

# Informe final publicable de proyecto

## Poblaciones microbianas en suelos de pastizal y arrozal de las planicies del Este

Código de proyecto ANII: FCE\_3\_2022\_1\_172646

Fecha de cierre de proyecto: 01/10/2025

**AZZIZ DE LOS SANTOS, Julio Gastón** (Responsable Técnico - Científico)

**PEREZ, Germán** (Co-Responsable Técnico-Científico)

**VAZ JAURI, Patricia** (Investigador)

**BAEZA, Santiago** (Investigador)

**ILLARZE DIVE, Gabriela** (Investigador)

**LEZAMA HUERTA, Felipe Miguel** (Investigador)

---

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE AGRONOMÍA (Institución Proponente) \\  
FACULTAD DE AGRONOMÍA. FUNDACIÓN DR. EDUARDO ACEVEDO

## **Resumen del proyecto**

En Uruguay el cultivo de arroz es una actividad de importancia económica y un sector clave en las exportaciones. Las Planicies del Este son una región propicia para su cultivo, de manera que allí se concentra una importante área destinada a este fin. En esa región se encuentran los pastizales del este, una comunidad vegetal particular, con alta prioridad para su conservación. El área con pastizales naturales ha ido decreciendo, entre otras cosas, por el cambio de uso del suelo hacia el uso arrocero. Desde el punto de vista ambiental, y en el marco de un escenario de cambio climático global, el cultivo inundado de arroz se caracteriza por emitir gases de efecto invernadero (GEIs). El presente proyecto tuvo como objetivo estudiar las poblaciones microbianas del suelo en las Planicies del Este, según este suelo esté bajo campo natural o bajo uso arrocero (durante el cultivo de arroz y durante la rotación con pastura sembrada). Una parte del proyecto se centró en el estudio general de las poblaciones microbianas (hongos y bacterias), mientras que otra se enfocó con más detalle sobre los microorganismos implicados en los balances de la emisión de dos importantes GEIs. Los principales resultados mostraron que los hongos son más abundantes en el campo natural mientras que las bacterias lo fueron en el arroz. Las poblaciones de hongos y bacterias también fueron diferentes entre el campo natural y aquellas parcelas bajo uso arrocero (arroz y pastura sembrada). Las poblaciones en las parcelas bajo arroz y aquellas bajo pastura sembrada no se diferenciaron entre sí, lo que indica que durante la fase de pastura la microbiota del suelo tiene similitudes con aquella que existe bajo la fase de arroz. Este mismo resultado se observa para muchas de las poblaciones de microorganismos y genes implicados en la emisión de GEIs.

**Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Biología Celular, Microbiología / Microbiología del Suelo**

**Palabras clave: diversidad microbiana / usos del suelo / ciclos biogeoquímicos /**

### **Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.**

Las Planicies del Este, región ubicada principalmente en los departamentos de Rocha y Treinta y Tres, alberga entre sus formaciones vegetales naturales a los pastizales del este. Estos pastizales naturales albergan dos comunidades vegetales, ambas dominadas por especies C4 perennes, pero una caracterizada por especies hidrofíticas y la otra por especies mesofíticas. Estas comunidades se alternan en el paisaje asociadas a sutiles variaciones microtopográficas, conformando así un intrincado mosaico (Ríos et al., 2025). Actualmente, el área de las Planicies del Este que se encuentra bajo pastizal natural es alrededor del 21% y se la considera como de alta prioridad para su conservación.

Debido principalmente a sus características topográficas y el acceso al agua, el uso de los suelos de las Planicies del Este ha sido principalmente arrocero. En la actualidad, aproximadamente el 70% del área sembrada de arroz del país (un poco menos de 200.000 ha.) se encuentra en estas planicies. El manejo habitual del arroz en estos suelos incluye una rotación periódica con pasturas sembradas para ganadería, generalmente dos años de arroz son seguidos por 3-4 años de pasturas (Pittelkow et al., 2016).

Las áreas de pastizal natural han ido en descenso a medida que el arroz empezaba a ocupar más superficie, particularmente desde la década de 1970 (Ríos et al., 2018), hasta quedar un remanente cuya superficie es minoritaria dentro de las Planicies. Aunque la producción de arroz no es el único uso agrícola de la zona, la predominancia de este cultivo en la zona, así como sus particularidades de manejo, y su influencia sobre las poblaciones microbianas, particularmente aquellas implicadas en el balance de gases de efecto invernadero (GEI) (Azziz et al., 2017, 2016), hacen que estudiar la incidencia del cambio del uso suelo desde pastizal natural a uso arrocero sea de especial interés desde el punto de vista de la ecología

microbiana.

El cambio en el uso del suelo desde pastizal natural a uso arrocero tiene consecuencias directas y evidentes sobre la cobertura vegetal presente en las Planicies del Este. Esto ha determinado la sustitución de la comunidad vegetal original de pastizales (y otras comunidades) por el arroz y las pasturas sembradas. La comunidad vegetal presente en un suelo es un componente crucial en la determinación de las poblaciones microbianas que componen la microbiota edáfica. A partir de los exudados producidos en las raíces, las plantas son capaces de moldear las poblaciones que habitan la zona de directa influencia, denominada rizósfera. Se ha visto que diferencias en las comunidades vegetales, determinan a su vez diferencias en las comunidades microbianas del suelo, y que ambas comunidades se correlacionan significativamente (Azziz et al., 2023).

Debido a las condiciones en que se cultiva el arroz en Uruguay, donde permanece inundado la mayor parte de su ciclo de crecimiento, este cultivo es responsable de la producción de dos GEIs, CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O (Linguist et al., 2012). Ambos gases son consecuencia de la actividad de distintos microorganismos y las condiciones de aerobiosis/anaerobiosis, que en el cultivo de arroz están muy vinculadas a la inundación de los suelos, son particularmente determinantes del balance de su producción y consumo, y por tanto de su emisión a la atmósfera.

El CH<sub>4</sub> es producido en condiciones anaerobias por un grupo de microorganismos del dominio Archaea en un proceso denominado metanogénesis (Lyu et al., 2018). La producción de metano significa la última etapa en la descomposición de la materia orgánica en ambientes con ausencia de O<sub>2</sub>. Dependiendo de los donadores de electrones disponibles para esta respiración anaeróbica, la metanogénesis puede ocurrir por tres vías: acetoclásica, hidrogenotrófica y metilotrófica. Los metanógenos conocidos pertenecen a 7 órdenes del filo Euryarchaeota (Lyu and Liu, 2018) y albergan los genes *mcrA*, *mcrB* y *mcrG* los cuales codifican para distintas subunidades de la metil-coenzima M reductasa (Wagner Tristan et al., 2017), encargada de catalizar el paso final de la metanogénesis. Estos genes son habitualmente utilizados como marcadores para el estudio de poblaciones metanogénicas.

Por su parte, la metanotrofia, actividad llevada a cabo por un grupo de bacterias, ocurre en aerobiosis y significa el consumo de CH<sub>4</sub> para su utilización como fuente de carbono y energía (Kalyuzhnaya et al., 2019). Las bacterias metanotróficas del suelo generalmente viven en la interfase óxica/anóxica y pertenecen a las clases Gammaproteobacteria o Alphaproteobacteria, clasificadas en metanótrofos tipo I y II, respectivamente (Dedysh and Knief, 2018). El gen *pmoA* codifica la metano monooxigenasa, que es la enzima responsable de la catalización de la reacción que convierte el metano en metanol, primer paso de la metanotrofia (Hednec et al., 2024). Este gen es habitualmente utilizado como marcador para el estudio de las poblaciones metanotróficas.

El balance entre metanogénesis y metanotrofia en el suelo, en el interior de las plantas, o incluso en los tractos digestivos de los animales, determina la emisión del CH<sub>4</sub> hacia la atmósfera (Ding et al., 2019).

Por su parte, los procesos responsables por las emisiones de N<sub>2</sub>O también son consecuencia de la actividad de microorganismos del suelo, aunque las características de estos procesos, así como los microorganismos involucrados son diferentes a los implicados en las emisiones de CH<sub>4</sub>. El N<sub>2</sub>O puede ser producido mediante desnitrificación, una respiración anaerobia en la que los microorganismos desnitrificantes utilizan formas oxidadas del nitrógeno como aceptor final de electrones, y reducen secuencialmente el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> hasta N<sub>2</sub>, pasando por varios intermediarios. La naturaleza modular de este proceso, donde la energía se puede obtener en más de un paso de la cadena, determina que no todos los microorganismos desnitrificantes tengan la vía completa. Dependiendo de las condiciones ambientales, así como de las características de la población desnitrificante presente, este proceso puede ser interrumpido en el último paso, en cuyo caso se genera N<sub>2</sub>O en lugar de N<sub>2</sub> como producto final (Yang et al., 2022). De esta manera, la emisión de N<sub>2</sub>O producido por desnitrificación dependerá de distintos factores ambientales y biológicos, que incluyen entre los últimos, la potencialidad de los miembros de la comunidad de llevar a cabo la vía completa, así como los

mecanismos que regulan la expresión de los distintos genes involucrados. Los microorganismos desnitrificantes son un grupo polifilético, y se encuentran en distintos taxones microbianos, notablemente, algunos hongos son capaces de llevar a cabo este tipo de respiración, aunque de manera incompleta (Bösch Yvonne et al., 2023). Debido a la dispersión taxonómica de este rasgo, no es posible estudiar estos organismos a través de marcadores taxonómicos como el gen del ARNr 16S. Sin embargo, sí es posible estudiar estas poblaciones mediante genes que codifican enzimas involucradas directamente en la desnitrificación. Por un lado están los genes *nirS* (Azziz et al., 2017) y *nirK* (Azziz et al., 2017), que codifican para dos versiones de la nitrito reductasa, encargada del paso de reducción del nitrito a óxido nítrico, y por otro, el gen *nosZ* que codifica la óxido nitroso reductasa (Mise et al., 2025), catalizadora del último paso de la desnitrificación, la reducción de  $N_2O$  a  $N_2$ .

Por otra parte, la nitrificación, un proceso aerobio donde el  $NH_4^+$  es utilizado como fuente de energía por los microorganismos nitrificantes y oxidado hasta  $NO_3^-$ , también es responsable de emisiones de  $N_2O$ , el cual es un subproducto del proceso (Ruser and Schulz, 2015). La oxidación del amonio hasta nitrato implica un paso intermedio, en el cual el amonio se oxida a nitrito para luego pasar a nitrato. Hasta 2015, se creía que estos dos pasos siempre eran llevados a cabo por dos grupos distintos de microorganismos (Koch et al., 2019). El primer paso es llevado a cabo por dos grupos de microorganismos; por un lado las arqueas oxidadoras del amonio (AOA) que en suelos templados constituyen una amplia proporción de las arqueas presentes (Stahl and de la Torre, 2012), y por otro las bacterias oxidadoras del amonio (AOB) de las cuales se reconocen 5 géneros (Soliman and Eldyasti, 2018). El gen *amoA*, codificante para la subunidad A de la amonio monooxigenasa es utilizado generalmente como gen marcador para el estudio de poblaciones oxidadoras de amonio. El segundo paso, es llevado a cabo por bacterias oxidadoras de nitrito, la mayoría de las cuales pertenecen a los filos Nitrospirota y Nitrospinota. Recientemente se ha descubierto que este grupo bacteriano tiene una versatilidad metabólica amplia, y que incluye algunos integrantes capaces de realizar la nitrificación de manera completa (Daims et al., 2016). Los genes marcadores utilizados para el estudio de este grupo son el *nrxA* y *nrxB*, codificantes para nitrito oxidorreductasa. Desde el punto de vista del conocimiento de la biología de estos microorganismos, constituyen un grupo relativamente relegado dentro de los microorganismos involucrados en el ciclo del N.

Aunque los dos procesos mencionados en los párrafos anteriores son considerados los principales responsables de la emisión de  $N_2O$  a la atmósfera, existen otros que pueden ser no menos importantes, ya que pueden determinar el flujo de  $N_2O$ , a veces mediante su producción pero también mediante su consumo. La reducción desasimilativa del nitrato (DNRA, por sus siglas en inglés) ocurre principalmente en ambientes anaeróbicos y compite con la desnitrificación por el nitrato disponible. Como su producto final es el amonio, puede tener consecuencias favorables desde varios puntos de vista en comparación con la desnitrificación, ya que transforma el nitrato en una fuente de nitrógeno más estable y disponible para las plantas, a la vez que este no termina en la atmósfera (Pandey et al., 2020). El gen *nrfA* codificante de la enzima nitrito reductasa, que reduce nitrito a amonio, es utilizado como marcador para estudiar las poblaciones de microorganismos capaces de realizar esta reducción (Welsh et al., 2014). Otro proceso involucrado en el ciclo del N, y que muchas veces se considera secundario en el suelo, es el conocido como anammox, u oxidación anaeróbica del amonio. En este el amonio se oxida acoplado a la reducción de nitrito para producir  $N_2$ , consecuentemente, este proceso compite tanto con la nitrificación como con la desnitrificación por sus respectivos sustratos,  $NH_4^+$  y  $NO_2^-$ . Los microorganismos responsables de este proceso pertenecen a seis géneros del filo Planctomycetes (Nie et al., 2018). Sus poblaciones pueden ser estudiadas mediante el clúster *hzsCBA* que codifica la hidrazina sintasa, enzima que cataliza la formación de hidracina con el amonio y óxido nítrico como precursores (Zhou et al., 2017).

El objetivo general del presente trabajo fue estudiar las poblaciones microbianas presentes en suelos de las Planicies del Este según estén bajo pastizal natural o uso arrocero. Este objetivo general se cumple

mediante la concreción de objetivos específicos, los cuales implican estudiar distintos parámetros de diferentes grupos microbianos: 1) conocer la abundancia y diversidad de los microorganismos oxidadores de amonio; 2) conocer la abundancia y diversidad de los microorganismos desnitrificantes; 3) conocer la abundancia y diversidad de los microorganismos metanogénicos y metanotróficos; 4) conocer las actividades enzimáticas y potenciales de las poblaciones microbianas del suelo; 5) conocer la abundancia y diversidad de las poblaciones generales de microorganismos (hongos y procariotas).

La hipótesis de nuestro trabajo es que el cambio en el uso del suelo, a través de un cambio en la cobertura vegetal y de manejo, induce un cambio en las poblaciones microbianas, incluyendo las involucradas en las emisiones de GEIs, y que esta influencia perdura durante la fase de pastura del suelo bajo uso arrocero.

### **Metodología/Diseño del estudio**

La estrategia de muestreo se basó en la selección de sitios ubicados en las Planicies del Este donde se encontrarán tripletes de parcelas con suelo bajo campo natural, arroz y pastura sembrada para ganadería. Esta selección se llevó a cabo con una combinación de entrevistas a productores junto a análisis de imágenes satelitales que permitieran determinar la presencia del campo natural. Precisamente, el campo natural fue el factor limitante en la determinación de los sitios ya que es el menos abundante entre estos usos de suelo, y debe chequearse, lo más fehacientemente posible, la ausencia histórica de agricultura en el lugar. Este chequeo se realizó en primera instancia mediante el análisis de imágenes satelitales y posteriormente mediante una caracterización prospectiva de la comunidad vegetal presente.

Una vez determinados los sitios de muestreo, que finalmente fueron 6 en lugar de los 5 previstos inicialmente, se llevaron a cabo las campañas de muestreo, en los meses de marzo-abril de 2024, en momentos previos a la cosecha del arroz. Durante los muestreos se realizó la determinación de las comunidades vegetales presentes en las parcelas y se tomaron las muestras de suelo para los análisis posteriores. La determinación vegetal se realizó mediante el método relevé (Ellenberg and Mueller-Dombois, 1974), se localizaron cuadrados de 25m<sup>2</sup> en áreas centrales de los stands y se registraron las especies presentes. A cada especie se le asignó un valor de cobertura según Braun-Blanquet (Westhoff and Van Der Maarel, 1978). Con las matrices de abundancia de especies resultantes se calcularon los índices de  $\alpha$ -diversidad así como las distancias de  $\beta$ -diversidad.

Cada muestra de suelo consistió en 15 tomas con calador cilíndrico de 2,5 cm de diámetro a una profundidad de 10 cm. Las muestras fueron conservadas en frío hasta su procesamiento en el laboratorio. Una vez en el laboratorio, según se requiriera, se secó el exceso de humedad del suelo oreando las muestras a temperatura ambiente. Luego se tamizaron con una malla de 2mm. Una fracción de este suelo tamizado se liofilizó para su conservación, mientras que otra fue conservada a 4°C. Las muestras se liofilizaron por duplicado.

Una de las réplicas de las muestras liofilizadas fue utilizada para la extracción de ADN. Para que la cantidad de ADN extraído fuese suficiente para la secuenciación masiva y la metagenómica shotgun, el proceso se realizó por duplicado. El ADN fue extraído utilizando el kit comercial DNeasy PowerSoil Pro de Qiagen y siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad del ADN extraído fue visualizada mediante electroforesis en gel de agarosa e iluminación UV usando el agente colorante GoodView (SBS Genetech). La cantidad de ADN extraído se determinó mediante Qubit<sup>TM</sup> dsDNA Quantification Kit (Thermo Fischer Scientific).

Las dos réplicas del ADN extraído se enviaron a la empresa Mr. DNA (<https://www.mrdnalab.com/>; Texas, EEUU). Una de ellas fue usada para la secuenciación masiva de los genes del ARNr 16S (para la determinación de poblaciones procariotas) y la región intergénica ITS (para la determinación de poblaciones fúngicas). La profundidad de secuenciación solicitada fue de 20,000 secuencias por muestra en ambos casos. La secuenciación del gen del ARNr 16S fue realizada con los cebadores 515f

(GTGYCAGCMGCCGCGGTAA) y 806rb (GGACTACNVGGGTWTCTAAT) que permiten secuenciar la región hipervariable V4 de dicho gen (Caporaso et al., 2018). Por su parte, la secuenciación de la región ITS se realizó con los cebadores ITS1f (CTTGGTCAATTAGAGGAAGTAA) e ITS2r (GCTGCGTTCTTCATCGATGC) (Op De Beeck et al., 2014). La otra réplica fue utilizada como sustrato para la obtención de los metagenomas de los suelos, los cuales se obtuvieron mediante secuenciación «shotgun». La secuenciación solicitada fue de una profundidad de 70 millones de secuencias pareadas de 2x150 bp y se realizó en la plataforma Illumina NovaSeq 6000 (www.illumina.com).

La segunda réplica de las muestras liofilizadas fue enviada al Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA), España, para la determinación del perfil de ácidos grasos de fosfolípidos (PLFA) y de actividades enzimáticas extracelulares. Las actividades enzimáticas determinadas fueron:  $\beta$ -1,4-glucosidasa (AG),  $\beta$ -1,4-glucosidasa (BG), 4- $\beta$ -D-glucano cellobiohidrolasa (CB) y  $\beta$ -xilosidasa (XYL), relacionadas con el ciclo del C;  $\beta$ -1,4-N-acetilglucosaminidasa (NAG) y L-leucina aminopeptidasa (LAP), relacionadas con el ciclo del N; y fosfatasa ácida (PHOS), relacionada con el ciclo del P. Los protocolos mediante los cuales se llevaron a cabo los PLFA y las actividades enzimáticas fueron los mismos que en estudios previos (Azziz et al., 2023).

Los resultados de la secuenciación masiva de los genes del ARNr 16S y de la región intergénica ITS fueron procesados mediante el uso del paquete dada2 (Callahan et al., 2016) en RStudio (Posit Software, PBC). Brevemente, las secuencias se filtraron y cortaron según parámetros de calidad mínimos donde no se aceptaron secuencias con "N" (bases sin asignar) o que tuvieron bases con un valor de calidad menor a 2 después de haber sido recortadas. Una vez depuradas, los pares de secuencias se intentaron unir (mergePairs) y se eliminaron las secuencias quiméricas con el método "consensus". Al final del proceso se generó una tabla que contenía los valores de cantidad de secuencias que se conservaban después de cada paso. Si la cantidad de secuencias conservadas era poca en alguna de las muestras, se volvía a correr el proceso cambiando el largo al cual las secuencias se cortaban en el primer paso.

Una vez obtenidas las secuencias resultantes, su asignación taxonómica se realizó mediante el comando assignTaxonomy, utilizando las bases de datos SILVA nr99 v138.2 (<https://www.arb-silva.de/>) y UNITE General Release Dynamic 04.04.2024 (<https://unite.ut.ee/>), para procariotas y hongos, respectivamente.

Se construyó el objeto phyloseq agregando los datos de las muestras (sitio, uso del suelo, características fisicoquímicas, etc.) a las asignaciones taxonómicas de las secuencias en las distintas muestras. Las abundancias relativas de los distintos taxones, los parámetros de  $\alpha$ -diversidad, el cálculo de distancias de  $\beta$ -diversidad, así como las respectivas gráficas, fueron realizados usando el paquete microeco (Liu et al., 2021). La clasificación de los taxones en funciones y gremios fueron inferidas mediante las bases de datos FAPROTAX (Louca et al., 2016) y FunGuilds (Nguyen et al., 2016) para procariotas y hongos, respectivamente.

Los metagenomas obtenidos se ensamblaron mediante el software MEGAHIT (Li et al., 2015). Posteriormente, para asignar los genes y sus respectivas taxonomías presentes en los metagenomas de manera de poder calcular las abundancias y diversidad de los distintos genes funcionales, se utilizó el pipeline automatizado SqueezeMeta (Tamames and Puente-Sánchez, 2019). Brevemente, los pasos seguidos por este pipeline son: identificación de genes y rRNA, búsqueda por homología en distintas bases de datos públicas (nr de GenBank, eggNOG, KEGG y PFAM), asignación taxonómica, asignación funcional (según identidades KEGG y COGs), asignación taxonómica de los contigs, estimación de abundancia y cobertura, unión de contigs mediante binning, y asignación taxonómicas de los bins (resultantes de la unión de contigs).

Una vez obtenidas las bases de datos generadas por SqueezeMeta, se extrajo la información (abundancia relativa y taxonomía) de los genes de interés para el proyecto, a saber: metanogénesis (mcrA, mcrB y mcrG (Lyu and Liu, 2018)), metanotrofia (pmoA (Kalyuzhnaya et al., 2019)), desnitrificación (nirS (Azziz et al., 2017), nirK (Azziz et al., 2017) y nosZ (Mise et al., 2025)), nitrificación (amoA (Soliman and Eldyasti, 2018; Stahl and de la Torre, 2012), nrxA y nrxB (Daims et al., 2016)), DNRA (nrfA (Welsh et al., 2014)) y anammox (hzsA, hzsB

y hzsC(Nie et al., 2018)). Es de notar que algunos de estos genes no formaban parte de la propuesta original del proyecto. Sin embargo, debido a la metodología de secuenciación shotgun y del procesamiento bioinformático, es posible agregar su búsqueda de una manera muy sencilla, lo que significa una ventaja de esta estrategia con respecto a la secuenciación masiva de cada uno de los genes por separado.

Es de notar, que los resultados primarios de este análisis bioinformático exceden los objetivos planteados en el presente proyecto. Sin embargo, esto asegura la posibilidad de realizar estudios a posteriori con estos mismos resultados, como por ejemplo la búsqueda de microorganismos específicos en las distintas muestras y el análisis de los contextos genéticos de distintos genes de interés en los bins o contigs.

Los resultados de los parámetros de  $\alpha$ -diversidad, PLFA, actividades enzimáticas, abundancia de genes funcionales, FAPROTAX y Funguilds fueron analizados estadísticamente mediante prueba t pareada. Se usó el paquete Durga(Khan and McLean, 2024) para realizar el test y visualizar los gráficos resultantes. La  $\alpha$ -diversidad de bacterias, arqueas, hongos y plantas se calculó mediante non-metric multidimensional scaling (NMDS), los resultados se visualizaron en gráficos de dispersión y la significancia estadística de las agrupaciones por tratamiento se calculó mediante ADONIS pareado. Para esto último se utilizó el paquete vegan v2.8.0(Oksanen et al., 2025).

## Resultados, análisis y discusión

### 1. Comunidades vegetales, bacterianas y fúngicas generales.

#### 1.1 Composición taxonómica y parámetros de alfa-diversidad (Relacionado con el objetivo específico #5)

Las comunidades de plantas de las parcelas bajo cultivo de arroz estuvieron dominadas, de acuerdo a lo esperado, por *Oryza sativa*. En las parcelas bajo pastura sembrada, las especies vegetales dominantes fueron *Festuca arundinacea*, *Cynodon dactylon* y *Paspalum dilatatum*; mientras que en aquellas bajo campo natural *Cynodon dactylon*, *Stenotaphrum secundatum* y *Paspalum notatum* fueron las especies dominantes (Fig.1). En cuanto a los parámetros de alfa-diversidad, las comunidades vegetales presentes en el campo natural presentaron una riqueza (medida como número de especies observadas) significativamente mayor a las presentes en las pasturas sembradas y a las parcelas con arroz. Por su parte, estas últimas presentaron un valor significativamente menor a las otros dos tratamientos (Fig.2).

En cuanto a las comunidades bacterianas, el análisis de los resultados de la secuenciación de los genes del ARNr 16S mostró dominancia de los filos bacterianos Verrucomicrobiota, Actinomycetota, Pseudomonadota y Acidobacteriota (Fig.3). No se observa, en este caso, una diferenciación entre los tratamientos, al menos de forma exploratoria. Por su parte, los parámetros de alfa-diversidad bacteriana mostraron mayor riqueza en las parcelas con arroz respecto al resto (Chao1), así como una mayor diversidad (Shannon) en arroz respecto al campo natural (Fig.4).

Las comunidades de hongos, según la secuenciación de la región ITS, presentaron dominancia de los filos Ascomycota y Basidiomycota. De modo exploratorio se puede advertir un aumento de los Mortierellomycota y una baja proporción de Basidiomycota en las parcelas de arroz. A su vez, la proporción de Basidiomycota es particularmente alta en las parcelas de campo natural y en dos parcelas de pastura sembrada (Fig.5). En cuanto a los parámetros de alfa-diversidad, las poblaciones de hongos tuvieron mayor riqueza (Chao1) en el campo natural respecto a los otros tratamientos, mientras que la riqueza en las parcelas de arroz fue significativamente menor que la obtenida en parcelas de campo natural y pastura sembrada. Sin embargo, la diversidad según el índice de Shannon no varió significativamente entre los tratamientos (Fig.6).

#### 1.2 Análisis de diferencias de las comunidades (beta-diversidad) (Relacionado con el objetivo específico #5)

El análisis de las comunidades de plantas mostró claramente, y de forma esperada, diferencias significativas entre las tres coberturas del suelo. Entre los tres tratamientos, los más alejados entre sí en el espacio de ordenamiento fueron el campo natural y el arroz, mientras que las muestras de pastura sembrada se colocaron en una posición intermedia (Fig.7). En el caso de las comunidades de bacterias, la

dispersión de las muestras en el espacio bidimensional del NMDS es menos clara que para los vegetales, aunque se puede observar agrupamiento entre las muestras del campo natural a la izquierda del espacio, mientras que las muestras de pastura sembrada y arroz se alojan en la derecha y en la zona inferior (Fig.8). La prueba estadística ADONIS pareado encuentra diferencias entre las comunidades de campo natural y el resto, aunque no encuentra diferencias entre las parcelas de arroz y pastura sembrada. Por último, las comunidades de hongos muestran, en el análisis por Bray-Curtis, una separación entre las muestras de campo natural (hacia la derecha del espacio) y el resto de las muestras (pastura sembrada y arroz hacia la izquierda del espacio) (Fig.9). Esta separación de las muestras se ve sustentada por los resultados del ADONIS pareado que arroja diferencias significativas entre las comunidades fúngicas presentes en las parcelas de campo natural respecto a las de pastura sembrada y arroz.

## 2. Biomasa microbiana y resultados PLFAs. (Relacionado con el objetivo específico #5)

El análisis de las muestras de suelo mediante perfil de ácidos grasos de fosfolípidos (PLFAs) permite obtener valores de la biomasa total, y distinguir grandes grupos microbianos. Los resultados de este análisis permiten concluir que la biomasa microbiana total fue significativamente superior en las parcelas de campo natural, mientras que fue menor en las parcelas con arroz. Este mismo resultado se obtuvo para la biomasa de origen fúngico. Por su parte, para la biomasa bacteriana se obtuvo el resultado casi opuesto, ya que fue significativamente mayor en las parcelas de arroz con respecto al campo natural. Al analizar el cociente de la biomasa hongos/bacterias se encontró que éste es significativamente más alto en campo natural respecto a pastura sembrada y arroz (Fig10).

## 3. Análisis de poblaciones microbianas específicas según genes funcionales

### 3.1 Abundancias de genes funcionales

#### 3.1.1 Metanogénesis (*mcrA*, *mcrB* y *mcrG*) (Relacionado con el objetivo específico #3)

El análisis de la abundancia de los tres genes de metanogénesis evaluados arrojaron el mismo resultado en cada uno de ellos. En las muestras de campo natural no se encontraron estos genes, mientras que su abundancia fue significativamente superior en las muestras de arroz respecto a las de pastura sembrada (Fig11).

#### 3.1.2 Metanotrofia (*pmoA*) (Relacionado con el objetivo específico #3)

No hubo diferencias significativas entre ninguno de los tres tratamientos para el gen indicador de la metanotrofia *pmoA* (Fig12).

#### 3.1.3 Desnitrificación (*nirS*, *nirK* y *nosZ*) (Relacionado con el objetivo específico #2)

En cuanto a los genes involucrados en la desnitrificación, la abundancia de los genes *nirS* y *nirK* no presentaron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos. Por su parte, la abundancia del gen *nosZ* fue significativamente mayor en las parcelas bajo arroz respecto a aquellas bajo campo natural (Fig13).

#### 3.1.4 Nitrificación (*amoA*, *nrxA* y *nrxB*) (Relacionado con el objetivo específico #1)

La abundancia del gen *amoA* fue significativamente menor en campo natural respecto a los otros tratamientos (Fig14). En cuanto a los genes *nrxA* y *nrxB*, ninguno de los dos fueron encontrados en las muestras analizadas.

#### 3.1.5 DNRA (*nrfA*)

Para el gen marcador de la reducción desasimilativa del nitrato, la abundancia resultó significativamente inferior en las muestras de campo natural respecto a las de pastura sembrada, sin embargo no hubo diferencias significativas entre las de campo natural y arroz (Fig15).

#### 3.1.6 Anammox (*hzsA*, *hzsB* y *hzsC*)

Ninguno de los genes marcadores del proceso Anammox fueron encontrados en nuestras muestras.

### 3.2 Diversidad de genes funcionales

Solo se detallan los resultados de los genes que fueron encontrados según se describió en el apartado anterior.

### 3.2.1 Metanogénesis (*mcrA*, *mcrB* y *mcrG*) (Relacionado con el objetivo específico #3)

Al ser cero el valor obtenido para la riqueza y diversidad de estos genes en las parcelas de campo natural, se puede considerar como diferencia biológica significativa con respecto a los valores obtenidos para pastura sembrada y arroz. Entre los dos tratamientos con valores distintos de cero no se observan diferencias significativas. Se muestra el resultado de *mcrB* a modo de ejemplo (Fig16).

### 3.2.2 Metanotrofia (*pmoA*) (Relacionado con el objetivo específico #3)

Tanto la riqueza, contada como número de especies observadas, como la diversidad según el índice de Shannon, no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos para el gen *pmoA* (Fig17).

### 3.2.3 Denitrificación (*nirS*, *nirK* y *nosZ*) (Relacionado con el objetivo específico #2)

Para el gen *nirS* no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos tanto para la riqueza como para la diversidad medida como índice de Shannon (Fig18). Sin embargo, los resultados del gen *nirK* mostraron valores significativamente inferiores, tanto de riqueza como de diversidad, en las parcelas bajo campo natural respecto a arroz y pastura sembrada (Fig19). Por último, la riqueza y diversidad del gen *nosZ* mostró valores significativamente superiores en las parcelas de arroz con respecto al campo natural. Particularmente el índice de Shannon también fue significativamente superior en la pastura sembrada respecto al campo natural (Fig20).

### 3.2.4 Nitrificación (*amoA*) (Relacionado con el objetivo específico #1)

El número de especies observadas con el gen *amoA* fue significativamente superior en el arroz con respecto al campo natural. Lo mismo se observó para el índice de Shannon calculado para este gen, para el cual se obtuvieron diferencias significativas entre los tres tratamientos, siendo el menor valor el de campo natural y el mayor el del tratamiento de arroz (Fig21).

### 3.2.5 DNRA (*nrfA*)

La riqueza calculada para el gen *nrfA* fue significativamente inferior en las parcelas de campo natural respecto a las de pastura sembrada y arroz. Sin embargo, el índice de Shannon no mostró diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos (Fig22).

## 4 Actividades microbianas potenciales (Relacionado con el objetivo específico #4)

### 4.1 Actividades enzimáticas extracelulares

#### 4.1.1 Enzimas relacionadas con el ciclo del C

Las actividades enzimáticas de las enzimas alfa-1,4-glucosidasa, (AG), beta-1,4 glucosidasa (BG), beta-D-celobiohidrolasa (CB) y beta-xilosidasa (XYL) presentes en las muestras de pasturas sembrada fueron significativamente mayores respecto a las muestras de campo natural. Para el caso de la enzima XYL el valor menor fue el presente en las parcelas de arroz, con un valor intermedio obtenido en las parcelas de campo natural (Fig23).

#### 4.1.2 Enzimas relacionadas con el ciclo del N

Las enzimas beta-1,4-N-acetilglucaminidasa (NAG) y L-leucina aminopeptidasa (LAP) mostraron actividades significativamente superiores en campo natural; en NAG la diferencia fue respecto a la pastura sembrada, mientras que en LAP lo fue respecto a arroz (Fig24).

#### 4.1.3 Enzimas relacionadas con el ciclo del P

La actividad enzimática relacionada con el ciclo del P fue la fosfatasa ácida (PHOS). Los resultados mostraron una actividad significativamente mayor en las muestras de pastura sembrada con respecto a las muestras de campo natural y arroz (Fig25).

### 4.2 Potencial de nitrificación (Relacionado con el objetivo específico #5)

No hubo diferencias significativas para el potencial de nitrificación entre ninguno de los tratamientos (Fig26).

## Conclusiones y recomendaciones

Los análisis de las estructuras generales de las poblaciones de microorganismos muestran una diferenciación entre las parcelas de campo natural y aquellas bajo uso arrocero (arroz y pastura sembrada). Esto ocurrió tanto para las poblaciones bacterianas como fúngicas (prueba ADONIS pareado). Entre los parámetros biológicos medidos durante el proyecto, se encontraron particularmente algunos que diferenciaban al campo natural respecto a las otras coberturas del suelo estudiadas. De esta manera, en el campo natural se registró una mayor riqueza de hongos a la vez que una menor diversidad de bacterias. De manera similar, se observó que la biomasa fúngica fue mayor en campo natural, mientras que la bacteriana fue mayor en las parcelas de arroz; por tanto el cociente hongo/bacteria fue significativamente mayor en las parcelas de campo natural. Estos parámetros generales son muy relevantes desde el punto de vista biológico ya que permiten observar cambios grandes en la comunidad. Los hongos y los procariotas tienen formas de crecimiento distintas y procesan de manera diferente los nutrientes, cambios en sus abundancias y diversidades relativas pueden tener impactos profundos en el ciclo de nutrientes, o en la estructura del suelo. Es claro que el cambio del uso del suelo desde el campo natural hacia el uso arrocero ha ejercido un cambio significativo en parámetros globales de la microbiología de ese ambiente.

Otro impacto observado del cambio del uso del suelo es la presencia de genes implicados en la metanogénesis en las muestras de arroz, lo cual es un hecho casi esperado. Sin embargo, no tan esperado es su presencia en las parcelas de pastura sembrada, lo que denota la persistencia de estas poblaciones cuando el suelo deja de estar bajo arroz y pasa a la fase de pastura en la rotación. Por su parte, las poblaciones metanotróficas no presentaron diferencias entre los tratamientos, lo que significa que estas poblaciones no se enriquecen durante el cultivo de arroz, y tampoco en la fase pastura sembrada. La relevancia de esto radica en que estas poblaciones consumen el metano generado en el suelo y la falta de su enriquecimiento, a la vez que sí se enriquecen las metanogénicas, resulta en un balance negativo desde el punto de vista ambiental por el aumento en la producción de CH<sub>4</sub> sin su concomitante aumento en el consumo.

En cuanto al proceso de desnitrificación, de manera general, muchos parámetros de abundancia y diversidad de estos genes fueron mayores para las parcelas de arroz con respecto a las de campo natural. Particularmente relevante es el gen *nosZ*, por codificar la enzima responsable del último paso de la desnitrificación, que reduce el N<sub>2</sub>O a N<sub>2</sub>; por tanto, es un proceso deseable desde el punto de vista de la mitigación de la emisión de N<sub>2</sub>O. La diversidad y abundancia de este gen fue mayor en las parcelas de arroz respecto a las de campo natural; de los tres genes de desnitrificación evaluados, fue este que presentó diferencias sistemáticas tanto en parámetros de abundancia como diversidad.

El gen *amoA*, como indicador de la oxidación del amonio, también tuvo valores superiores de abundancia y diversidad en parcelas de arroz con respecto a las de campo natural. Esto, junto al resultado de desnitrificación comentado en el párrafo anterior, pueden ser resultado del aporte de nutrientes al suelo producto de su manejo. A pesar de las diferencias observadas en los genes, lo mismo no se vio en los resultados de potencial de nitrificación. Sin embargo, varias actividades enzimáticas fueron superiores en las muestras de campo natural, lo que puede significar un mayor esfuerzo por parte de los microorganismos para conseguir recursos más escasos.

El gen marcador de la DNRA, un proceso poco estudiado y que no estaba planteado inicialmente en el proyecto, mostró valores más bajos de abundancia y riqueza en el campo natural respecto a la pastura sembrada (tanto abundancia como riqueza) y las parcelas de arroz (riqueza).

Tomados en conjunto, estos resultados indican una clara incidencia del cambio de uso del suelo desde campo natural a uso arrocero en la microbiología del suelo, tanto en parámetros generales como en muchos parámetros específicos relacionados con el ciclo de nutrientes y la emisión de gases de efecto invernadero.

Un insumo valioso que ha generado este proyecto son los propios metagenomas obtenidos. Son 18 metagenomas, uno por muestra de suelo, que componen tripletes de campo natural, pastura sembrada y

arroz, que seguirán disponibles para estudiar otros genes de interés o incluso microorganismos a partir de sus genomas ensamblados al menos parcialmente. Es de destacar que para la propia preparación de los manuscritos derivados de este proyecto se ahondará aún más en los genes ya estudiados, ya que se puede determinar, de manera relativamente sencilla, la identidad taxonómica de muchos miembros de las poblaciones de algunos de estos genes.

La conversión del campo natural o pastizal natural a uso arrocero tiene consecuencias ecológicas, muchas de las cuales son conocidas, y han sido previamente estudiadas. Hasta qué punto estas consecuencias repercuten en la microbiología del suelo y de qué manera la rotación con pasturas puede amortiguar alguno de estos impactos, son cuestiones que no están del todo dilucidadas. Los resultados de este proyecto permiten empezar a encontrar respuestas a estas preguntas. Conocer estos impactos provee insumos necesarios para la toma de decisiones por parte de las autoridades competentes acerca del ordenamiento territorial y el uso del suelo. En un contexto nacional donde la producción de alimentos como parte de la actividad económica del país es de suma importancia, y la necesidad de valorizar los productos mediante la incorporación de manejos ambientalmente sustentables es vital, la única manera de tomar decisiones responsables acerca del uso del suelo es considerando sustentos científicos como los que surgen del proyecto que aquí se presenta.

## Referencias bibliográficas

- 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, 1383.
- Azziz, G., Monza, J., Etchebehere, C., Irisarri, P., 2017. nirS-and nirK-type denitrifier communities are differentially affected by soil type, rice cultivar and water management. *Eur. J. Soil Biol.* 78, 20–28.
- Azziz, G., Trasante, T., Monza, J., Irisarri, P., 2016. The effect of soil type, rice cultivar and water management on ammonia-oxidizing archaea and bacteria populations. *Appl. Soil Ecol.* 100, 8–17.
- Bösch Yvonne, Pold Grace, Saghaï Aurélien, Karlsson Magnus, Jones Christopher M., Hallin Sara, 2023. Distribution and Environmental Drivers of Fungal Denitrifiers in Global Soils. *Microbiol. Spectr.* 11, e00061-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00061-23>
- 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. *Nat. Methods* 13, 581–583.
- Caporaso, J.G., Ackermann, G., Apprill, A., Bauer, M., Berg-Lyons, D., Betley, J., Fierer, N., Fraser, L., Fuhrman, J.A., Gilbert, J.A., 2018. EMP 16S Illumina amplicon protocol.
- Daims, H., Lückner, S., Wagner, M., 2016. A New Perspective on Microbes Formerly Known as Nitrite-Oxidizing Bacteria. *Trends Microbiol.* 24, 699–712. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.05.004>
- Dedysh, S.N., Knief, C., 2018. Diversity and Phylogeny of Described Aerobic Methanotrophs, in: Kalyuzhnaya, M.G., Xing, X.-H. (Eds.), *Methane Biocatalysis: Paving the Way to Sustainability*. Springer International Publishing, Cham, pp. 17–42. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-74866-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-74866-5_2)
- Ding, L.-J., Cui, H.-L., Nie, S.-A., Long, X.-E., Duan, G.-L., Zhu, Y.-G., 2019. Microbiomes inhabiting rice roots and rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 95, fiz040. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz040>
- Ellenberg, D., Mueller-Dombois, D., 1974. *Aims and methods of vegetation ecology*. Wiley New York.
- Hednec, P., Alias, A., Almahsheer, H., Liu, C., Chee, P.S., Yao, M., Li, X., Vesterdal, L., Frouz, J., Kou, Y., Yue, K., 2024. Global assessment of soil methanotroph abundances across biomes and climatic zones: The role of climate and soil properties. *Appl. Soil Ecol.* 195, 105243. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2023.105243>
- Kalyuzhnaya, M.G., Gomez, O.A., Murrell, J.C., 2019. The Methane-Oxidizing Bacteria (Methanotrophs), in: McGenity, T.J. (Ed.), *Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon-Degrading Microbes*. Springer International Publishing, Cham, pp. 245–278. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-14796-9\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-030-14796-9_10)
- Khan, M.K., McLean, D.J., 2024. Durga: an R package for effect size estimation and visualization. *J. Evol. Biol.* 37, 986–993. <https://doi.org/10.1093/jeb/voae073>
- Koch, H., van Kessel, M.A.H.J., Lückner, S., 2019. Complete nitrification: insights into the ecophysiology of comammox Nitrospira. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 177–189. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9486-3>
- Li, D., Liu, C.-M., Luo, R., Sadakane, K., Lam, T.-W., 2015. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics* 31, 1674–1676. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv033>
- Linquist, B.A., Adviento-Borbe, M.A., Pittelkow, C.M., van Kessel, C., van Groenigen, K.J., 2012. Fertilizer management practices and greenhouse gas emissions from rice systems: A quantitative review and analysis. *Field Crops Res.* 135, 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2012.06.007>
- Liu, C., Cui, Y., Li, X., Yao, M., 2021. microeco: an R package for data mining in microbial community ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 97, fiae255. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae255>
- Louca, S., Parfrey, L.W., Doebeli, M., 2016. Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome. *Science* 353, 1272–1277. <https://doi.org/10.1126/science.aaf4507>

- Lyu, Z., Liu, Y., 2018. Diversity and Taxonomy of Methanogens, in: Stams, A.J.M., Sousa, D. (Eds.), *Biogenesis of Hydrocarbons*. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–59. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-53114-4\\_5-2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-53114-4_5-2)
- Lyu, Z., Shao, N., Akinyemi, T., Whitman, W.B., 2018. Methanogenesis. *Curr. Biol.* 28, R727–R732. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.021>
- Mise, K., Masuda, Y., Senoo, K., Itoh, H., 2025. Betaproteobacterial clade II nosZ activated under high N<sub>2</sub>O concentrations in paddy soil microcosms. *J. Appl. Microbiol.* 136, lxaf055. <https://doi.org/10.1093/jambio/lxaf055>
- Nguyen, N.H., Song, Z., Bates, S.T., Branco, S., Tedersoo, L., Menke, J., Schilling, J.S., Kennedy, P.G., 2016. FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecol.* 20, 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.06.006>
- Nie, S., Lei, X., Zhao, L., Wang, Y., Wang, F., Li, H., Yang, W., Xing, S., 2018. Response of activity, abundance, and composition of anammox bacterial community to different fertilization in a paddy soil. *Biol. Fertil. Soils* 54, 977–984. <https://doi.org/10.1007/s00374-018-1320-7>
- Oksanen, J., Simpson, G.L., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Szoecs, E., Wagner, H., Barbour, M., Bedward, M., Bolker, B., Borcard, D., Borman, T., Carvalho, G., Chirico, M., Caceres, M.D., Durand, S., Evangelista, H.B.A., FitzJohn, R., Friendly, M., Furneaux, B., Hannigan, G., Hill, M.O., Lahti, L., Martino, C., McGlenn, D., Ouellette, M.-H., Cunha, E.R., Smith, T., Stier, A., Braak, C.J.F.T., Weedon, J., 2025. *vegan: Community Ecology Package*.
- Op De Beeck, M., Lievens, B., Busschaert, P., Declerck, S., Vangronsveld, J., Colpaert, J.V., 2014. Comparison and Validation of Some ITS Primer Pairs Useful for Fungal Metabarcoding Studies. *PLOS ONE* 9, e97629. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097629>
- Pandey, C.B., Kumar, U., Kaviraj, M., Minick, K.J., Mishra, A.K., Singh, J.S., 2020. DNRA: A short-circuit in biological N-cycling to conserve nitrogen in terrestrial ecosystems. *Sci. Total Environ.* 738, 139710. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139710>
- Pittelkow, C.M., Zorrilla, G., Terra, J., Riccetto, S., Macedo, I., Bonilla, C., Roel, A., 2016. Sustainability of rice intensification in Uruguay from 1993 to 2013. *Glob. Food Secur.* 9, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2016.05.003>
- Ríos, C., Baldi, G., Lezama, F., Baeza, S., 2018. Cartografía de remanentes de pastizal natural y análisis de la fragmentación de un paisaje altamente transformado?: planicies del Este uruguayo. Presented at the XXVIII Reunión Argentina de Ecología, Argentina.
- Ríos, C.F., Lezama, F., Altesor, A., 2025. Floristic heterogeneity of the last grassland remnants in an agricultural landscape: a phytosociological study in the Uruguayan Eastern Plains. *Phytocoenologia* 52.
- Ruser, R., Schulz, R., 2015. The effect of nitrification inhibitors on the nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) release from agricultural soils—a review. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 178, 171–188. <https://doi.org/10.1002/jpln.201400251>
- Soliman, M., Eldyasti, A., 2018. Ammonia-Oxidizing Bacteria (AOB): opportunities and applications—a review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 17, 285–321. <https://doi.org/10.1007/s11157-018-9463-4>
- Stahl, D.A., de la Torre, J.R., 2012. Physiology and Diversity of Ammonia-Oxidizing Archaea. *Annu. Rev. Microbiol.* <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150128>
- Tamames, J., Puente-Sánchez, F., 2019. SqueezeMeta, A Highly Portable, Fully Automatic Metagenomic Analysis Pipeline. *Front. Microbiol.* 9, 3349. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03349>
- Wagner Tristan, Wegner Carl-Eric, Kahnt Jörg, Ermler Ulrich, Shima Seigo, 2017. Phylogenetic and Structural Comparisons of the Three Types of Methyl Coenzyme M Reductase from Methanococcales and Methanobacteriales. *J. Bacteriol.* 199, 10.1128/jb.00197-17. <https://doi.org/10.1128/jb.00197-17>
- Welsh, A., Chee-Sanford, J.C., Connor, L.M., Löffler, F.E., Sanford, R.A., 2014. Refined nrfA Phylogeny Improves PCR-Based nrfA Gene Detection. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 2110–2119. <https://doi.org/10.1128/AEM.03443-13>

Westhoff, V., Van Der Maarel, E., 1978. The braun-blanquet approach, in: *Classification of Plant Communities*. Springer, pp. 287–399.

Yang, Y., Liu, H., Lv, J., 2022. Response of N<sub>2</sub>O emission and denitrification genes to different inorganic and organic amendments. *Sci. Rep.* 12, 3940. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07753-9>

Zhou, Z., Chen, J., Meng, H., Dvornyk, V., Gu, J.-D., 2017. New PCR primers targeting hydrazine synthase and cytochrome c biogenesis proteins in anammox bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 1267–1287. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8013-7>

#### **Licenciamiento**

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)