resultados

4.3.1 Análisis de abundancia de genes codificantes de CAZymes en metagenomas de suelos.

El análisis de abundancia diferencial de CAZymes en los distintos usos del suelo mostró variaciones significativas en comparación con el tratamiento de referencia: el campo natural. En aquellos tratamientos donde hubo adición de especies vegetales, como en agricultura, mejoramiento de campo natural y pasturas perennes, se observó un aumento en la abundancia de ciertas enzimas vinculadas a la degradación de polímeros de carbono presentes en plantas (Figura 4.1). Sin embargo, en todos los usos del suelo analizados, la mayoría de las CAZymes que presentaron cambios se encontraron en menor abundancia que en el campo natural. Una observación destacable es el hecho de que en ningún uso del suelo aumentó la abundancia relativa de genes que codifican enzimas vinculadas a la degradación de polímeros carbonados de origen microbiano, como la quitina, el peptidoglicano y/o EPS.

La agricultura fue el tratamiento que presentó mayor cantidad de enzimas con una abundancia relativa superior a la del campo natural, con un total de diez familias de glicosil hidrolasas, relacionadas con la degradación de compuestos carbonados de origen vegetal, que aumentaron su abundancia. A su vez, la agricultura también mostró el mayor número de CAZymes codificadas que disminuyeron su abundancia respecto a los valores obtenidos en campo natural. Un total de veintitrés enzimas disminuyeron su abundancia de manera significativa, de las cuales ocho tienen como sustrato polímeros de origen microbiano. El segundo tratamiento con mayor variación fue el de fertilización, donde se detectó una disminución en la abundancia de once enzimas relacionadas con la degradación de compuestos carbonados, incluyendo tres que tienen como sustratos polímeros de origen microbiano. Este tratamiento mostró la particularidad de que no se detectaron aumentos en la abundancia de CAZymes respecto al campo natural.

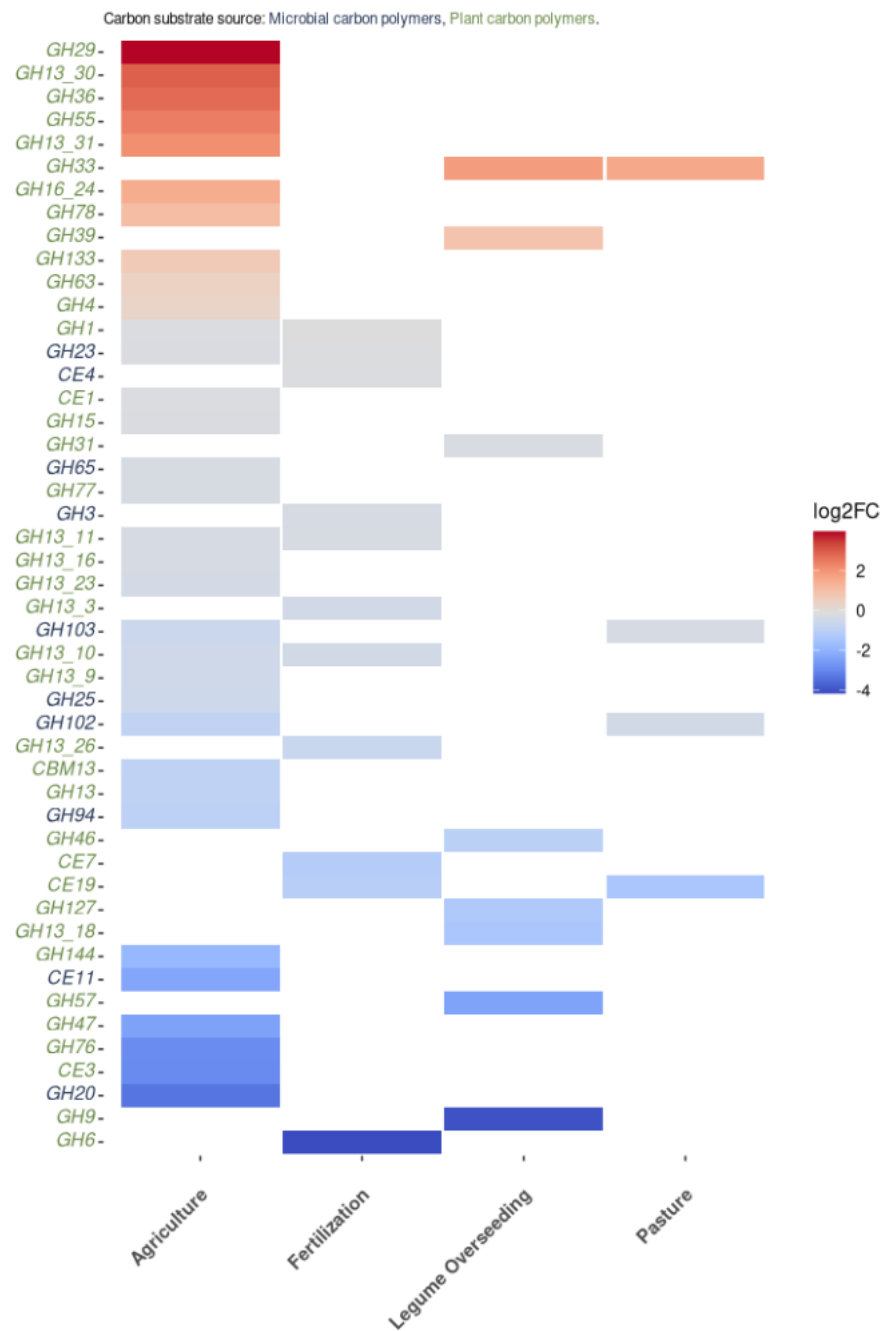


Figura 4.1. Mapa de calor mostrando las familias de CAZYmes codificadas por genes que cambian su abundancia de manera significativa en cada uso del suelo respecto al campo natural (rojo aumenta y azul disminuye su abundancia). Las enzimas en color verde refieren a familias que degradan compuestos de origen vegetal, mientras que las enzimas en color azul indican la degradación de compuestos de origen microbiano.

En el tratamiento de sobresiembra de leguminosas y adición de fósforo, seis enzimas mostraron una menor abundancia en comparación con el campo natural, mientras que solo dos presentaron una mayor abundancia. Todos los genes que mostraron cambios en su abundancia estuvieron vinculados a la degradación de polímeros carbonados de origen vegetal. Por otro lado, el tratamiento de pasturas perennes presentó la menor variación, con solo cuatro genes con cambios significativos en su abundancia respecto al campo natural. Dos de estos disminuyeron su abundancia respecto al campo natural y estuvieron vinculadas a la degradación de compuestos de origen microbiano, como es el caso de los genes que codifican enzimas de las familias GH102 y GH103.

Un patrón consistente en todos los tratamientos fue la pérdida de abundancia de genes vinculado a familias de CAZymes que utilizan como sustrato polímeros de carbono de origen microbiano, lo que sugiere un impacto generalizado en la degradación de estos compuestos bajo diferentes manejos del suelo. Estos resultados reflejan cómo los cambios en el uso de la tierra pueden influir en la estructura funcional de la comunidad microbiana y en los procesos de degradación y estabilización de la materia orgánica en los suelos.

4.3.2 Análisis de abundancia de genes vinculados al ciclo del nitrógeno en metagenomas de suelo

El análisis de abundancia diferencial de genes asociados al ciclo del nitrógeno mostró que la mayoría de los genes con cambios en su abundancia presentaron una disminución (*fold change* negativo) en comparación con el campo natural. Los únicos genes que aumentaron su abundancia respecto al tratamiento de referencia fueron *gdh* (K00261) y *glnA*, ambos involucrados en el metabolismo orgánico del nitrógeno, y *nirA*, relacionado con la reducción de nitrito a amonio. Estos aumentos se observaron principalmente en el tratamiento de pasturas, donde el único gen que mostró una disminución en su abundancia fue *gs* (K15371), el cual se encuentra vinculado al metabolismo orgánico del fósforo (Figura 4.2).

El tratamiento de mejoramiento de campo natural, caracterizado por la adición de leguminosas y fósforo, mostró el menor número de cambios en comparación con el campo natural, con *gdh* (K00261) como el único gen que presentó un incremento en su abundancia. Esto contrasta notablemente con la sustitución del campo natural por agricultura y la fertilización del campo

natural (presumiblemente con fuentes de nitrógeno inorgánico como urea), las cuales tuvieron un impacto significativo en la reducción de la abundancia de genes involucrados en el ciclo del nitrógeno, lo que podría afectar el reciclado de este nutriente en el suelo. Los procesos más afectados negativamente incluyeron la desnitrificación, con una disminución en la abundancia de los genes *nirS*, *nirK* y *nosZ*; la fijación biológica de nitrógeno, con una disminución en la abundancia de *nifH*; la reducción asimilatoria y disasimilatoria de nitrato; así como distintos procesos vinculados al metabolismo orgánico del nitrógeno.

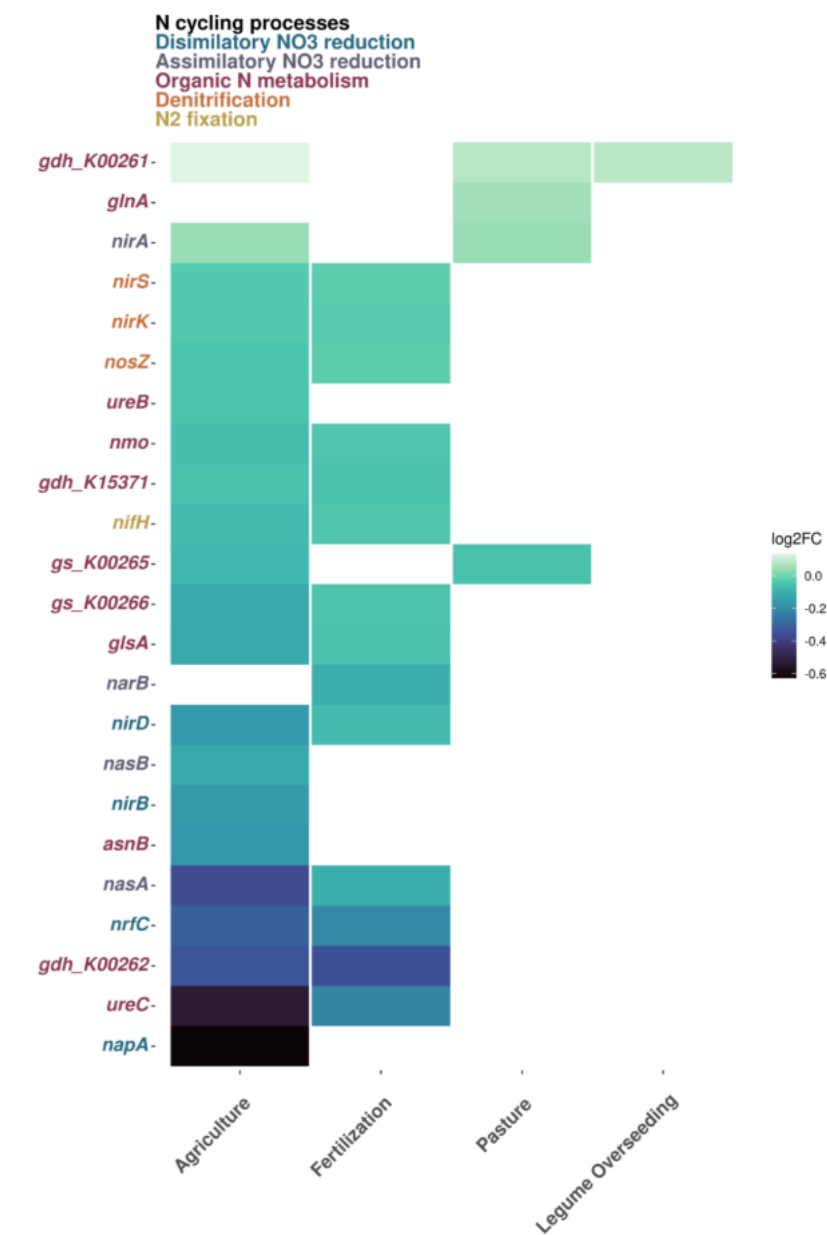


Figura 4.2. Mapa de calor mostrando los genes vinculados al ciclo del nitrógeno que cambian su abundancia de manera significativa (verde sube y negro disminuye su abundancia) en cada uso del suelo respecto al campo natural. Los colores de la etiqueta de cada gen refieren al proceso en los que se encuentran involucrados.

En concordancia con esto, la sobresiembra de leguminosas y la adición de fósforo no parecieron impactar negativamente en la abundancia de genes del ciclo del nitrógeno, sugiriendo que la introducción de fuentes de nitrógeno orgánico a través de leguminosas tiene un efecto menor en la alteración de la abundancia de estos genes en comparación con la adición de fertilizantes nitrogenados inorgánicos. Finalmente, la sustitución del campo natural por pasturas mostró un efecto positivo sobre la abundancia de genes relacionados con el metabolismo orgánico del nitrógeno, lo que sugiere que este manejo puede favorecer ciertos procesos biogeoquímicos vinculados a la transformación y disponibilidad de este nutriente en el suelo, algunos de los sitios muestreados con pasturas también incluyeron especies de leguminosas.

4.3.3 Análisis de abundancia de genes vinculados al ciclo del fósforo en metagenomas de suelo

El análisis de abundancia diferencial de genes asociados al metabolismo del fósforo mostró que la agricultura es el uso de la tierra con mayores cambios en comparación con el campo natural. En este tratamiento, se detectó una disminución en la abundancia de 24 genes, mientras que solo 6 genes presentaron un incremento respecto al tratamiento de referencia. Dentro de los genes que disminuyen su abundancia en suelos agrícolas, se destacaron los vinculados al operón *phn*, el cual regula la utilización de fosfonatos como fuente de fósforo. Además, se observaron cambios en la abundancia de genes vinculados a sistemas de regulación del metabolismo del fósforo como *phoB/phoR*, y cambios en genes vinculados al transporte de compuestos orgánicos fosforados como *ugpC* y *phnT*.

En contraste, la fertilización tuvo un impacto menor, con solo tres genes mostrando una disminución en su abundancia; estos estuvieron asociados a la degradación de fosfonatos y al metabolismo de compuestos orgánicos. A su vez, dos genes aumentaron su abundancia en este tratamiento y estuvieron vinculados al metabolismo orgánico del fósforo y a la regulación de la obtención de fosfatos: *ndk* y *phoH*.

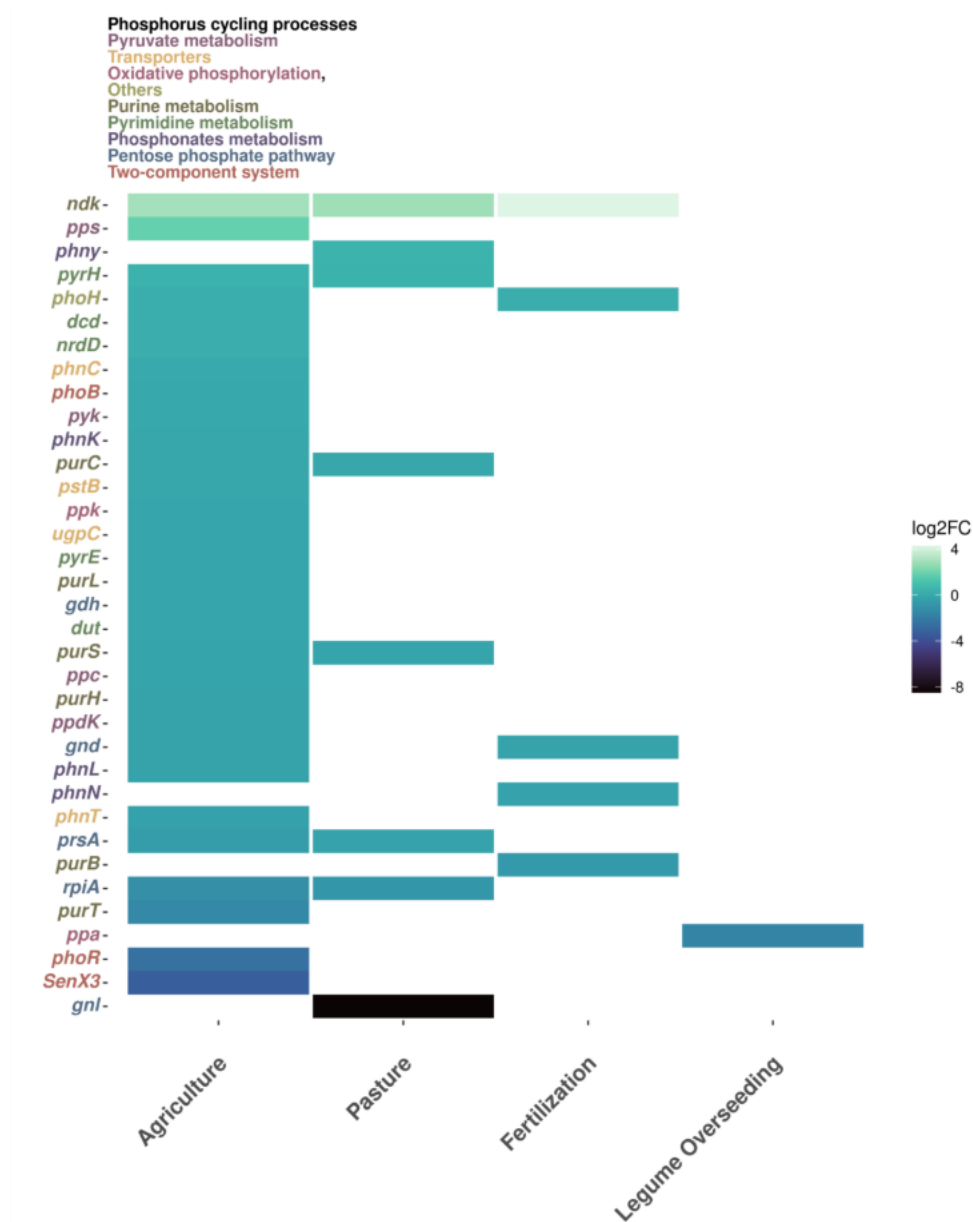


Figura 4.3. Mapa de calor mostrando los genes vinculados al ciclo del fósforo que cambian su abundancia de manera significativa en cada uso del suelo, utilizando como referencia el campo natural. Los colores claros muestran un aumento en la abundancia mientras que colores oscuros muestran una disminución en la abundancia relativa de genes. Los colores de la etiqueta de cada gen refieren al proceso en los que se encuentran involucrados.

El tratamiento de pasturas mostró mayor número de cambios que el tratamiento de fertilización en este caso, destacándose la disminución en la abundancia del gen *gnt*, el cual está relacionado con

el metabolismo de fosfonatos. Además, otros cuatro genes vinculados al metabolismo de fosfonatos y purinas también presentaron una reducción en su abundancia en este tratamiento. Es importante considerar que la base de datos utilizada en este análisis se centra en genes asociados al metabolismo orgánico del fósforo, lo que puede influir en la interpretación de los cambios detectados en los distintos tratamientos. Resulta interesante el hecho de que la sobresiembra de leguminosas y adición de fósforo haya sido el tratamiento con menor cantidad de genes afectados en su abundancia respecto al campo natural, ya que en este caso se adiciona específicamente este nutriente. Sin embargo, se observa la misma tendencia que para genes vinculados al ciclo del nitrógeno donde este uso del suelo presenta poca variación en la abundancia de genes respecto al campo natural.

4.3.4 Análisis de plasmidoma en metagenomas de suelos

El análisis de secuencias plasmídicas en los metagenomas de suelo reveló una baja detección de plásmidos en comparación con estudios previos en microbiomas de otros ambientes. Esta diferencia podría estar relacionada con la limitada representación del microbioma del suelo en las bases de datos utilizadas para la anotación, lo que dificulta la identificación y caracterización de secuencias plasmídicas en este tipo de ecosistemas.

Entre los principales hospederos de los plásmidos detectados se encontraron diferentes especies del género *Bradyrhizobium*, con una alta diversidad de plásmidos asociados. En particular, *Bradyrhizobium* sp. presentó 17 plásmidos diferentes, seguido por *B. japonicum* con 11 plásmidos, *B. barranii* con 6 plásmidos, *B. diazoefficiens* con 3 plásmidos, y *B. elkanii* con 2 plásmidos. Otro género con una notable cantidad de plásmidos fue *Priestia*, con 18 plásmidos en *P. megaterium* y 3 en *P. aryabhattai*. Asimismo, se identificaron plásmidos en diferentes especies del género *Streptomyces*, aunque en menor cantidad en comparación con los otros grupos mencionados (Figura 4.4).

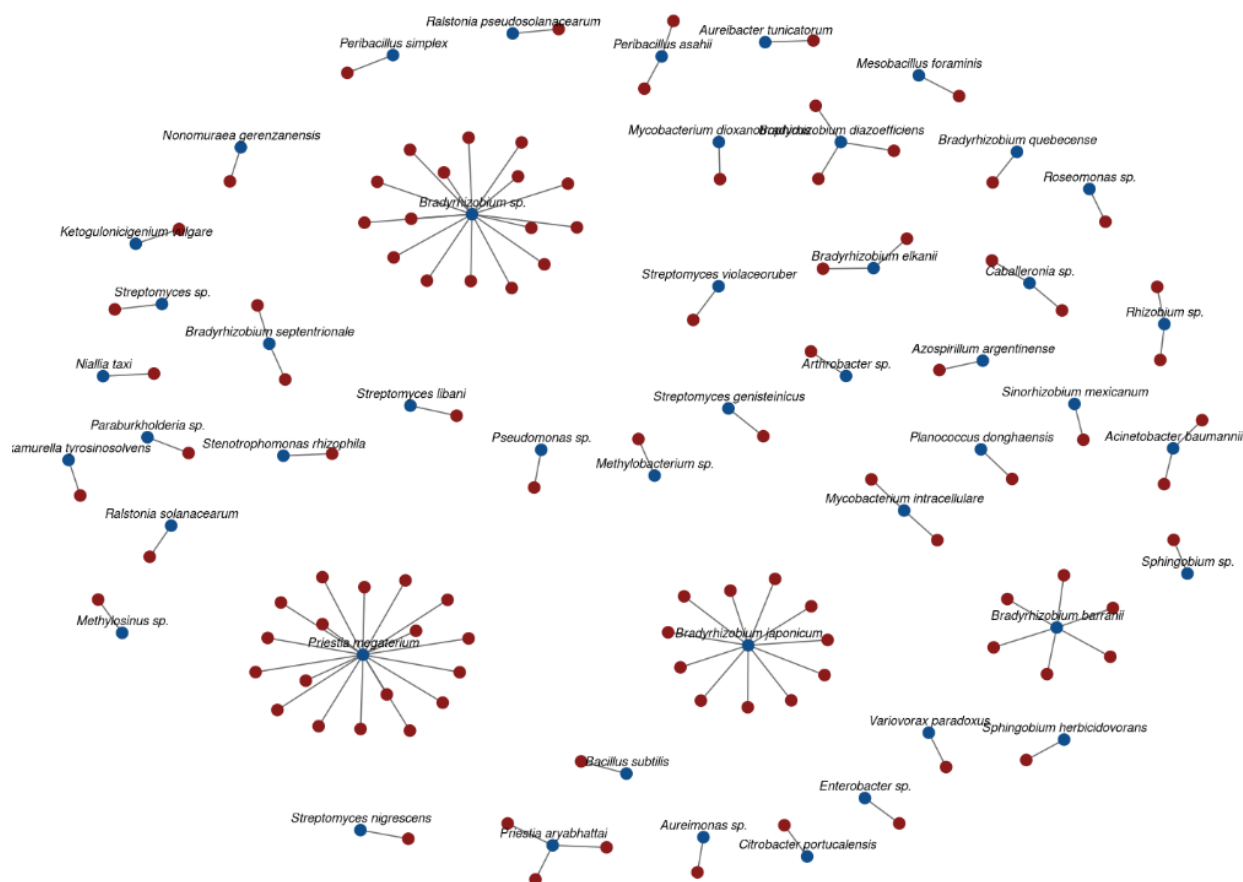


Figura 4.4. Red bipartita de hospederos y plásmidos detectados a través de plaSquid en todos los metagenomas analizados. Los diferentes contigs pertenecientes a un mismo plásmido se colapsaron en un nodo de color rojo, estos se unen a nodos de color azul que representan a sus hospederos bacterianos.

En términos funcionales, no fue posible asignar funciones biológicas específicas a la mayoría de los plásmidos detectados. La gran proporción de proteínas anotadas fueron clasificadas como hipotéticas, lo que refuerza la idea de que los plásmidos del microbioma del suelo están subrepresentados en las bases de datos actuales. Dentro del pequeño subconjunto de proteínas con funciones asignadas, la mayoría estuvieron vinculadas a la evolución de secuencias plasmídicas, destacándose aquellas relacionadas con la movilidad genética, como transposasas y secuencias de inserción.

Estos resultados sugieren que los plásmidos en comunidades microbianas del suelo pueden desempeñar un papel aún poco caracterizado en la ecología microbiana y en la dinámica de transferencia genética horizontal, lo que resalta la necesidad de mejorar las bases de datos y

estrategias bioinformáticas para una caracterización más precisa de estos elementos genéticos en ambientes edáficos.

4.3.5 Análisis de genomas representativos de especies en datos metagenómicos.

El análisis de genomas representativos de especie (SRGs) en los metagenomas de suelo permitió evaluar la distribución y prevalencia de los MAGs dereplicados a nivel de especie en los distintos tratamientos. Se consideraron aquellos SRGs detectados mediante InStrain con una amplitud de cobertura (breadth of coverage) mayor a la esperada, en función de la integridad de cada MAG, lo que permitió identificar diferencias en su representación dentro de cada tratamiento. A nivel filogenético, en la Figura 5 se observa un predominio del filo *Actinobacteriota*, seguido por el filo *Proteobacteria* y, en menor medida, el filo *Verrucomicrobiota*, con variaciones en la prevalencia de los distintos SRGs en función del tratamiento evaluado.

Dentro del filo *Proteobacteria*, el género VAZQ01, perteneciente a la familia *Xanthobacteraceae*, mostró una amplia distribución en todos los tratamientos, lo que sugiere su capacidad de adaptación a diferentes condiciones edáficas. Este género podría también estar presente dentro de las ASVs clasificadas a nivel de familia en los análisis de 16S rRNA, lo que indicaría su presencia recurrente en el microbioma del suelo analizado. Otro de los géneros con alta prevalencia fue *BOG-931*, también perteneciente a la familia *Xanthobacteraceae*, aunque con una notable ausencia en el tratamiento de agricultura, donde su prevalencia fue nula para 9 de los 10 SRGs detectados de este género (Figura suplementaria 1). La ausencia de este grupo en suelos agrícolas podría estar relacionada con cambios en la disponibilidad de nutrientes o con la competencia con otras poblaciones microbianas favorecidas bajo este manejo. El tamaño genómico recuperado para estos SRGs fue variable con algunos superando las 4 Mb, lo cual indicaría que su tamaño genómico no es estrictamente reducido. Por otra parte, la presencia de enzimas degradativas de polímeros vegetales en estos genomas es baja comparada con el resto de los SRGs obtenidos. A su vez, se detectó la presencia de clústers de genes biosintéticos que podrían sintetizar compuestos antimicrobianos.

Dentro de las características asociadas al Phylum *Proteobacteria* detectamos una baja capacidad biosintética de compuestos bioactivos, con algunos genomas de *VAZQ01* codificando enzimas para la biosíntesis de compuestos antimicrobianos. A su vez, estos genomas también muestran un bajo

número de genes que codifican enzimas para degradación de compuestos carbonados, solamente uno de los genomas supera los 50 genes codificados que degradan polisacáridos ya sean de origen microbiano o vegetal.

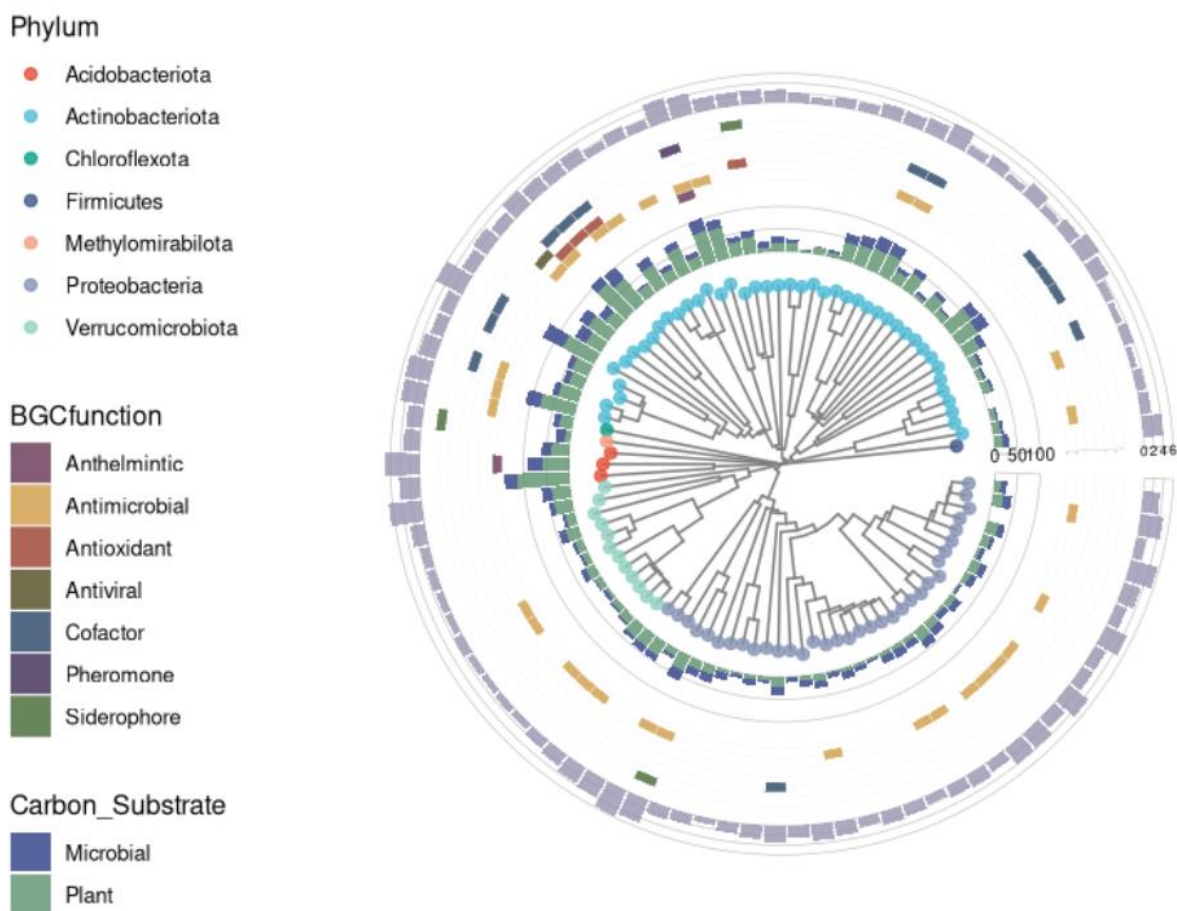


Figura 4.5. Árbol filogenético de SRGs detectados en las diferentes muestras, el color de las puntas de las ramas indica el Phylum al que pertenece cada SRG. En el primer anillo se muestra el número de genes que codifican CAZymes degradativas de polímeros de carbono de origen microbiano (azul) y vegetal (verde), en el siguiente anillo se muestra un mapa de presencia ausencia de clusters de genes biosintéticos (BGCs) de compuestos con diferentes actividades indicadas en colores. Por último, el gráfico de barras más externo indica el tamaño genómico recuperado para cada SRG variando entre 0 y 6 Megabases.

En cuanto al phylum *Verrucomicrobiota*, uno de los géneros con mayor prevalencia fue el género candidato *Udaeobacter*, del cual no existen aislamientos cultivables y que representó el 80% de los SRGs recuperados para este filo. Dentro de los 9 SRGs identificados para este género, 3 no fueron detectados en los tratamientos de fertilización ni de agricultura, lo que sugiere que las condiciones de estos sistemas podrían afectar su establecimiento o persistencia en la comunidad

microbiana del suelo (Figura Suplementaria S6). Se ha descrito que *Udaeobacter* es auxótrofo para varios aminoácidos y vitaminas, lo cual se condice con el tamaño genómico reducido obtenido para estos SRGs. A su vez, esto podría ayudar a explicar el bajo número de genes que codifican CAZymes degradativas de polímeros de origen vegetal y microbiano presentes en este género.

Por otro lado, dentro del phylum *Acidobacteriota* y *Actinobacteriota* se detectaron genomas con un gran número de genes que codificaban CAZymes que tienen como sustrato polímeros de origen vegetal principalmente, pero también de origen microbiano. El número de copias de estos genes fue mucho mayor que los obtenidos para el phylum *Proteobacteria* y *Verrucomicrobiota*, donde en algunos casos se superaron los 100 genes codificantes de CAZymes degradativas. Incluso en algunos casos con tamaños genómicos medios cercanos a los 4 Mb. De la misma forma, el número de clusters de genes biosintéticos y la función de estos fue más diversa para el filo *Actinobacteriota*, donde se encontró la capacidad de producir antimicrobianos, antioxidantes, co-factores y sideróforos, entre otros compuestos bioactivos. Dentro de este filo, se identificaron 4 SRGs pertenecientes al género *Palsa-504*, clasificado dentro de la familia *Streptosporangiaceae*. A diferencia de otros grupos, ninguno de estos SRGs estuvo presente en el tratamiento de mejoramiento de campo natural, lo que sugiere una posible sensibilidad a las condiciones promovidas por este tipo de manejo.

Finalmente, se identificaron dos clusters de SRGs clasificados únicamente a nivel de familia. Uno de ellos perteneciente a la familia *Propionibacteraceae*, con 4 SRGs, y el otro a la familia *Rubrobacteraceae*, también con 4 SRGs. Ambas agrupaciones mostraron una prevalencia significativamente mayor en suelos agrícolas, mientras que en otros tratamientos, incluida la referencia de campo natural, fueron escasos. En particular, dentro de la familia *Rubrobacteraceae*, el único género descrito hasta el momento es *Rubrobacter*, un taxón reconocido por su resistencia a la desecación, a la radiación y su capacidad de tolerancia a altas temperaturas, características que podrían explicar su mayor abundancia en suelos manejados bajo prácticas agrícolas intensivas, donde la perturbación y la exposición a condiciones ambientales extremas pueden ser más frecuentes.

Este análisis destaca la diferenciación en la composición de los SRGs entre tratamientos y sugiere que las prácticas de manejo del suelo pueden influir en la persistencia y distribución de grupos

microbianos específicos, afectando la estructura y función de la comunidad microbiana en estos ecosistemas.

4.4. Discusión

El análisis integral de los metagenomas de suelo revela cambios funcionales significativos en respuesta a diferentes usos del suelo. En este sentido, la aplicación de una estrategia de metagenómica centrada en genomas puede ayudar a elucidar el rol de distintos grupos microbianos asociados a cada tipo de uso (Fierer, 2009; Delgado-Baquerizo et al., 2016). En primer lugar, se detectó una alta prevalencia de *VAZQ01* y *BOG-931*, ambos pertenecientes a la familia *Xanthobacteraceae*, la cual ha sido vinculada con procesos como la fijación biológica de nitrógeno (Oren, 2014). En particular, el género *VAZQ01* ha sido asociado con la supresión de enfermedades como el marchitamiento por *Fusarium* y con modificaciones en el uso del suelo. En este sentido, se detectaron algunos SRGs con baja prevalencia en suelos agrícolas que codifican compuestos antimicrobianos en su genoma, lo cual podría estar vinculado a estos efectos. Además, este género ha sido descrito como hospedero de una importante diversidad de bacteriófagos (Yadav et al., 2023; Lyons et al., 2025).

Por otra parte, se han reconstruido varios MAGs correspondientes al género candidato *Udaeobacter*. A pesar de no contar con aislamientos de este género, los análisis genómicos lo describen como auxótrofo para diferentes vitaminas y aminoácidos (Brewer et al., 2016). Además, se asocia con la utilización de compuestos carbonados derivados de otros microorganismos, lo que sugiere su relevancia en el reciclaje de compuestos orgánicos solubles (Willms et al., 2020), especialmente en ecosistemas con menor intervención antrópica. Es interesante destacar que, en ambientes oligotróficos como el suelo, la auxotrofia no parece estar muy extendida (Ramoneda et al., 2023). Sin embargo, se ha reportado que la abundancia de este género correlaciona con mayores índices de salud del suelo (p. ej., altas concentraciones de materia orgánica), lo cual lo posiciona como un buen bioindicador de suelos no degradados. Esta observación también se ha extendido a otros microorganismos con genomas reducidos (Wilhelm et al., 2023). Este tipo de microorganismos, con auxotrofías definidas y tamaños genómicos pequeños, han sido clasificados como descomponedores pasivos, ya que dependen de una buena disponibilidad de compuestos orgánicos simples para establecerse (Morrissey et al., 2023). En este sentido, los compuestos

orgánicos solubles (DOC) constituyen un recurso clave para su desarrollo y podrían explicar las variaciones en la abundancia de este microorganismo bajo diferentes opciones de intensificación.

A partir del análisis de SRGs, se detectó que la mayoría de los genomas pertenecientes al phylum *Actinobacteriota* presentan un importante arsenal de enzimas vinculadas a la degradación de compuestos carbonados, tanto de origen vegetal como microbiano. Esto contrasta con la baja capacidad degradativa codificada en los genomas de *Proteobacteria* y *Verrucomicrobia*, aunque no con los pocos SRGs detectados de *Acidobacteriota*. Además, se observó una amplia presencia de BGCs en los SRGs de *Actinobacteriota*, lo cual ya ha sido reportado previamente (van Bergeijk et al., 2020; Zhang et al., 2024). Este phylum posee una gran capacidad para la producción de compuestos bioactivos, con diversas aplicaciones biotecnológicas (Schniete et al., 2024), destacándose la producción de antimicrobianos como metabolitos fundamentales para la competencia y la señalización en comunidades microbianas. A partir de la gran diversidad de actinobacterias muestreadas y de la detección de BGCs asociados mayoritariamente a estructuras moleculares desconocidas, el microbioma de campo natural podría representar un reservorio de valor biotecnológico aún no explorado.

Según el marco conceptual de Estrategias Ecológicas para la Adquisición de Carbono desarrollado por Morrissey et al. (2023), los microorganismos saprótrofos pueden clasificarse en: i) descomponedores primarios, que utilizan polímeros de origen vegetal como fuente de carbono; ii) descomponedores secundarios, que degradan y utilizan necromasa microbiana; iii) descomponedores pasivos, que se alimentan de DOC y compuestos carbonados simples; y iv) predadores, que utilizan biomasa microbiana como fuente de carbono. Al analizar la distribución de enzimas asociadas a diferentes compuestos carbonados, se observa que no existen SRGs que codifiquen exclusivamente enzimas para la degradación de compuestos de origen vegetal o microbiano. Por lo tanto, estructurar las comunidades microbianas en descomponedores primarios y secundarios como grupos discretos puede inducir a errores. Aunque se ha observado cierta preferencia de algunos microorganismos por utilizar necromasa microbiana como fuente de carbono, esta capacidad no parece ser exclusiva de un grupo taxonómico particular (Zheng et al., 2021). Además, comprender si estas funciones metabólicas son transferibles entre microorganismos podría aportar información valiosa sobre la evolución de las comunidades microbianas del suelo y su adaptación a cambios en el uso del suelo.

En este contexto, los plásmidos detectados en algunas especies de *Bradyrhizobium*, *Priestia* y *Streptomyces* podrían desempeñar un papel clave en la transferencia horizontal de genes, facilitando la adquisición de funciones adaptativas que incrementan la resiliencia y capacidad de adaptación local de las comunidades microbianas (Thomas & Nielsen, 2005; Finks et al., 2024). En este análisis, la presencia de transposones, secuencias de inserción y otros genes vinculados al procesamiento del ADN sugiere un enriquecimiento en elementos genéticos móviles dentro de las secuencias clasificadas como plasmídicas. Sin embargo, la fragmentación de los ensamblados, atribuida principalmente a la secuenciación con lecturas muy cortas (100 bp) y a la elevada diversidad presente en las muestras de suelo, limitó la detección de secuencias plasmídicas asociadas a funciones biológicas de interés. El impacto de esta fragmentación sobre la identificación de plásmidos ha sido ampliamente documentado (Smalla et al., 2015; Arredondo-Alonso et al., 2017). La decisión de realizar pooles equimolares de ADN a partir de muestras compuestas podría haber favorecido una representación más homogénea de las áreas de estudio, aunque a expensas de una mayor diversidad de secuencias y, en consecuencia, ensamblados más fragmentados. Finalmente, la obtención de secuencias similares a plásmidos previamente reportados en *Bradyrhizobium* coincide con la alta prevalencia de este género observada en los diferentes sitios y tratamientos muestreados, tal como se discute en capítulos previos.

A partir del análisis metagenómico centrado en genes del ciclo del carbono, se identificaron cambios en la abundancia de genes vinculados al reciclaje de compuestos orgánicos. Este enfoque se ve favorecido por los avances, colaborativos y acumulados, en bases de datos y herramientas que clasifican secuencias funcionales del metabolismo del carbono (The CAZypedia Consortium, 2018). Además, se ha documentado que las variaciones en la abundancia de secuencias codificantes para CAZymes en muestras de suelo se correlacionan estrechamente con cambios en la actividad potencial de estas enzimas (Trivedi et al., 2016). En este sentido, el tratamiento de rotaciones agrícolas mostró el cambio más marcado en el potencial de reciclaje de compuestos orgánicos en comparación con el campo natural, evidenciado por una profunda alteración en la abundancia de genes que codifican CAZymes. Se observaron aumentos en 10 familias de glicosil hidrolasas involucradas en la degradación de polímeros vegetales, junto con una disminución en 23 familias de enzimas también asociadas a compuestos de origen vegetal. Este patrón podría estar vinculado con el drástico cambio en la cobertura vegetal, donde las especies nativas del campo natural son reemplazadas por cultivos monoespecíficos sucesivos, sostenidos mediante el uso de

herbicidas. Este cambio estructural en la vegetación podría explicar la profunda remodelación observada en la abundancia de CAZymes involucradas en la degradación de polímeros carbonados vegetales, fenómeno que ha sido reportado en estudios recientes (Huang et al., 2024).

La clasificación de CAZymes según su especificidad de sustrato —ya sea polímeros presentes en tejidos vegetales o en microorganismos— permitió detectar variaciones en las poblaciones de descomponedores. Esta clasificación según el origen de los sustratos es coherente con los resultados obtenidos en relación con los usos y coberturas del suelo muestreados. Tratamientos que implican la adición de especies vegetales en la cobertura del suelo (como el mejoramiento de campo natural y la siembra de pasturas perennes) o el reemplazo total de la vegetación nativa (como en agricultura) muestran un aumento en al menos una enzima asociada a la degradación de polímeros vegetales, acompañado de la pérdida de varias otras. Estos cambios podrían estar reflejando alteraciones en la estructura de descomponedores particularmente en respuesta a la identidad de las especies vegetales presentes (Zhu et al., 2024). La intensificación de las prácticas agrícolas, que modifica tanto la calidad como la disponibilidad de la materia orgánica en el suelo, podría estar alterando el potencial del microbioma para degradar material vegetal (Allison & Martiny, 2008; Hartmann et al., 2015).

Por otro lado, se observaron disminuciones en la abundancia de enzimas involucradas en la utilización de compuestos carbonados de origen microbiano, como quitina y peptidoglicano, en todos los tratamientos de intensificación. En particular, ocho enzimas disminuyeron su abundancia en agricultura, tres lo hicieron en el tratamiento de fertilización, y una en la siembra de pasturas perennes. En el tratamiento de mejoramiento del campo natural no se registraron pérdidas de enzimas asociadas al reciclaje de carbono microbiano. La disminución en el contenido de carbono orgánico observada en suelos agrícolas respecto al campo natural ha sido vinculada a una reducción del carbono de origen microbiano (Wang et al., 2021; Liang et al., 2019). Se ha demostrado que una vía muy importante de formación de materia orgánica en el suelo es a través de la acumulación de necromasa microbiana, formada a partir de los exudados radiculares de plantas (Qu, et al 2024). A partir de nuestros datos, se identifica un gradiente de afectación en el potencial para el reciclaje de necromasa microbiana medido a través del cambio en la abundancia de enzimas específicas para la utilización de polímeros de carbono microbiano. Posiblemente

como consecuencia de la menor disponibilidad de necromasa, la cual constituye el sustrato principal para algunos microorganismos descomponedores.

A partir del análisis del ciclo del nitrógeno se observa un gradiente en los cambios de abundancia de genes vinculados al ciclado de este nutriente. La asociación entre genes funcionales y diferentes pools o procesos de reconversión de nutrientes en el suelo ha sido recientemente demostrada, lo que permite utilizar estos cambios como indicadores de alteraciones en la ocurrencia de distintos procesos biogeoquímicos (Jia et al., 2025). En primer lugar, la conversión del campo natural a agricultura vuelve a ser el uso del suelo con mayor impacto sobre la abundancia de genes del ciclo del nitrógeno. Le sigue el tratamiento de fertilización del campo natural, en el cual no se modifica la cobertura vegetal, pero se incorpora nitrógeno en forma de urea. Esta práctica muestra efectos negativos significativos, evidenciados por una disminución generalizada de genes implicados en procesos esenciales como la fijación biológica de nitrógeno, la desnitrificación y la reducción de nitratos.

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) es un proceso metabólicamente costoso, por lo que se encuentra fuertemente regulado. Se ha reportado que la disponibilidad de amonio actúa como un inhibidor de este proceso, mediante la señalización mediada por proteínas PII (Dixon & Kahn, 2004). Asimismo, la presencia de nitrato también inhibe la FBN a nivel de planta, especialmente en la formación de nódulos en leguminosas (Okamoto et al., 2013). Dada su importancia para la sostenibilidad de los sistemas agrícolas, algunos grupos de investigación trabajan en el desarrollo de estrategias para desacoplar esta regulación de la disponibilidad de nitrógeno en suelos, lo que permitiría mantener su funcionalidad incluso bajo condiciones de alta concentración de N (Wen et al., 2021).

Por su parte, el proceso de desnitrificación —la conversión de nitrato (NO_3^-) a nitrógeno gaseoso (N_2)— representa una pérdida de nitrógeno para el suelo y está mediado por los genes *nirK*, *nirS* y *nosZ*. En nuestros resultados, se detectó una disminución en la abundancia de estos genes en los tratamientos de rotación agrícola y fertilización. Aunque las diferencias observadas fueron leves, resultaron estadísticamente significativas. Si bien existen reportes contradictorios sobre la abundancia de estos genes en distintos agroecosistemas (Yang et al., 2017), la mayoría indica un aumento de la desnitrificación en sistemas agrícolas fertilizados. Se ha propuesto que factores

ambientales como el pH, la relación P/N y la disponibilidad de NH_4^+ en el suelo pueden influir más que la propia composición microbiana en la regulación de los procesos de nitrificación y desnitrificación en suelos forestales fertilizados (Tang et al., 2019). La alta abundancia de genes asociados a la vía de desnitrificación en suelos de campo natural podría estar relacionada con la prevalencia del género *Bradyrhizobium*, cuyos genomas codifican las enzimas necesarias para este proceso (Bedmar et al., 2005; Obando et al., 2019).

Otro cambio relevante observado fue la disminución en la abundancia de genes asociados a la reducción desasimilatoria de nitratos, proceso en el cual el nitrato es transformado en amonio bajo condiciones anaeróbicas, actuando como aceptor final de electrones (Cheng et al., 2022). Este proceso convierte una forma altamente soluble y móvil de nitrógeno en otra de menor movilidad y mayor retención en el suelo (Li et al., 2023). Ha sido vinculado a suelos con altas concentraciones de carbono y nitrógeno, y a mayores tasas de ocurrencia en sistemas pastoriles (Cheng et al., 2022). Por otro lado, en el tratamiento con pasturas implantadas se observó un leve incremento en genes relacionados con el metabolismo orgánico del nitrógeno, lo que sugiere que la incorporación de especies vegetales puede modular favorablemente algunos procesos del ciclo del nitrógeno (Hu et al., 2015; Ramirez et al., 2012).

En el caso del ciclo del fósforo, la agricultura fue nuevamente el uso del suelo más impactado, con una disminución en la abundancia de 24 genes y un aumento sólo en 6, en comparación con el campo natural. El tratamiento de fertilización mostró un efecto más moderado, con disminución en apenas tres genes relacionados con la degradación de fosfonatos y el metabolismo de compuestos orgánicos. En el tratamiento con pasturas, sin embargo, se detectó una disminución significativa en genes clave como *gnl*, involucrado en el metabolismo de fosfonatos, junto con otros cuatro genes relacionados con la degradación de fosfonatos y purinas. Estos cambios podrían explicarse por la alteración en la disponibilidad de fósforo y por modificaciones en los aportes de materia orgánica al suelo inducidas por prácticas agrícolas intensivas (Lori et al., 2017).

La literatura respalda que la intensificación agrícola y la conversión de campos naturales a sistemas manejados provocan una disminución en la diversidad microbiana (aunque en esta tesis se observó una disminución en la diversidad de hongos y no de bacterias) y en la funcionalidad de los ciclos de nutrientes. Múltiples estudios han demostrado que el cambio en el uso del suelo afecta

negativamente los procesos bioquímicos del carbono, nitrógeno y fósforo, comprometiendo la sostenibilidad y resiliencia de los ecosistemas edáficos (Cole, et al 2024; Lauber et al., 2008; Ramirez et al., 2012). En contraste, prácticas de manejo menos invasivas —como la sobresiembra de leguminosas o la adición de fósforo— parecen atenuar estos efectos negativos, conservando en mayor medida la funcionalidad microbiana esencial para el reciclaje de nutrientes. En conjunto, estos hallazgos destacan la importancia de adoptar estrategias de manejo del suelo que mantengan la integridad de los procesos microbianos y, por ende, la sostenibilidad de los ecosistemas agrícolas.

4.5 Conclusión

En conjunto, el análisis metagenómico revela que la intensificación del uso del suelo genera cambios profundos en la estructura y funcionalidad del microbioma edáfico, con impactos directos sobre los ciclos del carbono, nitrógeno y fósforo. La conversión de campo natural a agricultura surge como el factor más disruptivo, asociado a pérdidas en la capacidad de reciclaje de necromasa microbiana, disminución de genes vinculados a la fijación biológica y desnitrificación, así como alteraciones importantes en el metabolismo del fósforo. En contraste, manejos menos invasivos, como la fertilización moderada o incluso la siembra de pasturas, muestran efectos más atenuados, conservando parte de la funcionalidad microbiana. Además, la presencia de géneros como *Udaeobacter* o la diversidad de Actinobacteriota con su potencial biotecnológico destacan el valor del microbioma de campo natural como reservorio clave de funciones ecológicas y metabólicas. Estos resultados evidencian que la resiliencia de los suelos frente a la intensificación depende de mantener comunidades microbianas diversas y funcionales, lo que subraya la necesidad de estrategias de manejo que prioricen la sostenibilidad y preserven la integridad de los procesos microbianos esenciales para la salud del suelo y la productividad a largo plazo.

CAPITULO V

Discusión

5.1 Alcances y limitaciones de los métodos utilizados.

Este trabajo constituye el primer estudio en evaluar los efectos de diferentes manejos de intensificación del uso del suelo sobre las comunidades microbianas en pastizales del Río de la Plata, según nuestras revisiones. A pesar de la importancia productiva de este bioma, sus comunidades microbianas siguen estando escasamente caracterizadas. Diversos estudios han demostrado que muchas conclusiones obtenidas en otros tipos de suelo, climas o regiones no son necesariamente extrapolables (Li, et al 2025). En Uruguay, el campo natural representa un recurso productivo de gran relevancia, cuya conservación y mejora productiva son objetivos prioritarios. Existen esfuerzos tanto académicos como productivos enfocados en su preservación, pero el conocimiento sobre los efectos de la intensificación del uso del suelo en las comunidades microbianas locales sigue siendo limitado. Este trabajo se propuso justamente cubrir ese vacío.

Los resultados obtenidos también buscan aportar insumos relevantes para la agronomía, dado el interés en comprender cómo distintos manejos afectan el recurso suelo y los procesos que inciden en la productividad. En este marco, se han establecido numerosos experimentos de largo plazo (ELPs) en diversas regiones del país, coordinados por múltiples instituciones, con el objetivo de evaluar los impactos de la intensificación del uso del campo natural. En este estudio se analizó el microbioma del suelo en cinco ELPs ubicados en distintas ecorregiones del Uruguay. Una de las principales fortalezas de estos estudios inter-ELP es su capacidad para detectar de forma robusta los efectos del manejo a escala país, al contemplar la variabilidad natural de las comunidades microbianas del campo natural (Richter et al, 2007).

Los experimentos de largo plazo son fundamentales en la investigación agronómica, ya que permiten estudiar los efectos acumulados de manejos a lo largo del tiempo, tal como ocurre en los sistemas productivos reales, donde la sucesión de cultivos tiene efectos en la estructuración del microbioma del suelo (Dang et al. 2024). En este sentido, existe una amplia evidencia sobre el llamado efecto legado en las comunidades microbianas del suelo: cambios estructurales o funcionales que persisten más allá de la perturbación o condiciones que los generó (Jing et al, 2022). Estos efectos pueden incluso manifestarse en el microbioma asociado a raíces u órganos de las plantas, con consecuencias directas sobre la productividad vegetal (Hannula et al, 2021).

Utilizar ELPs permite minimizar la influencia de estos legados previos y atribuir los cambios observados en el microbioma a los manejos aplicados de manera continuada en el tiempo.

La elección de técnicas de secuenciación masiva de amplicones, complementadas con metagenómica *shotgun*, permitió una caracterización precisa de los cambios en el microbioma edáfico. En este sentido, a través de ambas aproximaciones hemos obtenido información coherente y complementaria. A modo de ejemplo, observamos que la adición de nitrógeno al suelo se asocia con la pérdida de géneros tradicionalmente vinculados a la fijación biológica de nitrógeno, como *Bradyrhizobium* y miembros del orden *Azospirillales*. De forma consistente, se detectó también una disminución significativa en la abundancia del gen *nifH*, marcador funcional de la nitrogenasa. Estos resultados ponen de manifiesto que los resultados de ambas técnicas, secuenciación masiva de amplicones y metagenómica *shotgun*, son coherentes en señalar una reducción en el potencial de fijación biológica de nitrógeno bajo sistemas que implementan este manejo de intensificación.

Estas aproximaciones basadas en ADN han demostrado ser eficaces para detectar alteraciones microbianas, aunque también presentan limitaciones, como la detección de ADN de organismos muertos o inactivos (Carini, et al, 2017). Este fenómeno, conocido como ADN reliquia, puede tener mayor impacto en estudios longitudinales que comparan un mismo sitio en diferentes momentos, más que en comparaciones entre sitios con largos períodos de manejo diferenciado (Carini, et al, 2020). En este trabajo, el hecho de que los sitios muestreados presenten, como mínimo, seis años bajo el mismo régimen de manejo permite reducir significativamente el impacto del ADN reliquia, dado que su degradación ocurre a tasas constantes e independientes del organismo del cual proviene (Lennon, et al 2018). Sin embargo, esto debe ser tenido en cuenta al momento de diseñar muestreos que tengan como objetivo estudiar el ADN de suelos.

Las metodologías empleadas aquí ofrecen una caracterización exhaustiva a nivel de secuencias del microbioma del suelo en los distintos ELPs muestreados. Existen múltiples aproximaciones que se pueden utilizar para el análisis de estos datos, muchos de los cuales exceden los objetivos de esta tesis. En este sentido, la disponibilización pública de las secuencias generadas permite que futuros estudios agronómicos sobre estos ELPs incluyan la dimensión microbiana en sus análisis. Asimismo, contar con datos microbianos vinculados a variables agronómicas y ambientales favorece la inclusión de suelos uruguayos en meta-análisis globales y en modelos que predicen

respuestas del microbioma a diferentes manejos, un área donde la representación de América del Sur continúa siendo escasa (Zhou, et al, 2020, Jurburg, et al, 2024). Además, las herramientas bioinformáticas y protocolos utilizados constituyen un insumo valioso para otros investigadores que deseen reanalizar datos de sitios similares o aplicar metodologías comparables.

Este estudio también priorizó la estandarización del protocolo de muestreo, lo que permitió realizar comparaciones consistentes entre manejos y entre ELPs. Se ha demostrado que las muestras compuestas incrementan linealmente la diversidad detectada según el número de submuestras que incorporan, mientras que el área muestreada no tiene el mismo efecto (Jurburg, et al 2025). En este trabajo, las muestras compuestas tomadas en áreas delimitadas y replicadas de forma independiente se comportaron como réplicas técnicas reales. Así lo muestran las distancias de beta diversidad, que evidenciaron un fuerte agrupamiento entre réplicas de una misma parcela, confirmando una alta similitud composicional. Esto sugiere que el protocolo empleado genera datos consistentes y con bajo ruido proveniente de las metodologías de generación de datos. El uso de estándares validados por iniciativas globales, como el Earth Microbiome Project (<https://earthmicrobiome.org/protocols-and-standards/>), facilita la reutilización y la comparabilidad futura de los datos obtenidos.

5.2 Caracterización del microbioma de campo natural

A partir de los resultados obtenidos hemos detectado un gradiente de cambios en el microbioma de suelos, en función del uso del suelo analizado. Para obtener estos resultados, hemos utilizado como línea de base, el microbioma de suelo de campo natural. A partir del muestreo de diferentes sitios de nuestro país, los cuales se distribuyeron en 8 departamentos de Uruguay. Consideramos que este trabajo constituye el análisis más abarcativo, hasta el momento, del microbioma de suelo de pastizales uruguayos. Trabajos previos describieron la estructura de comunidades bacterianas y la prevalencia de diferentes Phylum en estas comunidades. En dicho análisis se describen diferentes variables fisicoquímicas que estructuran las comunidades bacterianas de suelos (Garaycochea, et al 2020). Sin embargo, esta caracterización no ahonda en las comunidades fúngicas y tampoco genera datos metagenómicos que permitan ensamblar genomas de los microorganismos más abundantes en estos suelos.

En cuanto a la caracterización de las comunidades microbianas hemos logrado avanzar en la descripción de algunos géneros que han sido prevalentes en los diferentes suelos. Por un lado, como fue mencionado anteriormente el género *Bradyrhizobium* contiene representantes que han sido aislados en simbiosis con leguminosas nativas como *Desmodium incanum* en el sur de Brasil. Estos aislamientos han sido efectivos en la nodulación y en el proceso de fijación biológica de nitrógeno (Silva, et al. 2020). Sin embargo, existen aislamientos de este mismo género obtenidos a partir de suelos de pasturas que carecen de los genes necesarios para la nodulación y que por lo tanto tampoco son fijadores de nitrógeno (Jones, et al 2016). A partir de esto resulta de interés continuar con la caracterización de aislamientos del género *Bradyrhizobium* obtenidos de suelos de campo natural.

Por otra parte, se logró detectar una importante prevalencia de ASVs pertenecientes al orden *Azospirillales*. El hecho de que la clasificación de esta, y otras, ASV con alta prevalencia haya sido consistentemente a nivel de orden, evidencia la poca caracterización y representación de los microbiomas de suelo nativos de Uruguay en bases de datos globales de microorganismos. Este efecto ha sido discutido anteriormente para el ambiente suelo en general (Choi, et al 2017). Sin embargo, debido a la importancia y al posible rol de este ASV en la disponibilización de nitrógeno llama la atención su poca caracterización taxonómica y funcional. En estudios anteriores, en ambientes similares del sur de Brasil se ha logrado describir la importancia de este grupo funcional para la fijación biológica de nitrógeno especialmente asociados a gramíneas del tipo C₄, que también se encuentran en suelos uruguayos (Marques et al, 2017). Sería interesante determinar la especificidad de esta asociación, de forma de poder determinar roles funcionales de especies vegetales y su microbioma asociado en el campo natural.

De la misma manera, hemos detectado alguna ASVs clasificadas dentro de la familia *Xanthobacteraceae* y que han sido muy prevalentes en los distintos sitios muestreados. La reconstrucción de múltiples genomas clasificados en el género BOG-931, a partir de la secuenciación *shotgun*, y su gran prevalencia en los suelos muestreados podría indicar que nos encontramos detectando los mismos microorganismos a través de dos estrategias de secuenciación diferentes, donde la reconstrucción de genomas, como es de esperar, permite una mayor resolución taxonómica que la secuenciación de un fragmento del ARNr 16S. Esto podría ser corregido generando datos de las secuencias completas del gen codificante del ARNr 16S a través de

tecnologías de secuenciación de lecturas largas (Hrovat, et al 2024). Para probar que aquellas secuencias de ASVs con mayor prevalencia se corresponden con los MAGs recuperados se deberían extraer las secuencias del ARNr 16S de MAGs y alinearlas contra secuencias representativas de ASVs.

Por otra parte, al analizar las ASVs y géneros fúngicos con mayor prevalencia en nuestro conjunto de datos, observamos géneros como *Fusarium*, *Alternaria* y *Verticillium*. Estos se encuentran asociados a patogenicidad en plantas (Thomma, 2003), aunque también contienen especies no patogénicas y pueden sobrevivir en suelo en un estilo de vida saprofítico (Veloso, et al 2021). De hecho, la expresión de enfermedades incluye la presencia de hospederos vegetales y de condiciones ambientales favorables para que ocurra el proceso de patogénesis (Karunarathna, et al 2021). Para pasturas se ha descrito que la pérdida de biomasa vegetal por patógenos fúngicos se define por un compromiso entre la energía requerida para la activación de mecanismos de defensa y la energía requerida para la formación de biomasa, esto también termina afectando la abundancia de patógenos fúngicos en las pasturas (Cappelli, et al 2020). Entender las dinámicas de patógenos fúngicos en pastizales de Uruguay puede permitir diseñar estrategias para aumentar la productividad vegetal, sobre todo en este ambiente donde la productividad está marcada por una importante estacionalidad (Jaurena, et al 2021). A su vez, en un contexto de cambio climático donde la distribución global de patógenos fúngicos podría cambiar en respuesta a diversos factores (Singh, et al 2023), resulta fundamental lograr una descripción de la línea de base de patógenos fúngicos en el bioma más extendido de Uruguay.

Por otra parte, la detección de hongos que pueden establecer simbiosis con la raíz de las plantas, como hongos micorrícicos arbusculares o ASVs pertenecientes al género *Serendipita*, permite inferir que este tipo de estrategias para la captación de nutrientes se encuentra extendida en pastizales nativos. Esto también ha sido modelado por estudios que buscan entender patrones de diversidad fúngica a nivel global, donde se predice una alta diversidad de hongos micorrícicos arbusculares en los pastizales templados del río de la plata (Mikryukov, et al 2023). Este efecto también ha sido confirmado en otros trabajos locales a través del muestreo de raíces directamente y el uso de microscopía para la detección del establecimiento de esta simbiosis en diferentes especies vegetales. A su vez, se ha establecido que el nivel de P disponible en el suelo es una variable importante en la modulación de diferentes estrategias de adquisición de fósforo, dentro

de las cuales se encuentra el establecimiento de la simbiosis micorrícica (Michelini, et al 2025). En este trabajo hemos detectado géneros que también han sido reportados para países como Argentina y Brasil que forman parte del bioma Pastizales del Río de la Plata. A partir de nuestro muestreo reportamos 378 ASVs dentro del Phylum *Glomeromycota*, lo cual constituye una diversidad muy importante si lo comparamos con las 25 especies reportadas para todo el territorio argentino entre 1997 y 2023 (Lugo, et al 2023).

A su vez, nuestro reporte parece ser el primero en detectar la alta prevalencia del género *Serendipita* en pastizales nativos de Uruguay. Si bien existen algunos reportes en Brasil, estos son principalmente asociados a orquídeas, las cuales no se encuentran ampliamente representadas en el campo natural uruguayo (Miranda et al, 2021). Existe información sobre la asociación de representantes de este género con algunas especies de pastos y por tanto su distribución en pastizales de diferentes latitudes ha sido reportada previamente (Ray, et al 2021; Lin, et al 2025). Sin embargo, se desconoce el impacto de esta simbiosis en la productividad de pastizales templados, más aún en el pastizal uruguayo. Teniendo en cuenta que existe evidencia de mejoras en la resistencia frente a *Fusarium* y también de mejoras en la performance frente a sequías (Sefloo, et al 2021; Boorboori & Zhang 2022), continuar estudiando esta simbiosis podría ser importante hacia la mejora en la productividad primaria de pastizales nativos en Uruguay.

5.3 Impacto de la intensificación en el uso del suelo sobre el microbioma de campo natural.

En este trabajo se evaluaron diferentes opciones de intensificación del uso del campo natural, cada una con manejos que pueden impactar de manera diferencial en el microbioma del suelo. Los resultados muestran que los sistemas ganaderos intensificados, incluyendo la fertilización moderada, el mejoramiento de campo natural y las pasturas implantadas, no generan cambios significativos en la diversidad alfa ni en la diversidad beta de bacterias y hongos. Este patrón sugiere que el microbioma del suelo presenta cierto grado de resistencia frente a manejos productivos de intensidad intermedia, posiblemente debido a la heterogeneidad del hábitat edáfico y la permanencia de coberturas vegetales que contribuyen a su estabilidad (Sinha et al., 2024; Arora, 2025).

En contraste, la agricultura con cultivos anuales se destacó como el uso del suelo más disruptivo. En este tratamiento se detectó una pérdida significativa de diversidad fúngica, lo que concuerda con reportes previos que asocian la intensificación agrícola a una reducción en la multifuncionalidad de las comunidades biológicas de suelo (Xue et al., 2023). Además, la implantación de pasturas perennes fue el otro tratamiento que mostró cambios en diversidad fúngica respecto al campo natural. Estos efectos podrían estar vinculados a una menor diversidad de la cobertura vegetal (Shen et al., 2021; Wang et al., 2022) y al uso de fungicidas ya sea de manera preventiva o curativa (de la Cruz et al., 2024; Zhang et al., 2024).

El análisis de la estructura de las comunidades confirmó esta tendencia: los cambios en la composición de comunidades fúngicas fueron significativos únicamente en agricultura, donde se observó un agrupamiento claro por uso del suelo. En los demás casos, tanto bacterias como hongos tendieron a agruparse por sitio de muestreo más que por manejo, lo que refleja el fuerte efecto de factores edáficos y ambientales locales. De hecho, estudios globales han mostrado que en orden de importancia la distancia geográfica entre sitios, la temperatura media anual, el pH del suelo y el contenido de nitrógeno explican gran parte de la variación en la composición fúngica, lo que hace esperable el patrón observado en esta tesis (Mikryukov et al., 2023).

En cuanto a la diversidad bacteriana, no se detectaron cambios significativos en ninguno de los tratamientos intensificados. Este resultado puede estar vinculado a la alta diversidad intrínseca de bacterias del suelo y a la limitada profundidad de secuenciación alcanzada en este trabajo. A escala global, se ha reportado que unos pocos taxones bacterianos dominan las comunidades edáficas y pueden enmascarar cambios sutiles bajo esfuerzos de secuenciación moderados (Delgado-Baquerizo et al., 2018). Asimismo, no se evaluaron cambios en diversidad funcional, un enfoque que en otros estudios ha mostrado ser más sensible para detectar alteraciones en la estructura de comunidades microbianas bajo intensificación agrícola (Bahram et al., 2018).

En conjunto, estos resultados confirman que la magnitud del impacto sobre el microbioma depende fuertemente del grado de disturbio físico-químico al que se somete al suelo y a alteraciones en la productividad primaria y su estacionalidad. Mientras que los sistemas ganaderos y mixtos mantienen comunidades relativamente estables, la agricultura convencional se posiciona como la práctica más disruptiva, generando cambios profundos en la estructura y diversidad del microbioma edáfico (Parameswari et al., 2025; Viñas et al., 2025; Shamshitov et al., 2025). Debido

a la baja resolución de los datos físico-químicos generados, donde contamos con un dato para cada sitio y tratamiento, no se exploraron de manera detallada los cambios en estructura de las comunidades microbianas dados por las variables físicoquímicas como pH, contenido de carbono orgánico o textura del suelo.

5.3.1 Impacto de la intensificación en el uso del suelo en funciones microbianas vinculadas al ciclado de carbono

Al analizar los genes que codifican CAZYmes detectamos un cambio que se asocia con el gradiente de intensificación estudiado, donde la agricultura genera mayor número de cambios significativos en la abundancia de estos genes, seguido por la fertilización del suelo. Ya se han reportado cambios en la abundancia de genes involucrados en el ciclado de compuestos carbonados a partir de cambios en el uso del suelo (Zhu, et al., 2024). A su vez, dichos cambios se asociaron a cambios en parámetros físicoquímicos donde destacaron los cambios en el contenido de carbono orgánico del suelo. El análisis de sustratos de CAZymes ha demostrado ser útil para el entendimiento de dinámicas de Carbono del suelo. En un estudio reciente se ha reportado que diferentes tipos de vegetación generan perfiles de CAZymes diferentes (Yu, et al 2024), donde se detalla la importancia de diferentes sustratos según el tipo de cobertura muestreada. Para pastizales templados se ha determinado que la rizodeposición es una de las fuentes de carbono más importante en los suelos (Panchal, et al., 2022). El cambio en la estructura molecular de los exudados radiculares podría explicar los cambios en el perfil de CAZymes que hemos obtenido para los diferentes usos del suelo.

La hipótesis del minado de recursos (*resource mining*) explica la importancia de la necromasa microbiana para el metabolismo de los microorganismos del suelo. A partir de este recurso los microorganismos pueden obtener monómeros estructurales sin sintetizarlos *de novo*, y de esta forma logran disminuir considerablemente el costo energético para la biosíntesis de sus propias macromoléculas (Kastner, et al., 2021). Nuestros resultados indican una disminución en la abundancia de genes que codifican enzimas hidrolíticas específicas para quitina y peptidoglicano a lo largo de un gradiente de intensificación en el uso del suelo. Estas moléculas constituyen componentes estructurales clave de las paredes celulares de hongos y bacterias, respectivamente, y su degradación representa un paso fundamental en el reciclaje de necromasa microbiana. Una menor presencia de estas CAZymes sugiere, por tanto, una reducción en el potencial funcional de

la comunidad microbiana del suelo para descomponer necromasa y obtener monómeros estructurales, con posibles consecuencias directas sobre la dinámica y la estabilización del carbono orgánico en el suelo.

La necromasa microbiana es una de las principales vías de entrada de carbono a la fracción de Materia Orgánica Asociada a Minerales (MAOM), la cual representa el pool de carbono más estable y de mayor tiempo de residencia en suelos (Cotrufo, et al., 2013). Recientemente se detectó a través de técnicas de modelado de fases que esta fracción se forma predominantemente a través de procesos “*in vivo*”, es decir a través de la inmovilización de compuestos orgánicos que contribuyen a la formación de biomasa microbiana. Posteriormente, los productos microbianos, incluida su necromasa, son estabilizados mediante asociaciones con minerales del suelo como las partículas de arcillas con cargas negativas (Manzoni & Cotrufo 2024). Un estudio reciente a partir de la abundancia natural de isótopos de carbono reporta que la MAOM que ha sufrido múltiples ciclos de reciclaje —es decir, su descomposición parcial y reincorporación a nueva biomasa microbiana— se encuentra formando parte de agregados ocluidos y altamente adsorbida a compuestos minerales por lo cual es más estable a largo plazo. En este sentido, nuestros hallazgos cobran mayor sentido, dado que la disminución en el potencial de reciclado de necromasa en suelos con mayor intensificación podría afectar la estabilización de la MAOM a largo plazo. Esto se condice con resultados obtenidos en un estudio donde evalúan el uso de fertilizantes a largo plazo en pastizales, a partir del análisis de las diferentes fracciones de la MOS, reportan una disminución en la estabilización de la materia orgánica del suelo y un aumento de la proporción de POM respecto a la MAOM (Rocci, et al., 2022).

A su vez, en los usos del suelo más intensificados, como las rotaciones agrícolas, observamos no solo una menor abundancia de genes CAZyme, sino también una reducción del contenido total de carbono del suelo. La menor disponibilidad de sustratos y nutrientes debido, entre otras cosas, a la disminución en la cobertura del suelo, podría estar limitando la actividad y el crecimiento microbiano, afectando la producción de biomasa, necromasa y su procesamiento posterior (Cotrufo, et al., 2013). Existe evidencia de que los procesos de formación de necromasa pueden afectar su calidad y por tanto su reciclado. Se cree que el uso intensivo de insumos químicos podría afectar el proceso de formación de necromasa por acumulación de ROS y otros compuestos tóxicos que podrían derivar en un menor reciclado del carbono asimilado por microorganismos (Camenzind,

et al., 2023). Este efecto podría contribuir a una desaceleración de la acumulación de carbono estable en suelos sometidos a manejo intensivo.

En conjunto, estos hallazgos refuerzan la idea de que la funcionalidad microbiana —y en particular, el reciclaje de necromasa— es un componente clave en la capacidad de los suelos para secuestrar carbono de manera sostenida. En escenarios de intensificación agrícola, donde se reduce tanto la cantidad como la calidad del carbono disponible y la actividad microbiana funcional, los procesos que conducen a la estabilización de carbono en la MAOM pueden verse comprometidos. Esto limita no solo el almacenamiento actual de carbono, sino también la capacidad futura del suelo para actuar como sumidero en estrategias de mitigación del cambio climático.

5.3.2 Impacto de la intensificación en el uso del suelo en funciones microbianas vinculadas al ciclado de nitrógeno y fósforo

El impacto de la intensificación en el uso del suelo en la abundancia de genes vinculados al ciclado de nutrientes demuestra un claro gradiente en la disminución en la abundancia de genes vinculados al ciclado de nitrógeno y fósforo. En este gradiente, la agricultura aparece como el uso del suelo que genera mayor cantidad de cambios respecto al control de campo natural. Estos cambios en los procesos han sido observados en algunos estudios y se ha probado que pueden revertirse luego del cambio en el uso del suelo nuevamente hacia pasturas. A su vez, el siguiente uso del suelo con mayor impacto, medido a través del número de genes que presentan cambios significativos en su abundancia respecto al control, fue la fertilización del campo natural. Se ha reportado a través de múltiples ensayos que la fertilización inorgánica del suelo puede afectar de manera considerable el microbioma del suelo, aunque aún no existe claridad en los mecanismos detrás de los cambios reportados. Si bien se ha visto que la adición de nitrógeno puede contribuir a la acumulación de carbono orgánico en el suelo a corto plazo, estos efectos no son estables a largo plazo (Liu, et al., 2023). Además, el uso intensivo de nutrientes en pasturas templadas puede llevar a problemas ambientales a través de la pérdida de nutrientes por escorrentía (Apostolakis, et al., 2022).

La pérdida de capacidad de ciclado general de nutrientes, a medida que se intensifica el uso del suelo, deja en claro la necesidad de evaluar estrategias alternativas para la mejora del crecimiento vegetal. Existen diferentes alternativas en este sentido, la utilización de cultivos de cobertura, junto con la disminución en la dosis de Nitrógeno utilizado, puede ser una estrategia de fertilización sustentable. Esta práctica acarrea beneficios en la estructura del suelo y en el ciclado de nutrientes,

como pueden ser la acumulación de nitrógeno en compuestos orgánicos más estables (Restovich et al, 2019). A su vez, se ha evaluado el uso de fertilizantes orgánicos para la mejora de la productividad vegetal en pasturas y también en cultivos agrícolas. Como resultado de un meta-análisis reciente se encontró una mejora en la productividad vegetal, pero también en el contenido de Carbono orgánico del suelo en estos sistemas. A diferencia de la fertilización inorgánica, no se detectó pérdida de diversidad de especies en las pasturas suplementadas con fertilizantes orgánicos. Este tipo de manejos dan pauta de que existen alternativas con manejos que permiten mantener una alta productividad y que pueden disminuir los efectos negativos de la fertilización inorgánica (Shi, et al 2024).

Por otra parte, también se detectaron cambios a nivel de los genes vinculados a la utilización de fósforo. En este caso, los métodos utilizados para detectar transformaciones en el ciclo del fósforo se basan principalmente en funciones catalizadas por enzimas codificadas en genomas microbianos, lo cual no constituye el ciclo completo de este nutriente. El fósforo (P) es un nutriente esencial que puede limitar la productividad vegetal, incluso cuando otros nutrientes se encuentran disponibles en cantidades suficientes. Se ha demostrado que la baja disponibilidad de P restringe el crecimiento de la vegetación, actuando como un factor limitante clave en ecosistemas terrestres (Hou, et al 2020). En pasturas templadas, y particularmente en el bioma del Río de la Plata, se ha observado que las comunidades vegetales pueden adoptar diferentes estrategias para la adquisición de P (Michelini, et al 2025). Estas adaptaciones podrían explicar las diferencias observadas en pasturas diversas, que tienden a mejorar la disponibilidad de P y, en consecuencia, incrementar la productividad en distintos ecosistemas (Chen, et al 2022).

Nuestros resultados muestran un gradiente de impacto posiblemente vinculado a la diversidad de la cobertura vegetal. Los monocultivos, característicos de las rotaciones agrícolas, presentan los mayores cambios en la abundancia de genes relacionados con el metabolismo microbiano del P. Además, observamos que el ciclado del fósforo se ve estimulado por el pastoreo, una práctica ausente en suelos agrícolas. En particular, la vía metabólica de utilización de fosfonatos incrementa su abundancia en suelos pastoreados, lo que sugiere una mayor capacidad del microbioma para aprovechar fosfatos derivados de moléculas orgánicas (Liu, et al 2023).

Las asociaciones simbióticas entre plantas y hongos micorrícicos desempeñan un papel central en la adquisición de P y en el secuestro de carbono en los suelos (Wu, et al 2024; Zhang, et al 2025).

Sin embargo, existe evidencia de que los cambios en el uso y manejo del suelo pueden alterar significativamente la estructura de las comunidades micorrícicas, afectando su funcionalidad (Zhu, et al 2021; Zhang, et al 2023). El microbioma asociado a estos hongos también es fundamental, ya que facilita la liberación de nutrientes que posteriormente son transportados a la planta (Sangwan & Prasanna, 2021). En nuestros análisis, detectamos una pérdida de estructura en las redes de correlación entre bacterias y HMAs que perjudica estos procesos y, por lo tanto, reduce la eficiencia de los mecanismos naturales para la nutrición vegetal. En este contexto, identificamos la desaparición del género *Serendipita* en todos los tratamientos con fertilización de fosfato inorgánico, un endófito radicular que contribuye a la adaptación al estrés abiótico y a la nutrición vegetal (Gan, et al 2025).

El uso del suelo con menor cantidad de cambios en el potencial de ciclado de fósforo fue el de sobresiembra de leguminosas y adición de fósforo. En este tratamiento el único gen que disminuyó su abundancia fue *ppa*, este se encuentra vinculado a la solubilización de fósforo inorgánico ya que codifica una pirofosfatasa. Se ha reportado que la inclusión de leguminosas e inoculación de HMAs aumenta la disponibilidad de fósforo en el suelo a través del aumento en la abundancia *ppa* y *ppx* (Liao, et al 2023). Un manejo que podría ser interesante de explorar es la inoculación de HMAs como alternativa, o complemento, al agregado de fósforo inorgánico en este tratamiento en pastizales uruguayos. En este y otros trabajos se ha reportado la disminución en la abundancia de HMAs en este uso del suelo (Azziz, et al 2023). Este efecto podría estar vinculado a la adición de fósforo, lo cual fue discutido en capítulos anteriores (Ma, et al 2023). La inoculación de HMAs podría tener múltiples ventajas desde la modulación de especies vegetales que se logran establecer, la mejora en el ciclado y disponibilización de P en el suelo y la mejora de suelos degradados (Coban, et al 2022).

5.4 Estrategias sostenibles para la intensificación en sistemas agrícola-ganaderos

A partir de los resultados obtenidos, queda en evidencia que ciertos manejos agrícolas convencionales, particularmente la fertilización química intensiva, pueden afectar de forma significativa la estructura y funcionalidad del microbioma del suelo, reduciendo su resiliencia y capacidad de sostener el ciclado de nutrientes en el suelo. En contraposición, la adopción de

prácticas sostenibles como pueden ser el uso de cultivos de servicio, el uso de bioinsumos, la fertilización orgánica y uso de enmiendas orgánicas, podrían contribuir a aumentar la productividad disminuyendo el impacto en las funciones naturales de los microbiomas, favoreciendo procesos de ciclado de nutrientes y de nutrición vegetal en sistemas agrícola-ganaderos (Hartman & Six, 2023).

En los últimos años, se han abierto nuevas aproximaciones a través del desarrollo de biotecnologías aplicadas al agro que buscan aprovechar y rediseñar el microbioma de suelos. Entre estas destacan las aproximaciones basadas en ingeniería de microbiomas, la utilización de consorcios microbianos sintéticos para mejorar la eficiencia de procesos clave como la fijación de nitrógeno, la solubilización de fósforo o la supresión de patógenos (Compant et al., 2024; de Souza et al., 2020). Estos enfoques emergen de manera promisorio para avanzar hacia una intensificación sostenible, que no dependa únicamente de insumos quimiosintéticos, sino que busque potenciar los servicios ecosistémicos mediados por los microorganismos del suelo.

Dentro de las prácticas agrícolas que contribuyen al fortalecimiento del microbioma del suelo, destacan en primer lugar los cultivos de servicios o de cobertura, cuya inclusión mejora la diversidad microbiana, incrementa la disponibilidad de carbono y promueve comunidades más estables. Existe información sobre las cualidades de estos cultivos que reducen la erosión, aumentan la infiltración de agua y aportan compuestos orgánicos que estimulan el crecimiento de bacterias y hongos beneficiosos, fortaleciendo así la resiliencia del sistema (Wittwer et al., 2017; Mariotte et al., 2018). Desde un punto de vista microbiológico, lograr una cobertura continua del suelo, donde se generen exudados radiculares de forma ininterrumpida podría permitir el ingreso de compuestos orgánicos de manera constante al suelo. En este sentido las especies sembradas, así como las fechas de siembra y cosecha de estos cultivos juegan un rol fundamental (Seitz, et al 2024; Shi, et al 2025).

A su vez, el uso de bioinsumos, en particular inoculantes microbianos y bioestimulantes, han demostrado mejorar la eficiencia en la absorción de nutrientes, estimular mecanismos de defensa en las plantas y reducir la necesidad de agroquímicos sintéticos (Castiglione, et al., 2021). Evidencias recientes muestran que los bioinsumos no solo actúan directamente sobre el crecimiento vegetal, sino que también modulan las redes microbianas del suelo, generando

comunidades con más interacciones cooperativas y con mayor potencial funcional (De Vries & Wallenstein, 2017). Por su parte el uso de microorganismos biocontroladores emerge como una alternativa sustentable para el control de enfermedades en diferentes sistemas (Galli, et al., 2024).

Por último, la fertilización orgánica, a través de la aplicación de enmiendas como compost, estiércol o digestatos, aporta carbono al suelo y nutrientes en formas biodisponibles, lo que promueve comunidades microbianas más diversas y con mayor capacidad de ciclado de nutrientes. Estudios recientes han documentado mejoras en la mineralización de nitrógeno y fósforo, incremento en la biomasa microbiana y reducción de emisiones de gases de efecto invernadero en comparación con fertilización mineral intensiva (Xing et al., 2024; Li et al., 2025). Así, la combinación de estas prácticas representa estrategias clave para sostener la productividad agrícola al tiempo que se fortalece la funcionalidad del microbioma del suelo.

Sin embargo, persisten importantes vacíos de conocimiento vinculados a estas prácticas. Aún es limitado el entendimiento de la estabilidad y persistencia de microbiomas manipulados bajo condiciones de campo, así como de las interacciones multitróficas que determinan su eficacia (Compant et al., 2025). También se requiere profundizar en el escalamiento de tecnologías de microbioma hacia distintos sistemas agrícola-ganaderos, evaluando no solo la productividad, sino también impactos en biodiversidad y emisiones de gases de efecto invernadero (Jansson & Hofmockel, 2020; French et al., 2021). Finalmente, la integración de enfoques de big data, metagenómica y modelado predictivo representa un área crítica para acelerar la transición hacia prácticas agrícolas basadas en microbiomas (Wallenstein, 2022). En conclusión, el reto hacia adelante será vincular las prácticas regenerativas tradicionales con herramientas biotecnológicas más avanzadas, construyendo sistemas agrícolas capaces de sostener altos rendimientos sin comprometer la funcionalidad del suelo. Esto exige un diálogo interdisciplinario que combine microbiología, agronomía, ciencias del clima y otras áreas con el fin de desarrollar y medir alternativas que permitan implementar en la práctica real todo el potencial de la diversidad microbiana en la intensificación sostenible.

6. Conclusiones

Esta tesis constituye una caracterización exhaustiva del microbioma de suelos en sistemas ganaderos basados en campo natural en Uruguay, evaluando su estructura, diversidad y potencial funcional a lo largo de un gradiente de intensificación del uso del suelo. Los objetivos planteados en la introducción se cumplieron de manera consistente: se describieron patrones de composición bacteriana y fúngica en distintos sitios experimentales, se identificaron respuestas diferenciales según prácticas de manejo, y se avanzó en la comprensión de la distribución de genes vinculados al ciclado de nutrientes esenciales como carbono, nitrógeno y fósforo.

Los resultados mostraron que los manejos ganaderos de intensificación moderada —como la fertilización, la sobresiembra de leguminosas e incluso la siembra de pasturas perennes— no generan cambios profundos en la diversidad alfa ni beta de bacterias y hongos, sugiriendo cierta resistencia del microbioma en estos sistemas. En contraste, la conversión agrícola presentó impactos drásticos sobre las comunidades microbianas, en particular una reducción marcada de la diversidad fúngica y un cambio funcional asociado a la pérdida de simbiontes y al aumento de patógenos. Estos hallazgos confirman que la agricultura constituye un punto de quiebre en la estabilidad del ecosistema microbiano del suelo y ponen de relieve la importancia de conservar y manejar de forma sostenible los pastizales naturales.

Asimismo, la aproximación metagenómica permitió detectar variaciones en genes asociados al ciclado de nutrientes, aportando evidencia de que la intensificación modifica no sólo la estructura taxonómica de las comunidades, sino también su capacidad funcional. Esto resulta clave en un contexto donde los servicios ecosistémicos dependen en gran medida de la integridad del microbioma edáfico.

En conjunto, la tesis aporta evidencia empírica y conceptual que vincula biodiversidad microbiana, manejo productivo y funcionalidad ecosistémica. Resalta el valor de los pastizales templados del Río de la Plata como reservorios de diversidad y como reguladores de procesos críticos, y contribuye al diseño de estrategias de intensificación sostenible que contemplen la conservación de la salud del suelo. De esta manera, se da respuesta al objetivo general de comprender cómo el uso y manejo del suelo afectan al microbioma y su papel en la productividad y resiliencia de los sistemas agropecuarios del Uruguay.

7. Bibliografía

- Abarenkov, K., Nilsson, R. H., Larsson, K.-H., Taylor, A. F. S., May, T. W., Frøslev, T. G.,... Kõljalg, U. (2023). The UNITE database for molecular identification and taxonomic communication of fungi and other eukaryotes: Sequences, taxa and classifications reconsidered. *Nucleic Acids Research*
- Abrigo, M., Lezama, F., Grela, I., & Piñeiro, G. (2024). Grazing exclusion effects on vegetation structure and soil organic matter in savannas of Río de la Plata grasslands. *Journal of Vegetation Science*, 35(5), e13304
- Adan, I. H., Asudi, G. O., Niassy, S., Jalloh, A. A., Mutua, J. M., Chidawanyika, F.,... & Mutyambai, D. M. (2024). Comparative microbiome diversity in root-nodules of three *Desmodium* species used in push-pull cropping system. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1395811
- Adetunji, A. T., Ncube, B., Mulidzi, R., & Lewu, F. B. (2020). Potential use of soil enzymes as soil quality indicators in agriculture. In *Frontiers in soil and environmental microbiology* (pp. 57-64). CRC Press
- Ahlmann-Eltze, C., & Patil, I. (2021). ggsignif: R Package for Displaying Significance Brackets for 'ggplot2'. *PsyArxiv*. doi:10.31234/osf.io/7awm6
- Akar, A., Akkaya, E. U., Yesiladali, S. K., Çelikyilmaz, G., Çokgor, E. U., Tamerler, C., Orhon, D., & Çakar, Z. P. (2006). Accumulation of polyhydroxyalkanoates by *Microlunatus phosphovorus* under various growth conditions. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 33(3), 215-220
- Akbari, A., Wang, Z., He, P., Wang, D., Lee, J., Han, I. L.,... & Gu, A. Z. (2021). Unrevealed roles of polyphosphate-accumulating microorganisms. *Microbial Biotechnology*, 14(1), 82
- Alkorta, I., Aizpurua, A., Riga, P., Albizu, I., Amézaga, I., & Garbisu, C. (2003). Soil enzyme activities as biological indicators of soil health. *Reviews on environmental health*, 18(1), 65-73
- Allison, S. D., & Martiny, J. B. (2008). Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(supplement_1), 11512-11519
- Alneberg, J., Hagberg, J., Mehrshad, M., von Mering, C., Anna, S., & Lundberg, E. (2014). CONCOCT: Clustering contigs on the basis of coverage and composition to determine metagenomic species. *PeerJ*, 2, e448
- Apostolakis, A., Schöning, I., Klaus, V. H., Michalzik, B., Bischoff, W. A., Boeddinghaus, R. S., & Schrumpf, M. (2022). Direct and plant community mediated effects of management intensity on annual nutrient leaching risk in temperate grasslands. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 123(3), 83-104
- Arora, R. (2025). Harnessing soil health to mitigate greenhouse gas emissions in semi-arid pasture ecosystems. Texas Tech University

- Arredondo-Alonso, S., Willems, R. J., Van Schaik, W., & Schürch, A. C. (2017). On the (im) possibility of reconstructing plasmids from whole-genome short-read sequencing data. *Microbial genomics*, 3(10), e000128
- Azziz, G., Frade, C., Igual, J. M., Del Pino, A., Lezama, F., & Valverde, Á. (2023). Legume overseeding and P fertilization increases microbial activity and decreases the relative abundance of AM fungi in pampas natural pastures. *Microorganisms*, 11(6), 1383
- Baba, T., & Hirose, D. (2024). Two novel *Archaeorhizomyces* species isolated from ericoid mycorrhizal roots and their association with ericaceous plants in vitro. *Fungal Biology*, 128(5), 1939-1953
- Bach, E. M., Williams, R. J., Hargreaves, S. K., Yang, F., & Hofmockel, K. S. (2018). Greatest soil microbial diversity found in micro-habitats. *Soil Biology and Biochemistry*, 118, 217-226
- Baeza, S., & Paruelo, J. M. (2020). Land use/land cover change (2000–2014) in the Rio de la Plata grasslands: an analysis based on MODIS NDVI time series. *Remote sensing*, 12(3), 381
- Baeza, S., Velez-Martín, E., De Abelleira, D., Banchero, S., Gallego, F., Schirmbeck, J.,... & Hasenack, H. (2022). Two decades of land cover mapping in the Río de la Plata grassland region: The MapBiomás Pampa initiative. *Remote Sensing Applications: Society and Environment*, 28, 100834
- Bahram, M., Hildebrand, F., Forslund, S. K., Anderson, J. L., Soudzilovskaia, N. A., Bodegom, P. M.,... & Bork, P. (2018). Structure and function of the global topsoil microbiome. *Nature*, 560(7717), 233-237
- Bai, Y., & Cotrufo, M. F. (2022). Grassland soil carbon sequestration: Current understanding, challenges, and solutions. *Science*, 377(6606), 603-608
- Baldi, G., & Paruelo, J. M. (2008). Land-use change impacts on biodiversity and ecosystem services. *Journal of Environmental Management*
- Barabote, R. D., Xie, G., Leu, D. H., Normand, P., Necsulea, A., Daubin, V., & Berry, A. M. (2009). Complete genome of the cellulolytic thermophile *Acidothermus cellulolyticus* 11B provides insights into its ecophysiological and evolutionary adaptations. *Genome Research*, 19(6), 1033-1043
- Bardgett, R. D., & van der Putten, W. H. (2014). Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature*, 515(7528), 505–511
- Barneze, A. S., Whitaker, J., McNamara, N. P., & Ostle, N. J. (2022). Interactions between climate warming and land management regulate greenhouse gas fluxes in a temperate grassland ecosystem. *Science of the Total Environment*, 833, 155212
- Bauer, J. T., Kleczewski, N. M., Bever, J. D. (2012). Nitrogen-fixing bacteria, arbuscular mycorrhizal fungi, and the productivity and structure of prairie grassland communities. *Oecologia* 170, 1089–1098
- Bedmar, E. J., Robles, E. F., & Delgado, M. J. (2005). The complete denitrification pathway of the symbiotic, nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*

- Begum, N., Qin, C., Ahanger, M. A., Raza, S., Khan, M. I., Ashraf, M.,... & Zhang, L. (2019). Role of arbuscular mycorrhizal fungi in plant growth regulation: implications in abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1068
- Bender, S. F., Schulz, S., Martínez-Cuesta, R., Laughlin, R. J., Kublik, S., Pfeiffer-Zakharova, K.,... & van Der Heijden, M. G. (2023). Simplification of soil biota communities impairs nutrient recycling and enhances above-and belowground nitrogen losses. *New Phytologist*, 240(5), 2020-2034
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal statistical society: series B (Methodological)*, 57(1), 289-300
- Berkelmann, D., Schneider, D., Meryandini, A., & Daniel, R. (2020). Unravelling the effects of tropical land use conversion on the soil microbiome. *Environmental Microbiome*, 15(1), 5
- Bernard, L., Basile-Doelsch, I., Derrien, D., Fanin, N., Fontaine, S., Guenet, B.,... & Maron, P. A. (2022). Advancing the mechanistic understanding of the priming effect on soil organic matter mineralisation. *Functional Ecology*, 36(6), 1355-1377
- Bhunjun, C. S., Phukhamsakda, C., Jayawardena, R. S. et al. (2021). Investigating species boundaries in *Colletotrichum*. *Fungal Diversity* 107, 107–127
- Bi, J., Song, A., Li, S., Chen, M., Wang, Y., Wang, S., Si, Z., Wang, E., Zhang, J., Asante-Badu, B., Njyenawe, M. C., Zhang, Q., Xue, P., & Fan, F. (2022). Plant physiology, microbial community, and risks of multiple fungal diseases along a soil nitrogen gradient. *Applied Soil Ecology*, 175, 104445
- Bigirimana, V. D. P., Hua, G. K., Nyamangyoku, O. I., & Höfte, M. (2015). Rice sheath rot: an emerging ubiquitous destructive disease complex. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1066
- Blin, K., Shaw, S., Augustijn, H. E., Reitz, Z. L., Biermann, F., Alanjary, M., ... & Weber, T. (2023). antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation. *Nucleic acids research*, 51(1), 46-50.
- Bobbink, R., Hicks, W. K., Galloway, J. N., Spranger, T., Alkemade, R., Ashmore, M.,... & De Vries, W. (2017). Global assessment of nitrogen deposition effects on terrestrial plant diversity: a synthesis. *Applied Vegetation Science*, 20(4), 612–615
- Boldt-Burisch, K., & Naeth, M. A. (2017). Mycorrhization affects root distribution of *Lotus corniculatus* and *Calamagrostis epigeios* in a nutrient poor heterogeneous soil in a rhizotron experiment. *Rhizosphere*, 4, 36-47
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: un recortador flexible para datos de secuencias de Illumina. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120

- Bondaruk, V., Lezama, F., Del Pino, A., & Piñeiro, G. (2020). Overseeding legumes in natural grasslands: Impacts on root biomass and soil organic matter of commercial farms. *Science of the Total Environment*, 743, 140771
- Boorboori, M. R., & Zhang, H. Y. (2022). The role of *Serendipita indica* (*Piriformospora indica*) in improving plant resistance to drought and salinity stresses. *Biology*, 11(7), 952
- Boval, M., & Dixon, R. M. (2012). The importance of grasslands for animal production and other functions: a review on management and methodological progress in the tropics. *Animal*, 6(5), 748-762
- Bowers, R. M., Kyrpides, N. C., Gilbert, J. A., Blainey, P. C., Doudna, J. A., Eisen, J. A., Fraser, C. M., Hugenholtz, P., Knight, R., Litaudon, M., Lloyd, K. G., Locey, K. J., Marx, C. J., McLean, J. S., McMahon, T. A., Meyer, F., Morrison, H. G., Murat, F., Nelson, K. E., ... Williams, T. J. (2017). Minimum information about a metagenome-assembled genome (MIMAG) and a draft genome of bacteria and archaea (MIGS) of soils. *Nature Biotechnology*, 35(8), 725–733
- Brady, N. C., & Weil, R. R. (2017). *The nature and properties of soils* (15th ed.). Pearson
- Bray, R. H., & Kurtz, L. T. (1945). Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil science*, 59(1), 39-46.
- Brewer, T. E., Handley, K. M., Carini, P., Gilbert, J. A., & Fierer, N. (2016). Genome reduction in an abundant and ubiquitous soil bacterium ‘*Candidatus Udaeobacter copiosus*’. *Nature microbiology*, 2(2), 1-7
- Bronick, C. J., & Lal, R. (2005). Soil structure and management: a review. *Geoderma*, 124(1-2), 3–22
- Buchfink, B., Xie, C., & Huson, D. H. (2015). Fast and sensitive protein alignment with *SinhDIAMOND*. *Nature Methods*, 12(1), 59–60
- Buckeridge, K. M., Mason, K. E., McNamara, N. P., Ostle, N., Puissant, J., Goodall, T.,... & Whitaker, J. (2020). Environmental and microbial controls on microbial necromass recycling, an important precursor for soil carbon stabilization. *Communications Earth & Environment*, 1(1), 36
- Calabrese, S., Mohanty, B. P., & Malik, A. A. (2022). Soil microorganisms regulate extracellular enzyme production to maximize their growth rate. *Biogeochemistry*, 158(3), 303-312
- 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
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: Inferencia de muestras de alta resolución a partir de datos de amplicones de Illumina. *Métodos de la naturaleza*, 13(7), 581-583
- Calonne, M., Schouteden, N., De Tender, C., Haegeman, A., & De Gelder, L. (2022). Mycorrhiza Helper Bacteria: Mechanisms and applications. *Frontiers in Plant Science*, 13, 883769

- Camenzind, T., Mason-Jones, K., Mansour, I., Rillig, M. C., & Lehmann, J. (2023). Formation of necromass-derived soil organic carbon determined by microbial death pathways. *Nature geoscience*, 16(2), 115-122
- Cao Y, Ding J, Li J, Xin Z, Ren S, Wang T. (2023) Necromass-derived soil organic carbon and its drivers at the global scale. *Soil Biology and Biochemistry*. 181:109025.
- Cappelli, S. L., Pichon, N. A., Kempel, A., & Allan, E. (2020). Sick plants in grassland communities: a growth-defense trade-off is the main driver of fungal pathogen abundance. *Ecology Letters*, 23(9), 1349-1359
- Caram, N., Casalás, F., Soca, P., Anfuso, V., García-Favre, J., Wallau, M.,... & Boggiano, P. (2021). Configuration of daily grazing and searching of growing beef cattle in grassland: observational study. *Animal*, 15(9), 100336
- Carbutt, C., Henwood, W. D., & Gilfedder, L. A. (2017). Global plight of native temperate grasslands: going, going, gone?. *Biodiversity and Conservation*, 26(12), 2911-2932
- Cardozo, G. A., Ayala, W., Lezama, F., Reyno, R., Cuadro, R., Michelini, D.,... & Lattanzi, F. A. (2024). Limited response to phosphorus fertilization in native South American grasslands across a productivity gradient despite low phosphorus concentrations in grassland herbage. *Plant and Soil*, 1-17
- Carini, P., Marsden, P. J., Leff, J. W., Morgan, E. E., Strickland, M. S., & Fierer, N. (2017). Relic DNA is abundant in soil and obscures estimates of soil microbial diversity. *Nature microbiology*, 2(3), 1-6
- Carini, P., Delgado-Baquerizo, M., Hinckley, E. L. S., Holland-Moritz, H., Brewer, T. E., Rue, G.,... & Fierer, N. (2020). Effects of spatial variability and relic DNA removal on the detection of temporal dynamics in soil microbial communities. *MBio*, 11(1), 10-1128
- Carswell, A., Sánchez-Rodríguez, A. R., Saunders, K., le Cocq, K., Shaw, R., Cotton, J.,... & Misselbrook, T. (2022). Combining targeted grass traits with red clover improves grassland performance and reduces need for nitrogen fertilisation. *European Journal of Agronomy*, 133, 126433
- Carvalho, P. D. F., Fisher, V., SANTOS, D. D., Ribeiro, A. M., QUADROS, F. D., Castilhos, Z. M.,... & Jacques, A. V. (2006). Produção animal no bioma campos sulinos. *Brazilian Journal of Animal Science*, 35(Supl), 156-202
- Carvalho, P. C. F., & Batello, C. (2009). Conservation and sustainable use of grasslands: The challenge in South America. *Grassland Science*
- Castiglione, A. M., Mannino, G., Contartese, V., Berteà, C. M., & Ertani, A. (2021). Microbial biostimulants as response to modern agriculture needs: Composition, role and application of these innovative products. *Plants*, 10(8), 1533
- CAZypedia Consortium. (2018). Ten years of CAZypedia: a living encyclopedia of carbohydrate-active enzymes. *Glycobiology*, 28(1), 3-8

- Cezimbra, I. M., de Albuquerque Nunes, P. A., de Souza Filho, W., Tischler, M. R., Genro, T. C. M., Bayer, C.,... & de Faccio Carvalho, P. C. (2021). Potential of grazing management to improve beef cattle production and mitigate methane emissions in native grasslands of the Pampa biome. *Science of The Total Environment*, 780, 146582
- Chang, S. X. (2022). Land-use-driven change in soil labile carbon affects microbial community composition and function. *Geoderma*, 426, 116056.
- Chang, Y., Sokol, N. W., van Groenigen, K. J., Bradford, M. A., Ji, D., Crowther, T. W.,... & Ding, F. (2024). A stoichiometric approach to estimate sources of mineral-associated soil organic matter. *Global Change Biology*, 30(1), e17092
- Chao, L., Ma, X., Tsetsegmaa, M., Zheng, Y., Qu, H., Dai, Y.,... & Bao, Y. (2022). Response of soil microbial community composition and diversity at different gradients of grassland degradation in Central Mongolia. *Agriculture*, 12(9), 1430
- Chapin, F. S., Matson, P. A., & Vitousek, P. (2011). *Principles of terrestrial ecosystem ecology* (2nd ed.). Springer
- Chen, J., Kuzyakov, Y., & Ge, T. (2022). Experimental evidence for the impact of phages on mineralization of soil-derived dissolved organic matter under different temperature regimes., 157517
- Chen, X., Chen, H. Y., & Chang, S. X. (2022). Meta-analysis shows that plant mixtures increase soil phosphorus availability and plant productivity in diverse ecosystems. *Nature Ecology & Evolution*, 6(8), 1112-1121
- Chen, L., Wang, C., Li, Y., Xie, X., Deng, X., Chen, H.,... & Qiu, G. (2024). Metabolisms of *Microbacterium* phosphovorus NM-1 Using Glucose, Glutamate, and Aspartate as Carbon Sources for Enhanced Biological Phosphorus Removal. *ACS ES&T Water*, 4(9), 4150-4164
- Cheng, Y., Elrys, A. S., Merwad, A. R. M., Zhang, H., Chen, Z., Zhang, J.,... & Müller, C. (2022). Global patterns and drivers of soil dissimilatory nitrate reduction to ammonium. *Environmental Science & Technology*, 56(6), 3791-3800
- Chi, J., Fan, Y., Wang, L., Putnis, C. V., & Zhang, W. (2022). Retention of soil organic matter by occlusion within soil minerals. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 21(3), 727-746
- Choi, J., Yang, F., Stepanauskas, R., Cardenas, E., Garoutte, A., Williams, R.,... & Howe, A. (2017). Strategies to improve reference databases for soil microbiomes. *The ISME journal*, 11(4), 829-834
- Clark, I. M., Hughes, D. J., Fu, Q., Abadie, M., & Hirsch, P. R. (2021). Metagenomic approaches reveal differences in genetic diversity and relative abundance of nitrifying bacteria and archaea in contrasting soils. *Scientific Reports*, 11(1), 15905
- Coban, O., De Deyn, G. B., & van der Ploeg, M. (2022). Soil microbiota as game-changers in restoration of degraded lands. *Science*, 375(6584), abe0725

- Cole, L., Goodall, T., Jehmlich, N., Griffiths, R. I., Gleixner, G., Gubry-Rangin, C., & Malik, A. A. (2024). Land use effects on soil microbiome composition and traits with consequences for soil carbon cycling. *ISME communications*, 4(1), ycae116
- Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of advanced research*, 19, 29-37
- Compant, S., Cassan, F., Kostić, T., Johnson, L., Brader, G., et al. (2025). Harnessing the plant microbiome for sustainable crop production. *Nat Rev Microbiol* 23, 9–23
- Cordovez, V., Carrion, V. J., Etalo, D. W., Mumm, R., Zhu, H., Van Wezel, G. P., & Raaijmakers, J. M. (2015). Diversity and functions of volatile organic compounds produced by *Streptomyces* from a disease-suppressive soil. *Frontiers in microbiology*, 6, 1081
- Cotrufo, M. F., Wallenstein, M. D., Boot, C. M., Denef, K., & Paul, E. (2013). The Microbial Efficiency-Matrix Stabilization (MEMS) framework integrates plant litter decomposition with soil organic matter stabilization: do labile plant inputs form stable soil organic matter?. *Global change biology*, 19(4), 988-995
- Cotrufo, M. F., & Lavelle, J. M. (2022). Soil organic matter formation, persistence, and functioning: A synthesis of current understanding to inform its conservation and regeneration. *Advances in Agronomy*, 172, 1-66
- Crosa, M., Oliveira, A., Goyenola, R., & Frioni, L. (1999). Comportamiento simbiótico en *Desmodium incanum* en Uruguay. *Agrociencia Uruguay*, 3(1), 38-42
- Crème, A., Rumpel, C., Gastal, F., de la Luz Mora Gil, M., & Chabbi, A. (2016). Effects of grasses and a legume grown in monoculture or mixture on soil organic matter and phosphorus forms. *Plant and Soil*, 402, 117-128
- Csardi G, Nepusz T (2006). “The igraph software package for complex network research.” *InterJournal, Complex Systems*, 1695
- Curd, E. E., Martiny, J. B., Li, H., & Smith, T. B. (2018). Bacterial diversity is positively correlated with soil heterogeneity. *Ecosphere*, 9(1), e02079
- Dai, X., Su, C., Nong, R., Huang, X., Xie, Y., Liang, B.,... & Chen, M. (2023). Performance, microbial community, and metabolism pathway in adsorption-biological coupling reactor treating sulfonamide antibiotics wastewater: effect of influent frequency and aeration rate. *Journal of Water Process Engineering*, 53, 103732
- Dang, K., Ma, Y., Liang, H., Fan, Z., Guo, S., Li, Z.,... & Zhang, S. (2024). Distinct planting patterns exert legacy effects on the networks and assembly of root-associated microbiomes in subsequent crops. *Science of The Total Environment*, 946, 174276
- Das, S., Pendall, E., Malik, A. A., Nannipieri, P & Kim, J. P. (2024). Control microbiano de la dinámica de la materia orgánica del suelo: Effects of land use and climate change. *Biol Fertil Soils* 60, 1-3

- Davis, M. A., Grime, J. P., & Thompson, K. (2000). Fluctuating resources in plant communities: a general theory of invasibility. *Journal of Ecology*, 88(3), 528–534
- Dawson, L. E. R., O’Kiely, P., Moloney, A. P., Vipond, J. E., Wylie, A. R. G., Carson, A. F., & Hyslop, J. (2011). Grassland systems of red meat production: integration between biodiversity, plant nutrient utilisation, greenhouse gas emissions and meat nutritional quality. *Animal*, 5(9), 1432-1441
- De Almeida, R. F., Naves, E. R., & Da Mota, R. P. (2015). Soil quality: Enzymatic activity of soil β -glucosidase. *Glob. J. Agric. Res. Rev*, 3(2), 146-450
- de Jonge, I. K., Veldhuis, M. P., Cornelissen, J. H. C., Berg, M. P., & Olf, H. (2023). The metamicrobiome: key determinant of the homeostasis of nutrient recycling. *Trends in Ecology & Evolution*, 38(2), 183-195
- de Souza RSC, Armanhi JSL, and Arruda P., (2020). From Microbiome to Traits: Designing Synthetic Microbial Communities for Improved Crop Resiliency. *Front. Plant Sci.* 11:1179. doi: 10.3389/fpls.2020.01179
- De Vries, F. T., & Wallenstein, M. D. (2017). Below-ground connections underlying above-ground food production: A framework for optimising ecological connections in the rhizosphere. *Journal of Ecology*, 20(10), 1–16
- dela Cruz, J. A., Camenzind, T., Xu, B., & Rillig, M. C. (2024). Limited role of fungal diversity in maintaining soil processes in grassland soil under concurrent fungicide stress. *Environmental Sciences Europe*, 36(1), 156
- Delgado-Baquerizo, M., Maestre, F. T., Reich, P. B., Jeffries, T. C., Gaitan, J. J., Encinar, D.,... & Singh, B. K. (2016). Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems. *Nature communications*, 7(1), 10541
- Delgado-Baquerizo, M., Maestre, F. T., Reich, P. B., Jeffries, T. C., Gaitan, J. J., Encinar, D.,... & Singh, B. K. (2018). A global atlas of the dominant bacteria found in soil. *Science*, 359(6373), 320–325
- Delgado-Baquerizo, M., Reich, P. B., Trivedi, C., Eldridge, D. J., Abades, S., Alfaro, F. D., Bastida, F., Berhe, A. A., Cutler, N. A., Gallardo, A., García-Velázquez, L., Hart, S. C., Hayes, P. E., He, J.-Z., Hseu, Z.-Y., Hu, H.-W., Kirchmair, M., Neuhauser, S., Pérez, C. A.,... Singh, B. K. (2020). Multiple elements of soil biodiversity drive ecosystem functions across biomes. *Nature Ecology & Evolution*, 4(2), 210-220
- Devi, N. O., Tombisana Devi, R. K., Debbarma, M., Hajong, M., & Thokchom, S. (2022). Effect of endophytic *Bacillus* and arbuscular mycorrhiza fungi (AMF) against *Fusarium* wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 32, 1-14
- Dickie, I. A. N., & Reich, P. B. (2005). Ectomycorrhizal fungal communities at forest edges. *Journal of Ecology*, 93(2), 244-255

- Dietz, C. L., Jackson, R. D., Ruark, M. D., & Sanford, G. R. (2024). Soil carbon maintained by perennial grasslands over 30 years but lost in field crop systems in a temperate Mollisol. *Communications Earth & Environment*, 5(1), 360.
- Dindová, A., Čermák, P., Hakl, J., Fuksa, P., & Mikula, M. (2019). Long-term effects of fertilization on production and botanical composition of permanent grassland under different management regimes. *Grass and Forage Science*, 74(3), 496–506
- Dixon, P. (2003). VEGAN, a package of R functions for community ecology. *Journal of vegetation science*, 14(6), 927-930
- Dixon, R., & Kahn, D. (2004). Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology*, 2(8), 621-631
- Dorrough, J., Moll, J., & Crosthwaite, J. (2007). Can intensification of temperate Australian livestock production systems save land for native biodiversity?. *Agriculture, ecosystems & environment*, 121(3), 222-232
- Durán, A., Morrás, H., Studdert, G., & Liu, X. (2011). Distribution, properties, land use and management of Mollisols in South America. *Chinese Geographical Science*, 21(5), 511-530.
- Egidi, E., Delgado-Baquerizo, M., Plett, J. M., Wang, J., Eldridge, D. J., Bardgett, R. D.,... & Singh, B. K. (2019). A few Ascomycota taxa dominate soil fungal communities worldwide. *Nature communications*, 10(1), 2369
- Eichmann, R., Richards, L., & Schäfer, P. (2021). Hormones as go-betweens in plant microbiome assembly. *The Plant Journal*, 105(2), 518-541
- Elnahal, A. S., El-Saadony, M. T., Saad, A. M., Desoky, E. S. M., El-Tahan, A. M., Rady, M. M., & El-Tarabily, K. A. (2022). The use of microbial inoculants for biological control, plant growth promotion, and sustainable agriculture: A review. *European Journal of Plant Pathology*, 162(4), 759-792
- Elser, J. J., Bracken, M. E. S., Cleland, E. E., Gruner, D. S., Harpole, W. S., Hillebrand, H.,... & Smith, J. E. (2007). Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 10(12), 1135–1142
- Ernst, F., Alonso, B., Colazzo, M., Pareja, L., Cesio, V., Pereira, A., & Pérez-Parada, A. (2018). Occurrence of pesticide residues in fish from south American rainfed agroecosystems. *Science of the total environment*, 631, 169-179
- FAO. (2020). State of knowledge of soil biodiversity — Status, challenges and potentialities. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Feng, J., Wang, L., Zhai, C., Jiang, L., Yang, Y., Huang, X.,... & Wan, S. (2024). Root carbon inputs outweigh litter in shaping grassland soil microbiomes and ecosystem multifunctionality. *npj Biofilms and Microbiomes*, 10(1), 150

- Feng, X., Wang, M., Li, Q., Qin, Y., Sun, B., Tan, P.,... & Zhang, J. (2024). Comammox dominate soil nitrification under different N fertilization regimes in semi-arid areas of Northeast China. *Applied Soil Ecology*, 193, 105119
- Fierer, N. (2009). Microbial biogeography: Patterns in microbial diversity across space and time. *Science*, 326(5953), 1238–1240
- Fierer, N., Lauber, C. L., Ramirez, K. S., Zaneveld, J., Bradford, M. A., & Knight, R. (2012). Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. *The ISME Journal*, 6(5), 1007-1017
- Fierer, N. (2017). Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 15(10), 579–590
- Finks, S. S., Moudgalya, P., Weihe, C., & Martiny, J. B. (2024). The contribution of plasmids to trait diversity in a soil bacterium. *ISME communications*, 4(1), 025
- Fornara, D. A., Wasson, E. A., Christie, P., & Watson, C. J. (2016). Long-term nutrient fertilization and the carbon balance of permanent grassland: any evidence for sustainable intensification?. *Biogeosciences*, 13(17), 4975-4984
- Fornara, D. A., Flynn, D., & Caruso, T. (2020). Improving phosphorus sustainability in intensively managed grasslands: The potential role of arbuscular mycorrhizal fungi. *Science of The Total Environment*, 706, 135744
- French, E., Kaplan, I., Iyer-Pascuzzi, A., Nakatsu, C. H., & Enders, L. (2021). Emerging strategies for precision microbiome management in diverse agroecosystems. *Nature Plants*, 7(3), 256–267
- Frey-Klett, P., Garbaye, J., & Tarkka, M. (2007). The mycorrhiza helper bacteria concept and past, present, and future perspectives. *FEMS Microbiology Ecology*, 61(1), 13-24
- Galata, V., Vieira-Silva, S., уровне, Д., уровне, Д., уровне, Д., уровне, Д., & уровне, Д. (2019). PLSDb: the Plasmid Sequence DataBase. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D199–D204
- Gallego, F., Redo, D., Gutiérrez, J., & Sacristán, V. (2023). Land use and ecosystem service dynamics in the Río de la Plata grasslands. *Ecological Indicators*
- Galli, M., Feldmann, F., Vogler, U. K., & Kogel, K. H. (2024). Can biocontrol be the game-changer in integrated pest management? A review of definitions, methods and strategies. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 131(2), 265-291
- Gan, X., Janus, J., Willbold, S., Dombinov, V., Kuhn, A. J., Amelung, W.,... & Schrey, S. D. (2025). Wheat growth and phosphorus uptake from polyculture algal biofilms are synergistically modulated by arbuscular mycorrhizal fungi and *Serendipita vermifera*. *Plant and Soil*, 1-18

- Gao, C., Xu, L., Montoya, L., Madera, M., Hollingsworth, J., Chen, L.,... & Taylor, J. W. (2022). Co-occurrence networks reveal more complexity than community composition in resistance and resilience of microbial communities. *Nature Communications*, 13(1), 3867
- Goyenola, G. (2023). Uruguay's water crisis: Prepare for future events. *Nature*, 618(7966), 675-675. Gao, Y., & Cabrera Serrenho, A. (2023). Greenhouse gas emissions from nitrogen fertilizers could be reduced by up to one-fifth of current levels by 2050 with combined interventions. *Nature Food*, 4(2), 170-178
- Garaycochea, S., Altier, N. A., Leoni, C., Neal, A. L., & Romero, H. (2023). Abundance and phylogenetic distribution of eight key enzymes of the phosphorus biogeochemical cycle in grassland soils. *Environmental Microbiology Reports*, 15(5), 352-369
- Garaycochea, S., Romero, H., Beyhaut, E., Neal, A. L., & Altier, N. (2020). Soil structure, nutrient status and water holding capacity shape Uruguayan grassland prokaryotic communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 96(12), fiae207.
- Garcia, J., Gannett, M., Wei, L., Cheng, L., Hu, S., Sparks, J.,... & Kao-Kniffin, J. (2022). Selection pressure on the rhizosphere microbiome can alter nitrogen use efficiency and seed yield in *Brassica rapa*. *Communications Biology*, 5(1), 959
- García, I. V., Covacevich, F., Fernández-López, C., & Cabello, M. N. (2023). *Lotus tenuis* maintains high arbuscular mycorrhizal diversity in grasslands regardless of soil properties or management. *Rhizosphere*, 27, 100754
- García, S., Pezzani, F., Guido, A., & Lattanzi, F. A. (2025). Degradation of Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis: A Mechanism Underlying *Cynodon dactylon* Invasion in Grasslands? *Journal of Vegetation Science*, 36(1), e70010
- García-Préchac, F., Salvo, L., Ernst, O., Siri-Prieto, G., Quincke, J. A., & Terra, J. A. (2022). Long-Term Effects of Different Agricultural Soil Use and Management Systems on Soil Degradation in Uruguay. En R. Li, T. L. Napier, S. A. El-Swaify, M. Sabir, & E. Rienzi (Eds.), *Global Degradation of Soil and Water Resources* (pp. 77-92). Springer Nature Singapur
- Ge, Z., Du, H., Gao, Y., & Qiu, W. (2018). Analysis on metabolic functions of stored rice microbial communities by BIOLOG ECO microplates. *Frontiers in microbiology*, 9, 1375
- Giménez, M. (2022). *plaSquid: A pipeline for plasmidome characterization from metagenomic data* (Version 1.0) [Software]
- Gomez-Casanovas, N., Blanc-Betes, E., Moore, C. E., Bernacchi, C. J., Kantola, I., & DeLucia, E. H. (2021). A review of transformative strategies for climate mitigation by grasslands. *Science of the Total Environment*, 799, 149466
- Gomez-Ramirez, L. F., Uribe-Velez, D. (2021). Phosphorus Solubilizing and Mineralizing *Bacillus* spp. Contribute to Rice Growth Promotion Using Soil Amended with Rice Straw. *Curr Microbiol* 78, 932–943

- Gomzhina, M. M., Gasich, E. L., Khlopunova, L. B., et al. (2020). Paraphoma species associated with Convolvulaceae. *Mycological Progress*, 19, 185–194
- Goyenola, G. (2023). Uruguay's water crisis: Prepare for future events. *Nature*, 618(7966), 675-675.
- Gross, K. L., & Mittelbach, G. G. (2017). Negative effects of fertilization on grassland species richness are stronger when tall clonal species are present. *Folia Geobotanica*, 52, 401-409
- Gryndler, M., Hršelová, H., Klír, J. et al. (2003). Long-term fertilization affects the abundance of saprotrophic microfungi degrading resistant forms of soil organic matter. *Folia Microbiol* 48, 76–82
- Guerra, C. A., Bardgett, R. D., Caon, L., Crowther, T. W., Delgado-Baquerizo, M., Montanarella, L.,... & Eisenhauer, N. (2021). Tracking, targeting, and conserving soil biodiversity. *Science*, 371(6526), 239-241
- Guido, A., Varela, R. D., Baldassini, P., & Paruelo, J. (2014). Spatial and temporal variability in aboveground net primary production of Uruguayan grasslands. *Rangeland Ecology & Management*, 67(1), 30-38
- Gutiérrez, F., Gallego, F., Paruelo, J. M., & Rodríguez, C. (2020). Damping and lag effects of precipitation variability across trophic levels in Uruguayan rangelands. *Agricultural Systems*, 185, 102956
- Gwak, J. H., Awala, S. I., Nguyen, N. L., Yu, W. J., Yang, H. Y., von Bergen, M.,... & Rhee, S. K. (2022). Sulfur and methane oxidation by a single microorganism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(32), e2114799119
- Habtewold, J. Z., Helgason, B. L., Yanni, S. F., Janzen, H. H., Ellert, B. H., & Gregorich, E. G. (2020). Litter composition has stronger influence on the structure of soil fungal than bacterial communities. *European Journal of Soil Biology*, 98, 103190
- Hagmann, D. F., Goodey, N. M., Mathieu, C., Evans, J., Aronson, M. F., Gallagher, F., & Krumins, J. A. (2015). Effect of metal contamination on microbial enzymatic activity in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 91, 291-297
- Hallasgo, A. M., Hauser, C., Steinkellner, S., & Hage-Ahmed, K. (2022). Single and coinoculation of Serendipita herbamans with arbuscular mycorrhizal fungi reduces Fusarium wilt in tomato and slows disease progression in the long-term. *Biological Control*, 168, 104876
- Ham, S. H., Yoon, A. R., Oh, H. E., & Park, Y. G. (2022). Plant growth-promoting microorganism Pseudarthrobacter sp. NIBRBAC000502770 enhances the growth and flavonoid content of Geum alepicum. *Microorganisms*, 10(6), 1241
- Han, L., Xu, M., Kong, X., Liu, X., Wang, Q., Chen, G., & Nie, J. (2022). Deciphering the diversity, composition, function, and network complexity of the soil microbial community after repeated exposure to a fungicide boscalid. *Environmental Pollution*, 312, 120060

- Han, Z., Zhang, Z., Li, Y., Wang, B., Xiao, Q., Li, Z.,... & Chen, J. (2023). Effect of Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculation on endophytic bacteria of lettuce. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 126, 102036
- Hanisch, M., Schweiger, O., Cord, A. F., Volk, M., & Knapp, S. (2020). Plant functional traits shape multiple ecosystem services, their trade-offs and synergies in grasslands. *Journal of Applied Ecology*, 57(8), 1535-1550
- Hannula, S. E., Heinen, R., Huberty, M., Steinauer, K., De Long, J. R., Jongen, R., & Bezemer, T. M. (2021). Persistence of plant-mediated microbial soil legacy effects in soil and inside roots. *Nature communications*, 12(1), 5686
- Harpole, W. S., Ngai, J. T., Cleland, E. E., Seabloom, E. W., Borer, E. T., Bracken, M. E.,... & Smith, J. E. (2011). Nutrient co-limitation of primary producer communities. *Ecology Letters*, 14(9), 852–862
- Harpole, W., Sullivan, L., Lind, E. et al. (2016). Addition of multiple limiting resources reduces grassland diversity. *Nature*, 537, 93–96
- Harrell Jr, F. E., & Harrell Jr, M. F. E. (2019). Package ‘hmisc’. CRAN2018, 2019, 235-236
- Hartmann, M., Frey, B., Mayer, J., Mäder, P., & Widmer, F. (2015). Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming. *The ISME journal*, 9(5), 1177-1194
- Hartmann, M., & Six, J. (2023). Soil structure and microbiome functions in agroecosystems. *Nature Reviews Earth & Environment*, 4(1), 4-18
- Hautier, Y., Niklaus, P. A., & Hector, A. (2009). Competition for light causes plant biodiversity loss after eutrophication. *Science*, 324(5927), 636-638
- Hautier, Y., Zhang, P., Loreau, M. et al. General destabilizing effects of eutrophication on grassland productivity at multiple spatial scales. *Nat Commun* 11, 5375 (2020)
- Hayatsu, M., Katsuyama, C., & Tago, K. (2021). Overview of recent researches on nitrifying microorganisms in soil. *Soil Science and Plant Nutrition*, 67(6), 619-632
- Hayes, M. H., Tseng, T. Y., & Wang, M. K. (2007). Chemistry of soil organic matter. *Taiwan J For Sci*, 22(3), 215-26
- Helfenstein, J., Ringeval, B., Tamburini, F., Mulder, V. L., Goll, D. S., He, X.,... & Frossard, E. (2024). Understanding soil phosphorus cycling for sustainable development: A review. *One Earth*, 7(10), 1727-1740
- Henwood, W. D. (2010). Toward a strategy for the conservation and protection of the world's temperate grasslands. *Great Plains Research*, 121-134
- Hillel, D. (2004). Introduction to environmental soil physics. Academic Press

- Hirsch, P. R., & Mauchline, T. H. (2015). The importance of the microbial N cycle in soil for crop plant nutrition. *Advances in Applied Microbiology*, 93, 45-71
- Hou, E., Luo, Y., Kuang, Y., Chen, C., Lu, X., Jiang, L.,... & Wen, D. (2020). Global meta-analysis shows pervasive phosphorus limitation of aboveground plant production in natural terrestrial ecosystems. *Nature communications*, 11(1), 637
- Hrovat, K., Dutilh, B. E., Medema, M. H., & Melkonian, C. (2024). Taxonomic resolution of different 16S rRNA variable regions varies strongly across plant-associated bacteria. *ISME communications*, 4(1), ycae034.
- Hu, H. W., Chen, D., & He, J. Z. (2015). Microbial regulation of terrestrial nitrous oxide formation: understanding the biological pathways for prediction of emission rates. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(5), 729-749
- Hu, H. W., et al. (2015). Contrasting soil microbial responses to organic versus inorganic fertilization. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(3), fiv004
- Hu, X., Liu, J., Liang, A., Gu, H., Liu, Z., Jin, J., & Wang, G. (2025). Soil metagenomics reveals reduced tillage improves soil functional profiles of carbon, nitrogen, and phosphorus cycling in bulk and rhizosphere soils. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 379, 109371
- Huang, W., Kuzyakov, Y., Niu, S., Luo, Y., Sun, B., Zhang, J., & Liang, Y. (2023). Drivers of microbially and plant-derived carbon in topsoil and subsoil. *Global Change Biology*, 29(22), 6188-6200
- Huang, Q., Wang, B., Shen, J., Xu, F., Li, N., Jia, P.,... & Huang, Y. (2024). Shifts in C-degradation genes and microbial metabolic activity with vegetation types affected the surface soil organic carbon pool. *Soil Biology and Biochemistry*, 192, 109371
- Hyatt, D., Chen, G. L., LoCascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W., & Hauser, L. J. (2010). Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC bioinformatics*, 11(1), 119
- Isbell, F., Reich, P. B., Tilman, D., Hobbie, S. E., Polasky, S., & Binder, S. (2013). Nutrient enrichment, biodiversity loss, and consequent declines in ecosystem productivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(29), 11911-11916
- Issifu, M., Songoro, E. K., Onguso, J., Ateka, E. M., & Ngumi, V. W. (2022). Potential of *Pseudarthrobacter chlorophenolicus* BF2P4-5 as a biofertilizer for the growth promotion of tomato plants. *Bacteria*, 1(4), 191-206
- Ivica, T., Smirnova, A. V., He, Z., Dunfield, P. F. (2014). The (d)evolution of methanotrophy in the Beijerinckiaceae—a comparative genomics analysis. *The ISME Journal*, 8(2), 369–382
- Jangir, P., Shekhawat, P. K., Bishnoi, A., Ram, H., & Soni, P. (2021). Role of *Serendipita indica* in enhancing drought tolerance in crops. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 116, 101691

- Jansson, J. K., & Hofmockel, K. S. (2020). Soil microbiomes and climate change. *Nature Reviews Microbiology*, 18(1), 35–46
- Jaurena, M., Giorello, D., Cruz, P., Lemaire, G., & Nabinger, C. (2014). Medium Term Effects of Water Availability and NP Fertilization Interactions on the Productivity and Composition of Natural Grasslands of Uruguay. *Options Méditerranéennes. Série A, Séminaires Méditerranéens*, 167-171
- Jaurena, M., Durante, M., Devincenzi, T., Savian, J. V., Bendersky, D., Moojen, F. G.,... & Lattanzi, F. A. (2021). Native grasslands at the core: A new paradigm of intensification for the Campos of Southern South America to increase economic and environmental sustainability. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 547834
- Jauri, P. V., Altier, N., & Kinkel, L. L. (2016). *Streptomyces for sustainability. In Microbial Models: From Environmental to Industrial Sustainability* (pp. 251-276). Singapore: Springer Singapore
- Ji, C., Guo, J., Ma, Y., Xu, X., Zang, T., Liu, S.,... & Zheng, W. (2024). Application progress of culturomics in the isolated culture of rhizobacteria: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72(14), 7586-7595
- Jia, J., de Goede, R., Li, Y., Zhang, J., Wang, G., Zhang, J., & Creamer, R. (2025). Unlocking soil health: Are microbial functional genes effective indicators?. *Soil Biology and Biochemistry*, 204, 109768
- Jing, J., Cong, W. F., & Bezemer, T. M. (2022). Legacies at work: plant–soil–microbiome interactions underpinning agricultural sustainability. *Trends in Plant Science*, 27(8), 781-792
- Jones, F. P., Clark, I. M., King, R., Shaw, L. J., Woodward, M. J., & Hirsch, P. R. (2016). Novel European free-living, non-diazotrophic Bradyrhizobium isolates from contrasting soils that lack nodulation and nitrogen fixation genes—a genome comparison. *Scientific reports*, 6(1), 25858
- Jurburg, S. D., Blanco, M. J. Á., Chatzinotas, A., Kazem, A., König-Ries, B., Babin, D.,... & Frene, J. P. (2024). Datathons: fostering equitability in data reuse in ecology. *Trends in Microbiology*
- Jurburg, S. D., Chatzinotas, A., Kostakou, M., & Wang, L. (2025). Report on spatial sampling designs for long term biodiversity monitoring of soil biota. *Ecoevorxiv. org*
- Karunarathna, A., Tibpromma, S., Jayawardena, R. S., Nanayakkara, C., Asad, S., Xu, J.,... & Kumla, J. (2021). Fungal pathogens in grasslands. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 695087
- Kawakoshi, A., Nakazawa, H., Fukada, J., Sasagawa, M., Katano, Y., Nakamura, S.,... & Fujita, N. (2012). Deciphering the genome of polyphosphate accumulating actinobacterium *Microlunatus phosphovor*. *DNA research*, 19(5), 383-394
- Klimasmith, I. M., & Kent, A. D. (2022). Micromanaging the nitrogen cycle in agroecosystems. *Trends in microbiology*, 30(11), 1045-1055

- 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), e1-e1
- Kobae, Y. (2019). Dynamic phosphate uptake in arbuscular mycorrhizal roots under field conditions. *Frontiers in Environmental Science*, 6, 159
- Kopittke, P. M., Minasny, B., Pendall, E., Rumpel, C., & McKenna, B. A. (2024). Healthy soil for healthy humans and a healthy planet. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 54(3), 210-221
- Kravchenko, A. N., Guber, A. K., Razavi, B. S., Koestel, J., Quigley, M. Y., Robertson, G. P., & Kuzyakov, Y. (2019). Microbial spatial footprint as a driver of soil carbon stabilization. *Nature communications*, 10(1), 3121.
- Kuhar, F., Tejedor-Calvo, E., Sequeira, A., Pelissero, D., Cosse, M., Donnini, D., & Nouhra, E. (2024). Comprehensive characterization of *Tuber maculatum*, New in Uruguay: Morphological, molecular, and aromatic analyses. *Journal of Fungi*, 10(6), 421.
- Kuusemets, L., Mander, Ü., Escuer-Gatius, J., Astover, A., Kauer, K., Soosaar, K., & Espenberg, M. (2025). Interactions of fertilisation and crop productivity in soil nitrogen cycle microbiome and gas emissions. *Soil*, 11(1), 1-15
- Kuzyakov, Y., & Mason-Jones, K. (2018). Viruses in soil: Nano-scale undead drivers of microbial life, biogeochemical turnover and ecosystem functions. *Soil Biology and Biochemistry*, 305-317
- Kästner, M., Miltner, A., Thiele-Bruhn, S., & Liang, C. (2021). Microbial necromass in soils—linking microbes to soil processes and carbon turnover. *Frontiers in Environmental Science*, 9, 756378
- Labouyrie, M., Ballabio, C., Romero, F., Panagos, P., Jones, A., Schmid, M. W., Mikryukov, V., Dulya, O., Tedersoo, L., Bahram, M., Lugato, E., Van Der Heijden, M. G. A., & Orgiazzi, A. (2023). Patterns in soil microbial diversity across Europe. *Nature Communications*, 14(1), 3311
- Lahti, L., Salojärvi, J., Salonen, A., Scheffer, M., & De Vos, W. M. (2014). Tipping elements in the human intestinal ecosystem. *Nature communications*, 5(1), 4344
- Lal, R. (2020). Soil health and climate change. *Sustainability*, 12(9), 3719
- Laranjo, M., Alexandre, A., & Oliveira, S. (2014). Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the *Mesorhizobium* genus. *Microbiological Research*, 169(1), 2-17
- Lastovetsky, O. A., Caruso, T., Brennan, F. P., Wall, D. P., McMahon, S., & Doyle, E. (2022). Evidence of a selective and bi-directional relationship between arbuscular mycorrhizal fungal and bacterial communities co-inhabiting plant roots. *Environmental Microbiology*, 24(11), 5378-5391

- Lauber, C. L., Strickland, M. S., Bradford, M. A., & Fierer, N. (2008). The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *SoilMarquesBiology and Biochemistry*, 40(9), 2407–2415
- Lavallee, J. M., Chomel, M., Alvarez Segura, N., De Castro, F., Goodall, T., et al. (2024). Land management shapes drought responses of dominant soil microbial taxa across grasslands. *Nat Commun* 15, 29
- Le Pioufle, O., Ganoudi, M., Calonne-Salmon, M., Ben Dhaou, F., & Declerck, S. (2019). *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 improves phosphorus uptake and water use efficiency in maize plants during recovery from drought stress. *Frontiers in plant science*, 10, 897
- Le Provost, G., Schenk, N. V., Penone, C., Thiele, J., Westphal, C., Allan, E.,... & Manning, P. (2023). The supply of multiple ecosystem services requires biodiversity across spatial scales. *Nature ecology & evolution*, 7(2), 236-249
- Leff, J. W., Jones, S. E., Prober, S. M., Barberán, A., Borer, E. T., Firn, J. L.,... Fierer, N. (2015). Consistent responses of soil microbial communities to elevated nutrient inputs in grasslands across the globe. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(35), 10967-10972
- Leifheit, E. F., Veresoglou, S. D., Lehmann, A., Morris, E. K., & Rillig, M. C. (2014). Multiple factors influence the role of arbuscular mycorrhizal fungi in soil aggregation—a meta- analysis. *Plant and Soil*, 374(1), 523-537
- Leigh, M. B., Pellizari, V. H., Uhlík, O., Sutka, R., Rodrigues, J., Ostrom, N. E.,... Tiedje, J. M. (2007). Biphenyl-utilizing bacteria and their functional genes in a pine root zone contaminated with polychlorinated biphenyls (PCBs). *The ISME Journal*, 1(2), 134-148
- Lekberg, Y., Arnillas, C. A., Borer, E. T., Bullington, L. S., Fierer, N., Kennedy, P. G., & Henning, J. A. (2021). Nitrogen and phosphorus fertilization consistently favor pathogenic over mutualistic fungi in grassland soils. *Nature Communications*, 12(1), 3484
- Lengyel, S., Deri, E., & Magura, T. (2016). Species richness responses to structural or compositional habitat diversity between and within grassland patches: a multi-taxon approach. *PLoS ONE*, 11(2), e0149662
- Lennon, J. T., Muscarella, M. E., Placella, S. A., & Lehmkuhl, B. K. (2018). How, when, and where relic DNA affects microbial diversity. *MBio*, 9(3), 10-1128
- Leoni, C. (2024). INIA's Agro-Environmental Platform: a network of long term experiments. *Agrociencia Uruguay*, 28, e1608-e1608
- Leuthold, S., Lavallee, J. M., Haddix, M. L., & Cotrufo, M. F. (2024). Contrasting properties of soil organic matter fractions isolated by different physical separation methodologies. *Geoderma*, 445, 116870

- Lezama, F., Cáceres, D., Pañella, P., & del Pino, A. (2024). Land-Use Intensification by Overseeding Legumes on Natural Grasslands: Impacts on Plant Diversity. *Rangeland Ecology & Management*, 93, 95-103
- Li, D., Luo, R., Liu, C. M., Leung, C. M., Ting, H. F., Sadakane, K., Yamashita, H., & Lam, T. W. (2015). MEGAHIT v1. 0: A fast and scalable metagenomic assembler driven by advanced methodologies. *Bioinformatics*, 31(16), 2592–2594
- Li, H. (2018). Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 34(18), 3094–3100
- Li, H., A. Lehmann, R. Rongstock, Y. Xu, E. Kunze, P. Meidl and M.C. Rillig, (2025). Diversity of organic amendments increases soil functions and plant growth. *Plants People Planet*, 7: 80-86.
- Li, J. T., Lu, J. L., Wang, H. Y., Fang, Z., Wang, X. J., Feng, S. W.,... & Liang, J. L. (2021). A comprehensive synthesis unveils the mysteries of phosphate-solubilizing microbes. *Biological Reviews*, 96(6), 2771-2793
- Li, X. F., Wang, Z. G., Bao, X. G., Sun, J. H., Yang, S. C., Wang, P.,... & Li, L. (2021). Long-term increased grain yield and soil fertility from intercropping. *Nature Sustainability*, 4(11), 943-950
- Li, S., Jiang, H., Guo, W., Zhang, W., & Zhang, Q. (2023). From soil to river: revealing the mechanisms underlying the high riverine nitrate levels in a forest dominated catchment. *Water Research*, 241, 120155
- Li, S., Lian, W. H., Han, J. R., Ali, M., Lin, Z. L., Liu, Y. H.,... & Dong, L. (2023). Capturing the microbial dark matter in desert soils using culturomics-based metagenomics and high-resolution analysis. *npj Biofilms and Microbiomes*, 9(1), 67
- Li, Z., Wang, Y., Liu, Z., Han, F., Chen, S., & Zhou, W. (2023). Integrated application of phosphorus-accumulating bacteria and phosphorus-solubilizing bacteria to achieve sustainable phosphorus management in saline soils. *Science of The Total Environment*, 885, 163971
- Li, J., Yang, H., Duan, Y. Y., Sun, X. D., Pang, X. P., & Guo, Z. G. (2024). Fungi contribute more than bacteria to the ecological uniqueness of soil microbial communities in alpine meadows. *Global Ecology and Conservation*, 55, e03246
- Li, Y., Xiao, M., Wei, L., Liu, Q., Zhu, Z., Yuan, H., Wu, J., Yuan, J., Wu, X., Kuzyakov Y. & Ge, T. (2024). Bacterial necromass determines the response of mineral-associated organic matter to elevated CO₂. *Biology and Fertility of Soils*, 60(3), 327-340
- Li, H., A. Lehmann, R. Rongstock, Y. Xu, E. Kunze, P. Meidl and M. C. Rillig, (2025). Diversity of organic amendments increases soil functions and plant growth. *Plants People Planet*, 7: 80-86
- Liang, C., Amelung, W., Lehmann, J., & Kästner, M. (2019). Quantitative assessment of microbial necromass contribution to soil organic matter. *Global change biology*, 25(11), 3578-3590

- Liao, X., Zhao, J., Yi, Q., Li, J., Li, Z., Wu, S.,... & Wang, K. (2023). Metagenomic insights into the effects of organic and inorganic agricultural managements on soil phosphorus cycling. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 343, 108281
- Liu, X., Chen, D., Yang, T., Huang, F., Fu, S., & Li, L. (2020). Changes in soil labile and recalcitrant carbon pools after land-use change in a semi-arid agro-pastoral ecotone in Central Asia. *Ecological Indicators*, 110, 105925.
- Lin, C., Hu, W., Qin, X., Fei, Y., & Hu, D. (2025). Effects of *Serendipita indica* on the Morphological and Physiological Characteristics of *Agrostis stolonifera* L. Under Drought Stress. *Agronomy*, 15(1)
- Liu, H., Hou, L., Kang, N., Nan, Z., & Huang, J. (2022). The economic value of grassland ecosystem services: A global meta-analysis. *Grassland Research*, 1(1), 63-74
- Liu, J., Li, Y., Han, C., Yang, D., Yang, J., Cade-Menun, B. J., Chen, Y., & Sui, P. (2022). Maize-soybean intercropping facilitates chemical and microbial transformations of phosphorus fractions in a calcareous soil. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1028969
- Liu, S., García-Palacios, P., Tedersoo, L., Guirado, E., Van Der Heijden, M. G. A., Wagg, C., Chen, D., Wang, Q., Wang, J., Singh, B. K., & Delgado-Baquerizo, M. (2022). Phylotype diversity within soil fungal functional groups drives ecosystem stability. *Nature Ecology & Evolution*, 6(7), 900-909
- Liu, H. Y., Huang, N., Zhao, C. M., & Li, J. H. (2023). Responses of carbon cycling and soil organic carbon content to nitrogen addition in grasslands globally. *Soil Biology and Biochemistry*, 186, 109164
- Liu, H., Zhang, J., Zhang, L., Zhang, X., & Yang, R. (2023). *Funneliformis mosseae* influences leaf decomposition by altering microbial communities under saline-alkali conditions. *Science of The Total Environment*, 895, 165079
- Liu, J., Li, F. Y., Liu, J., Wang, S., Liu, H., Ding, Y., & Ji, L. (2023). Grazing promotes soil phosphorus cycling by enhancing soil microbial functional genes for phosphorus transformation in plant rhizosphere in a semi-arid natural grassland. *Geoderma*, 430, 116303
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42(1), 490–495
- Lori, M., Symnaczik, S., Mäder, P., De Deyn, G. B., & Gattinger, A. (2017). Organic farming enhances soil microbial abundance and activity—A meta-analysis and meta-regression. *PLOS ONE*, 12(7), e0180442
- Louca, S., Polz, M. F., Mazel, F., Albright, M. B., Huber, J. A., O'Connor, M. I.,... & Parfrey, L. W. (2018). Function and functional redundancy in microbial systems. *Nature ecology & evolution*, 2(6), 936-943
- Lugo, M. A., Ontivero, R. E., Iriarte, H. J., Yelikbayev, B., & Pagano, M. C. (2023). The Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and their associations in South America: a case study of Argentinean and Brazilian cattle raising productive ecosystems: a review. *Diversity*, 15(9), 1006

- Luo, X., Hu, Y., Xia, J., Zhang, K., Ma, L., Xu, Z., & Ma, J. (2024). Morphological and Phylogenetic Analyses Reveal Three New Species of *Didymella* (Didymellaceae, Pleosporales) from Jiangxi, China. *Journal of Fungi*, 10, 75
- Lyons, R., Clarke, A. B. C., Lapis-Gaza, H. R., Sun, J., Birt, H. W., Pattison, A. B., & Dennis, P. G. (2025). Landuse affects the likelihood of soil colonization by a key plant pathogen. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 393, 109814
- Ma, L., Song, D., Liu, M., Li, Y., & Li, Y. (2022). Effects of earthworm activities on soil nutrients and microbial diversity under different tillage measures. *Soil and Tillage Research*, 222, 105441
- Ma, X., Xu, X., Geng, Q., Luo, Y., Ju, C., Li, Q., & Zhou, Y. (2023). Global arbuscular mycorrhizal fungal diversity and abundance decreases with soil available phosphorus. *Global Ecology and Biogeography*, 32(8), 1423-1434
- Maharana, B., Mahalle, S., Bhende, R., & Dafale, N. A. (2024). Repercussions of Prolonged Pesticide Use on Natural Soil Microbiome Dynamics Using Metagenomics Approach. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1-21
- Mahmud, K., Lee, K., Hill, N. S., Mergoum, A., & Missaoui, A. (2021). Influence of Tall Fescue *Epichloë* Endophytes on Rhizosphere Soil Microbiome. *Microorganisms*, 9(9), 1843
- Mallick, H., Rahnavard, A., McIver, L. J., Ma, S., Zhang, Y., Nguyen, L. H., Tickle, T. L., Weingart, G., Ren, B., Schwager, E. H., Chatterjee, S., Thompson, K. N., Wilkinson, J. E., Subramanian, A., Lu, Y., Waldron, L., Paulson, J. N., Franzosa, E. A., Bravo, H. C., & Huttenhower, C. (2021). Multivariable association discovery in population-scale meta-omics studies. *PLOS Computational Biology*, 17(11), e1009442
- Mallick, H., Rahnavard, G., McIver, L. J., Ma, S., Saleem, M. Z., Subramanian, A., Irvine, J. H., Haiminen, N., Tikkanen, E., Vatanen, T., Franzosa, E. A., Tripathi, S., Almugbel, A., Wardeh, H., Debelius, J. W., Ursell, L. K., Pasolli, E., ... Huttenhower, C. (2021). Multivariable association of microbial community profiles with continuous metadata. *Nature Communications*, 12(1), 667
- Manici, L. M., Caputo, F., De Sabata, D., & Fornasier, F. (2024). The enzyme patterns of Ascomycota and Basidiomycota fungi reveal their different functions in soil. *Applied Soil Ecology*, 196, 105323
- Manzoni, S., & Cotrufo, M. F. (2024). Mechanisms of soil organic carbon and nitrogen stabilization in mineral-associated organic matter—insights from modeling in phase space. *Biogeosciences*, 21(18), 4077-4098
- Mariotte, P., Mehrabi, Z., Bezemer, T. M., De Deyn, G. B., Kulmatiski, A., Drigo, B., ... & Kardol, P. (2018). Plant–soil feedback: Bridging natural and agricultural sciences. *Trends in Ecology & Evolution*, 37(3), 252–265

- Markfeld, M., Titcomb, G., Randriamoria, T. M., Sehgal, G., Baksh, N., Kerrigan, A., Soarimalala, A., Nunn, C. L., Pilosof, S. (2025). Differential assembly of core and non-core host-microbe network structures along a land-use change gradient. *EcoEvoRxiv*
- Marques, A. C. R., de Oliveira, L. B., Nicoloso, F. T., Jacques, R. J. S., Giacomini, S. J., & de Quadros, F. L. F. (2017). Biological nitrogen fixation in C4 grasses of different growth strategies of South America natural grasslands. *Applied Soil Ecology*, 113, 54-62
- Masuda, Y., Yamanaka, H., Xu, Z., Shiratori, Y., Aono, T., Amachi, S., Senoo, K., & Itoh, H. (2020). Diazotrophic *Anaeromyxobacter* isolates from soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(5), e00956-20
- 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
- Meidl, P., Lehmann, A., Bi, M., Breitenreiter, C., Benkrama, J., Li, E., & Rillig, M. C. (2024). Combined application of up to ten pesticides decreases key soil processes. *Environmental Science and Pollution Research*, 31(8), 11995-12004
- Mesny, F., Hacquard, S., & Thomma, B. P. (2023). Co-evolution within the plant holobiont drives host performance. *EMBO reports*, 24(9), e57455
- Michelini, D. F., Lattanzi, F. A., Rodríguez-Blanco, A., Del Pino, A., Piccin Torchelsen, F., Lezama, F.,... & Lambers, H. (2025). Phenotypic plasticity accounts for changes in plant phosphorus-acquisition strategies from mining to scavenging along a gradient of soil phosphorus availability in South American Campos grasslands. *Journal of Ecology*, 113(1), 4-21
- Michelson, H. (2009). Conservation challenges in South American grasslands. *Biological Conservation*
- Mikheenko, A. V., Saveliev, V. V., & Gurevich, A. (2016). MetaQUAST: assessment of metagenome assembly quality. *Bioinformatics*, 32(7), 1088–1090
- Mikryukov, V., Dulya, O., Zizka, A., Bahram, M., Hagh-Doust, N., Anslan, S., Prylutskyi, O., Delgado-Baquerizo, M., Maestre, F. T., Nilsson, H., Pärn, J., Öpik, M., Moora, M., Zobel, M., Espenberg, M., Mander, Ü., Khalid, A. N., Corrales, A., Agan, A.,... Tedersoo, L. (2023). Connecting the multiple dimensions of global soil fungal diversity. *Science Advances*, 9(48), eadj8016
- Mikryukov, V., Dulya, O., Zizka, A., Bahram, M., Hagh-Doust, N., Anslan, S.,... & Tedersoo, L. (2023). Connecting the multiple dimensions of global soil fungal diversity. *Science advances*, 9(48), eadj8016
- Miranda, L., Pereira, M. C., Veloso, T. G. R., Tartarine, N., de Carvalho, S. B. G., & Kasuya, M. C. M. (2021). Endophytic fungi in roots of native orchids of rupestrian grasslands (campos rupestres) in Serra do Cipó, Brazil. *Iheringia, Série Botânica*, 76
- Mitchell, M. F., MacLean, M. G., & DeAngelis, K. M. (2022). Microbial necromass response to soil warming: a meta-analysis. *Frontiers in Soil Science*, 2, 987178

- Modernel, P., Rossing, W. A. H., Corbeels, M., Dogliotti, S., Picasso, V., & Titttonell, P. (2016). Land use change and ecosystem service provision in Pampas and Campos grasslands of southern South America. *Environmental Research Letters*, 11(11), 113002
- Modernel, P., Dogliotti, S., Alvarez, S., Corbeels, M., Picasso, V., Titttonell, P., & Rossing, W. A. (2018). Identification of beef production farms in the Pampas and Campos area that stand out in economic and environmental performance. *Ecological Indicators*, 89, 755-770
- Modernel, P., Picasso, V., Do Carmo, M., Rossing, W. A., Corbeels, M., Soca, P., ... & Titttonell, P. (2019). Grazing management for more resilient mixed livestock farming systems on native grasslands of southern South America. *Grass and Forage Science*, 74(4), 636-649.
- Morrissey, E. M., Kane, J., Tripathi, B. M., Rion, M. S. I., Hungate, B. A., Franklin, R.,... & Brzostek, E. (2023). Carbon acquisition ecological strategies to connect soil microbial biodiversity and carbon cycling. *Soil Biology and Biochemistry*, 177, 108893
- Mortensen, E. Ø., Abalos, D., & Rasmussen, J. (2025). Well-designed multi-species grassland mixtures enhance both soil carbon inputs and aboveground productivity. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 385, 109578
- Moureu, S., Caradec, T., Trivelli, X., Drobecq, H., Beury, D., Bouquet, P.,... & Hartkoorn, R. C. (2021). Rubrolone production by *Dactylosporangium vinaceum*: biosynthesis, modulation and possible biological function. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(13), 5541-5551
- Mulvaney, R. L. (1996). Nitrogen—inorganic forms. *Methods of soil analysis: Part 3 Chemical methods*, 5, 1123-1184.
- Nannipieri, P., et al. (2017). Soil enzymes and their role in nutrient cycling. In *Structure and functions of pedosphere* (pp. 173-188). Singapore: Springer Nature Singapore
- Nara, K., & Hogetsu, T. (2004). Ectomycorrhizal fungi on established shrubs facilitate subsequent seedling establishment of successional plant species. *Ecology*, 85(6), 1700-1707
- Neemisha, & Sharma, S. (2022). Soil enzymes and their role in nutrient cycling. In *Structure and functions of pedosphere* (pp. 173-188). Singapore: Springer Nature Singapore
- Nelson, P. N., & Baldock, J. A. (2005). Estimating the molecular composition of a diverse range of natural organic materials from solid-state ¹³C NMR and elemental analyses. *Biogeochemistry*, 72(1), 1-34
- Nelson, M. B., Martiny, A. C., & Martiny, J. B. (2016). Global biogeography of microbial nitrogen-cycling traits in soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(29), 8033-8040
- Nelson, D. W., & Sommers, L. E. (1996). Total carbon, organic carbon, and organic matter. *Methods of soil analysis: Part 3 Chemical methods*, 5, 961-1010.

- Nguyen, N. H., Song, Z., Bates, S. T., Branco, S., Tedersoo, L., Menke, J.,... & Kennedy, P. G. (2016). FUNGuild: an open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecology*, 20, 241-248
- Nikitin, D. A., Ivanova, E. A., Semenov, M. V., Zhelezova, A. D., Ksenofontova, N. A., Tkhakakhova, A. K., & Kholodov, V. A. (2023). Diversity, ecological characteristics and identification of some problematic phytopathogenic *Fusarium* in soil: a review. *Diversity*, 15(1), 49
- Niu, D., Yuan, X., Cease, A. J., Wen, H., Zhang, C., Fu, H., & Elser, J. J. (2018). The impact of nitrogen enrichment on grassland ecosystem stability depends on nitrogen addition level. *Science of the Total Environment*, 618, 1529-1538
- Nurk, S., Meleshko, D., Korobeynikov, A., & Pevzner, P. A. (2017). metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome Research*, 27(5), 824–834
- Obando, M., Correa-Galeote, D., Castellano-Hinojosa, A., Gualpa, J., Hidalgo, A., Alché, J. D. D.,... & Cassán, F. (2019). Analysis of the denitrification pathway and greenhouse gases emissions in *Bradyrhizobium* sp. strains used as biofertilizers in South America. *Journal of applied microbiology*, 127(3), 739-749
- Okamoto, S., Shinohara, H., Mori, T. et al. Root-derived CLE glycopeptides control nodulation by direct binding to HAR1 receptor kinase. *Nat Commun* 4, 2191 (2013)
- Oliveira, L. B., Soares, E. M., Jochims, F., Tiecher, T., Marques, A. R., Kuinchtner, B. C.,... & Quadros, F. L. (2015). Long-term effects of phosphorus on dynamics of an overseeded natural grassland in Brazil. *Rangeland Ecology & Management*, 68(6), 445-452
- Oliverio, A. M., Bissett, A., McGuire, K., Saltonstall, K., Turner, B. L., & Fierer, N. (2020). The Role of Phosphorus Limitation in Shaping Soil Bacterial Communities and Their Metabolic Capabilities. *mBio*, 11(5), e01718-20
- Olm, M. R., Brown, C. T., Brooks, B., & Banfield, J. F. (2017). dRep: a tool for fast and accurate genomic comparisons in large microbial datasets. *Nucleic Acids Research*, 45(9), e1
- Olm, M. R., West, P. T., Brooks, B., Firek, B. A., Baker, R., Thomas, B. C., & Banfield, J. F. (2021). InStrain: high-resolution microbial population genomics. *Genome Biology*, 22(1), 208
- Oren, A. (2014). The family xanthobacteraceae. In *The prokaryotes* (pp. 709-726). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Osono, T., Hobara, S., Hishinuma, T., & Azuma, J. I. (2011). Selective lignin decomposition and nitrogen mineralization in forest litter colonized by *Clitocybe* sp. *European Journal of Soil Biology*, 47(2), 114-121
- Oyedele, A. O., Ezaka, E., & Taiwo, L. B. (2024). Microbial biosynthesis of the classical phytohormones by plant growth-promoting microorganisms in plants. In *Microbial Biostimulants for Plant Growth and Abiotic Stress Amelioration* (pp. 345-366). Elsevier

- Palladino, C., García, I., & Fernández, G. (2023). Pesticide dependence and associated risks in Uruguayan agriculture: limitations in its approach. *Agrociencia Uruguay*, 27
- Panchal, P., Preece, C., Peñuelas, J., & Giri, J. (2022). Soil carbon sequestration by root exudates. *Trends in Plant Science*, 27(8), 749-757
- Pang, F., Li, Q., Solanki, M. K., Wang, Z., Xing, Y. X., & Dong, D. F. (2024). Soil phosphorus transformation and plant uptake driven by phosphate-solubilizing microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1383813
- Parameswari, E., Dhevagi, P., Bommi, S., & Krishnan, R. (2025). Comparative analysis of effects of nutrient management practices on soil microbiome and rhizosphere chemistry in *Solanum melongena* L. *Sustainability*, 17(17), 7832
- Paruelo, J. M., Beltrán, A., Sala, O. E., & Golluscio, R. A. (2007). Land-use changes and ecosystem service impacts in the Río de la Plata Grasslands. *Global Ecology and Biogeography*
- Paruelo, J. M., Sala, O. E., & Golluscio, R. A. (2016). Ecosystem Services Supply Index: Quantifying ecosystem service trends in grasslands. *Remote Sensing of Environment*
- Pañella, P. G., Guido, A., Jaurena, M., Cardozo, G., & Lezama, F. (2022). Fertilization and overseeding legumes on native grasslands leads to a hardly reversible degraded state. *Applied Vegetation Science*, 25(4), e12693
- Peng, Z., Qian, X., Liu, Y., Li, X., Gao, H., An, Y.,... & Jiao, S. (2024). Land conversion to agriculture induces taxonomic homogenization of soil microbial communities globally. *Nature communications*, 15(1), 3624
- Perotto, S., Girlanda, M., Martino, E. (2002). Ericoid mycorrhizal fungi: some new perspectives on old acquaintances. In: Smith, S. E., Smith, F. A. (eds) *Diversity and Integration in Mycorrhizas*. *Developments in Plant and Soil Sciences*, vol 94. Springer, Dordrecht
- Peterman, J. S., & Buzhdygan, O. Y. (2021). Grassland biodiversity. *Current Biology*, 31(19), R1195-R1201
- Philippot, L., Chenu, C., Kappler, A., Rillig, M. C., & Fierer, N. (2023). The interplay between microbial communities and soil properties. *Nature Reviews Microbiology*. 22(4), 226-239.
- Piazza, M., Pinto, P., Bazzoni, B., Berenstecher, P., Casas, C., Zieher, X. L., Mallerman, J., Méndez, M. S., Omacini, M., Piñeiro, G., Semmartin, M., Vivanco, L., & Yahdjian, L. (2024). From plant litter to soil organic matter: a game to understand carbon dynamics. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 22(4), e2724.
- Pishgar, R., Dominic, J. A., Sheng, Z., & Tay, J. H. (2019). Denitrification performance and microbial versatility in response to different selection pressures. *Bioresource technology*, 281, 72-83

- Plantureux, S., Peeters, A., & McCracken, D. (2005). Biodiversity in intensive grasslands: Effect of management, improvement and challenges. *Agronomy research*, 3(2), 153-164
- Prangel, E., Kasari-Toussaint, L., Neuenkamp, L., Noreika, N., Karise, R., Marja, R.,... & Helm, A. (2023). Afforestation and abandonment of semi-natural grasslands lead to biodiversity loss and a decline in ecosystem services and functions. *Journal of Applied Ecology*, 60(5), 825-836
- Pánek, M., Vlková, T., Michalová, T., Borovička, J., Tedersoo, L., Adamczyk, B.,... & Lopéz-Mondéjar, R. (2024). Variation of carbon, nitrogen and phosphorus content in fungi reflects their ecology and phylogeny. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1379825
- Qayyum, H., Ishaq, Z., Ali, A., Kayani, M. U. R., & Huang, L. (2025). Genome-resolved metagenomics from short-read sequencing data in the era of artificial intelligence. *Functional & Integrative Genomics*, 25(1), 124
- Qian, S., Zhang, Q., Li, S., Shi, R., He, X., Zi, S., & Liu, T. (2024). Arbuscular mycorrhiza and plant growth promoting endophytes facilitates accumulation of saponin under moderate drought stress. *Chinese Herbal Medicines*, 16(2), 214-226. P
- Qu, Q., Deng, L., Gunina, A., Hai, X., Deng, J., Shangguan, Z., & Kuzyakov, Y. (2024). Grazing exclusion increases soil organic C through microbial necromass of root-derived C as traced by ¹³C labelling photosynthate. *Biology and Fertility of Soils*, 60(3), 407-420
- Quan, Z., Huang, B., Lu, C., Shi, Y., Chen, X., Zhang, H., & Fang, Y. (2016). The fate of fertilizer nitrogen in a high nitrate accumulated agricultural soil. *Scientific reports*, 6(1), 21539.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P.,... & Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, 41(1), 590-596
- Quinn, JohnP., Peden, JosephM. M., & Dick, R. E. (1989). Carbon-phosphorus bond cleavage by Gram-positive and Gram-negative soil bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31(3)
- Rama, G., Oyarzabal, M., Cardozo, G., Lezama, F., & Baeza, S. (2022). Legume overseeding along with P fertilization increase forage production of temperate natural grasslands. *Agronomy*, 12(10), 2507
- Rama, G., Oyarzabal, M., Cardozo, G., Lezama, F., & Baeza, S. (2022). Legume Overseeding along with Phosphorus Fertilization Enhances Productivity in a Temperate South American Natural Grassland. *Agronomy Journal*, 114(1), 53-61
- Ramirez, K. S., Craine, J. M., & Fierer, N. (2012). Consistent effects of nitrogen amendments on soil microbial communities and processes across biomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(40), 16464–16469
- Ramoneda, J., Jensen, T. B., Price, M. N., Casamayor, E. O., & Fierer, N. (2023). Taxonomic and environmental distribution of bacterial amino acid auxotrophies. *Nature Communications*, 14(1), 7608

- Rappé, M. S., & Giovannoni, S. J. (2003). The uncultured microbial majority. *Annual Review of Microbiology*, 57, 369-394
- Rath, K. M., Maheshwari, A., Rousk, J., & McCulley, R. L. (2019). Linking microbial community structure to soil biogeochemistry in grasslands under plant community and climate change scenarios. *Soil Biology and Biochemistry*, 133, 179-186
- Ray, P., Guo, Y., Chi, M. H., Krom, N., Boschiero, C., Watson, B.,... & Craven, K. D. (2021). Serendipita fungi modulate the switchgrass root transcriptome to circumvent host defenses and establish a symbiotic relationship. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 34(10), 1128-1142
- Redo, D., Aide, T. M., Clark, M. L., & Grau, H. R. (2012). Landscape dynamics in the Río de la Plata grasslands. *Landscape Ecology*
- Reich, P. B., Hobbie, S. E., Lee, T., Ellsworth, D. S., West, J. B., Tilman, D.,... Trost, J. (2006). Nitrogen limitation constrains sustainability of ecosystem response to CO₂. *Nature*, 440(7086), 922-925
- Restovich, S. B., Andriulo, A. E., Armas-Herrera, C. M., Beribe, M. J., & Portela, S. I. (2019). Combining cover crops and low nitrogen fertilization improves soil supporting functions. *Plant and Soil*, 442(1), 401-417
- Richter, D. D., Hofmockel, M., Callahan, M. A., Powlson, D. S., & Smith, P. (2007). Long-term soil experiments: Keys to managing Earth's rapidly changing ecosystems. *Soil Science Society of America Journal*, 71(2), 266-279
- Richter, F. J., Suter, M., Lüscher, A., Buchmann, N., El Benni, N., Feola Conz, R.,... & Klaus, V. H. (2024). Effects of management practices on the ecosystem-service multifunctionality of temperate grasslands. *Nature Communications*, 15(1), 3829
- Riess, K., Oberwinkler, F., Bauer, R., & Garnica, S. (2014). Communities of endophytic Sebaciniales associated with roots of herbaceous plants in agricultural and grassland ecosystems are dominated by *Serendipita herbamans* sp. nov. *PLoS One*, 9(4), e94676
- Robertson, A. D., Paustian, K., Ogle, S., Wallenstein, M. D., Lugato, E., & Cotrufo, M. F. (2019). Unifying soil organic matter formation and persistence frameworks: the MEMS model. *Biogeosciences*, 16(6), 1225-1248
- Robinson, D. A., Nemes, A., Reinsch, S., Radbourne, A., Bentley, L., & Keith, A. M. (2022). Global meta-analysis of soil hydraulic properties on the same soils with differing land use. *Science of the Total Environment*, 852, 158506
- Rocci, K. S., Barker, K. S., Seabloom, E. W., Borer, E. T., Hobbie, S. E., Bakker, J. D.,... & Cotrufo, M. F. (2022). Impacts of nutrient addition on soil carbon and nitrogen stoichiometry and stability in globally-distributed grasslands. *Biogeochemistry*, 159(3), 353-370
- Rodrigues, K. M., & Rodrigues, B. F. (2020). *Glomus*. In *Beneficial microbes in agro-ecology* (pp. 561-569). Academic Press

- Rodríguez, C., Leoni, E., Lezama, F., & Altesor, A. (2003). Temporal trends in species composition and plant traits in natural grasslands of Uruguay. *Journal of Vegetation Science*, 14(3), 433-440
- Rodríguez-Palma, R., & Rodríguez, T. (2017). “Fertilización de campo natural: respuesta en producción animal Campo natural de Basalto,” in XXIV Reunión del Grupo Técnico en Forrajerías del Cono Sur-Grupo Campos (Tacuarembó), 129–131. Available online at:
- Rolfe, S. A., Griffiths, J., & Ton, J. (2019). Crying out for help with root exudates: adaptive mechanisms by which stressed plants assemble health-promoting soil microbiomes. *Current Opinion in Microbiology*, 49, 73-82
- Romdhane, S., Spor, A., Banerjee, S., Breuil, M. C., Bru, D., Chabbi, A.,... & Philippot, L. (2022). Land-use intensification differentially affects bacterial, fungal and protist communities and decreases microbiome network complexity. *Environmental microbiome*, 17(1), 1
- Rong, Z. Y., Lei, A. Q., Wu, Q. S., Srivastava, A. K., Hashem, A., Abd_Allah, E. F.,... & Yang, T. (2023). *Serendipita indica* promotes P acquisition and growth in tea seedlings under P deficit conditions by increasing cytokinins and indoleacetic acid and phosphate transporter gene expression. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1146182
- Rovira, P., Ayala, W., Terra, J., García-Préchac, F., Harris, P., Lee, M. R., & Rivero, M. J. (2020). The ‘Palo a Pique’ long-term research platform: first 25 years of a crop–livestock experiment in Uruguay. *Agronomy*, 10(3), 441
- Ruggia, A., Dogliotti, S., Aguerre, V., Albicette, M. M., Albin, A., Blumetto, O.,... & Rossing, W. A. (2021). The application of ecologically intensive principles to the systemic redesign of livestock farms on native grasslands: a case of co-innovation in Rocha, Uruguay. *Agricultural Systems*, 191, 103148
- Saeid, A., Prochownik, E., & Dobrowolska-Iwanek, J. (2018). Phosphorus solubilization by *Bacillus* species. *Molecules*, 23(11), 2897
- Sala, O. E., Austin, A. T., & Vivanco, L. (2001). Temperate grassland and shrubland ecosystems. *Encyclopedia of biodiversity*, 5, 627-635
- Saleem, S., Sekara, A., & Pokluda, R. (2022). *Serendipita indica*—A Review from Agricultural Point of View. *Plants*, 11(24), 3417
- Sangwan, S., & Prasanna, R. (2022). Mycorrhizae helper bacteria: unlocking their potential as bioenhancers of plant–arbuscular mycorrhizal fungal associations. *Microbial ecology*, 84(1), 1-10
- Saxena, A. K., Kumar, M., Chakdar, H., Anuroopa, N., & Bagyaraj, D. J. (2020). *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. *Journal of applied microbiology*, 128(6), 1583-1594
- Schils, R. L., Bufer, C., Rhymer, C. M., Francksen, R. M., Klaus, V. H., Abdalla, M.,... & Price, J. P. N. (2022). Permanent grasslands in Europe: Land use change and intensification decrease their multifunctionality. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 330, 107891

- Schimel, J. P., & Bennett, J. (2004). Nitrogen mineralization: Challenges of a changing paradigm. *Ecology*, 85(3), 591-602
- Schmidt, M. W., Torn, M. S., Abiven, S., Dittmar, T., Guggenberger, G., Janssens, I. A.,... & Trumbore, S. E. (2011). Persistence of soil organic matter as an ecosystem property. *Nature*, 478(7367), 49–56
- Schniete, J. K., & Fernández-Martínez, L. T. (2024). Natural product discovery in soil actinomycetes: unlocking their potential within an ecological context. *Current Opinion in Microbiology*, 79, 102487
- Seaton, F. M., George, P. B., Lebron, I., Jones, D. L., Creer, S., & Robinson, D. A. (2020). Soil textural heterogeneity impacts bacterial but not fungal diversity. *Soil Biology and Biochemistry*, 144, 107766
- Sebilo, M., Mayer, B., Nicolardot, B., Pinay, G., & Mariotti, A. (2013). Long-term fate of nitrate fertilizer in agricultural soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(45), 18185-18189
- Sefloo, N. G., Steinkellner, S., & Hage-Ahmed, K. (2021). The bioprotective effect of root endophytic *Serendipita herbarum* against *Fusarium* wilt in tomato and its impact on root traits are determined by temperature. *Rhizosphere*, 20, 100453
- Seitz, V. A., McGivern, B. B., Borton, M. A., Chaparro, J. M., Schipanski, M. E., Prenni, J. E., & Wrighton, K. C. (2024). Cover crop root exudates impact soil microbiome functional trajectories in agricultural soils. *Microbiome*, 12(1), 183
- Semchenko, M., Leff, J. W., Lozano, Y. M., Saar, S., Davison, J., Wilkinson, A.,... & Bardgett, R. D. (2018). Fungal diversity regulates plant-soil feedbacks in temperate grassland. *Science Advances*, 4(11), eaau4578
- Semenov, M. V. (2021). Metabarcoding and Metagenomics in Soil Ecology Research: Achievements, Challenges, and Prospects. *Biol Bull Rev*, 11, 40–53
- Semenov, M. V., Krasnov, G. S., Semenov, V. M., & van Bruggen, A. (2022). Mineral and organic fertilizers distinctly affect fungal communities in the crop rhizosphere. *Journal of Fungi*, 8(3), 251
- Shamshitov, A., Kadžienė, G., & Pini, F. (2025). The role of tillage practices in wheat straw decomposition and shaping the associated microbial communities. *Biology and Fertility of Soils*, 61, 135–148
- Shang, J., Peng, C., Liao, H., Tang, X., Sun Y. (2023). PhaBOX: a web server for identifying and characterizing phage contigs in metagenomic data. *Bioinformatics Advances* 3(1).
- Shen, C., Wang, J., He, J. Z., Yu, F. H., & Ge, Y. (2021). Plant diversity enhances soil fungal diversity and microbial resistance to plant invasion. *Applied and environmental microbiology*, 87(11), e00251-21
- Shen, M. C., Shi, Y. Z., Bo, G. D., & Liu, X. M. (2022). Fungal inhibition of agricultural soil pathogen stimulated by nitrogen-reducing fertilization. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 866419
- Shi, S., Gong, X., Cheng, S., Tao, D., Chen, X., van der Heijden, M. G.,... & Liu, M. (2025). Maize growth as a function of cover crop-mediated soil microbiome. *New Phytologist*

- Siles, J. A., Starke, R., Martinovic, T., Fernandes, M. L. P., Orgiazzi, A., & Bastida, F. (2022). Distribution of phosphorus cycling genes across land uses and microbial taxonomic groups based on metagenome and genome mining. *Soil Biology and Biochemistry*, 174, 108826.
- Silva, V., Catry, F. X., Fernandes, P. M., Rego, F. C., Paes, P., Nunes, L.,... & Bugalho, M. N. (2019). Effects of grazing on plant composition, conservation status and ecosystem services of Natura 2000 shrub-grassland habitat types. *Biodiversity and Conservation*, 28(5), 1205-1224
- Silva, F. B., Winck, B., Borges, C. S., Santos, F. L., Bataioli, R. D., Backes, T.,... & Sá, E. L. S. (2020). Native rhizobia from southern Brazilian grassland promote the growth of grasses. *Rhizosphere*, 16, 100240
- Silvertown, J., Poulton, P., Johnston, E., Edwards, G., Heard, M., & Biss, P. M. (2006). The Park Grass Experiment 1856–2006: its contribution to ecology. *Journal of Ecology*, 94(4), 801-814
- Singh, B. K., Delgado-Baquerizo, M., Egidi, E., Guirado, E., Leach, J. E., Liu, H., & Trivedi, P. (2023). Climate change impacts on plant pathogens, food security and paths forward. *Nature Reviews Microbiology*, 21(10), 640-656
- Sinha, N., Rushing, B. R., & Acharya, A. (2024). Effect of integrated crop–livestock systems on soil properties and microbial diversity in soybean production. *Applied Microbiology*, 3(4), 31
- Smalla, K., Jechalke, S., & Top, E. M. (2015). Plasmid detection, characterization, and ecology. *Microbiology spectrum*, 3(1), 10-1128
- Smercina, D. N., Evans, S. E., Friesen, M. L., & Tiemann, L. K. (2019). To fix or not to fix: controls on free-living nitrogen fixation in the rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(6), e02546-18
- Smith, S. E., & Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis* (3rd ed.). Academic Press
- Soares, M., & Rousk, J. (2019). Crecimiento microbiano y eficiencia del uso del carbono en el suelo: Links to fungal-bacterial dominance, SOC-quality and stoichiometry. *Soil Biology and Biochemistry*, 131, 195-205
- Sokol, N. W., Slessarev, E., Marschmann, G. L., Nicolas, A., Blazewicz, S. J., Brodie, E. L., Firestone, M. K., Foley, M. M., Hestrin, R., Hungate, B. A., Koch, B. J., Stone, B. W., Sullivan, M. B., Zablocki, O., LLNL Soil Microbiome Consortium, Trubl, G., McFarlane, K., Stuart, R., Nuccio, E., Pett-Ridge, J. (2022). Life and death in the soil microbiome: How ecological processes influence biogeochemistry. *Nature Reviews Microbiology*, 20(7), 415-430
- Soriano, A., León, R. J. C., Sala, O. E., Lavado, R. S., Dereguibus, V. A., Cauhepe, M. A.,... & Lemcoff, J. H. (1991). Rio de la Plata Grasslands. *Natural grassland. Introduction and Western Hemisphere. Ecosystems of the World*, 367-407
- Soumare, A., Diop, T., Manga, A., & Ndoeye, I. (2015). Role of arbuscular mycorrhizal fungi and nitrogen fixing bacteria on legume growth under various environmental stresses. *Int. J. Biosci*, 7(4), 31-46

- Soussana, J. F., Loiseau, P., Vuichard, N., Ceschia, E., Balesdent, J., Chevallier, T., & Arrouays, D. (2004). Carbon cycling and sequestration opportunities in temperate grasslands. *Soil Use and Management*, 20(2), 219-230
- Srivastava, S., Anand, V., Kaur, J., Ranjan, M., Bist, V., Asif, M. H., & Srivastava, S. (2022). Functional genetic diversity and plant growth promoting potential of polyphosphate accumulating bacteria in soil. *Microbiology Spectrum*, 10(1), e00345-21
- Steinegger, M., & Söding, J. (2017). MMseqs2 enables sensitive protein sequence searching for the analysis of massive data sets. *Nature Biotechnology*, 35(11), 1026–1028
- Stevens, N., Bond, W., Feurdean, A., & Lehmann, C. E. (2022). Grassy ecosystems in the Anthropocene. *Annual Review of Environment and Resources*, 47(1), 261-289
- Suz, L. M., Barsoum, N., Benham, S., Dietrich, H. P., Fetzer, K. D., Fischer, R.,... & Bidartondo, M. I. (2014). Environmental drivers of ectomycorrhizal communities in Europe's temperate oak forests. *Molecular Ecology*, 23(22), 5628-5644
- Tang, Y., Yu, G., Zhang, X., Wang, Q., Tian, D., Tian, J.,... & Ge, J. (2019). Environmental variables better explain changes in potential nitrification and denitrification activities than microbial properties in fertilized forest soils. *Science of the total environment*, 647, 653-662
- Tao, F., Huang, Y., Hungate, B. A., Manzoni, S., Frey, S. D., Schmidt, M. W.,... & Luo, Y. (2023). Microbial carbon use efficiency promotes global soil carbon storage. *Nature*, 618(7967), 981-985
- Taylor, D. L., Walters, W. A., Lennon, N. J., Bochicchio, J., Krohn, A., Caporaso, J. G., & Pennanen, T. (2016). Accurate estimation of fungal diversity and abundance through improved lineage-specific primers optimized for Illumina amplicon sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(24), 7217-7226
- Tedersoo, L., May, T. W., & Smith, M. E. (2010). Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza*, 20(4), 217-263
- Terlouw, B. R., Blin, K., Navarro-Munoz, J. C., Avalon, N. E., Chevrette, M. G., Egbert, S.,... & Medema, M. H. (2023). MIBiG 3.0: a community-driven effort to annotate experimentally validated biosynthetic gene clusters. *Nucleic acids research*, 51(D1), D603-D610
- Thiergart, T., Zgadzaj, R., Bozsóki, Z., Garrido-Oter, R., Radutoiu, S., & Schulze-Lefert, P. (2019). Lotus japonicus symbiosis genes impact microbial interactions between symbionts and multikingdom commensal communities. *MBio*, 10(5), 10-1128
- Thioub, M., Ewusi-Mensah, N., Sarkodie-Addo, J., & Adjei-Gyapong, T. (2019). Arbuscular mycorrhizal fungi inoculation enhances phosphorus use efficiency and soybean productivity on a Haplic Acrisol. *Soil and Tillage Research*, 192, 174-186.
- Thomas, C. M., & Nielsen, K. M. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 711–721

- Thomma, B. P. (2003). *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular plant pathology*, 4(4), 225-236
- Tian, J., Ge, F., Zhang, D., Deng, S., & Liu, X. (2021). Roles of phosphate solubilizing microorganisms from managing soil phosphorus deficiency to mediating biogeochemical P cycle. *Biology*, 10(2), 158
- Tilman, D., Cassman, K. G., Matson, P. A., Naylor, R., & Polasky, S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, 418(6898), 671-677
- Tiscornia, G., Jaurena, M., and Baethgen, W. (2019). Drivers, process, and consequences of native grassland degradation: Insights from a literature review and a survey in Río de la Plata grasslands. *Agronomy* 9:239. doi: 10.3390/agronomy9050239
- Tittonell, P. (2021). Beyond CO2: multiple ecosystem services from ecologically intensive grazing landscapes of South America. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 664103.
- Torrecillas, E., Alguacil, M. M., & Roldán, A. (2012). Host preferences of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing annual herbaceous plant species in semiarid Mediterranean prairies. *Applied and environmental microbiology*, 78(17), 6180-6186
- Treseder, K. K., & Lennon, J. T. (2015). Fungal traits that drive ecosystem dynamics on land. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(2), 243-262
- Trivedi, P., Delgado-Baquerizo, M., Trivedi, C., Hu, H., Anderson, I. C., Jeffries, T. C.,... & Singh, B. K. (2016). Microbial regulation of the soil carbon cycle: evidence from gene–enzyme relationships. *The ISME Journal*, 10(11), 2593-2604
- Tu, Q., Liu, B., Chen, M., Chen, Z., Yuan, M., Zhao, T., ... Zhang, T. (2019). NCycDB: a comprehensive database of nitrogen cycling genes. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D246–D252
- Turrini, A., Sbrana, C., Pitto, L., & Giovannetti, M. (2018). The role of the plant microbiota in plant–pathogen interactions. *Pathogens*, 7(1), 6
- Ujvári, G., Turrini, A., Avio, L., & Agnolucci, M. (2021). Possible role of arbuscular mycorrhizal fungi and associated bacteria in the recruitment of endophytic bacterial communities by plant roots. *Mycorrhiza*, 31(5), 527-544
- Ujvári, G., Grassi, A., Avio, L., Pagliarani, I., Cristani, C., Giovannetti, M.,... & Turrini, A. (2024). Root endophytic bacterial communities are shaped by the specific microbiota associated to mycorrhizal symbionts. *Plant and Soil*, 1-18
- Uritskiy, G. V., DiRuggiero, J., & Taylor, J. (2018). metaWRAP—a flexible pipeline for genome-resolved metagenomic data analysis. *Microbiome*, 6(1), 158
- Valentini, A., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2009). DNA barcoding for ecologists. *Trends in ecology & evolution*, 24(2), 110-117.

van Bergeijk, D. A., Terlouw, B. R., Medema, M. H., & van Wezel, G. P. (2020). Ecology and genomics of Actinobacteria: new concepts for natural product discovery. *Nature Reviews Microbiology*, 18(10), 546-558

van der Heijden, M. G., Bardgett, R. D., & van Straalen, N. M. (2008). The unseen majority: Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 11(3), 296-310

Van Der Heijden, M. G., De Bruin, S., Luckerhoff, L., Van Logtestijn, R. S., & Schlaeppi, K. (2016). A widespread plant-fungal-bacterial symbiosis promotes plant biodiversity, plant nutrition and seedling recruitment. *The ISME journal*, 10(2), 389-399

Van Lierop, W. (1990). Soil pH and lime requirement determination. *Soil testing and plant analysis*, 3, 73-126.

Velasco-Sánchez, Á., Ferron, L. M., Mani, D. T., Bennegadi-Laurent, N., Trinsoutrot-Gattin, I., Van Groenigen, J. W., & Moinet, G. Y. (2024). Combination of *Lolium perenne* L. and *Festuca arundinacea* Schreb. improve yields under low phosphorus availability. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 128(2), 199-215

Veloso, J., & Díaz, J. (2021). The non-pathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 induces distinct responses in two closely related Solanaceae plants against the pathogen *Verticillium dahliae*. *Journal of Fungi*, 7(5), 344

Verma, S., Varma, A., Rexer, K. H., Hassel, A., Kost, G., Sarbhoy, A.,... & Franken, P. (1998). *Piriformospora indica*, gen. et sp. nov., a new root-colonizing fungus. *Mycologia*, 90(5), 896-903

Verrone V, Gupta A, Laloo AE, Dubey RK, Hamid NAA, Swarup S (2024). Organic matter stability and lability in terrestrial and aquatic ecosystems: a chemical and microbial perspective. *Science of the Total Environment*. 906:167757.

Vieira, A. F., Moura, M., & Silva, L. (2021). Soil metagenomics in grasslands and forests—a review and bibliometric analysis. *Applied Soil Ecology*, 167, 104047.

Vitorino, L. C., da Silva, E. J., Oliveira, M. S., Silva, I. D. O., Santos, L. D. S., Mendonça, M. A. C., & Bessa, L. A. (2024). Effect of a *Bacillus velezensis* and *Lysinibacillus fusiformis*-based biofertilizer on phosphorus acquisition and grain yield of soybean. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1433828

Vitousek, P. M., & Howarth, R. W. (1991). Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? *Biogeochemistry*, 13(2), 87-115

Viñas, M., Marull, J., Guivernau, M., Tello, E., & Lucas, Y. (2025). Impact of organic and conventional agricultural management on subsurface soil microbiota in Mediterranean vineyards. *Agronomy*, 15(8), 2001

- Walder, F., Schmid, M. W., Riedo, J., Valzano-Held, A. Y., Banerjee, S., Büchi, L.,... & van Der Heijden, M. G. (2022). Soil microbiome signatures are associated with pesticide residues in arable landscapes. *Soil Biology and Biochemistry*, 174, 108830
- Wallau, M. O., Santos, S. A., Caram, N., & Soca, P. (2021). Influence of grazing intensity and weather on animal behavior in grasslands. *Agricultural Systems*, 191, 103160
- Wallenstein, M. D. (2022). Managing and manipulating the soil microbiome for climate change mitigation and adaptation. *Annual Review of Soil Research*, 7, 1–25
- Wang, B., An, S., Liang, C., Liu, Y., & Kuzyakov, Y. (2021). Microbial necromass as the source of soil organic carbon in global ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 162, 108422
- Wang, C., Qu, L., Yang, L., Liu, D., Morrissey, E., Miao, R.,... & Bai, E. (2021). Large-scale importance of microbial carbon use efficiency and necromass to soil organic carbon. *Global Change Biology*, 27(10), 2039-2048
- Wang, C., Ma, L., Zuo, X., Ye, X., Wang, R., Huang, Z.,... & Cornelissen, J. H. (2022). Plant diversity has stronger linkage with soil fungal diversity than with bacterial diversity across grasslands of northern China. *Global Ecology and Biogeography*, 31(5), 886-900
- Wang, X., Chi, Y., & Song, S. (2024). Important soil microbiota's effects on plants and soils: a comprehensive 30-year systematic literature review. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1347745
- Wei, X., Zhang, W., Zulfiqar, F., Zhang, C., & Chen, J. (2022). Ericoid mycorrhizal fungi as biostimulants for improving propagation and production of ericaceous plants. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1027390
- Weiß, M., Waller, F., Zuccaro, A., & Selosse, M. A. (2016). Sebaciniales—one thousand and one interactions with land plants. *New Phytologist*, 211(1), 20-40
- Wen, A., Havens, K. L., Bloch, S. E., Shah, N., Higgins, D. A., Davis-Richardson, A. G.,... & Temme, K. (2021). Enabling biological nitrogen fixation for cereal crops in fertilized fields. *ACS synthetic biology*, 10(12), 3264-3277
- Whalen, E. D., Grandy, A. S., Geyer, K. M., Morrison, E. W., & Frey, S. D. (2024). Microbial trait multifunctionality drives soil organic matter formation potential. *Nature Communications*, 15(1), 10209
- Wickham, H. (2011). *ggplot2*. Wiley interdisciplinary reviews: computational statistics, 3(2), 180-185
- Wickham, H. (2016). *Data analysis* (pp. 189-201). Springer International Publishing
- Wilhelm, R. C., Amsili, J. P., Kurtz, K. S., van Es, H. M., & Buckley, D. H. (2023). Ecological insights into soil health according to the genomic traits and environment-wide associations of bacteria in agricultural soils. *Isme Communications*, 3(1), 1.

- Willms, I. M., Rudolph, A. Y., Göschel, I., Bolz, S. H., Schneider, D., Penone, C., & Nacke, H. (2020). Globally abundant "Candidatus Udaeobacter" benefits from release of antibiotics in soil and potentially performs trace gas scavenging. *Mosphere*, 5(4), 10-1128
- Wittwer, R. A., Dorn, B., Jossi, W., & van der Heijden, M. G. A. (2017). Cover crops support ecological intensification of arable cropping systems. *Scientific Reports*, 11(1), 1–12
- Wu, Y. W., Simmons, B. A., & Singer, S. W. (2016). MaxBin 2.0: an automated binning algorithm to recover genomes from metagenomic data. *Bioinformatics*, 32(4), 605–607
- Wu, X., Cui, Z., Peng, J., Zhang, F., & Liesack, W. (2022). Genome-resolved metagenomics identifies the particular genetic traits of phosphate-solubilizing bacteria in agricultural soil. *ISME communications*, 2(1), 17
- Wu, Y., Chen, D., Delgado-Baquerizo, M., Liu, S., Wang, B., Wu, J.,... & Bai, Y. (2022). Long-term regional evidence of the effects of livestock grazing on soil microbial community structure and functions in surface and deep soil layers. *Soil Biology and Biochemistry*, 168, 108629
- Wu, Y., Chen, C., & Wang, G. (2024). Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi improves plant biomass and nitrogen and phosphorus nutrients: a meta-analysis. *BMC plant biology*, 24(1), 960
- Xing, Y., Li, Y., Zhang, F., & Wang, X. (2024). Appropriate Application of Organic Fertilizer Can Effectively Improve Soil Environment and Increase Maize Yield in Loess Plateau. *Agronomy*, 14(5), 993
- Xu, H., Shi, Y., Chen, C., Pang, Z., Zhang, G., Zhang, W., & Kan, H. (2024). Arbuscular Mycorrhizal Fungi Selectively Promoted the Growth of Three Ecological Restoration Plants. *Plants*, 13(12), 1678
- Xue, R., Wang, C., Zhao, L., Sun, B., & Wang, B. (2022). Agricultural intensification weakens the soil health index and stability of microbial networks. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 339, 108118
- Xue, R., Wang, C., Zhao, L., Cao, J., Liu, M., & Zhang, D. (2023). Agricultural intensification weakens soil multifunctionality by reducing fungal diversity. *Applied Soil Ecology*, 189, 104900
- Yadav, P., Quattrone, A., Yang, Y., Owens, J., Kiat, R., Kuppusamy, T.,... & Weber, K. A. (2023). Zea mays genotype influences microbial and viral rhizobiome community structure. *ISME communications*, 3(1), 129
- Yang, Y., Zhao, J., Jiang, Y., Hu, Y., Zhang, M., & Zeng, Z. (2017). Response of bacteria harboring nirS and nirK genes to different N fertilization rates in an alkaline northern Chinese soil. *European Journal of Soil Biology*, 82, 1-9
- Yu, Z., Zhang, W., He, H., Li, Y., Xie, Z., Sailike, A.,... & Yang, P. (2024). The CAZyme family regulates the changes in soil organic carbon composition during vegetation restoration in the Mu Us desert. *Geoderma*, 452, 117109
- Zaixing, M., Lu, X., & Yanjie, L. (2024). Effects of light, phosphorus and arbuscular mycorrhizal fungi on *Trifolium repens* L. growth. *Plant Science Journal*, 42(1), 104

- Zeng, J., Tu, Q., Yu, X., Qian, L., Wang, C., Shu, L., & He, Z. (2022). PCycDB: a comprehensive and accurate database for fast analysis of phosphorus cycling genes. *Microbiome*, 10(1), 101
- Zeng, Q., Hu, H. W., Ge, A. H., Xiong, C., Zhai, C. C., Duan, G. L.,... & Zhang, L. M. (2025). Plant–microbiome interactions and their impacts on plant adaptation to climate change. *Journal of Integrative Plant Biology*, 67(3), 826-844
- Zhai, C., Han, L., Xiong, C., Ge, A., Yue, X., Li, Y.,... & Wan, S. (2024). Soil microbial diversity and network complexity drive the ecosystem multifunctionality of temperate grasslands under changing precipitation. *Science of the Total Environment*, 906, 167217
- Zhalnina, K., Dias, R., de Quadros, P. D., Camargo, F. A. O., Drew, J. C., Farmerie, W. G.,... Triplett, E. W. (2015). Soil pH determines microbial diversity and composition in the park grass experiment. *Microbial Ecology*, 69(2), 395-406
- Zhang, B., Penton, C. R., Xue, C., Quensen, J. F., Roley, S. S., Guo, J.,... Tiedje, J. M. (2017). Soil depth and crop determinants of bacterial communities under ten biofuel cropping systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 112, 140-152
- Zhang, H., Yohe, T., Huang, L., Entwistle, S., Wu, P., Yang, Z., ... Yin, Y. (2018). dbCAN2: a meta-server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), 1 W344–W350
- Zhang, H., Fang, Y., Zhang, B., Luo, Y., Yi, X., Wu, J., ... & Chang, S. X. (2022). Land-use-driven change in soil labile carbon affects microbial community composition and function. *Geoderma*, 426, 116056.
- Zhang, H., Dong, L., Yao, X., & Wang, W. (2023). Soil fertility shifts the relative importance of saprotrophic and mycorrhizal fungi for maintaining ecosystem stability. *Global change biology*, 29(4), 1206-1216
- Zhang, Y., Chang, J., Xie, J., Yang, L., Sheteiwy, M. S., Moustafa, A. R. A.,... & Ren, H. (2023). The Impact of Root-Invasive Fungi on Dominant and Invasive Plant Species in Degraded Grassland at Nanshan Pasture. *Agronomy*, 13(7), 1666
- Zhang, Y., Zhang, Q., Yang, W., Zhang, Y., Wang, N., Fan, P.,... & Wang, R. (2023). Response mechanisms of 3 typical plants nitrogen and phosphorus nutrient cycling to nitrogen deposition in temperate meadow grasslands. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1140080
- Zhang, L., Zuo, Q., Cai, H., Li, S., Shen, Z., & Song, T. (2024). Fungicides reduce soil microbial diversity, network stability and complexity in wheat fields with different disease resistance. *Applied Soil Ecology*, 201, 105513
- Zhang, Q., Jin, C. H. E. N., Yingyue, L. I., Huang, T., Kailing, X. I. E., Jing, Z. H. O. U., & Xiaoyu, L. I. (2024). Effects of interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria on the growth of *Lotus corniculatus* L.: From the perspective of regulating rhizosphere fungal community. *Pedosphere*, 34(2), 411-423

- Zhang, Y., Feng, H., Druzhinina, I. S., Xie, X., Wang, E., Martin, F., & Yuan, Z. (2024). Phosphorus/nitrogen sensing and signaling in diverse root–fungus symbioses. *Trends in Microbiology*, 32(2), 200-215
- Zhang, Z., Zhang, L., Zhang, L., Chu, H., Zhou, J., & Ju, F. (2024). Diversity and distribution of biosynthetic gene clusters in agricultural soil microbiomes. *Msystems*, 9(4), e01263-23
- Zhang, E., Wang, Y., Crowther, T. W., Sun, W., Chen, S., Zhou, D.,... & Yu, G. (2025). Mycorrhiza increases plant diversity and soil carbon storage in grasslands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 122(7), e2412556122
- Zhao, Y., Liu, Z., & Wu, J. (2020). Grassland ecosystem services: a systematic review of research advances and future directions. *Landscape Ecology*, 35(4), 793-814
- Zhao, W., Yin, Y., Li, S., Dong, Y., & Su, S. (2023). Changes in soil fungal community composition and functional groups during the succession of Alpine grassland. *Plant and Soil*, 484(1), 201-216
- Zhao, Q., Bell, S., Kukkadapu, R., Richardson, J., Cliff, J., Bowden, M.,... & Hofmockel, K. S. (2025). Accumulation of Soil Microbial Necromass Controlled by Microbe–Mineral Interactions. *Environmental Science & Technology*
- Zheng, T., Miltner, A., Liang, C., Nowak, K. M., & Kästner, M. (2021). Turnover of gram-negative bacterial biomass-derived carbon through the microbial food web of an agricultural soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 152, 108070
- Zheng, J., Hu, B., Zhang, X., Ge, Q., Yan, Y., Akresi, J., & Yin, Y. (2023). dbCAN-seq update: CAZyme gene clusters and substrates in microbiomes. *Nucleic Acids Research*, 51(1), 557-563
- Zhou, Z., Wang, C., & Luo, Y. (2020). Meta-analysis of the impacts of global change factors on soil microbial diversity and functionality. *Nature communications*, 11(1), 3072
- Zhu, X., Yang, W., Sun, L., Song, F., & Li, X. (2021). Anthropogenic land use changes diversity and structure of arbuscular mycorrhizal fungal communities at 100-m scale in northeast China. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 67(6), 778-792
- Zhu, R., Azene, B., Gruba, P., Pan, K., Nigussie, Y., Guadie, A.,... & Zhang, L. (2024). Response of carbohydrate-degrading enzymes and microorganisms to land use change in the southeastern Qinghai-Tibetan Plateau, China. *Applied Soil Ecology*, 200, 105442

8. Anexos

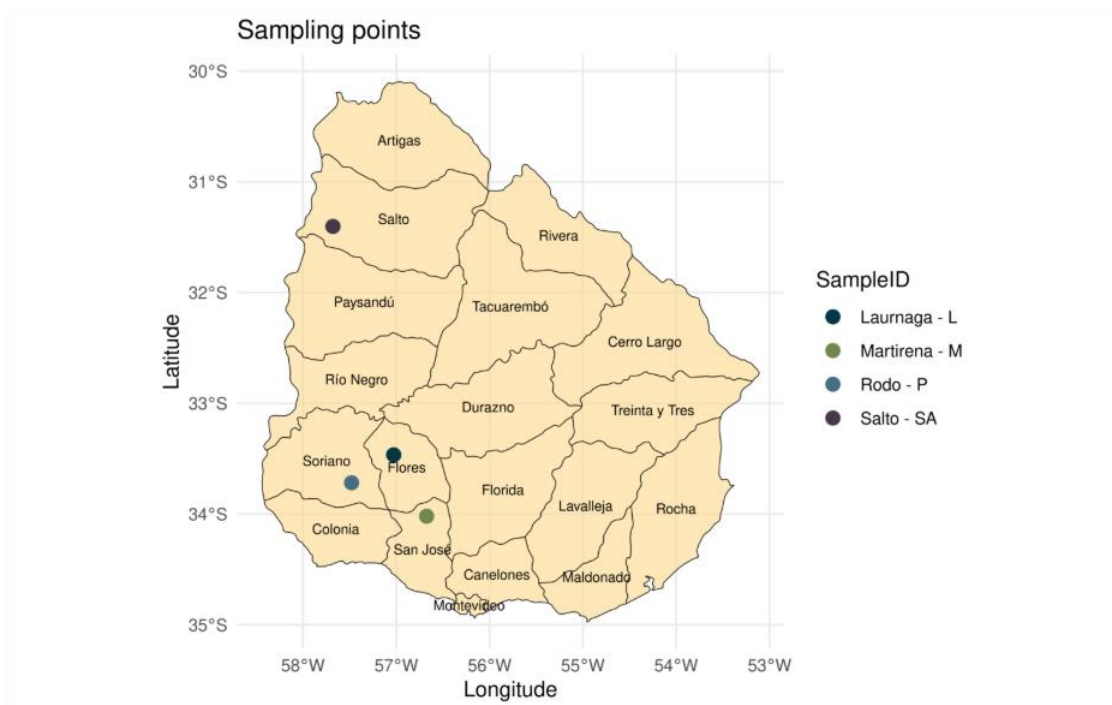


Figura Suplementaria S1. Mapa de Uruguay con los sitios muestreados para este trabajo. Las características de las muestras se detallan en la Tabla Suplementaria S1.

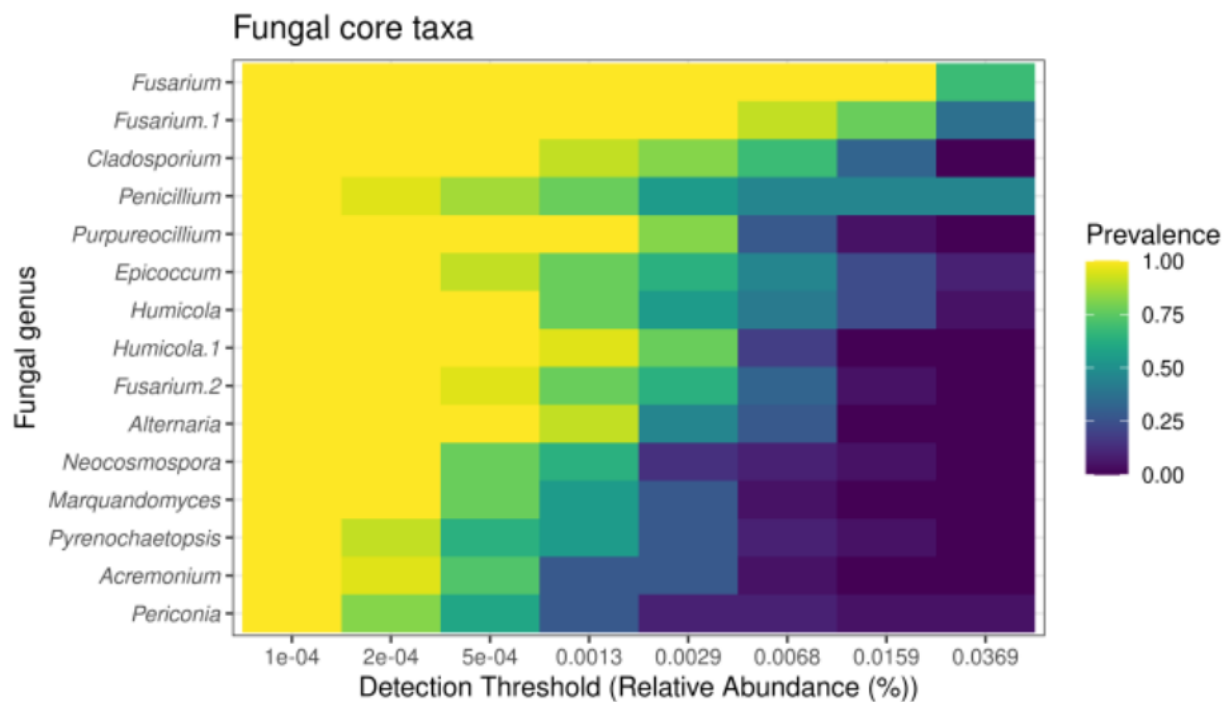


Figura suplementaria S2. Mapa de calor del análisis del microbioma fúngico *core* a nivel de ASV. Las ASV correspondientes al mismo género se describen con números diferentes a continuación de la descripción del género.

La abundancia relativa para la detección de cada ASV se describe en el eje de ordenadas, mientras que diferentes colores describen la prevalencia de ASVs para cada nivel de abundancia.

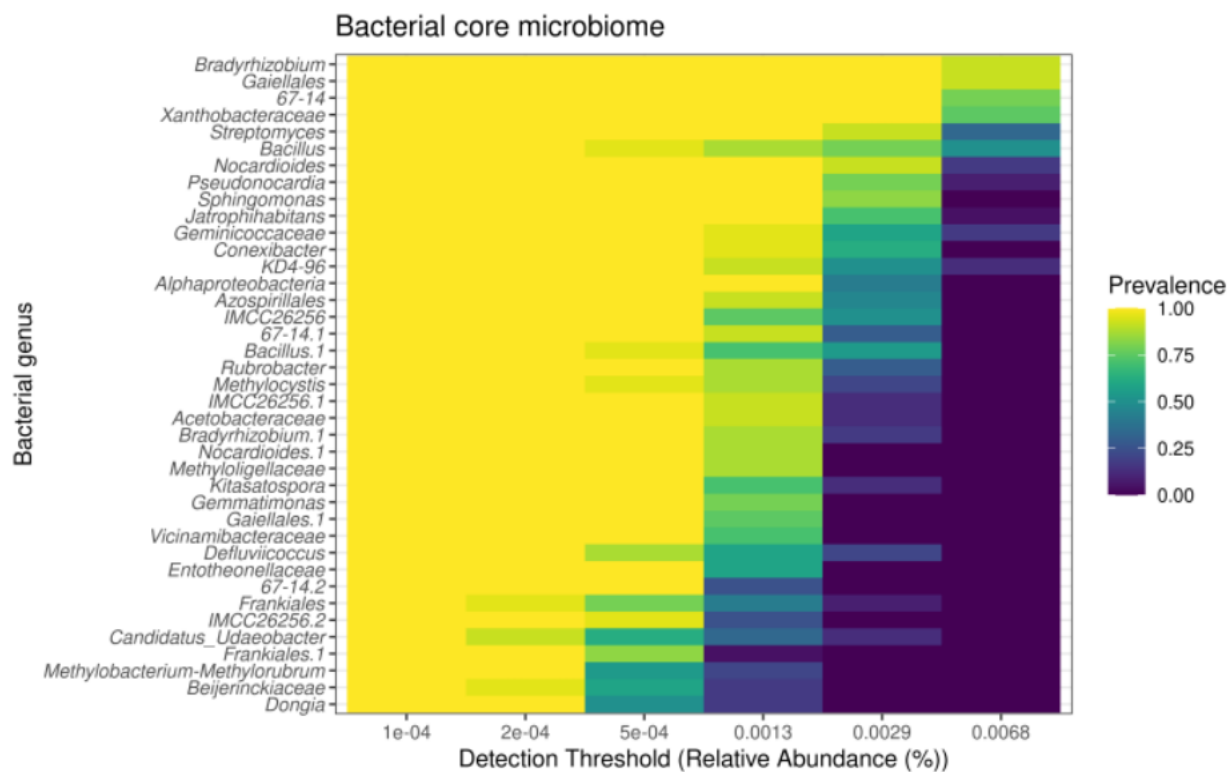


Figura suplementaria S3. Mapa de calor del análisis del microbioma *core* bacteriano a nivel de ASV. Las ASV correspondientes al mismo género se describen con números diferentes a continuación de la descripción del género. La abundancia relativa para la detección de cada ASV se describe en el eje de ordenadas, mientras que diferentes colores describen la prevalencia de ASVs para cada nivel de abundancia.

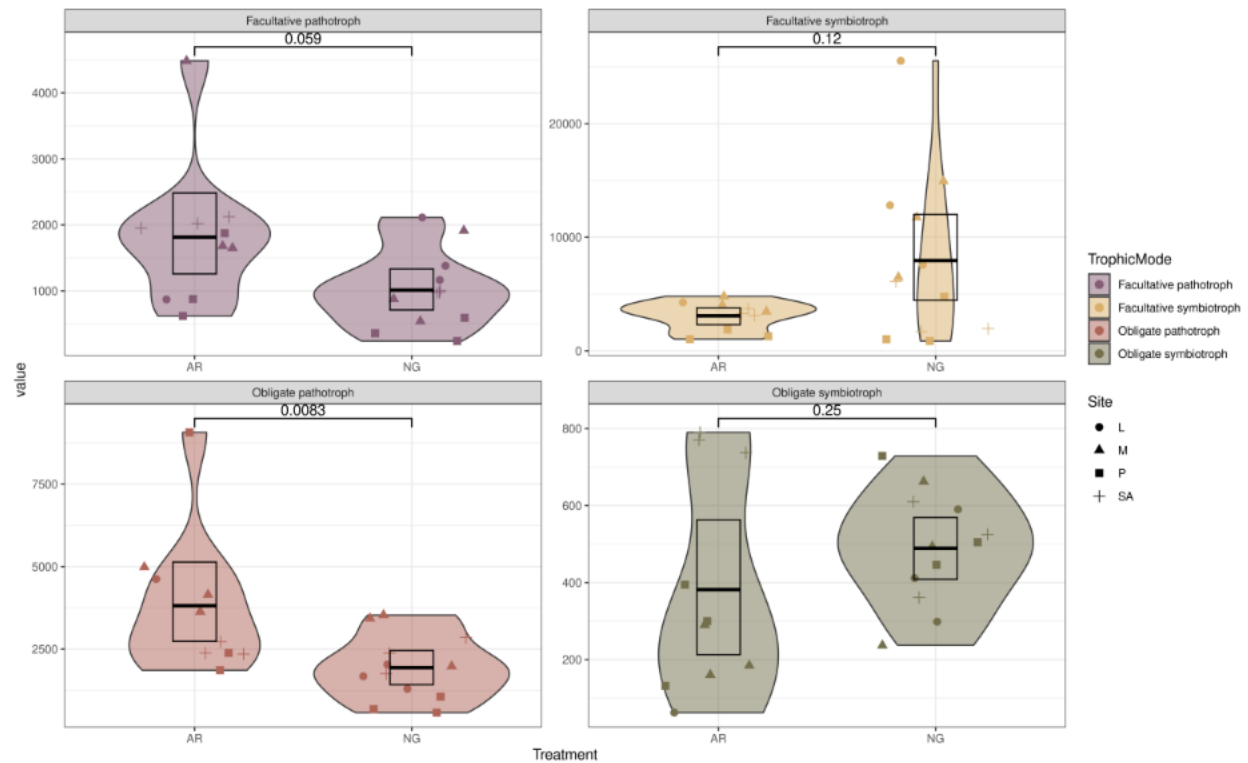


Figura suplementaria S4. Diagramas de Violin que muestran la distribución de abundancia de patógenos y simbiógenos obligados y facultativos para muestras obtenidas de Rotaciones Agrícolas y Pastizales Naturales. La abundancia acumulada de organismos con cada modo trófico se expresa en recuentos por millón (CPM).

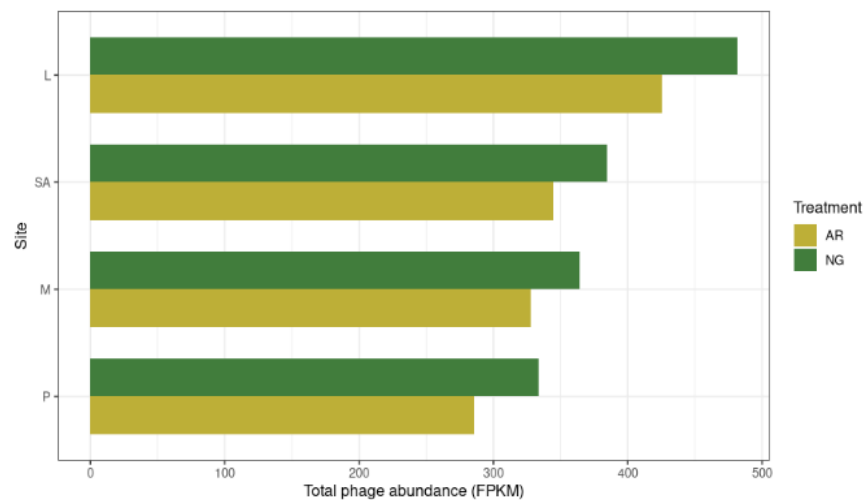


Figura Suplementaria S5. Abundancia total de contigs de fagos detectados por el software PhaBox y cuantificados por lecturas mapeadas usando el software MMSeqs2.

Tabla suplementaria S1. Variables químicas y físicas medidas en cada muestra de suelo.

| Region | Land use | Sample | pH | Mg | Na | CEC | OM | P Bray1 | N_NO3 | N_NH4 | Texture |
|----------|----------|--------|------|----------|------|-------|------|---------|-------|-------|---------|
| Flores | NG | L-CN1 | 5.65 | 3.4 | 0.23 | 30.03 | 5.95 | 5 | 9 | 29 | FAc |
| Flores | NG | L-CN2 | 5.65 | 3.4 | 0.23 | 30.03 | 5.95 | 5 | 9 | 29 | FAc |
| Flores | NG | L-CN3 | 5.65 | 3.4 | 0.23 | 30.03 | 5.95 | 5 | 9 | 29 | FAc |
| Flores | AR | L-RA1 | 5.65 | 3.1 1 | 0.25 | 28.86 | 3.28 | 9 | 15 | 12 | FAc |
| Flores | AR | L-RA2 | 5.65 | 3.1 1 | 0.25 | 28.86 | 3.28 | 9 | 15 | 12 | FAc |
| Flores | AR | L-RA3 | 5.65 | 3.1 1 | 0.25 | 28.86 | 3.28 | 9 | 15 | 12 | FAc |
| San José | NG | M-CN1 | 6.82 | 3.2 6 | 0.18 | 20.97 | 6.25 | 3 | 43 | 5 | FL |
| San José | NG | M-CN2 | 6.82 | 3.2 6 | 0.18 | 20.97 | 6.25 | 3 | 43 | 5 | FL |
| San José | NG | M-CN3 | 6.82 | 3.2 6 | 0.18 | 20.97 | 6.25 | 3 | 43 | 5 | FL |
| San José | AR | M-RA1 | 6.63 | 2.0 3 | 0.08 | 27.52 | 4.4 | 29 | 29 | 9 | FAc |
| San José | AR | M-RA2 | 6.63 | 2.0 3 | 0.08 | 27.52 | 4.4 | 29 | 29 | 9 | FAc |
| San José | AR | M-RA3 | 6.63 | 2.0 3 | 0.08 | 27.52 | 4.4 | 29 | 29 | 9 | FAc |
| Soriano | NG | P-CN1 | 5.85 | 3.3 1 | 0.52 | 17.67 | 4.35 | 3 | 9 | 30 | FAc |
| Soriano | NG | P-CN2 | 5.85 | 3.3 1 | 0.52 | 17.67 | 4.35 | 3 | 9 | 30 | FAc |
| Soriano | NG | P-CN3 | 5.85 | 3.3 1 | 0.52 | 17.67 | 4.35 | 3 | 9 | 30 | FAc |
| Soriano | AR | P-RA1 | 5.9 | 2.2 4 | 0.14 | 23.47 | 3.74 | 14 | 17 | 7 | FAc |
| Soriano | AR | P-RA2 | 5.9 | 2.2 4 | 0.14 | 23.47 | 3.74 | 14 | 17 | 7 | FAc |
| Soriano | AR | P-RA3 | 5.9 | 2.2 4 | 0.14 | 23.47 | 3.74 | 14 | 17 | 7 | FAc |
| Salto | NG | SA-CN1 | 5.09 | 3.6 8 | 0.14 | 21.5 | 5.9 | 2 | 55 | 6 | FAcL |
| Salto | NG | SA-CN2 | 5.09 | 3.6 8 | 0.14 | 21.5 | 5.9 | 2 | 55 | 6 | FAcL |
| Salto | NG | SA-CN3 | 5.09 | 3.6 8 | 0.14 | 21.5 | 5.9 | 2 | 55 | 6 | FAcL |
| Salto | AR | SA-RA1 | 5.24 | 3.6 7 | 0.14 | 23.72 | 5.05 | 4 | 27 | 3 | AcL |
| Salto | AR | SA-RA2 | 5.24 | 3.6 7 | 0.14 | 23.72 | 5.05 | 4 | 27 | 3 | AcL |

9. Agradecimientos

Agradezco a todos los que participaron y colaboraron de diferentes maneras para que este trabajo sea llevado a cabo y llegue a esta instancia.

Al tribunal por dedicar parte de su tiempo a la corrección del manuscrito, a los miembros de la CAS por el seguimiento durante los años de trabajo.

A las instituciones participantes y financiadoras, a investigadores y funcionarios vinculados a diferentes ELPs que colaboraron en la toma de muestras y en la identificación de sitios de muestreo y que me han permitido acceder a los datos.

A los investigadores que me guiaron y de quienes aprendí mucho durante este período de trabajo, en especial a Gervasio Piñeiro por la disponibilidad constante, las devoluciones y por la paciencia en el intercambio.

Al Dr. Matias Arim por la guía en el análisis de redes de correlación y la disponibilidad para discutir los datos.

A mis compañeros en otros grupos académicos de Facultad de Agronomía que me ayudaron en salidas de campo y en la interpretación de los datos.

A mis compañeros del LGM con quienes hemos sorteado varios obstáculos juntos y que me han apoyado y respaldado durante todo este proceso. A mis compañeros del CiVE que también han sido fundamentales en los 5 años de trabajo.

Para el que mira sin ver, la tierra es tierra nomás
A. Yupanqui