

Diversidad de la comunidad microbiana del suelo bajo diferentes manejos
en la implantación y cosecha de caña de azúcar

*Tesis presentada para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires,
Área Producción Vegetal*

Lucía Martina Ortiz Rocca

Licenciada en Ciencias Ambientales - Universidad de Buenos Aires - 2020

Lugar de trabajo: Cátedra de Microbiología Agrícola, Facultad de Agronomía, UBA



Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires

COMITÉ CONSEJERO

Director de Tesis

Marcelo Abel Soria

Licenciado en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Co-directora de Tesis

Olga Susana Correa

Ingeniera Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Master of Science (Universidad de Buenos Aires)

JURADO DE TESIS

JURADO

Natalia Pin Viso

Ingeniera Agrónoma (Universidad de Buenos Aires)

Doctora en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

Paola Adriana Georgina Delaporte Quintana

Ingeniera Agrónoma (Universidad Nacional de Tucumán)

Doctora en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de Tucumán)

JURADO

Diego Herman Sauka

Bioquímico (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Microbiología (Universidad de Buenos Aires)

Fecha de defensa de la tesis: 7 de octubre de 2025

Agradecimientos

A La Secretaría de Ciencia y Técnica de la UBA por otorgarme la beca para realizar este trabajo.

A mi comité consejero y todas las personas de la Cátedra que me ayudaron con los datos, ensayos o simplemente con un comentario que sumaba.

A Marcelo Soria, mención especial, por todo lo que me enseñás y por hacerme sentir cada vez más sólida en la profesión.

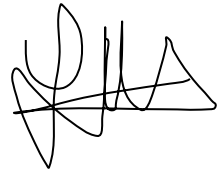
A mis compas de -todos- los trabajos. Son las personas con las que se pasa el día a día, la vida misma. Gracias por las risas.

A lxs míos que siempre están para hacer cosas que no sean trabajar. No sería lo mismo sin ese empuje.

A todas las personas que con sus palabras me hacen pensar. Pensar me encanta y, en esta profesión, me pasa todos los días.

Declaración

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en esta u otra institución.

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, overlapping loops and lines, positioned above the printed name.

Lic. Lucía Martina Ortiz Rocca

Índice general

AGRADECIMIENTOS.....	III
DECLARACIÓN.....	IV
ÍNDICE GENERAL.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
RESUMEN.....	IX
ABSTRACT.....	X
1. Capítulo 1: Introducción general y metodología.....	1
1.1 Introducción.....	2
1.1.1 Microbiología del suelo y su rol en agroecosistemas.....	3
1.1.2 Cultivo de caña de azúcar y contexto productivo.....	3
1.1.3 Genes funcionales del microbioma.....	4
1.1.4 MAGs y metagenómica ensamblada.....	7
1.1.5 Enfoque multi-ómico e integración metodológica.....	8
1.2.1 Objetivos.....	10
1.2.2 Hipótesis.....	10
1.3 Materiales y métodos.....	11
1.3.1 Sitio de estudio y diseño experimental.....	11
1.3.2 Muestras de suelo y análisis de parámetros físico-químicos.....	14
1.3.3 Medición de emisiones de gases de efecto invernadero.....	15
1.3.4 Estimación de diversidad bacteriana por amplicones 16S.....	16
1.3.5 Secuenciación masiva del ADN total, construcción de genomas ensamblados de metagenomas y diversidad de genes funcionales.....	19
1.3.6 Cuantificación de genes por qPCR.....	22
1.3.7 Búsqueda de diversidad en las abundancias: enfoque multi-ómico.....	25
2. Capítulo 2. Variables edáficas y emisiones de GEI: impacto del manejo en caña de azúcar	27
2.1 Breve introducción.....	28
2.2 Resultados.....	28
3. Capítulo 3: Comunidades microbianas y su rol funcional en la emisión de GEI.....	32
3.1 Breve introducción.....	33
3.2 Resultados.....	34
3.2.1 Abundancias taxonómicas.....	34
3.2.2 Abundancia de eubacterias.....	35
3.2.3 Abundancia de hongos.....	35
3.2.4 Abundancia de arqueobacterias.....	36
3.2.5: Análisis de la abundancia de genes funcionales medidas por qPCR.....	37
4. Capítulo 4. Análisis de la diversidad microbiana del suelo: caracterización taxonómica y funcional por amplicones y ADN total.....	43
4.1 Breve introducción.....	44

4.2 Resultados.....	45
4.2.1 Análisis de secuencias de amplicones del gen 16S rRNA.....	45
4.2.1.1 Análisis de la biodiversidad alfa y beta de la comunidad.....	45
4.2.2 Análisis de la secuenciación masiva de ADN TOTAL.....	48
4.2.2.1 Ensamblado.....	49
4.2.2.2 Binning.....	49
4.2.2.3 Anotación.....	50
4.2.3 Búsqueda de diversidad en la secuencia de proteínas funcionales en el proteoma derivado del metagenoma.....	51
5. Capítulo 5: Discusiones y conclusiones.....	54
5.1 Efecto del manejo conservacionista sobre la diversidad microbiana del suelo.....	55
5.2 Impacto en las emisiones de GEI en Sistemas de Caña de Azúcar.....	60
5.3 Enfoque multi-ómico en los estudios de microbiomas del suelo.....	63
5.4 Contrastación de hipótesis.....	67
5.5 Conclusiones generales.....	70
5.6 Perspectivas futuras.....	72
6. Bibliografía.....	75
7. Anexo.....	89

Índice de Figuras

Figura F01: Cronología del experimento. Se muestra la transición de soja a caña de azúcar a partir de 2012, seguida del ciclo anual de cosecha y las sucesivas socas (rebrotos) desde 2013 hasta 2018.....	12
Figura F02: Esquema de los tratamientos utilizados, combinando los factores 'Labranza' (Convencional y Reducida en Franjas) y 'Cosecha' (Convencional y Liviana). Se detallan las cuatro combinaciones resultantes en los tratamientos: LC-CC, LC-CL, LF-CC y LF-C	14
Figura F03: Pipeline, pasos utilizados para procesar y clasificar los datos para estimar la diversidad bacteriana por amplicones 16S.....	19
Figura F04: Pipeline utilizada para obtener genomas ensamblados de metagenomas.....	20
Figura F05: Correlación entre variables edáficas y emisiones de GEI. Los valores positivos indican una relación directa entre las variables: cuando un parámetro se expresa, el otro también. Los valores negativos reflejan una relación inversa: el incremento en un valor se asocia a una disminución del otro. La magnitud del coeficiente (entre -1 y 1) representa la fuerza de la asociación.....	29
Figura F06: abundancia de Eubacteria (A), Hongos (B) y Archeobacterias (C) en verano y otoño. Los valores representan medias \pm error estándar, expresados en log ₁₀ (copias de gen/g suelo).....	34
Figura F07: correlación de GEI con los genes funcionales. Los valores positivos indican una relación directa entre las variables: cuando un parámetro se expresa, el otro también. Los valores negativos reflejan una relación inversa: el incremento en un valor se asocia a una disminución del otro. La magnitud del coeficiente (entre -1 y 1) representa la fuerza de la asociación.....	37
Figura F08: PCA de la abundancia de genes según la época. En verano se expresan más <i>met_T1</i> , <i>nosZ</i> , <i>nirS</i> y <i>mcrA</i> mientras que, en otoño, se expresan <i>pmoA</i> , <i>nirK</i> , <i>met_T2</i> y <i>amoA</i>	41
Figura F09: Análisis de componentes principales derivado de la matriz de distancias Unifrac entre comunidades. Las diferencias entre tipos de labranza son significativas con un $P = 0.013$	47
Figura F10: Cantidad de genes totales encontrados y con coordenadas asignadas por bin (barras celestes), y cantidad de genes con al menos una anotación funcional (barras marrones)	51

Índice de Tablas

Tabla T01: Detalle de las secuencias por tratamiento después del análisis de calidad y corte de nucleótidos	21
Tabla T02: grupos microbianos, genes marcadores, función relacionada, primers y perfil térmico de la qPCR utilizados para la amplificación de genes funcionales y marcadores filogenéticos. Se detallan las secuencias de los primers, perfiles térmicos (temperaturas de alineamiento y ciclos) y referencias bibliográficas para cada conjunto de cebadores. Los genes incluyen marcadores de procesos microbianos clave (ej. desnitrificación [<i>nirK</i> , <i>nirS</i> , <i>nosZ</i>], oxidación de amonio [<i>amoA</i>], metanogénesis [<i>mcrA</i>], oxidación de metano [<i>pmoA</i>]) y marcadores taxonómicos (ARNr 16S bacteriano y arqueal, ARNr 18S fúngico).....	24
Tabla T03: resultados para modelos de cada una de las variables edáficas.....	30
Tabla T04: Resultados para los modelos de las variables de GEI... ..	31
Tabla T05: Abundancia de eubacterias cuantificada mediante qPCR del gen 16S rRNA bacteriano, utilizando el modelo lineal mixto correspondiente para evaluar los efectos de labranza, cosecha y época.....	35
Tabla T06: Abundancia de hongos determinada mediante qPCR del gen 18S rRNA fúngico, analizada mediante el modelo lineal mixto considerando los factores de labranza, cosecha y época.....	36
Tabla T07: Abundancia de arqueas estimada mediante qPCR del gen 16S rRNA arqueal, evaluada con el modelo lineal mixto que incluye los efectos de labranza, cosecha y época....	36
Tabla T08: resumen de los modelos de expresión de los genes funcionales. Correspondientes al ciclo del Nitrógeno: <i>nirK</i> , <i>nirS</i> , <i>nosZ</i> y <i>amoA</i> . Correspondientes al ciclo del Carbono: <i>pmoA</i> y <i>mcrA</i>	39
Tabla T09: índices de Chao y de Simpson. Los cálculos no arrojaron diferencias significativas entre los tratamientos.....	46
Tabla T010: Resultados del análisis de calidad de los contigs en MetaQUAST. N50 es la longitud de contig que marca la mitad de la longitud de la muestra, es decir que la mitad de la muestra tiene una longitud de al menos 1697-pb. El N90 nos indica entonces, que el 10% de los contigs tienen una longitud de 1081-pb o más. Un L50 indica la cantidad de contigs que hay de igual o mayor tamaño que el N50, es decir que 299.913 contigs, tienen 1697-pb de longitud, o más. Análogamente, el L90 nos indica que 863.886 contigs tienen una longitud de 1081-pb o más.....	49
Tabla T011: Resultados del binning a partir del ensamble de contigs. Se indica el número total de bins obtenidos, así como la cantidad y el porcentaje de aquellos con un nivel de completitud superior al 70%	50

RESUMEN

Los microorganismos del suelo cumplen funciones esenciales en el sostenimiento de los agroecosistemas, ya que regulan procesos como el ciclado de nutrientes, la emisión de gases de efecto invernadero y la estructuración del suelo. Este trabajo estudia la diversidad microbiana en suelos cultivados con caña de azúcar bajo distintas prácticas de manejo, evaluando tanto su estructura taxonómica como su potencial funcional. El objetivo principal es caracterizar los cambios en la comunidad microbiana del suelo y en genes funcionales clave (*nirK*, *nirS*, *nosZ*, *amoA*, *mcrA*, *pmoA*), asociados al ciclo del nitrógeno y del metano, en respuesta a tratamientos combinados de tipo de labranza (convencional o en franjas) y tipo de cosecha (liviana o convencional). Las hipótesis plantean que el manejo conservacionista promueve una mayor diversidad microbiana y contribuye a mitigar las emisiones de gases de efecto invernadero. La estrategia metodológica combina enfoques multi-ómicos: cuantificación de genes por qPCR, análisis de diversidad mediante secuenciación del gen 16S rRNA, ensamblado metagenómico y generación de genomas ensamblados a partir de metagenomas (MAGs). También se aplica inferencia funcional con PICRUSt2 y anotación de proteínas a partir de marcos de lectura abiertos (ORFs). Los resultados muestran que el tipo de labranza tiene un efecto más marcado que el tipo de manejo sobre la estructura de la comunidad bacteriana, con mayor riqueza observada en sistemas de labranza en franjas. En cuanto a los genes funcionales, se registra una disminución de *mcrA* y un aumento de *nirK* en otoño, lo que indicaría un posible cambio en las rutas de metanogénesis y desnitrificación. La secuenciación de amplicones permite una detección robusta de la diversidad microbiana, mientras que la metagenómica ensamblada aporta información funcional complementaria, aunque con una recuperación limitada de MAGs de alta calidad. Este trabajo evidencia el impacto diferencial de las prácticas agrícolas sobre la microbiota del suelo y destaca la utilidad de los enfoques multi-ómicos para comprender su funcionalidad ecológica en sistemas productivos complejos.

Palabras clave: microbioma del suelo, caña de azúcar, metagenómica, qPCR, genes funcionales, gases de efecto invernadero, MAGs, enfoque multi-ómico

ABSTRACT

Soil microorganisms play essential roles in sustaining agroecosystems by regulating nutrient cycling, greenhouse gas emissions, and soil structure. This study investigates the microbial diversity of soils under sugarcane cultivation, evaluating both taxonomic composition and functional potential under different management practices. The main objective is to characterize shifts in soil microbial communities and in key functional genes (*nirK*, *nirS*, *nosZ*, *amoA*, *mcrA*, *pmoA*) associated with nitrogen and methane cycles, in response to combinations of tillage type (conventional or strip-till) and harvest method (light or conventional). The working hypotheses propose that conservation management promotes higher microbial diversity and contributes to the mitigation of greenhouse gas emissions. The methodological strategy integrates multi-omic approaches, including qPCR quantification of target genes, 16S rRNA gene amplicon sequencing for diversity profiling, metagenomic assembly, and the reconstruction of metagenome-assembled genomes (MAGs). Functional inference is performed using PICRUSt2 and annotation of open reading frames (ORFs). Results show that tillage type has a stronger effect on bacterial community structure than the management system as a whole, with greater richness observed under strip-till practices. Regarding functional genes, a seasonal shift is observed: *mcrA* abundance decreases while *nirK* increases in autumn, suggesting changes in methanogenesis and denitrification pathways. Amplicon sequencing provides robust taxonomic coverage, while metagenomic assembly offers complementary functional insights, despite limited recovery of high-quality MAGs. This study highlights the differential impact of agricultural practices on soil microbiota and underscores the value of multi-omic approaches for understanding ecological functions in complex productive systems.

Key words: soil microbiome, sugarcane, metagenomics, qPCR, functional genes, greenhouse gases, MAGs, multi-omic approach

Capítulo 1: Introducción general y metodología

1. Capítulo 1: Introducción general y metodología

1.1 Introducción

1.1.1 Microbiología del suelo y su rol en agroecosistemas

El suelo es uno de los ecosistemas más biodiversos del planeta y alberga comunidades microbianas complejas que cumplen funciones fundamentales para la sostenibilidad de los ecosistemas terrestres. Estos microorganismos, entre los que se encuentran bacterias, arqueas y hongos participan activamente en procesos clave como la descomposición de la materia orgánica, el reciclado de nutrientes, la formación y estabilización de agregados del suelo, y la regulación de gases de efecto invernadero (Bender et al., 2016; Palm et al., 2014; Powlson et al., 2011).

En términos funcionales, los microorganismos del suelo son actores centrales de los principales ciclos biogeoquímicos. Intervienen en la mineralización del nitrógeno, la fijación biológica de nitrógeno atmosférico, la nitrificación, la desnitrificación y la metanogénesis, entre otros procesos. Estas transformaciones no sólo afectan la disponibilidad de nutrientes para las plantas, sino que también influyen en la emisión de gases como el óxido nitroso (N_2O) y el metano (CH_4), con implicancias a escala global en el balance climático (Foley et al., 2005).

La estructura y diversidad de las comunidades microbianas del suelo están influenciadas por una combinación de factores abióticos —como el pH, la textura, la humedad o el contenido de materia orgánica— y factores bióticos, incluyendo la presencia y tipo de vegetación, las raíces y sus exudados. En agroecosistemas, estas comunidades responden además de forma sensible a las prácticas de manejo agrícola, como la rotación de cultivos, la fertilización, la labranza o la cobertura vegetal (Tosi et al.,

2016; Powlson et al., 2011). Estos cambios pueden alterar tanto la composición taxonómica como la funcionalidad del microbioma del suelo, con consecuencias directas sobre su capacidad para sostener la productividad y los servicios ecosistémicos.

En este contexto, el estudio de la microbiología del suelo en sistemas productivos es crucial para comprender cómo las decisiones de manejo afectan la salud del suelo y, en última instancia, la resiliencia del sistema agrícola. Evaluar la estructura y función de las comunidades microbianas puede ofrecer herramientas valiosas para el diseño de prácticas agrícolas más sostenibles, que favorezcan un uso más eficiente de los recursos, una menor dependencia de insumos externos y una mitigación de los impactos ambientales de la actividad agropecuaria (Bender et al., 2016; Palm et al., 2014; Powlson et al., 2011).

1.1.2 Cultivo de caña de azúcar y contexto productivo

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) es un cultivo fundamental en regiones tropicales y subtropicales, donde ocupa millones de hectáreas y se posiciona como fuente primaria tanto de azúcar como de bioenergía. En el noroeste argentino, y particularmente en Tucumán, este cultivo constituye uno de los pilares de la actividad agroindustrial, con una cadena productiva históricamente arraigada que representa una fuente clave de empleo, desarrollo regional y exportaciones (Chalco Vera et al., 2022; Tesouro et al., 2015a, 2015b).

En esta región, el sistema de producción se encuentra en un proceso de intensificación sostenida que incluye el uso de maquinaria pesada para la implantación, fertilización nitrogenada intensiva y la generalización de la cosecha mecanizada en verde. Esta última implica el abandono progresivo de la quema previa a la cosecha y deja una capa superficial de residuos (“trash”) que modifica drásticamente las condiciones microambientales del suelo (Chalco Vera & Acreche, 2018; Linnenluecke et al., 2018).

Según el tipo de manejo, dicho residuo puede dejarse como cobertura o retirarse, generando distintos efectos sobre la temperatura, humedad, actividad biológica y disponibilidad de nutrientes del suelo (Moneda et al., 2022).

Diversas prácticas asociadas al cultivo —como el grado de labranza, el tipo de implantación, la estrategia de fertilización o el manejo del residuo— influyen de manera directa sobre propiedades físicas y químicas del suelo, incluyendo la compactación, el contenido de carbono y la dinámica del nitrógeno (Moraes et al., 2019; Chalco Vera et al., 2022). Estas alteraciones condicionan el hábitat microbiano, afectando la estructura, composición y funcionalidad de las comunidades microbianas del suelo, y con ello su capacidad de sostener procesos ecológicos clave como la desnitrificación o la estabilización del carbono (Moneda et al., 2022; Marin & de Carvalho, 2012).

Si bien el cultivo de caña de azúcar ha sido ampliamente estudiado desde una perspectiva agronómica, aún persisten vacíos importantes en relación a la dinámica de sus comunidades microbianas del suelo bajo diferentes esquemas de manejo. Esto cobra particular relevancia en el marco de una transición hacia sistemas más sustentables, donde el microbioma del suelo aparece como un indicador sensible de la salud edáfica y como una posible palanca para mejorar la eficiencia en el uso de nutrientes y reducir impactos ambientales (Linnenluecke et al., 2018; Bender et al., 2016).

1.1.3 Genes funcionales del microbioma

La estructura de las comunidades microbianas del suelo está estrechamente vinculada con su funcionalidad ecológica. Determinados grupos de microorganismos participan en rutas metabólicas clave que regulan el ciclo de nutrientes, la emisión de gases de efecto invernadero y la disponibilidad de compuestos esenciales para las plantas. Por este motivo, los genes asociados a procesos como la nitrificación, desnitrificación,

metanogénesis y oxidación de metano se utilizan frecuentemente como marcadores funcionales para evaluar el potencial metabólico del microbioma del suelo (Philippot & Hallin, 2005; Nazaries et al., 2013; Jones et al., 2014).

Dentro del ciclo del nitrógeno, uno de los procesos más relevantes es la desnitrificación, una vía de respiración anaerobia que convierte el nitrato (NO_3^-) en nitrógeno gaseoso (N_2) mediante una serie de reacciones reductoras. Los genes *nirK* y *nirS* codifican para dos tipos de nitrito reductasas (dependientes de cobre y hierro respectivamente), mientras que el gen *nosZ* codifica la nitroso reductasa que cataliza la conversión de óxido nitroso (N_2O) a N_2 , siendo clave para mitigar las emisiones de este potente gas de efecto invernadero (Henry et al., 2006; Domeignoz-Horta et al., 2015).

Por su parte, la nitrificación —la oxidación del amonio (NH_4^+) a nitrito (NO_2^-) y luego a nitrato— está iniciada por microorganismos amonio-oxidantes, cuyo marcador funcional es el gen *amoA*. Este gen se encuentra tanto en bacterias como en arqueas, y permite inferir el potencial nitrificante de una comunidad edáfica (Rotthauwe et al., 1997; Leininger et al., 2006).

En cuanto al ciclo del metano, se consideran dos rutas microbianas opuestas: la producción (metanogénesis) y la oxidación (metanotrofía). Las arqueas estrictamente anaeróbicas realizan la metanogénesis, y el gen *mcrA* —que codifica para la subunidad alfa de la metil coenzima M reductasa— se usa ampliamente como marcador funcional en estudios de ecología microbiana (Luton et al., 2002; Steinberg & Regan, 2008). La metanotrofía, en cambio, la realizan bacterias capaces de oxidar metano en condiciones aeróbicas. Estas bacterias se clasifican clásicamente en metanotrofos tipo I y tipo II, los cuales difieren en su filogenia, vías metabólicas y requerimientos ecológicos (Henckel et al., 1999; Kolb, 2009). Los metanotrofos tipo I, pertenecientes al filo Gammaproteobacteria, utilizan una vía metabólica eficiente basada en la ribulosa

monofosfato para asimilar carbono derivado del metano. En cambio, los tipo II, del filo Alphaproteobacteria, recurren a una ruta alternativa más flexible y energéticamente demandante para incorporar el carbono metanogénico, lo que les confiere ventajas adaptativas en ambientes con condiciones variables o recursos limitados. Estas diferencias pueden implicar respuestas diferenciales frente a factores como el contenido de oxígeno, la disponibilidad de nitrógeno o el tipo de sustrato carbonado, lo cual justifica su análisis independiente en estudios de diversidad funcional. Para ambos grupos, se utilizan variantes del gen 16S rRNA o genes específicos como *pmoA* -que codifica la subunidad A de la enzima metano monooxigenasa- para su identificación y cuantificación (Henckel et al., 1999; Nazaries et al., 2013). Cabe señalar que debido a la alta similitud entre las secuencias de *pmoA* y *amoA*, su diferenciación requiere análisis adicionales en contexto genómico (Henckel et al., 1999). Por ello, su interpretación debe realizarse con cautela.

La evaluación conjunta de estos genes funcionales permite estimar el potencial metabólico de una comunidad en relación con su participación en ciclos elementales. A su vez, su cuantificación y diversidad pueden servir como indicadores sensibles frente a cambios en el uso del suelo, prácticas de manejo o condiciones ambientales (Jones et al., 2013; Hamonts et al., 2018). En este trabajo, se seleccionaron estos seis genes clave con el objetivo de caracterizar la funcionalidad microbiana en suelos de caña de azúcar bajo distintos manejos, explorando tanto su abundancia relativa como su diversidad estructural. Además de estos genes funcionales, se incluyeron en el estudio marcadores taxonómicos generales para bacterias (16S rRNA), arqueas (16S rRNA específico) y hongos (18S rRNA), con el fin de evaluar la estructura general de los tres dominios principales del microbioma edáfico

1.1.4 MAGs y metagenómica ensamblada

La metagenómica ha revolucionado el estudio de comunidades microbianas al permitir el análisis directo del material genético presente en una muestra ambiental, sin necesidad de cultivo. Entre las estrategias más avanzadas dentro de este campo se encuentra la reconstrucción de genomas ensamblados por metagenomas, conocidos como MAGs (por sus siglas en inglés: *Metagenome-Assembled Genomes*). Esta aproximación permite obtener representaciones genómicas parciales o completas de los microorganismos más abundantes en una comunidad, a partir de la secuenciación masiva y el posterior ensamblado y agrupamiento (*binning*) de *contigs* (Parks et al., 2015; Chaumeil et al., 2020).

Los MAGs constituyen una herramienta poderosa para acceder al papel funcional y potencial metabólico de microorganismos no cultivables, que conforman la mayoría de la diversidad microbiana del suelo. Al proveer información taxonómica y funcional a nivel genómico, permiten explorar la ecología de grupos raros o novedosos, identificar rutas metabólicas completas y asociarlas a taxones específicos, y evaluar su distribución relativa en distintas condiciones ambientales o tratamientos experimentales (Setubal, 2021; Semenov, 2021).

La calidad de los MAGs se evalúa mediante criterios estandarizados que consideran el porcentaje de completitud (proporción de genes esenciales recuperados) y contaminación (presencia de genes redundantes o de múltiples orígenes), lo cual permite seleccionar aquellos genomas más confiables para estudios posteriores. Si bien la generación de MAGs impone ciertos límites metodológicos —como la pérdida de grupos poco abundantes o la dificultad para resolver genomas muy similares—, su aporte en términos de resolución funcional y taxonómica ha demostrado ser crucial en estudios de ecología microbiana en agroecosistemas (Lammel et al., 2015; Mandakovic et al., 2018).

En este trabajo, el uso de MAGs a partir de metagenomas ensamblados nos permitió no sólo describir el potencial funcional de las comunidades microbianas del suelo en distintos manejos de caña de azúcar, sino también vincular genes de interés con genomas específicos, proporcionando un marco más robusto para interpretar los resultados de abundancia, diversidad y funcionalidad observados.

1.1.5 Enfoque multi-ómico e integración metodológica

En el estudio de comunidades microbianas del suelo, cada aproximación metodológica captura una dimensión distinta de la complejidad biológica. Las técnicas basadas en secuenciación de amplicones (como 16S rRNA o genes funcionales) permiten caracterizar la composición taxonómica o funcional con alta sensibilidad, mientras que la cuantificación por qPCR ofrece una estimación precisa de la abundancia relativa de genes específicos. Por su parte, la metagenómica permite acceder al repertorio genético completo de la comunidad, incluyendo rutas metabólicas, elementos móviles, y genes no conocidos previamente (Pasolli et al., 2016; Semenov, 2021).

Si bien cada enfoque aporta información valiosa por sí solo, su combinación en un esquema integrativo —el llamado enfoque multi-ómico— permite superar limitaciones individuales y construir una visión más robusta del ecosistema microbiano. Por ejemplo, la metagenómica puede identificar nuevas variantes génicas y rutas funcionales, pero no indica cuán abundantes son; la qPCR puede cuantificarlas con precisión, pero solo si se conocen de antemano. En conjunto, estas técnicas permiten conectar diversidad, abundancia y función, un objetivo central de la ecología microbiana actual (Hamonts et al., 2018; Bender et al., 2016).

Además, el enfoque multi-ómico resulta especialmente útil para interpretar la respuesta microbiana a perturbaciones ambientales o prácticas de manejo. Por un lado,

revela qué grupos aumentan o disminuyen frente a ciertos tratamientos; por otro, permite asociar esas respuestas con funciones ecológicas clave, como la transformación del nitrógeno o la regulación del metano (Dini-Andreote et al., 2015). Esta integración de datos —que en este trabajo incluyó qPCR, análisis de amplicones, metagenómica y MAGs— permite construir una narrativa funcional más precisa del impacto del manejo agrícola sobre el microbioma del suelo.

1.2 Objetivos e Hipótesis

En el contexto actual de intensificación agrícola, comprender cómo las prácticas de manejo afectan la estructura y funcionalidad de las comunidades microbianas del suelo se vuelve esencial para avanzar hacia sistemas más sostenibles. La caña de azúcar, como cultivo extensivo y de alta demanda nutricional, representa un modelo particularmente sensible para evaluar estas interacciones. Sin embargo, el conocimiento sobre la respuesta del microbioma edáfico ante distintos esquemas de manejo en este cultivo sigue siendo limitado, especialmente en lo que respecta a su funcionalidad vinculada al ciclo del nitrógeno y del metano.

Este trabajo se propone abordar dicha brecha mediante un enfoque multi-ómico que combine herramientas de alta sensibilidad y resolución funcional, como la qPCR, la secuenciación masiva y la reconstrucción de genomas ensamblados de metagenomas (MAGs). Esta estrategia nos permitirá caracterizar en profundidad la composición, abundancia y diversidad funcional de los microorganismos del suelo en distintos contextos de manejo de caña de azúcar, generando conocimiento clave para el diseño de prácticas agronómicas que favorezcan la salud del suelo y mitiguen impactos ambientales negativos. A continuación, se enuncian los objetivos e hipótesis de este trabajo.

1.2.1 Objetivos

Objetivo 1.

Establecer si un sistema de agricultura conservacionista aplicado en la implantación y cosecha del cultivo de caña de azúcar modifica la diversidad de la comunidad microbiana de bacterias, arqueas y hongos del suelo en comparación con el manejo convencional, usando técnicas de secuenciación masiva de ADN y metodologías metagenómicas.

Objetivo 2.

Indagar si un sistema de agricultura conservacionista aplicado en la implantación y cosecha del cultivo de caña de azúcar altera la diversidad de microorganismos desnitrificadores, metanógenos y metanótrofos.

1.2.2 Hipótesis

1. La diversidad de bacterias y hongos saprobios se modifica con el manejo conservacionista del cultivo de caña de azúcar. La menor remoción del suelo y la mayor retención de humedad derivados del manejo conservacionista determina una mayor diversidad de ambos grupos microbianos en comparación con lo observado bajo manejo convencional.
2. La diversidad de bacterias metanótrofes aumenta y la diversidad de arqueobacterias metanógenas disminuye con el manejo conservacionista del cultivo de caña de azúcar, en comparación con el manejo convencional.

3. La diversidad de bacterias desnitrificantes se modifica con el manejo conservacionista del cultivo de caña de azúcar en comparación con el manejo convencional. Nuevamente, dada la mayor retención de humedad, secuestro de carbono y la menor remoción del suelo derivados del manejo conservacionista, se espera un aumento en diversidad de bacterias desnitrificantes.

4. Los microorganismos involucrados en la producción/degradación de gases de efecto invernadero forman grupos de co-ocurrencia o consorcios con otros microorganismos que, sin participar directamente en esos procesos funcionales, son necesarios para potenciarlos porque intervienen en reacciones metabólicas que contribuyen a la eficiencia de dichos procesos.

1.3 Materiales y métodos

1.3.1 Sitio de estudio y diseño experimental.

El campo experimental está ubicado en la Estación Experimental Agropecuaria Famaillá (EEA Famaillá) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) en la provincia de Tucumán, Argentina (27°00'52.6"S, 65°22'46.5"O). Es una zona subtropical donde se cultiva la caña de azúcar en secano. La temperatura y la precipitación anuales presentan una variación significativa: la temperatura media oscila entre 9,5 °C y 26,5 °C en los meses más cálidos (enero) y más fríos (julio), y la precipitación media anual es de 1324 mm, concentrándose principalmente entre noviembre y abril. La humedad relativa promedio es del 85% (Zeman, 2019).

Como se muestra en la Figura F01, el cultivo de caña de azúcar se conduce como un cultivo semipermanente, lo que significa que no sigue un ciclo anual, sino que abarca

varios años. Se plantan fragmentos de tallo genéticamente idénticos, es decir, clones, que al brotar durante el primer año forman una mata de la cual los tallos se cosechan individualmente. El cultivo vuelve a crecer año tras año (soca) y continúa hasta que su rendimiento disminuye, generalmente en un ciclo de aproximadamente cinco años. Al finalizar ese ciclo, se siembra soja durante un año para permitir el descanso del suelo. Por esta razón, antes del año 2012, el área estuvo dedicada al cultivo de soja.

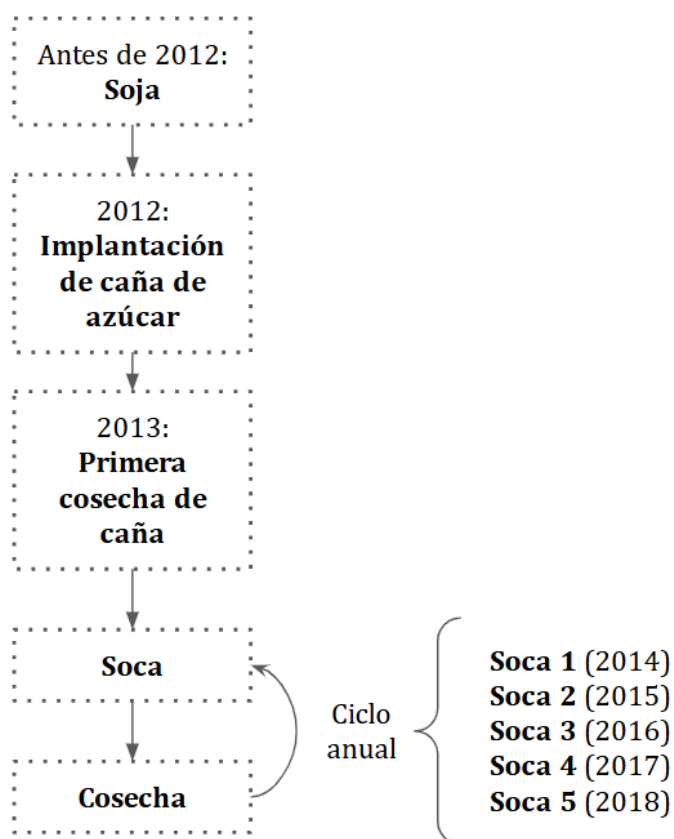


Figura F01: Cronología del experimento. Se muestra la transición de soja a caña de azúcar a partir de 2012, seguida del ciclo anual de cosecha y las sucesivas socas (rebrotos) desde 2013 hasta 2018.

Para este estudio se evaluaron dos sistemas de cultivo: labranza convencional (LC) y labranza reducida en franjas (LF) sin alteración profunda del suelo en los surcos. En la labranza convencional, el establecimiento del cultivo se realizó con dos pasadas de una rastra excéntrica y dos aradas profundas, perturbando completamente la superficie de la parcela al inicio del ciclo del cultivo. En la labranza reducida en franjas, la labranza profunda se llevó a cabo solo en el surco donde posteriormente se colocó la caña semilla para el cultivo. Esta técnica requirió un prototipo de máquina diseñado y desarrollado en el Laboratorio de Terramecánica y Establecimiento de Cultivos (IIR-CIA-CNIA-INTA).

Las parcelas fueron cosechadas con el método convencional (CC) o con una cosecha alternativa liviana (LC). Los tratamientos combinados de siembra y cosecha se

repetieron tres veces en un diseño de -tres- bloques completamente aleatorizado con parcelas divididas (Figura F02)

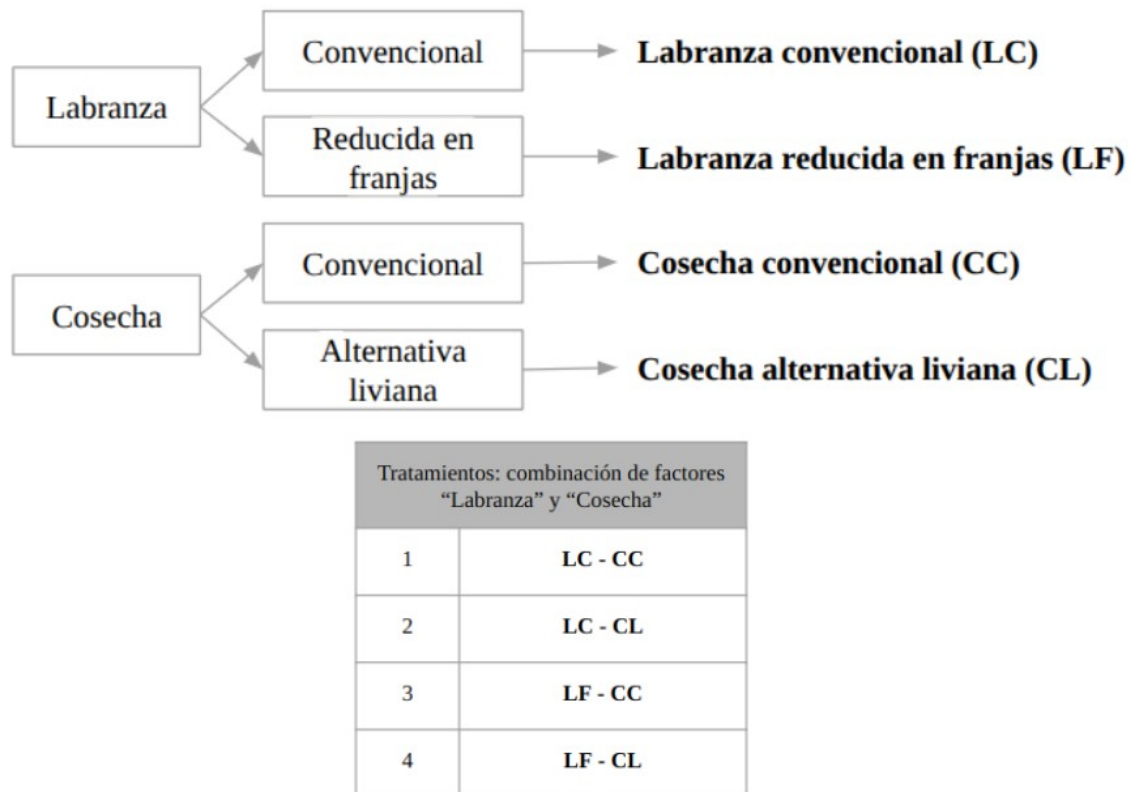


Figura F02: Esquema de los tratamientos utilizados, combinando los factores 'Labranza' (Convencional y Reducida en Franjas) y 'Cosecha' (Convencional y Liviana). Se detallan las cuatro combinaciones resultantes en los tratamientos: LC-CC, LC-CL, LF-CC y LF-CL.

1.3.2 Muestras de suelo y análisis de parámetros físico-químicos

El muestreo de suelos se realizó a una profundidad de 0-10 cm, en el horizonte A y se llevó a cabo en dos épocas del año: otoño (marzo) y verano (diciembre). En cada unidad experimental (tratamiento*bloque) se tomó con barreno una muestra compuesta de varios

sub-muestreos realizados. Las muestras fueron transportadas en cajas conservadoras al laboratorio y allí se tamizaron por malla de 2 mm. Una fracción de las muestras se conservó a -80 °C para los análisis moleculares correspondientes.

Los parámetros físico-químicos de las muestras de suelo fueron analizados en el Centro Regional INTA Tucumán-Santiago del Estero, EEA Famaillá, Laboratorio de Suelos, Agua y Material Vegetal. Se evaluaron los siguientes parámetros: pH, materia orgánica, nitrógeno del suelo, fósforo disponible, potasio y textura.

El pH del suelo se determinó en una mezcla de suelo y agua destilada (1:2,5) utilizando un pH-metro digital (Instituto Argentino de Normalización y Certificación, 2009). El nitrógeno orgánico del suelo se determinó mediante el método de Kjeldahl (Bremner, 1965a). El potasio intercambiable se estimó mediante el método de acetato de amonio (Jackson, 1958). El fósforo disponible se midió mediante extracción con fluoruro de amonio (Bray y Kurtz, 1945). La clasificación del tamaño de partículas del suelo se determinó mediante el método de pipeta (Soil Conservation Service, 1972).

1.3.3 Medición de emisiones de gases de efecto invernadero

El grupo de colaboradores de la EEA Famaillá INTA junto con estudiantes de doctorado y postdoctorado de nuestro grupo de trabajo, realizaron las mediciones de las emisiones de CO₂, CH₄ y N₂O del suelo utilizando el método de cámaras estáticas (Hutchinson y Livingston, 2001). Se utilizaron tres cámaras por tratamiento, distribuidas en el cultivo. De cada cámara, se recolectaron tres muestras a los 0, 15 y 30 minutos, las cuales fueron selladas en viales de 10 ml (previamente evacuados con una bomba de vacío) para su análisis en laboratorio. Los flujos de gases se calcularon según lo descrito en Chalco Vera et al. (2022) en la Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires.

Durante cada muestreo, se midieron la temperatura y la humedad gravimétrica del suelo utilizando termómetros digitales manuales y barreno. La humedad gravimétrica del suelo se convirtió a espacio poroso lleno de agua (WFPS, por sus siglas en inglés) según Araujo et al. (2021).

Además, se determinó el contenido de nitrógeno inorgánico en el suelo, en forma de nitratos (NO_3^- -N) y amonio (NH_4^+ -N), en todas las fechas de muestreo de gases a una profundidad de 0,1 m (mg N kg^{-1} de suelo seco) según Keeney y Nelson, 1982.

1.3.4 Estimación de diversidad bacteriana por amplicones 16S

Para estimar la diversidad de bacterias y hongos totales del suelo, como primer paso, se extrajo el ADN de las muestras de suelo. Para ello se utilizó un kit comercial (DNeasy PowerSoil Kit de Qiagen), el cual permite obtener un buen rendimiento de ADN con una pureza adecuada. La calidad del ADN fue verificada mediante espectrofotometría (NanoDrop) y fluorometría (Qubit), asegurando su aptitud para la posterior amplificación por PCR.

Para analizar la composición de la comunidad de bacterias se amplificó la región hipervariable V3-V4 del gen que codifica para el 16S rRNA por reacción de cadena de la polimerasa (PCR) con los primers 341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') y 806R (5'-GGACTACNNGGTATCTAAT-3'). Esta elección de primers nos permitió detectar y cuantificar un amplio rango de Eubacteria y también una fracción grande de las *Arqueobacterias* que incluye a los miembros del filo Euryarchaeota, donde se ubican la totalidad de las arqueas metanógenas. (Montecchia et al., 2011). Los productos de amplificación se secuenciaron con un protocolo *paired-end* con fragmentos de 150-pb en Novogene (California, Estados Unidos) en un secuenciador illumina HiSeq.

Se realizó la caracterización de la diversidad alfa y beta de cada una de las muestras. Para ésto se siguieron esta serie de pasos (ver Figura F03): se tomó un subconjunto representativo al azar de secuencias de cada muestra usando el procedimiento *sample* del programa seqtk (Seqtk, 2023) para realizar un control de calidad con la herramienta FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) y se decidió remover siete nucleótidos del extremo 5' de ambas secuencias del par *paired-end* con la herramienta cutadapt (Marin, 2011). A continuación, la mayor parte del procesamiento de los datos se realizó con Qiime2 (Bolyen et al., 2019): las secuencias “paired-end” se empalmaron, obteniéndose una sola secuencia por amplicón. Las secuencias sin procesar (*rawdata*) se demultiplexaron con el procedimiento *q2-demux*, luego se utilizó la implementación en Qiime2 del algoritmo DADA2 (Callahan et al, 2016) para eliminar el ruido presente en la secuenciación, empalmar los miembros del par *paired-end*, eliminar quimeras y generar variantes de secuencia amplificadas únicas (ASVs por sus siglas en inglés), también conocidas como *features*, de todas las muestras. Un *feature* es una unidad de observación que reúne secuencias similares entre sí, pero no se corresponden con secuencias agrupadas por nivel de similitud, sino que se derivan a partir de un modelo teórico de la generación de errores (“ruido”) de la secuenciación y la similitud general de las secuencias. La salida de DADA2 brinda tres tablas: por un lado, una tabla de estadísticos que indica cómo el algoritmo va filtrando y eliminando el ruido, por otro lado, la tabla de secuencias representativas de cada ASV y, por último, el resumen de las abundancias. Para facilitar la interpretación de los análisis de diversidad alfa y beta, se rarefaccionaron las muestras a 41.000 secuencias. Se realizó la asignación taxonómica de los ASVs utilizando un clasificador Naive Bayes entrenado (Pedregosa et al. 2011) y la base de datos de SILVA 132 (Mikheenko et al. 2016). La diversidad beta de las microbiotas se

estimó a partir de cálculos de distancia entre muestras mediante las medidas de Bray-Curtis y UniFrac. La distancia de Bray-Curtis se calculó con la fórmula:

$$BC_{ij} = 1 - \frac{2C_{ij}}{S_i + S_j}$$

donde C_{ij} es la suma de los valores mínimos de las abundancias compartidas entre las muestras i y j y S_i y S_j son las sumas totales de abundancia en cada muestra (Bray & Curtis, 1957). Para UniFrac, se consideraron dos variantes: la distancia UniFrac no ponderada, que compara la fracción de la rama filogenética exclusiva entre comunidades; y la distancia UniFrac ponderada, que también incorpora la abundancia relativa de los taxones. Esta métrica se calcula según:

$$d_{UniFrac} = \frac{\sum_L \Delta_L \cdot w_L}{\sum_L w_L}$$

donde Δ_L es la diferencia en la presencia o abundancia relativa de las muestras en una rama L , y w_L es la longitud de esa rama (Lozupone & Knight, 2005). Ambas matrices de distancia se visualizaron mediante análisis de coordenadas principales (PCoA, Principal Coordinate Analysis) y se evaluaron estadísticamente mediante un test de permutación ADONIS, implementado en el entorno R (R Core Team, 2025) con los paquetes ape (Paradis & Schliep, 2018) y vegan (Oksanen et al., 2019). Las salidas gráficas fueron generadas con el paquete ggplot2 (Wickham, 2016).

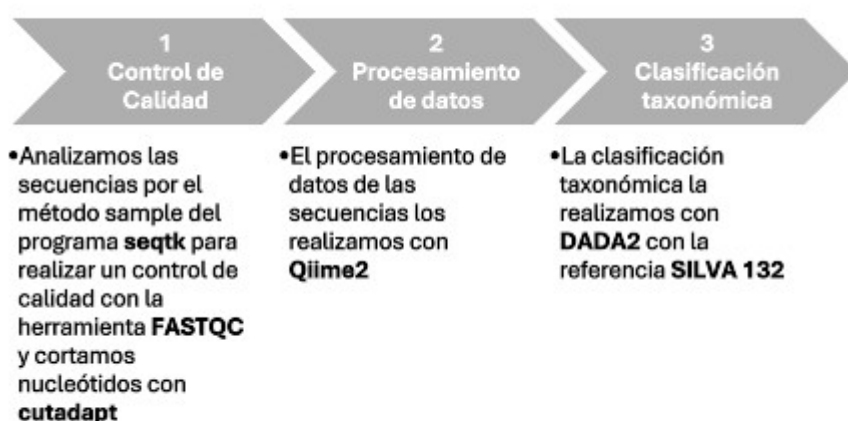


Figura F03: Pipeline, pasos utilizados para procesar y clasificar los datos para estimar la diversidad bacteriana por amplicones 16S

1.3.5 Secuenciación masiva del ADN total, construcción de genomas ensamblados de metagenomas y diversidad de genes funcionales

A partir de las extracciones de ADN de las muestras por triplicado del paso anterior, se preparó una muestra compuesta para cada uno de los cuatro tratamientos, las cuáles se usaron para secuenciación de ADN total. La secuenciación se realizó en un equipo de secuenciación Illumina HiSeq (Novogene), con la modalidad *paired-end* de 150-pb de longitud.

Para el procesamiento de los datos generados, se diseñó una *pipeline* específica para esta etapa que incluyó los siguientes pasos: filtrado y acondicionamiento de las secuencias, ensamblado en *contigs*, separación de los *contigs* en *bins* por similitud (*binning*), anotación taxonómica y funcional de los *bins*. Cada uno de estos pasos, excepto la anotación, estuvo acompañado por su correspondiente análisis de calidad. Es sumamente importante realizar los análisis de calidad al finalizar cada uno de éstos para

poder tomar decisiones acordes a los objetivos del trabajo. A continuación se presenta una figura de la *pipeline* con las herramientas utilizadas (Figura F04).



Figura F04: *Pipeline* utilizada para obtener genomas ensamblados de metagenomas

En cada uno de los pasos de la *pipeline* se realizó:

1. *Control de calidad* Análisis de calidad extrayendo una muestra aleatoria de 500.000 *reads* de cada archivo fastq con el procedimiento *sample* del programa seqtk, para luego realizar un control de calidad con FastQC (Andrews, 2010). Observado los resultados de este primer paso de la *pipeline* (F04), llegando a la conclusión de que era conveniente cortar los primeros cuatro nucleótidos del extremo 5', debido a que tenían una calidad muy baja, quedando todos los *reads* con una longitud de 146-pb. La composición de la muestra que se usó para los análisis bioinformáticos se muestra en la tabla T01.

Tabla T01: Detalle de las secuencias por tratamiento después del análisis de calidad y corte de nucleótidos (paso 1 de la Figura F04, más abajo)

Tratamiento	Cantidad de <i>reads paired-end</i>	Longitud de los <i>reads</i> (pb)	Posición	Tamaño del archivo (GB)
1 → LC-CC	123.556.226	146	<i>forward</i>	4.1
			<i>reverse</i>	4.2
2 → LC-CL	138.316.218	146	<i>forward</i>	4.6
			<i>reverse</i>	4.7
3 → LF-CC	126.866.762	146	<i>forward</i>	4.3
			<i>reverse</i>	4.3
4 → LF-CL	124.243.274	146	<i>forward</i>	4.2
			<i>reverse</i>	4.2

2. *Ensamblaje*: una vez establecida la muestra, se procedió a realizar un ensamblado de los *reads* a *contigs* con el programa MEGAHIT (Li et al., 2015) que tiene requerimientos de *hardware* elevados donde se usó un servidor de nuestro laboratorio tipo *Workstation* HPZ840 con procesador Intel XEON E51650v3 de 6 núcleos (12 hilos de ejecución), 256GB de memoria RAM y 8TB de almacenamiento interno. Para el ensamblado, se estableció una longitud mínima por *contig*, de 1000-pb. Además, se optó por el parámetro preestablecido “*meta-large*”, que está recomendado por la documentación del programa para comunidades de suelo y la opción “*no mercy*” para que

no restrinja el uso de la RAM. La corrida requirió de aproximadamente ocho días. El control de calidad del ensamblado se realizó con MetaQUAST (Mikheenko et al., 2016).

3. *Binning*: Una vez obtenido el conjunto de *contigs*, se agruparon en *bins* con el programa MaxBin2 (Wu et al. 2014). Este paso se realizó en una máquina equipada con procesador Intel Core i7 (i7-4770, 3.40GHz, 8 threads), pues este paso de la *pipeline* es menos demandante de *hardware*. El control de calidad del *binning* fue realizado con el programa CheckM (Parks et al., 2015). Este paso es fundamental como antesala de la anotación, ya que de aquí se obtienen los datos de calidad y contaminación del *binning*. Como punto de corte, se seleccionó un 70% de completitud y 30% de contaminación de los *bins* para realizar la anotación.

4. *Anotación*: La anotación de los *contigs* se realizó con eggNOG-mapper v2 (Cantalapiedra et al., 2021) sobre los *bins* con menos del 70% de completitud. Este programa produce anotaciones físicas (localización de posibles genes) y funcionales para los genes encontrados de diferente tipo (similitud a genes conocidos, presencia de dominios, anotaciones KEGG, GO, etc.). Como salida, ofrece una tabla de anotaciones en un archivo de texto con tabulaciones como delimitador de campos. La anotación taxonómica la se realizó con GTDB-Tk (Chaumeil et al., 2020).

1.3.6 Cuantificación de genes por qPCR

Se extrajo ADN total de 0,25 g de muestra de suelo utilizando el kit DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen) igual que en la sección 1.3.4, siguiendo las indicaciones del fabricante e incluyendo un paso de lisis alternativo (70 °C, 10 min). La cantidad y calidad del ADN extraído se determinaron por espectrofotometría y fluorometría, utilizando un

espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y un fluorómetro Qubit 1.0 (Invitrogen) con el kit Qubit dsDNA HS assay kit, respectivamente. Todas las preparaciones de ADN se almacenaron a -20°C. Los genes marcadores funcionales y taxonómicos evaluados para los grupos de interés se presentan en la Tabla T02.

La cuantificación de las muestras se realizó en un termociclador Mx3000P qPCR (Agilent Technologies), utilizando la mezcla FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) de Roche, con un volumen final de reacción de 15 µl, bajo las condiciones especificadas en la Tabla T02. Como estándares para qPCR se utilizó ADN genómico total, plásmidos linearizados que contenían la secuencia blanco o productos de PCR purificados. La curva estándar se elaboró mediante diluciones seriadas al décimo del estándar correspondiente. Las muestras, las curvas estándar y los controles negativos, se analizaron por triplicado en cada microplaca de PCR.

Tabla T02: grupos microbianos, genes marcadores, función relacionada, *primers* y perfil térmico de la qPCR utilizados para la amplificación de genes funcionales y marcadores filogenéticos. Se detallan las secuencias de los *primers*, perfiles térmicos (temperaturas de alineamiento y ciclos) y referencias bibliográficas para cada conjunto de cebadores. Los genes incluyen marcadores de procesos microbianos clave (ej. desnitrificación [*nirK*, *nirS*, *nosZ*], oxidación de amonio [*amoA*], metanogénesis [*mcrA*], oxidación de metano [*pmoA*]) y marcadores taxonómicos (ARNr 16S bacteriano y arqueal, ARNr 18S fúngico).

	Grupo	Gen marcador	Función relacionada	Primer y secuencias 3' 5'	PCR perfil térmico	Referencia
TAXONOMÍA	Bacteria	16S rRNA	Estructura de ribosomas	Eub338: ACTCCTACGGGAGGCAGCAG Eub518: ATTACCGCGGCTGCTGG	95°C 15" / 60°C 30 s, 72°C 30 s (40 c.)	Fierer et al., 2005
	Hongos total	18S rRNA	Estructura de ribosomas	FF390: CGATAACGAACGAGACCT FR1: AICCATTCAATCGGTAIT	95°C 60" / 50°C 30 s, 72°C 30 s (45 c.)	Prévost-Bouré et al., 2011
	Archaea total	16S rRNA	Estructura de ribosomas	Arch85F: CCGGTTGATCCTGCCGG Arch313R: TTATTACCGCGGCGGCTG	95°C 60", 61°C 60", 72°C 60" (45 c.)	Hollister et al., 2010
NITRÓGENO	Desnitrificadores tipo NirK	<i>nirK</i>	Nitrato reductasa	nirK876: ATYGGCGGVCAYGGCGA nirK1040: GCCTCGATCAGRTTGTGGTT	95°C 60", 63°C 30" (-1°C en cada ciclo) / 72°Cx30") x5 ciclos / (95°Cx15", 58°Cx30" / 72°Cx30") x41 ciclos	Henry et al., 2004
	Desnitrificadores tipo NirS	<i>nirS</i>	Nitrato reductasa	Cd3aF: GTSAACTSAAGGARACSGG R3cd: GASTTCGGRTGSGTCTTGA	95°C 15" / 51°C 30" / 72°C 30" (45 c.)	Throback et al., 2004
	Desnitrificadores	<i>nosZ</i>	Óxido nítrico reductasa	nosZ2F: CGCRACGGCAASAAGGTSMSST nosZ2R: CAKRTGCAKSGCRTGGCAGAA	95°C 15" / 59°C 30" / 72°C 30" (40 c.)	Henry et al., 2006
	Nitrificadores (bacterias)	<i>amoA</i>	Amonio monooxigenasa	amoA-1F: GGGGTTTCTACTGGTGGT amoA-2R: CCCCTCKGSAAGCCTTCTTC	95°C 60" / 60°C 30", 72°C 60" (40 c.)	Rotthauwe et al (1997)
CARBONO	Metanótrofos	<i>pmoA</i>	Metano monooxigenasa particulada	A189F: GGNGACTGGGACTTCTGG Mb661: CCGGMGCAACGTCYTTACC	95°C 30" / 55°C 30" / 72°C 30" (40 c.)	Costello y Lidstrom, 1999
	Metanógenos	<i>mcrA</i>	Metil coenzima M reductasa	mlas:GGTGGTGMGGATTCACACARTAYGC WACAGC mcrA-rev:TTCATTGCRTAGTTWGGRTAGTT	95°C 30" / 50°C 30" / 72°C 30" / 74°C 10" (40 c.)	Steinberg y Regan, 2008. Luton et al., 2002
	Metanotrofos tipo I (Gammaproteobacteria)	16S rRNA	Estructura de ribosomas	142F: GGTGTGCAGCCGCCGCGTAA 533r: TTWCCYACWCCTTCCTCC	95°C 60" / 63°C 30" / 72°C 30" / 83°C 10" (35 c.)	Henckel et al., 1999
	Metanótrofos tipo II (Alphaproteobacteria)	16S rRNA	Estructura de ribosomas	197F: GGGATAACGTAGCGAAAGCT 533r: TTWCCYACWCCTTCCTCC	95°C 30" / 60°C 30" / 72°C 30" (35 c.)	

Estadísticamente los datos se analizaron bajo modelos lineales mixtos y ANOVA para observar diferencias significativas entre los distintos tratamientos y/o la combinación de factores. Todo este procedimiento sumado a los gráficos y figuras se realizó en R utilizando las librerías, ggplot2, ggbiplot (Vu, 2011), nlme (Pinheiro et al., 2023), dplyr y corrplot (Wei & Simko, 2021).

1.3.7 Búsqueda de diversidad en las abundancias: enfoque multi-ómico

Las técnicas ómicas empleadas en este trabajo abordan distintos niveles de información: genómica, funcional y cuantitativa. Este enfoque multi-ómico constituye uno de los aspectos más relevantes de este estudio, ya que permite integrar datos obtenidos mediante qPCR (sección 1.3.6) y metagenómica de ADN total (sección 1.3.5). Para ello, se buscó en la base de datos *Identical protein groups* del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) aquellos registros que tuvieran la misma anotación que los genes de interés de este trabajo. En esta base de datos el NCBI agrupa secuencias de proteínas idénticas bajo un mismo identificador. Estas proteínas pueden provenir de las bases de datos GenBank, RefSeq, SwissProt o PDB.

Con las secuencias en formato fasta de los accesos encontrados en el paso anterior se construyeron bases de datos blast para los genes de interés. Luego se usaron las proteínas inferidas por eggNOG como consultas y se recuperaron secuencias de alta similitud con aquellas de los *Identical protein groups*. De esta manera se pudo determinar aquellas proteínas presentes en nuestro proteoma que por su grado de similitud se pueden considerar muy buenas candidatas a ser las proteínas funcionales de interés.

El gen *pmoA* fue dejado de lado porque la secuencia es muy similar a la del gen *amoA*. No se encontró en nuestro proteoma secuencias similares a las secuencias de referencia de *mcrA*. Se analizaron las secuencias de nucleótidos de los *contigs* iniciales con PrimerSearch (v. 6.6.0.0), un programa de la suite EMBOSS (Rice & Bleasby, 2000) para determinar si un par dado de *primers* encuentra secuencias amplificables en secuencias de ADN largas. Con una tolerancia del 10% no se encontraron posibles secuencias blanco, con una tolerancia mayor, 20%, se encontraron posibles blancos, pero las secuencias amplificadas no tenían ninguna relación con *mcrA*.

Esta base de datos fue comparada con la anotación de nuestro proteoma (paso 4 de la *pipeline* de la Figura F04) pero no proveniente del paso 3 como se hizo en la sección 1.3.5, sino del paso 2. Es decir que en vez de un proteoma proveniente de un genoma o *bin* es un proteoma correspondiente al metagenoma ensamblado: metaproteoma. De estas comparaciones se conformaron los árboles de cada uno de los genes (ver anexo) con la librería *seqinr* de R y Rstudio.

Capítulo 2. Variables edáficas y emisiones de Gases de Efecto

Invernadero (GEI): impacto del manejo en caña de azúcar

2. Capítulo 2. Variables edáficas y emisiones de GEI: impacto del manejo en caña de azúcar

2.1 Breve introducción

El análisis de suelos es un paso fundamental para caracterizar las condiciones edáficas que influyen en la dinámica de las comunidades microbianas y los procesos biogeoquímicos. En este estudio, se evaluaron parámetros físico-químicos del suelo con el objetivo de comprender su variabilidad bajo diferentes manejos agrícolas y su relación con la microbiota del suelo. Se realizaron determinaciones de humedad, porosidad, nitrato, nitrógeno inorgánico, amonio) que proporcionan información clave para interpretar los procesos microbianos en el suelo y su impacto en la emisión de GEI.

2.2 Resultados

Para evaluar la relación entre las propiedades físico-químicas del suelo y la dinámica de emisiones de GEI, se realizó un análisis de correlación Pearson entre las variables edáficas (humedad, porosidad, nitrato, nitrógeno inorgánico, amonio) y los flujos acumulativos de N_2O , CO_2 y CH_4 medidos a campo. A continuación, se muestra el gráfico de correlaciones (Figura F05)

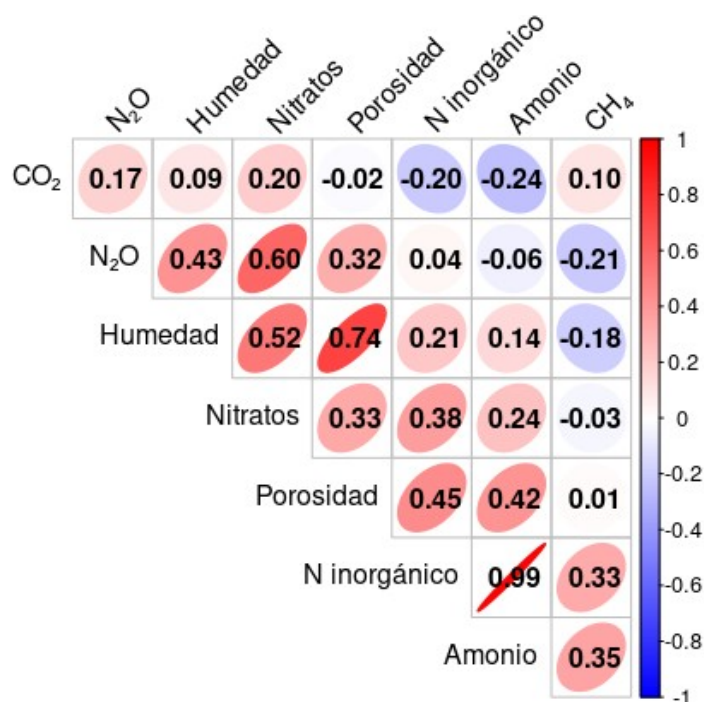


Figura F05: Correlación entre variables edáficas y emisiones de GEI. Los valores positivos indican una relación directa entre las variables: cuando un parámetro se expresa, el otro también. Los valores negativos reflejan una relación inversa: el incremento en un valor se asocia a una disminución del otro. La magnitud del coeficiente (entre -1 y 1) representa la fuerza de la asociación.

Las correlaciones observadas en la figura anterior (Figura F05), además de revelar relaciones de interés entre variables, sirvieron de guía para orientar el análisis de los tratamientos y factores. El objetivo en este punto era obtener una comprensión inicial del impacto de las prácticas de manejo sobre las variables edáficas y de emisiones GEI. Para ello se utilizaron modelos lineales para estimar la dependencia de las variables edáficas y de emisiones GEI con respecto a las variantes de labranza y las de cosecha. A continuación, se presentan dos tablas con los hallazgos de relaciones entre variables edáficas y de evolución de GEI con respecto a la época del año y el manejo. A modo de resumen la Tabla T03 muestra las asociaciones con algunas variables edáficas seleccionadas: amonio, nitrato, humedad y porosidad. Nitrógeno inorgánico fue

desestimado debido a la correlación con el contenido de nitratos (0.99). Si bien la correlación entre porosidad y humedad fue alta, se decidió mantener ambas porque, por un lado, el valor no es excesivamente alto, y por el otro son variables relacionadas pero que se enfocan en propiedades de los suelos que no son idénticas.

Tabla T03: resultados para modelos de cada una de las variables edáficas

Variable edáfica	p valor	Efecto significativo	Interpretación
Amonio (NH_4^+)	0.2	no significativo	Los niveles de amonio no mostraron variaciones atribuibles a los factores estudiados.
Nitratos (NO_3^-)	3.37×10^{-6}	época	Las concentraciones de nitrato variaron entre las estaciones verano y otoño siendo mayor su expresión en otoño.
Humedad	0.0016	época	La humedad del suelo presentó cambios marcados entre las estaciones verano y otoño siendo mayor su valor en otoño.
Porosidad	0.000772	época	La porosidad del suelo presentó cambios marcados entre las estaciones verano y otoño siendo mayor su valor en otoño.

Respecto a la dinámica de GEI de CO_2 , CH_4 y N_2O , continuación de muestra en Tabla T04 el resumen de los resultados de los modelos desarrollados para dichas variables.

Tabla T04: Resultados para los modelos de las variables de GEI

GEI	p valor	Efecto significativo	Interpretación
CO₂	0.4	ninguno	Las emisiones de CO ₂ no mostraron patrones significativos asociados a los factores evaluados.
CH₄	0.00666	labranza	Las emisiones de CH ₄ variaron según el manejo durante la siembra, con mayores emisiones en labranza en franjas (LF)
	0.00069	cosecha	Las emisiones de CH ₄ variaron según el manejo durante la cosecha, con mayores emisiones en cosecha convencional (CC)
N₂O	0.00018	época	Las emisiones de N ₂ O presentaron una clara dependencia temporal siendo mayor la emisión en otoño.

Capítulo 3: Comunidades microbianas y su rol funcional en la emisión de GEI

3. Capítulo 3: Comunidades microbianas y su rol funcional en la emisión de GEI

3.1 Breve introducción

La cuantificación de genes funcionales mediante qPCR permite vincular la estructura microbiana con procesos biogeoquímicos clave, como la desnitrificación (genes *nirK*, *nirS*, *nosZ*) y la metabolización del metano (*mcrA*, *pmoA*). Estos genes actúan como marcadores de la capacidad potencial del suelo para emitir o mitigar GEI, complementando los análisis de diversidad taxonómica.

En el capítulo anterior se observaron pocos cambios en las variables edáficas y de evolución de GEI con respecto a las variaciones en el manejo. Ya que las variables asociadas a la abundancia y actividad microbiana en los suelos suelen ser más sensibles y responder antes a cambios en el suelo, resulta de interés determinar si cambios en la abundancia de grandes grupos microbianos y la abundancia de genes relacionados con la producción y consumo de GEI y el ciclado de nitrógeno muestran algún tipo de asociación con los manejos. En este capítulo se muestran los resultados de qPCR para determinar la abundancia relativa del gen 16S rRNA de procariotas, el 18S rRNA fúngico, y genes clave involucrados en el ciclo del nitrógeno y el metano, así como los genes que codifican el ARNr 16S (bacterias) y 18S (hongos). Se aborda específicamente el Objetivo 2 mediante: (a) la cuantificación de genes funcionales asociados a ciclos de N y CH₄, y (b) la comparación de su abundancia relativa entre manejos agrícolas y épocas (verano vs. otoño).

3.2 Resultados

3.2.1 Abundancias taxonómicas

La composición microbiana general del suelo, cuantificada mediante qPCR de genes marcadores taxonómicos (ARNr 16S para bacterias, 18S para hongos y arqueas), reveló diferencias significativas entre épocas (verano vs. otoño) en los tres grupos analizados (Figura F06).

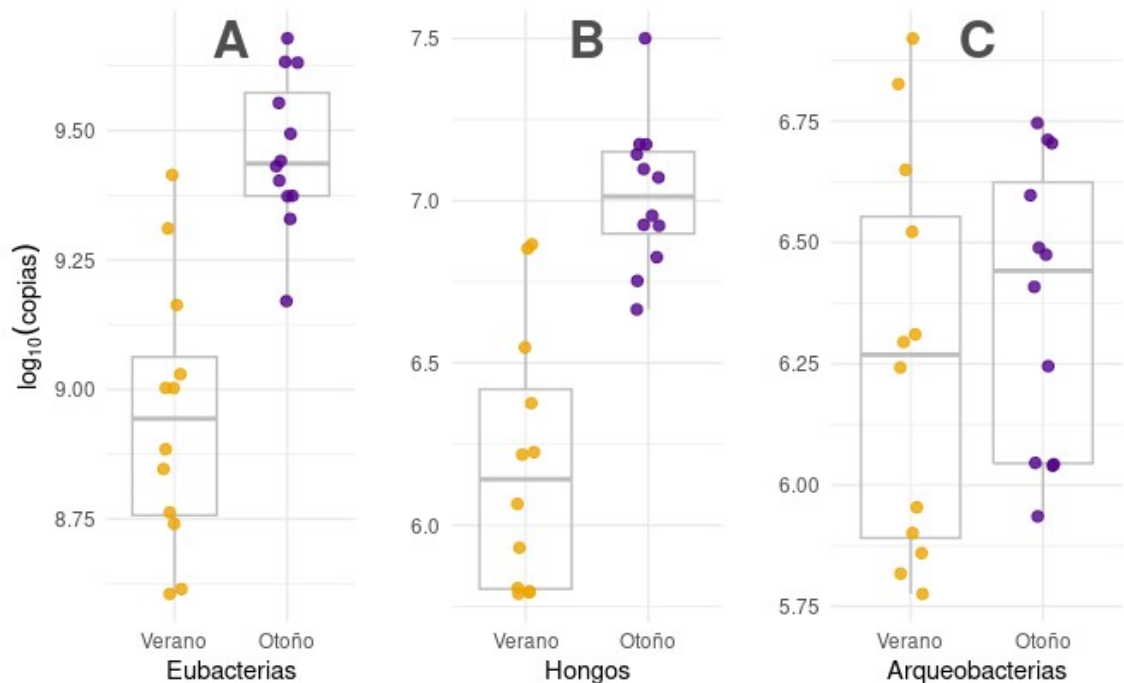


Figura F06: abundancia de Eubacteria (A), Hongos (B) y Arqueobacterias (C) en verano y otoño.

Los valores representan medias \pm error estándar, expresados en $\log_{10}(\text{copias de gen/g suelo})$

Los tres grupos taxonómicos muestran variaciones con respecto a la época de muestreo (verano - otoño): Bacterias y hongos son más abundantes en otoño y las arqueobacterias tienden a ser, en general, menos abundantes que hongos y bacterias.

3.2.2 Abundancia de eubacterias

La abundancia de Eubacteria, cuantificada mediante qPCR del gen ARNr 16S (*primers:* Eub338: ACTCCTACGGGAGGCAGCAG y Eub518: ATTACCGCGGCTGCTGG) expresada en log(copias)/g suelo, se analizó mediante un modelo lineal aditivo que incluyó como variables explicativas los tratamientos y la época del año. Los resultados del modelo se muestran a continuación en Tabla T05

Tabla T05: Abundancia de eubacterias cuantificada mediante qPCR del gen 16S rRNA bacteriano, utilizando el modelo lineal mixto correspondiente para evaluar los efectos de labranza, cosecha y época.

Variable	p valor	Interpretación
Labranza	0.8975	Los tratamientos de Labranza (LC - LF) no tuvieron efecto detectable sobre la abundancia bacteriana.
Cosecha	0.0515	Los tratamientos de cosecha (CC y CL) no tuvieron efectos detectables sobre la abundancia bacteriana.
Época	0.0039	La abundancia bacteriana fue significativamente mayor en otoño que en verano.

Para la abundancia de Eubacteria no se observa efecto de las variables de manejo, y se confirma el efecto de la época del año (Tabla T05).

3.2.3 Abundancia de hongos

La abundancia de hongos, cuantificada mediante qPCR del gen ARNr 18S (expresada en log(copias)/g suelo), se evaluó mediante un modelo lineal de efectos principales e interacciones. A continuación, se muestran los resultados en la Tabla T06

Tabla T06: Abundancia de hongos determinada mediante qPCR del gen 18S rRNA fúngico, analizada mediante el modelo lineal mixto considerando los factores de labranza, cosecha y época.

Variable	p valor	Interpretación
Labranza	0.0003	Abundancia mayor para el tratamiento de Labranza Convencional (LC).
Cosecha	0.0140	Se observa una reducción significativa de la abundancia de hongos en la Cosecha convencional (CC) por sobre la Cosecha Liviana (CL).
Época	0.0039	La abundancia fue significativamente mayor en otoño que en verano.

3.2.4 Abundancia de arqueobacterias

La abundancia de arqueobacterias, cuantificada mediante qPCR del gen ARNr 16S (*primers:* Arch85F: CCGGTTGATCCTGCCGG, Arch313R: TTATTACCGCGGCGGCTG) expresada en log(copias)/g suelo, se analizó mediante un modelo lineal aditivo que incluyó como variables explicativas los tratamientos y la época del año. A continuación, se muestran los resultados en la Tabla T07

Tabla T07: Abundancia de arqueas estimada mediante qPCR del gen 16S rRNA arqueal, evaluada con el modelo lineal mixto que incluye los efectos de labranza, cosecha y época.

Variable	p valor	Interpretación
Labranza	0.00245	Abundancia mayor para el tratamiento de Labranza Convencional (LC) .
Cosecha	0.03778	Se observa una reducción significativa de la abundancia de arqueobacterias en la Cosecha Liviana (CL) por sobre la Cosecha Convencional (CC).
Época	0.01593	La época del año tuvo efectos significativos sobre la abundancia de arqueobacterias .

3.2.5: Análisis de la abundancia de genes funcionales medidas por qPCR

A continuación, se muestra una figura (F07) de correlación de genes funcionales y GEI CH₄, CO₂ Y N₂O (ver sección 1.1.3 de la introducción)

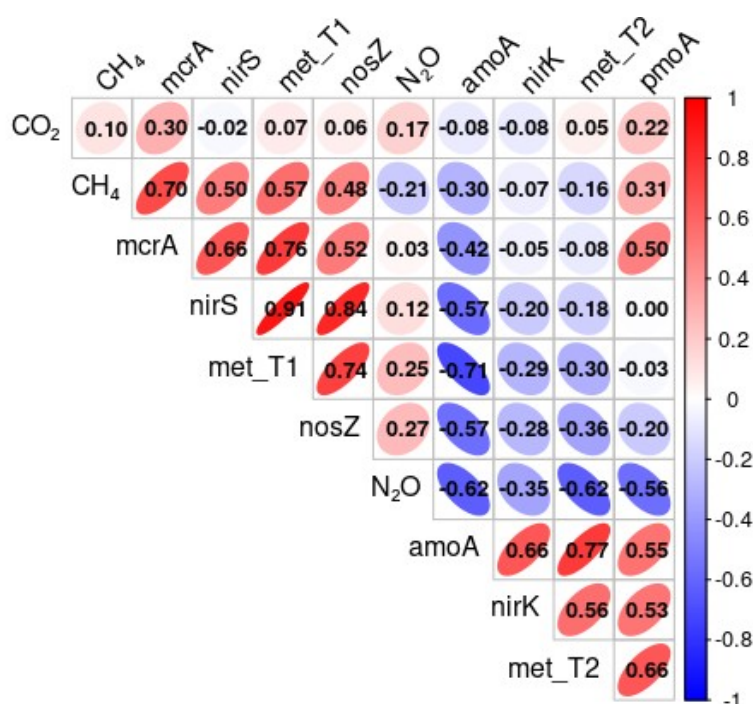


Figura F07: correlación de GEI con los genes funcionales. Los valores positivos indican una relación directa entre las variables: cuando un parámetro se expresa, el otro también. Los valores

negativos reflejan una relación inversa: el incremento en un valor se asocia a una disminución del otro. La magnitud del coeficiente (entre -1 y 1) representa la fuerza de la asociación.

Los resultados de la matriz de correlación (Figura F07) revelan patrones clave entre los genes funcionales y las emisiones de GEI, destacando mecanismos microbianos coherentes con las vías metabólicas conocidas. La fuerte correlación positiva entre *mcrA* y CH₄ (0.70) es esperable por el rol central de este gen en la metanogénesis, ya que codifica una subunidad de la metil-coenzima M reductasa, enzima crítica en la producción de metano.

En el ciclo del nitrógeno, *nirS* presentó una correlación baja y positiva con N₂O ($r = 0.12$), sin implicancias funcionales evidentes. Por su parte, *nosZ* mostró una correlación positiva moderada con N₂O ($r = 0.27$), lo cual sugiere que, en este caso, una mayor abundancia potencial de reductasas de N₂O no se tradujo en una mayor capacidad de mitigación de este gas. En contraste, *amoA* evidenció una correlación negativa marcada con N₂O ($r = -0.62$), indicando que la abundancia de amonio-oxidantes no estuvo asociada a un aumento de las emisiones, sino posiblemente a dinámicas más complejas en la transformación de compuestos nitrogenados. Estos resultados ponen de manifiesto la dificultad de establecer asociaciones directas entre genes funcionales individuales y flujos de GEI, resaltando la necesidad de un abordaje integrativo que considere múltiples rutas metabólicas en paralelo.

Se realizaron y analizaron modelos para evaluar la abundancia de genes con respecto al manejo agronómico y la época. A continuación, se presenta la Tabla T08 donde se detalla lo encontrado.

Tabla T08: resumen de los modelos de expresión de los genes funcionales. Correspondientes al ciclo del Nitrógeno: *nirK*, *nirS*, *nosZ* y *amoA*. Correspondientes al ciclo del Carbono: *pmoA* y *mcrA*.

	Gen	p valor	Efecto	Interpretación
N I T R Ó G E N O	<i>nirK</i>	0.0017	Labranza	<i>nirK</i> muestra una abundancia significativamente menor en Labranza en franjas (LF) que en Labranza convencional (LC)
		0.0159	Cosecha	<i>nirK</i> muestra abundancia significativamente menor en Cosecha convencional (CC) que en Cosecha Liviana (CL)
		3.3×10^{-6}	Época	<i>nirK</i> muestra una abundancia significativamente menor en verano que en otoño
	<i>nirS</i>	0.0569	Labranza	no hay efecto significativo
		0.0214	Cosecha	<i>nirS</i> muestra una abundancia significativamente menor en Cosecha convencional (CC) que en Cosecha Liviana (CL)
		1.1×10^{-7}	Época	<i>nirS</i> muestra una abundancia significativamente mayor en verano
	<i>nosZ</i>	0.1026	Labranza	no hay efecto significativo
		0.0527	Cosecha	no hay efecto significativo
		1.3×10^{-10}	Época	<i>nosZ</i> muestra una abundancia significativamente mayor en verano
	<i>amoA</i>	0.6250	Labranza	no hay efecto significativo
		0.8130	Cosecha	no hay efecto significativo
		9.3×10^{-8}	Época	<i>amoA</i> muestra una abundancia significativamente mayor en otoño
C A R B O N O	<i>pmoA</i>	0.028	Labranza	<i>pmoA</i> muestra una abundancia significativamente mayor en Labranza Convencional (LC) que en Labranza en Franjas (LF)
		0.012	Cosecha	<i>pmoA</i> muestra una abundancia significativamente mayor en Cosecha Liviana (CL) que en Cosecha Convencional (CC)
		1.2×10^{-4}	Época	<i>pmoA</i> muestra una abundancia significativamente mayor en otoño
	<i>mcrA</i>	0.0183	Labranza	<i>mcrA</i> muestra una abundancia significativamente mayor en Labranza convencional (LC) que en Labranza en Franjas (LF)
		0.0094	Cosecha	<i>mcrA</i> muestra una abundancia significativamente mayor en Cosecha Liviana (CL) que en Cosecha Convencional (CC)
		2.8×10^{-5}	Época	<i>mcrA</i> muestra una abundancia significativamente mayor en verano que en otoño

Con base en los resultados de las abundancias de la sección 3.2, se observó que bacterias y hongos responden a la época de muestreo y sumado a los resultados presentados en la figura F08 y tabla T08, se realizó un ordenamiento de la matriz de abundancia de genes por muestra con la técnica de Análisis de Componentes Principales (PCA), que se visualiza con un biplot, con las muestras coloreadas según la época del año en que fueron tomadas (Figura F08). Se evidencia claramente un patrón de abundancia temporal para los genes analizados.

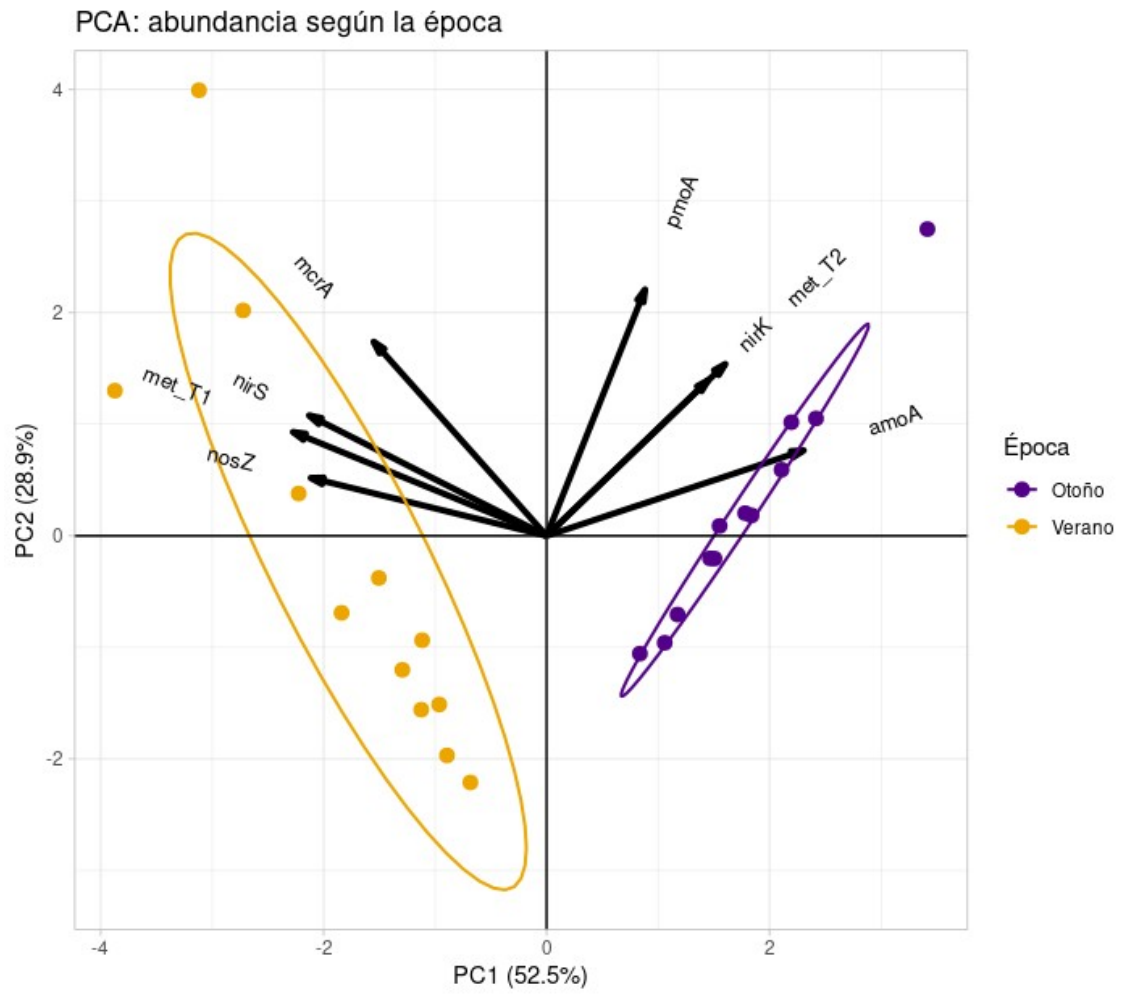


Figura F08: PCA de la abundancia de genes según la época. En verano se expresan más *met_T1*, *nosZ*, *nirS* y *mcrA* mientras que, en otoño, se expresan *pmoA*, *nirK*, *met_T2* y *amoA*.

**Capítulo 4. Análisis de la diversidad microbiana del suelo:
caracterización taxonómica y funcional por amplicones y ADN total**

4. Capítulo 4. Análisis de la diversidad microbiana del suelo: caracterización taxonómica y funcional por amplicones y ADN total.

4.1 Breve introducción

La integración de los resultados de los capítulos anteriores sugiere que los cambios en los manejos agronómicos se asocian a cambios en variables físico-químicas del suelo, de evolución de GEI y a variaciones en la abundancia de grandes grupos microbianos (eubacterias, arqueas y hongos) y genes clave en la dinámica de GEI. En los modelos estadísticos el efecto del manejo sobre la comunidad microbiana se mantiene al controlar la variación temporal, que es el modulador más importante de la composición de la comunidad. Para caracterizar la diversidad microbiana del suelo y sus cambios con los manejos agronómicos, se combinan los enfoques de secuenciación de alto rendimiento dirigidos al gen 16S rRNA y la secuenciación metagenómica total. La primera técnica permite analizar la abundancia a nivel taxonómico de género o mayor con buen nivel de profundidad y a bajo costo. La segunda, con un costo mayor, permite agregar una dimensión funcional al análisis. En primer lugar, se analizó la comunidad de eubacterias y buena parte de la de arqueas mediante la amplificación y secuenciación de la región hipervariable V3-V4 del gen 16S rRNA, lo que permitió estimar la diversidad alfa y beta de las muestras y realizar asignaciones taxonómicas. En paralelo, la secuenciación masiva de ADN total nos permitió ensamblar genomas metagenómicos (MAGs) y caracterizar funcionalmente los microorganismos más abundantes del suelo. Para ello, se implementó una *pipeline* bioinformática específica que incluyó controles de calidad, ensamblado de

reads, *binning* y anotación funcional de los genomas obtenidos. A continuación, se presentan los principales hallazgos derivados de estos análisis. En este capítulo se tratará el objetivo 1: “Establecer si el manejo conservacionista modifica la diversidad de la comunidad microbiana”. Es importante aclarar que debido a que estos análisis tienen un carácter más bien exploratorio dentro del marco de esta tesis, sólo se analizaron muestras tomadas en diciembre.

4.2 Resultados

4.2.1 Análisis de secuencias de amplicones del gen 16S rRNA

El conjunto de datos inicial contenía 2.053.203 de pares de secuencias *paired-end*. Después del filtrado, eliminación de ruido y consolidación en secuencias únicas con DADA2 se generó una tabla de abundancia por muestra para 12.010 *features*. La clasificación taxonómica de estos *features* mostró que a nivel taxonómico los *phyla* más abundantes fueron *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Gemmatimonadetes* y *Verrucomicrobia*.

4.2.1.1 Análisis de la biodiversidad alfa y beta de la comunidad

Para llevar a cabo los análisis de diversidad alfa y beta sobre comunidades uniformes, las abundancias se rarefaccionaron a 41.000 secuencias por muestra. Para el análisis de diversidad alfa se consideraron el estimador de riqueza Chao y el índice de diversidad de Simpson. La significancia estadística se evaluó mediante el método robusto de Kruskal–Wallis. Sólo se detectaron diferencias significativas en el estimador de riqueza Chao, que resultó mayor en las parcelas con labranza en franjas ($p = 0.037$). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos planteados (LC-CC, LC-CL,

LF-CC, LF-CL). A continuación, se presenta una tabla (Tabla T09) con los resultados obtenidos.

Tabla T09: índices de Chao y de Simpson. Los cálculos no arrojaron diferencias significativas entre los tratamientos.

Tratamiento	Chao	Simpson
1 → LC-CC	1024,572	0.9982
2 → LC-CL	1142.203	0.9983
3 → LF-CC	1181.4169	0.9984
4 → LF-CL	1256.1061	0.9984

Para el estudio de la diversidad *beta* se construyeron matrices de distancia para los datos de composición de las comunidades a nivel de *features* con las métricas Bray-Curtis y Unifrac, que es una métrica de distancia entre comunidades que incluye en su cálculo las distancias filogenéticas entre *features*. En este caso también se observaron diferencias significativas, usando el test de permutaciones Adonis, para el tipo de labranza ($p = 0.013$), pero sólo para la matriz de distancia Unifrac.

Como una aproximación extra al análisis funcional con los datos de secuenciación del rRNA 16S se utilizó PICRUST2 con su implementación en *qiime2* para inferir anotaciones funcionales. Se derivaron datos de abundancia para 423 vías metabólicas, pero ninguna mostró diferencias asociadas a los manejos agronómicos (datos no mostrados).

A continuación, se presenta un Análisis de coordenadas principales (PCoA) de las distancias Unifrac discriminada por tipos de labranzas en la Figura F09.

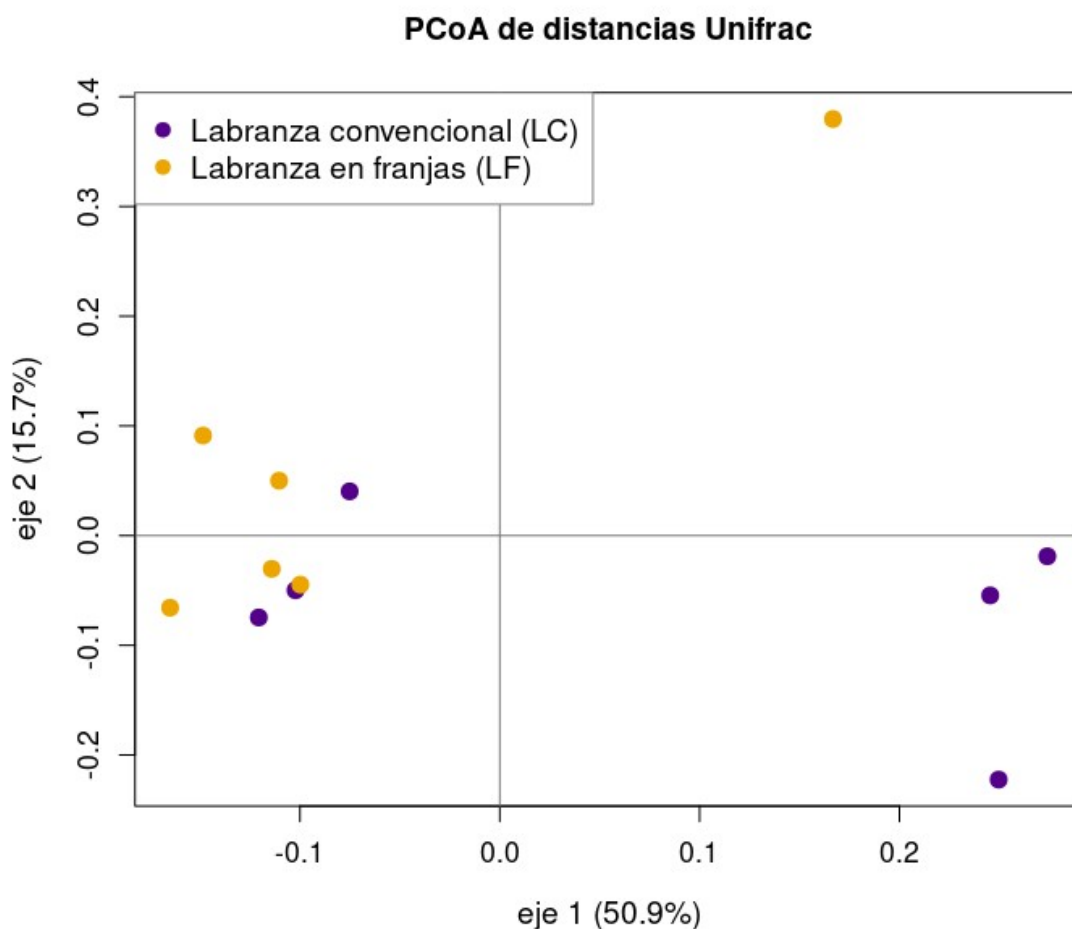


Figura F09: Análisis de componentes principales derivado de la matriz de distancias Unifrac entre comunidades. Las diferencias entre tipos de labranza son significativas con un $P = 0.013$.

Dado que el diseño experimental incluyó cuatro combinaciones de tratamientos (LC-CC, LC-CL, LF-CC y LF-CL), los análisis de diversidad beta se evaluaron tanto a nivel de tratamientos combinados como de factores independientes. En este marco, el tipo de labranza fue el único factor que mostró diferencias significativas con la métrica Unifrac no ponderada ($p = 0.013$), mientras que no se detectaron efectos de la cosecha ni de la interacción. En consecuencia, los análisis diferenciales se enfocaron en el factor labranza, agrupando las muestras en las dos categorías correspondientes (LC vs. LF) para evaluar cambios en la abundancia relativa de géneros.

Los *features* se agruparon a nivel taxonómico de género y se analizaron cambios en su abundancia mediante tres enfoques estadísticos independientes —limma-voom (Ritchie et al., 2015), DESeq2 (Love et al., 2014) y corncob (Martin et al., 2020)—, implementados en R-Bioconductor. En total se identificaron doce géneros con abundancias diferenciales entre tipos de labranza, pero únicamente dos fueron detectados de manera consistente por más de un método: *Flavobacterium*, que resultó 4.1 veces más abundante en las parcelas bajo labranza convencional, y *Chthoniobacter*, que fue 2.4 veces más abundante en las parcelas con labranza en franjas. Estos valores corresponden a abundancias relativas normalizadas dentro de cada tratamiento y refuerzan que el efecto principal sobre la estructura de la comunidad se concentró en el factor labranza.

4.2.2 Análisis de la secuenciación masiva de ADN TOTAL

El análisis de diversidad *beta* basado en la distancia Unifrac de los géneros derivados de los *features* basados en las secuencias del rRNA 16S, indicó que las comunidades se estructuraban diferencialmente según el tipo de labranza. Sin embargo, se encontraron pocas diferencias a nivel de abundancia de géneros y de actividades funcionales que puedan considerarse claves para explicar las variaciones en la estructura de las comunidades. Es posible que las diferencias entre comunidades se expliquen, por la sumatoria de pequeñas variaciones en un grupo de taxones presentes en todas las parcelas, entre los que se podrían ubicar aquellos más abundantes. Para conocer mejor las características de los miembros más abundantes de las comunidades, se realizó una secuenciación de ADN total a gran profundidad siguiendo la *pipeline* de la Figura F04, con el objetivo de reconstruir genomas, anotarlos y obtener información preliminar sobre posibles marcadores moleculares para seguimientos más precisos a campo.

4.2.2.1 Ensamblado

El ensamblado se realizó con Megahit y produjo un archivo FASTA con 1.041.898 *contigs* que fueron sometidos a una prueba de calidad con MetaQUAST, sobre todo para determinar cómo se distribuyen los largos de los *contigs*. A continuación, en la Tabla T010 se muestran los valores arrojados más relevantes.

Tabla T010: Resultados del análisis de calidad de los *contigs* en MetaQUAST. N50 es la longitud de *contig* que marca la mitad de la longitud de la muestra, es decir que la mitad de la muestra tiene una longitud de al menos 1697-pb. El N90 nos indica entonces, que el 10% de los *contigs* tienen una longitud de 1081-pb o más. Un L50 indica la cantidad de *contigs* que hay de igual o mayor tamaño que el N50, es decir que 299.913 *contigs*, tienen 1697-pb de longitud, o más. Análogamente, el L90 nos indica que 863.886 *contigs* tienen una longitud de 1081-pb o más.

Resultados del análisis de calidad de los <i>contigs</i> en MetaQUAST	
Cantidad total de <i>contigs</i>	1.041.898 (100%)
Cantidad de <i>contigs</i> de longitud <5.000pb	1.013.368 (97.26%)
Cantidad de <i>contigs</i> de longitud >=5.000pb y <10.000	21.430 (2.06%)
Cantidad de <i>contigs</i> de longitud >=10.000pb	7.100 (0.68%)
Longitud del <i>contig</i> más largo	120.370pb
N50	1.697pb
N90	1.081pb
L50	299.913 <i>contigs</i>
L90	863.886 <i>contigs</i>

4.2.2.2 Binning

El *binning* fue realizado con MaxBin2 y después de realizar el control de calidad con CheckM se retuvieron aquellos *bins* con más del 70% de completitud y menos del 30% de contaminación (Tabla T011).

Tabla T011: Resultados del *binning* a partir del ensamble de *contigs*. Se indica el número total de *bins* obtenidos, así como la cantidad y el porcentaje de aquellos con un nivel de completitud superior al 70%.

Resultados del <i>binning</i>	
Cantidad de <i>bins</i> obtenidos	374 (100%)
Cantidad de <i>bins</i> con más del 70% de completitud	30 (8,02%)

4.2.2.3 Anotación

Los *contigs* de cada uno de los *bins* se anotaron con EggNog para obtener en primer lugar una anotación física, es decir, las coordenadas de inicio y fin de los marcos de lectura abierto que pueden corresponder con genes, y luego se anotaron funcionalmente. En promedio el 71.7% de los marcos de lectura abierto descubiertos recibieron anotaciones funcionales, dato que se observa a continuación en la Figura F10.

La asignación taxonómica de los MAGs retenidos (más del 70 % de completitud y menos del 30% de contaminación) se realizó mediante el programa GTDB-Tk. La mayoría de los MAGs recuperados se clasificaron dentro de los filos Proteobacteria y Thaumarchaeota, lo que indica una comunidad dominada por bacterias típicamente asociadas al suelo y por arqueas amonio-oxidantes, respectivamente. Esta distribución es coherente con la alta participación de estos grupos en los ciclos del nitrógeno en ambientes edáficos aireados.

En cuanto a la clasificación a nivel de género, muchos MAGs fueron asignados a clados aún no descritos o mal caracterizados, lo cual es esperable en estudios metagenómicos en ambientes complejos como el suelo. Entre los MAGs de alta calidad no se identificaron secuencias correspondientes a los géneros *Chthoniobacter* ni *Flavobacterium*, previamente detectados como diferenciales en los análisis de secuenciación del 16S rRNA. Esta discrepancia puede atribuirse a su baja abundancia

relativa o a que sus secuencias no superaron los filtros de longitud y cobertura requeridos para formar parte de los MAGs retenidos. Estos resultados refuerzan la necesidad de complementar la metagenómica con otras técnicas, como la secuenciación de amplicones y la qPCR, para una caracterización más exhaustiva del microbioma del suelo.

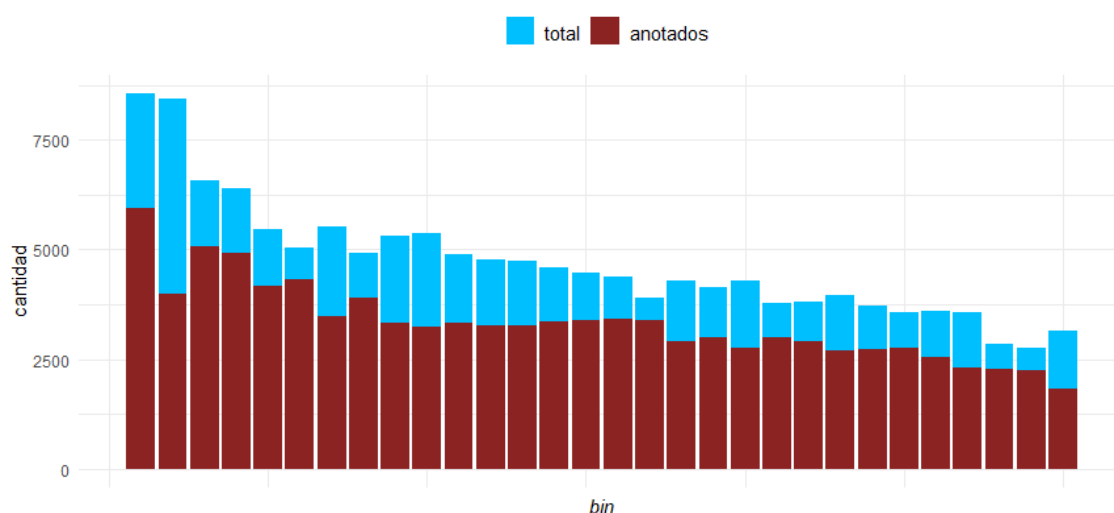


Figura F10: Cantidad de genes totales encontrados y con coordenadas asignadas por *bin* (barras celestes), y cantidad de genes con al menos una anotación funcional (barras marrones).

4.2.3 Búsqueda de diversidad en la secuencia de proteínas funcionales en el proteoma derivado del metagenoma.

Para complementar el análisis de abundancia de genes funcionales obtenido mediante qPCR, se exploró la diversidad de las proteínas codificadas por dichos genes en el proteoma derivado del metagenoma ensamblado. El objetivo de este análisis fue identificar si las proteínas funcionales, particularmente aquellas involucradas en procesos clave como la desnitrificación, la metanogénesis y la oxidación de amonio, estaban representadas en los *contigs* ensamblados y evaluar su diversidad estructural y filogenética.

A partir del ensamblado metagenómico descrito en la sección 1.3.5, se derivó un conjunto de secuencias proteicas (proteoma) que representaban los marcos de lectura abiertos predichos. Estas secuencias se utilizaron como consultas en un análisis comparativo contra la base de datos *Identical protein groups* del NCBI, seleccionando únicamente aquellas proteínas que compartían una alta similitud con secuencias funcionales bien caracterizadas en GenBank, RefSeq o SwissProt. La similitud fue evaluada mediante alineamientos locales y globales, y los genes considerados incluyeron *mcrA*, *pmoA*, *amoA*, *nirK*, *nirS* y *nosZ*.

El análisis reveló que para los genes *nirK*, *nirS*, *nosZ* y *amoA*, fue posible recuperar secuencias altamente similares en el metaproteoma, con alineamientos que mostraron elevada identidad y cobertura. Esto permitió inferir que las funciones asociadas a estos genes estaban representadas no sólo a nivel genético, sino también en la secuencia codificante de las proteínas. En cambio, no se recuperaron secuencias funcionales correspondientes al gen *mcrA*, ni siquiera con una tolerancia del 20% en el análisis de aplicabilidad con PrimerSearch (EMBOSS suite). Esta ausencia podría explicarse por una baja cobertura de arqueas metanogénicas (siendo poco abundantes) en el conjunto de *contigs* o por limitaciones técnicas del ensamblado.

Para visualizar la diversidad de las proteínas detectadas, se construyeron árboles filogenéticos a partir de las secuencias del metaproteoma alineadas con sus contrapartes de referencia (ver Anexo). Estos árboles permitieron observar clados específicos asociados a las muestras analizadas, así como divergencias entre secuencias de campo y aquellas reportadas en bases de datos. En algunos casos, como *nosZ*, se observaron agrupamientos con secuencias derivadas de microbiomas de suelo, mientras que en otros, como *amoA*, se detectó una mayor similitud con secuencias de microbiotas asociadas a ambientes más especializados.

Finalmente, este análisis permitió no sólo confirmar la presencia de funciones clave detectadas por qPCR, sino también estimar su diversidad y posibles adaptaciones. La integración de este enfoque con los datos obtenidos de abundancia funcional y anotaciones por MAGs refuerza el valor del enfoque multi-ómico adoptado en este trabajo, aportando evidencia convergente sobre la funcionalidad del microbioma del suelo bajo distintos manejos agrícolas.

Capítulo 5: Discusiones y conclusiones

5. Capítulo 5: Discusiones y conclusiones

5.1 Efecto del manejo conservacionista sobre la diversidad

microbiana del suelo

En la hipótesis inicial 1 (sección 1.2.2) se planteó que la diversidad de bacterias y hongos saprobios aumentaría bajo manejo conservacionista. Sin embargo, el análisis de los resultados no mostró diferencias significativas en la composición de la comunidad microbiana del ensayo analizado en este trabajo (Tablas T05, T06 y T09). En cambio, dejando de lado los tratamientos y en base a los factores se observó una respuesta diferencial al tipo de labranza en la riqueza total: fue mayor en parcelas con labranza en franjas (LF) (sección 4.2.1.1, $p = 0.037$). Además, se identificaron cambios diferenciales, particularmente por el aumento de *Chthoniobacter* (2.4 veces más abundante en LF que en labranza convencional (LC)).

Este patrón es congruente con los hallazgos de Moraes et al. (2019), quienes reportaron que el rendimiento del cultivo de caña de azúcar mejora a largo plazo bajo labranza mínima, siempre que se mantenga una fertilización adecuada. Así, el tipo de labranza emerge como un modulador relevante de la comunidad microbiana del suelo, posiblemente más influyente que el manejo conservacionista en su conjunto. La ausencia de diferencias significativas en la riqueza de la comunidad bacteriana global (Tabla T09) podría deberse a una menor sensibilidad de estos microorganismos frente a perturbaciones físicas, en comparación con los hongos saprobios, como se discutió en la sección 3.2.3.

En resumen, el manejo conservacionista no genera cambios significativos en la diversidad global de la comunidad microbiana del suelo, pero prácticas puntuales como la labranza en franjas sí promueven aumentos en la riqueza bacteriana y en la abundancia relativa de ciertos géneros.

Resultados similares fueron observados por Moneda et al. (2022), quienes analizaron comunidades microbianas de la rizósfera de caña de azúcar bajo manejo orgánico y convencional. En ambos estudios, las prácticas agrícolas no generaron cambios significativos en la diversidad microbiana global, pero sí promovieron modificaciones en la abundancia relativa de taxones específicos. Mientras que Moneda et al. identificaron diferencias en géneros como *Flavobacterium*, *Devosia* y *Pseudonocardia*, esta tesis detectó un aumento significativo en *Chthoniobacter* bajo labranza en franjas. Si bien los taxones afectados no coinciden, ambos trabajos sugieren que ciertas prácticas de manejo —como el tipo de labranza o el sistema de producción— pueden modular selectivamente la composición microbiana del suelo. Asimismo, en ambas investigaciones se destaca la mayor sensibilidad de los hongos saprobios frente a cambios de manejo, en comparación con la relativa estabilidad de la comunidad bacteriana global, lo que refuerza la necesidad de analizarlos por separado al evaluar el impacto ecológico de las prácticas agronómicas.

En esta tesis no se detectaron cambios significativos en la diversidad de hongos saprobios entre los manejos evaluados. En cambio, la abundancia fúngica sí mostró efectos del manejo (Tabla T06): fue mayor bajo labranza convencional (LC) ($p = 0.0003$), menor bajo cosecha convencional (CC) respecto de cosecha liviana (CL) ($p = 0.0140$) y mayor en otoño que en verano ($p = 0.0039$). Esta respuesta puede explicarse por la menor plasticidad de los hongos frente a cambios agronómicos en comparación con las bacterias, y por su mayor sensibilidad a factores edáficos como el pH y la materia orgánica. En línea con esta interpretación, Hamonts et al. (2018) mostraron que las comunidades fúngicas están más influenciadas por el compartimento de la planta (suelo, raíces, hojas), la edad del cultivo y el tipo de suelo, que por las prácticas agrícolas aplicadas. Además, identificaron un *core microbiota* estable en el tiempo y entre parcelas, lo que refuerza la

idea de que la estructura de la comunidad fúngica se encuentra fuertemente determinada por condiciones edáficas y ecológicas, más que por el manejo agronómico.

Uno de los objetivos de este trabajo es evaluar si la conversión a un manejo más conservacionista impacta en la fracción de la comunidad procariótica involucrada en la dinámica de los gases de efecto de invernadero y si esos cambios se correlacionan con cambios en la emisión o consumo de estos gases (hipótesis 2 y 3, 1.2.2). Se propuso que el manejo conservacionista altera la diversidad de microorganismos metanogénicos, metanotróficos y desnitrificadores. Los resultados evidenciaron efectos significativos del tipo de manejo sobre estos grupos bacterianos, resultando algunos más sensibles al tipo de labranza y otros al tipo de cosecha (Tabla T08). Esto implicaría que las prácticas agrícolas afectan tanto la estructura microbiana como las vías metabólicas predominantes.

En cuanto a los microorganismos metanogénicos, se observó una reducción en la abundancia del gen *mcrA* en sistemas conservacionistas. Contrario a lo esperado, las parcelas bajo labranza en franjas (LF) presentaron una disminución significativa de este marcador clave de arqueas metanógenas, con mayores niveles en verano que en otoño (Tabla T07).

En esta tesis se detectó un cambio en la composición funcional de los desnitrificadores asociado a la estacionalidad: *nirK* presentó un aumento significativo en otoño, mientras que *nirS* disminuyó en la misma estación (Tabla T08). Esta sustitución funcional sugiere un cambio en las rutas metabólicas utilizadas para la reducción de nitrito (NO_2^-), más que una pérdida general de diversidad. Este patrón puede estar vinculado a la afinidad diferencial de los portadores de *nirK* y *nirS* por condiciones edáficas específicas: *nirK* es más frecuente en suelos bien aireados y con fluctuaciones redox, mientras que *nirS* predomina en ambientes más anaeróbicos (Jones et al., 2013). En otoño, el aumento

de la humedad edáfica y las temperaturas moderadas podrían haber generado microambientes oxigenados variables que favorecieron la expresión de *nirK*.

Este cambio funcional coincidió con un incremento en la abundancia de eubacterias durante el otoño (sección 3.1.3), lo que respalda la hipótesis de que la comunidad desnitrificante tuvo un rol activo en los picos de emisión de N_2O registrados en esa estación (Capítulo 2). La mayor actividad de *nirK* en combinación con condiciones edáficas favorables puede haber potenciado la tasa de desnitrificación parcial, generando una acumulación transitoria de N_2O .

Por su parte, *nosZ*, gen que codifica la última etapa del proceso desnitrificante (reducción de N_2O a N_2), se mantuvo estable entre tratamientos. Esta estabilidad sugiere que la capacidad funcional para reducir N_2O no se vio comprometida, al menos desde un punto de vista potencial. Este resultado es coherente con los hallazgos de Domeignoz-Horta et al. (2015), quienes encontraron que el manejo conservacionista puede preservar la abundancia de microorganismos con rutas de desnitrificación completas.

Adicionalmente, la estructura del suelo podría explicar parte de los patrones observados. La labranza convencional (LC) tiende a generar micrositios anaeróbicos por compactación y pérdida de porosidad, mientras que la labranza en franjas (LF) conserva una estructura más aireada, limitando los hábitats propicios para la metanogénesis. Esta interpretación es respaldada por Smith et al. (2018), quienes reportaron que una mayor difusividad de gases en suelos no compactados reduce la actividad metanogénica al favorecer condiciones aeróbicas. En este trabajo, se observa que las arqueas metanogénicas —marcadas por el gen *mcrA*— mostraron patrones estacionales más estables y menor abundancia bajo LF, lo que refuerza la idea de que responden principalmente a condiciones redox específicas más que a variaciones estacionales amplias.

Khan et al. (2023) describieron cómo la acidificación edáfica inducida por prácticas agrícolas intensivas en caña de azúcar modifica la estructura microbiana del suelo: se reduce la abundancia de Pseudomonadota (anteriormente Proteobacteria), un filo que incluye bacterias fijadoras de nitrógeno y promotoras del crecimiento vegetal, y aumentan Acidobacteriota y Actinomycetota, grupos adaptados a suelos ácidos y con menor disponibilidad de nutrientes (N, P). En los tratamientos LF y CL de este trabajo se observó una variación en la abundancia relativa del filo Pseudomonadota y del género *Acidothermus* —un género acidófilo dentro de Actinomycetota—. Si bien estos cambios no fueron incluidos en la sección de resultados, podrían estar vinculados con procesos de acidificación progresiva, en concordancia con lo reportado en otros agroecosistemas. Aunque los taxones específicos que responden pueden diferir, el patrón funcional coincide con una pérdida de grupos promotores del crecimiento y una selección por microorganismos tolerantes a pH bajo.

Mientras que los resultados ya expuestos indican que la labranza en franjas (LF) no reduce la diversidad funcional de la comunidad microbiana, sino que selecciona grupos específicos asociados a condiciones edáficas particulares —como mayor presencia de genes *nirK* y *nosZ* bajo menor compactación y aireación favorable—, estudios previos sugieren otros efectos del manejo intensivo. Por ejemplo, Dini-Andreote et al. (2015) propusieron que las prácticas agrícolas intensivas tienden a homogeneizar las comunidades microbianas, disminuyendo el rol de procesos estocásticos en favor de una selección determinística más fuerte. En contraste, los datos de este trabajo sugieren que LF preserva cierta heterogeneidad funcional al favorecer rutas metabólicas distintas sin perder diversidad global, lo que podría indicar una forma más balanceada de ensamblaje comunitario entre procesos estocásticos y determinísticos.

Mientras Dini-Andreote et al. (2015) sugieren que los manejos intensivos homogenizan las comunidades, los resultados de este estudio indican que LF no reduce la diversidad funcional, sino que selecciona grupos específicos según condiciones físicas y químicas. Por ejemplo, la menor compactación favorece bacterias con *nirK* y *nosZ*, pero no a metanógenos ni a portadores de *nirS*.

En resumen, aunque el manejo conservacionista no genera cambios significativos en la diversidad global de la comunidad microbiana del suelo, prácticas específicas como la labranza en franjas (LF) sí inducen respuestas estructurales y funcionales diferenciales. Estas respuestas incluyen un aumento en la riqueza bacteriana, una reconfiguración en la abundancia de genes clave del ciclo del nitrógeno y del metano, y un desplazamiento en la composición de taxones sensibles a condiciones edáficas. El patrón observado sugiere que LF promueve un ensamblaje comunitario determinado por filtros ambientales —como la compactación del suelo o la disponibilidad de oxígeno— que favorecen rutas metabólicas específicas sin comprometer la diversidad funcional general. Así, la implementación de prácticas de manejo que preserven la heterogeneidad estructural del suelo podría ser una vía eficaz para modular las funciones microbianas del agroecosistema sin alterar drásticamente su composición. Esta evidencia refuerza la necesidad de evaluar las prácticas agrícolas no sólo por sus efectos productivos, sino también por su capacidad para sostener la funcionalidad ecológica del suelo a largo plazo.

5.2 Impacto en las emisiones de GEI en Sistemas de Caña de Azúcar

Diversas investigaciones han identificado múltiples fuentes microbianas de gases de efecto invernadero (GEI) en sistemas de cultivo de caña de azúcar, siendo el óxido nitroso (N_2O) y el metano (CH_4) los principales compuestos involucrados.

Fuentes de N₂O

Las emisiones de N₂O en caña de azúcar dependen de factores como la forma y dosis de fertilización nitrogenada, así como del manejo del suelo. Estudios como los de Chalco Vera & Acreche (2018) y Chalco Vera et al. (2022) han demostrado que fertilizantes como el nitrato de amonio generan mayores emisiones que la urea, especialmente en las primeras 48 horas, debido a la nitrificación en condiciones aeróbicas. Además, encontraron que la combinación de labranza convencional con cosecha liviana tiende a incrementar las emisiones en comparación con otros sistemas de manejo. Estos antecedentes resaltan la relevancia de seleccionar prácticas agronómicas adecuadas para mitigar emisiones y, en línea con dichos antecedentes, los resultados de este trabajo demuestran que las emisiones de N₂O en caña de azúcar están fuertemente vinculadas a la interacción entre prácticas de manejo y condiciones ambientales.

Fuentes de CH₄

Chalco Vera & Acreche (2018) evaluaron emisiones de CH₄ en un mismo lote de caña de azúcar en Tucumán (Argentina) durante tres ciclos consecutivos (2012-2015), comparando sistemas con y sin quema de rastrojo, fertilización nitrogenada y un bosque nativo como referencia. Reportaron flujos netos insignificantes en la mayoría de los tratamientos, con emisiones puntuales asociadas a la combinación de rastrojo no quemada y fertilización nitrogenada, atribuidas al equilibrio entre metanogénesis y metanotrofía.

En suelos no inundados de cañaverales, las condiciones aeróbicas limitan la actividad metanogénica, mientras que la metanotrofía predomina en suelos bien aireados, como se observó en el bosque nativo (con mayor porosidad y capacidad oxidativa). Este

contraste es marcado frente a sistemas como arrozales, donde la saturación hídrica favorece la metanogénesis (Serrano-Silva et al., 2014).

Los resultados de este trabajo coinciden con los siguientes hallazgos: en verano, las emisiones de CH_4 fueron cercanas a cero o negativas, sugiriendo que la metanotrofía supera a la metanogénesis bajo alta temperatura y baja humedad. Esto refuerza la importancia de evitar la compactación —común en cañaverales por el tráfico de maquinaria— para preservar la estructura porosa y la capacidad oxidativa del suelo.

Factores climáticos

Los factores climáticos emergieron como los principales moduladores de la variabilidad en las emisiones de GEI, superando incluso el efecto de los tratamientos de manejo evaluados. La estacionalidad (otoño vs. verano) mostró un impacto más pronunciado que las prácticas agronómicas, tanto en la estructura de las comunidades microbianas como en los flujos de gases.

La revisión de Basheer et al. (2024) identifica la temperatura y la humedad del suelo como variables críticas que explican hasta el 74% y 86% de las emisiones de N_2O , respectivamente, en sistemas agrícolas. Estos hallazgos coinciden con los patrones observados en este estudio: durante el otoño, el aumento de la humedad edáfica y la concentración de nitratos (Capítulo 2) crearon condiciones ideales para la desnitrificación, amplificando las emisiones de N_2O . En contraste, las condiciones secas del verano suprimieron estos flujos.

La interacción entre disponibilidad de sustrato (NO_3^-) y microambientes anaeróbicos —generados por la saturación hídrica— explica los picos de N_2O en otoño. Sin embargo, como señalan Basheer et al. (2024), estos procesos son altamente sensibles a cambios abruptos en humedad, como los eventos de lluvia posteriores a sequías, que

pueden disparar emisiones episódicas no capturadas en muestreos puntuales. Esto sugiere que nuestras mediciones, aunque válidas para comparaciones relativas, podrían subestimar los flujos acumulados a escala temporal.

En sistemas cañeros, el clima no solo regula las emisiones, sino también la productividad. Linnenluecke et al. (2018) destacan que el cambio climático exacerba la variabilidad en rendimientos debido a estrés hídrico y fluctuaciones térmicas, un fenómeno documentado en Brasil por Marin & de Carvalho (2012), donde las oscilaciones en precipitación y temperatura explicaron el 43% de la eficiencia productiva del cultivo.

5.3 Enfoque multi-ómico en los estudios de microbiomas del suelo

Los análisis basados en la secuenciación de amplicones del gen 16S rRNA y los enfoques funcionales evidenciaron que la comunidad de procariotas respondió de forma diferencial a los manejos agronómicos evaluados. La secuenciación profunda del gen 16S rRNA permitió identificar cerca de 12.000 *features*, agrupadas en 477 géneros, de los cuales 276 presentaron abundancias suficientes para realizar análisis diferenciales entre tratamientos.

El abaratamiento de los estudios de amplicones en los últimos años favoreció su aplicación a mayor profundidad por muestra. En este trabajo, se combinó esta estrategia acompañada de la inferencia funcional con PICRUSt2, con el análisis de secuenciación de ADN total. Este abordaje permitió recuperar abundancias elevadas para la mayoría de las rutas metabólicas inferidas, y también analizar en detalle la diversidad de algunos genes funcionales de interés. A su vez, la cuantificación de genes individuales mediante qPCR complementó los análisis anteriores al permitir detectar con alta sensibilidad funciones

microbianas clave vinculadas a la producción y mitigación de gases de efecto invernadero. La comparación entre métodos mostró que sólo un subconjunto de genes funcionales habría variado en respuesta a los tratamientos, en concordancia con los patrones observados en la composición taxonómica.

Si bien algunos enfoques actuales priorizan la metagenómica total por sobre los estudios de amplicones, los resultados de este trabajo indican que, al alcanzar una profundidad adecuada, la secuenciación del 16S rRNA permite relevar una diversidad taxonómica considerable con menor demanda computacional y financiera. Sin embargo, si se desea llevar a cabo un análisis funcional más profundo, será necesario incluir técnicas cuantitativas como la qPCR y de secuenciación de ADN total. En nuestro caso, se integra la información de los estudios de amplicones para orientar el ensamblado de ADN total hacia la recuperación de genomas derivados de metagenomas (MAGs), focalizando la búsqueda de *contigs* y MAGs relevantes.

Una estrategia alternativa —la secuenciación individual de cada una de las doce parcelas— habría requerido una inversión sustancialmente mayor y un tratamiento computacional más complejo para lograr comparabilidad estadística. En cambio, el enfoque integrador aplicado permitió conservar la resolución funcional con un diseño más eficiente.

El ensamblado de ADN total mostró que la mayoría de los *contigs* recuperados tenían una longitud inferior a 5000 pb. Aunque estas longitudes no resultan ideales, dada la alta compactación de los genomas procariotas, se logró conservar información funcional relevante. El análisis de *binning* reveló que solo el 8% de los MAGs generados alcanzó los umbrales de calidad (alta completitud y baja contaminación), lo cual representa una limitación frecuente en ambientes edáficos complejos. A pesar de la baja proporción de MAGs de alta calidad recuperados, se exploró la presencia de genes

funcionales previamente cuantificados por qPCR dentro de estos genomas parciales. Sin embargo, no se identificaron secuencias correspondientes a *nirK*, *nirS*, *nosZ*, *amoA*, *mcrA* ni *pmoA* dentro de los MAGs filtrados. Esto sugiere que los microorganismos portadores de estos genes pueden encontrarse en fracciones no ensambladas o en *contigs* descartados por su baja longitud o cobertura.

Cabe destacar, no obstante, que al analizar el proteoma derivado del metagenoma ensamblado, sí se recuperaron secuencias proteicas altamente similares a las correspondientes a *nirK*, *nirS*, *nosZ* y *amoA*, lo que indica que estas funciones clave estaban representadas a nivel codificante, incluso si no formaban parte de MAGs completos. La comparación con la base de datos *Identical protein groups* del NCBI permitió confirmar estas coincidencias funcionales y visualizar su diversidad filogenética mediante árboles contruidos a partir de alineamientos con proteínas de referencia. En cambio, no se identificaron secuencias confiables para *mcrA*, en concordancia con los resultados de qPCR y de los MAGs, lo que sugiere una baja presencia de arqueas metanogénicas en las muestras analizadas. Esta convergencia metodológica refuerza la interpretación de que las condiciones del suelo no favorecieron el desarrollo de comunidades metanogénicas activas. En conjunto, estos hallazgos resaltan la utilidad de integrar herramientas complementarias —como la qPCR, la secuenciación de 16S rRNA y el análisis proteómico— para caracterizar la funcionalidad microbiana en suelos agrícolas, especialmente cuando las limitaciones del ensamblado impiden la reconstrucción de genomas completos.

El análisis de taxones diferenciales derivados de los amplicones del gen 16S rRNA mostró que los géneros *Flavobacterium* y *Chthoniobacter* presentaron abundancias diferenciales según el tipo de labranza. Lamentablemente entre los MAGs seleccionados no se identificaron genomas asignables a ninguno de estos dos géneros, algo que nos

podría haber permitido investigar sus genomas para encontrar las razones de ese comportamiento diferencial. Esto puede atribuirse a que estos géneros no estaban entre los más abundantes de la comunidad. Este hallazgo refuerza la utilidad de combinar múltiples aproximaciones. Si bien la secuenciación de amplicones presenta ciertos sesgos y se restringe a una región específica del 16S rRNA, permite alcanzar una cobertura taxonómica más robusta cuando se realiza a alta profundidad.

La *pipeline* empleada incluyó múltiples etapas con parámetros configurables en cada paso. Las decisiones tomadas durante esa configuración pueden influir sustancialmente en el tipo y la calidad de la información obtenida. Por ello, se recomienda un uso crítico de cada herramienta y la implementación sistemática de controles de calidad.

En el análisis funcional a partir de *Open reading frames* (ORFs) no se identificaron secuencias confiables para *mcrA*, en concordancia con los resultados de qPCR, lo cual sugiere una baja presencia de arqueas metanogénicas en las muestras analizadas. Este resultado fue consistente entre metodologías, ya que tampoco se detectó la secuencia codificante de *mcrA* mediante qPCR, ni se encontraron secuencias relevantes dentro de los ORFs o *contigs* anotados. Esta coincidencia refuerza la interpretación de que las condiciones del suelo en los tratamientos evaluados no favorecieron el desarrollo de comunidades metanogénicas activas, probablemente por la buena aireación del perfil y la ausencia de zonas persistentemente anóxicas. Este abordaje integrador refuerza los hallazgos previos y proporciona validación cruzada entre niveles taxonómicos y funcionales. Al comparar las funciones inferidas mediante PICRUSt2 a partir de secuencias 16S rRNA con las anotaciones obtenidas a partir de ORFs (eggNOG-mapper), se observaron coincidencias generales en rutas metabólicas clave, como la desnitrificación y la oxidación de metano. En este punto es importante considerar que las

asignaciones funcionales que hace PICRUSt2 dependen de la disponibilidad de genomas anotados cuyos genes 16S rRNA sean similares a los presentes en la muestra bajo análisis. Esto puede introducir sesgos basados en la selección de genomas usados para su base de datos, y en la posibilidad de errores al transferir anotaciones entre amplicones similares, pero pertenecientes a genomas que han divergido en otras secuencias. Además, la resolución ofrecida por las anotaciones de ORFs fue mayor al permitir la visualización directa de variantes proteicas específicas. Existe entonces una complementariedad entre ambos resultados en cuanto a precisión y profundidad que destaca el valor del enfoque multi-ómico, ya que cada técnica aporta una escala distinta de análisis: inferencia estadística a partir de filogenia en un caso, evidencia directa basada en secuencias codificantes en el otro.

5.4 Contrastación de hipótesis

La hipótesis 1 postulaba que la *diversidad de bacterias y hongos saprobios aumentaría bajo manejo conservacionista, como resultado de una menor remoción del suelo y una mayor retención de humedad en comparación con el manejo convencional*. Esta hipótesis se acepta parcialmente. En el caso de las bacterias, los análisis de diversidad alfa mostraron un aumento significativo de la riqueza bajo labranza en franjas (LF) (sección 4.2.1.1), particularmente asociada a una mayor abundancia relativa del género *Chthoniobacter*. Asimismo, el análisis de diversidad beta evidenció diferencias significativas en la composición comunitaria entre tipos de labranza según la métrica Unifrac, lo cual sugiere una estructuración diferencial asociada a las condiciones edáficas inducidas por el manejo conservacionista. No obstante, estas diferencias no se observaron al considerar el esquema de manejo completo (combinaciones de labranza y cosecha), lo que indica que la labranza, más que el manejo como categoría compuesta, fue el factor

determinante en la respuesta bacteriana. En contraste, los hongos saprobios no mostraron diferencias significativas en su diversidad global frente a los tratamientos evaluados. La abundancia de secuencias fúngicas en el ADN total fue baja. Sin embargo, los resultados disponibles sugieren una mayor estabilidad de la comunidad fúngica frente a las variaciones de manejo agronómico. En resumen, la hipótesis se confirma para las bacterias, al observar un incremento en riqueza y diferencias de composición asociadas a la labranza en franjas, pero no se confirma para los hongos saprobios, cuya diversidad aparenta ser menos sensible a los cambios de manejo evaluados.

La hipótesis 2 proponía que *la diversidad de microorganismos funcionales asociados al ciclo del nitrógeno y del carbono se modifica con el manejo conservacionista del cultivo de caña de azúcar*, esperándose un cambio en la abundancia relativa de grupos funcionales como metanógenos, metanotrofos y desnitrificadores en función del tipo de labranza y cosecha. Esta hipótesis se acepta parcialmente. Los análisis funcionales basados en la cuantificación por qPCR mostraron cambios significativos en algunos genes marcadores: *mcrA* (arqueas metanogénicas), *nirK*, *nirS* y *nosZ* (desnitrificadores), y *amoA* y *pmoA* (oxidación de amonio y metano, respectivamente). En particular, se observó una disminución significativa de *mcrA* bajo labranza en franjas (LF), lo cual sugiere una reducción de la actividad metanogénica en suelos menos compactados y más aireados. Esta observación fue coherente con el resultado negativo en la detección de *mcrA* en *contigs*, MAGs y ORFs, lo que indica una baja presencia de arqueas metanogénicas. En el caso de los desnitrificadores, se observó un aumento de *nirK* y una disminución de *nirS* durante el otoño, asociado a un aumento de la humedad edáfica y la disponibilidad de nitratos, lo cual sugiere un cambio en la vía metabólica de reducción de nitrito hacia una dominancia de organismos portadores de *nirK*, típicamente más adaptados a ambientes oxigenados con condiciones redox variables. El gen *nosZ*, en

cambio, se mantuvo estable entre tratamientos, lo cual indica una capacidad funcional conservada para reducir N_2O a N_2 , y sugiere que los manejos conservacionistas no comprometen esta etapa clave para mitigar emisiones. Los análisis derivados del metagenoma y del proteoma teórico confirmaron la presencia y diversidad de los genes *nirK*, *nirS*, *nosZ* y *amoA*, lo cual valida su relevancia funcional. En cambio, *mcrA* no se recuperó en ninguna plataforma, reforzando su escasa abundancia. Es por esto que hipótesis 2 se valida parcialmente: se observa una modificación significativa en la diversidad funcional de ciertos grupos, pero no de manera uniforme ni sistemática.

La hipótesis 3 planteaba que *la diversidad funcional de la comunidad microbiana relacionada al ciclo del nitrógeno y del carbono impacta sobre la dinámica de los gases de efecto invernadero (GEI), particularmente CH_4 y N_2O* . Es decir, se esperaba que los cambios en la abundancia de genes funcionales microbianos se correlacionaran con los flujos medidos de CH_4 y N_2O en campo. Esta hipótesis se acepta parcialmente, ya que se evidenciaron asociaciones plausibles entre la abundancia de genes funcionales y los patrones de emisión de gases, aunque con ciertas limitaciones metodológicas y espaciales. Durante el otoño, se observó un aumento en la abundancia del gen *nirK* y un descenso de *nirS*, lo que sugeriría una reestructuración en las rutas de desnitrificación. Esta reorganización metabólica coincidió con mayores emisiones de N_2O , observadas en la misma estación. Este resultado respalda la idea de que los microorganismos desnitrificantes con *nirK* podrían estar más activos bajo condiciones de humedad y disponibilidad de NO_3^- , favoreciendo una desnitrificación parcial con acumulación transitoria de N_2O . Asimismo, la abundancia de *nosZ* se mantuvo estable, lo que indica que la etapa de reducción de N_2O a N_2 no estuvo limitada funcionalmente, aunque no necesariamente fue suficiente para contrarrestar los picos de emisión registrados. Respecto del metano (CH_4), la baja abundancia de *mcrA* —tanto en qPCR como en

MAGs, ORFs y *contigs*— sugiere una limitación en la actividad metanogénica, lo cual fue consistente con las emisiones cercanas a cero o incluso negativas registradas en verano.

La hipótesis 4 proponía que *el manejo conservacionista modifica la abundancia de genes funcionales vinculados a los procesos de metanogénesis, metanotrofia y desnitrificación, en comparación con el manejo convencional*. Es decir, se esperaba detectar cambios cuantificables en genes como *mcrA*, *pmoA*, *nirK*, *nirS*, *nosZ* y *amoA* asociados al tipo de labranza y cosecha. Los resultados obtenidos permiten aceptar esta hipótesis, ya que se detectaron cambios significativos en la abundancia de varios de estos genes como respuesta al tipo de manejo: el manejo conservacionista afecta selectivamente la abundancia de genes funcionales clave, particularmente *mcrA* y *nirK*, lo que evidencia una modulación de las rutas metabólicas microbianas por efecto del tipo de labranza y cosecha.

5.5 Conclusiones generales

Este trabajo demostró que los distintos manejos agronómicos aplicados durante la implantación y cosecha de caña de azúcar afectan la diversidad y funcionalidad de las comunidades microbianas del suelo, aunque estos efectos no siempre se reflejan en diferencias significativas en todas las escalas observadas. Se observó que el tipo de labranza, en particular la labranza en franjas, ejerció una influencia más marcada sobre la estructura microbiana que el esquema general de manejo conservacionista.

En términos de diversidad, la riqueza microbiana aumentó en parcelas con labranza en franjas, destacándose la mayor abundancia del género *Chthoniobacter*, mientras que la labranza convencional favoreció a *Flavobacterium*. No se registraron diferencias significativas en la abundancia general de hongos, lo cual podría explicarse por su mayor dependencia de factores intrínsecos del suelo y de la planta. Se debe

mencionar que no se analiza la comunidad fúngica a nivel de amplicones y la presencia de secuencias fúngicas en los análisis de secuenciación de ADN total, fue baja.

Desde una perspectiva funcional, los genes asociados a procesos clave del ciclo del nitrógeno y del carbono —*nirK*, *nirS*, *nosZ*, *amoA*, *pmoA* y *mcrA*— mostraron variaciones significativas, principalmente relacionadas con los factores de labranza, cosecha y época del año. En particular, se observó una menor abundancia del gen *mcrA* bajo manejo conservacionista, lo que sugiere una reducción de la metanogénesis en suelos menos perturbados. Asimismo, las variaciones en *nirK* y *nirS* indicaron una reestructuración de las vías de desnitrificación asociada a condiciones edáficas inducidas por el manejo.

En conjunto, los resultados subrayan la utilidad de adoptar un enfoque multi-ómico para comprender cómo los sistemas de manejo agrícola modelan la estructura y funcionalidad del microbioma del suelo. La integración de técnicas como la secuenciación de amplicones del gen 16S rRNA, la metagenómica total y la cuantificación de genes funcionales por qPCR permitió identificar patrones diferenciales de respuesta microbiana tanto a nivel taxonómico como funcional.

Sin embargo, se reconocen las limitaciones de la secuenciación basada en amplicones, entre ellas el sesgo introducido por los *primers*, la amplificación diferencial entre taxones y la resolución taxonómica restringida, en especial a nivel de especie o cepa. En este sentido, la incorporación futura de tecnologías de secuenciación de lectura larga —como las ofrecidas por Oxford Nanopore o PacBio— permitiría superar estas limitaciones al posibilitar la lectura completa del gen 16S o incluso de operones completos, mejorando la resolución taxonómica y la integración con datos funcionales.

El uso combinado de estas técnicas puede optimizar recursos en estudios microbiológicos del suelo. Mientras que la secuenciación de ADN total proporciona un

panorama integral, pero requiere mayores recursos computacionales y financieros, el análisis de amplicones a alta profundidad —cada vez más accesible— permite una caracterización taxonómica sensible que puede guiar eficazmente análisis funcionales o la reconstrucción de MAGs. Por su parte, la qPCR aporta una herramienta específica, precisa y de bajo costo para validar hipótesis funcionales concretas.

Esta sinergia metodológica, aplicada estratégicamente, permite obtener resultados robustos con un uso racional de los recursos disponibles. En contextos con limitaciones presupuestarias o logísticas, el enfoque multi-ómico no solo representa una mejora técnica en calidad y profundidad de análisis, sino también una estrategia costo-eficiente para la evaluación de la diversidad microbiana en agroecosistemas.

5.6 Perspectivas futuras

Los hallazgos de este trabajo abren múltiples líneas de investigación orientadas a profundizar en la comprensión de las comunidades microbianas del suelo en sistemas agrícolas subtropicales. Una primera dirección posible consiste en ampliar la escala temporal de los muestreos, incorporando campañas multianuales que permitan evaluar la dinámica del microbioma en función del envejecimiento del cultivo de caña de azúcar y de la sucesión de socas. Este enfoque permitiría analizar patrones de resiliencia o deriva en la estructura y funcionalidad microbiana bajo distintas intensidades de manejo.

Por otro lado, la incorporación de un mayor número de réplicas biológicas, así como de muestreos independientes por combinación de tratamiento, mejoraría sustancialmente la potencia estadística, especialmente en estudios de metagenómica total. Esto habilitaría comparaciones más robustas entre parcelas, permitiría identificar MAGs

diferenciales con mayor confianza y posibilitaría la aplicación de pruebas estadísticas más exigentes sobre genes o rutas metabólicas específicas.

La utilización de tecnologías de secuenciación de tercera generación representa otra vía de mejora sustancial. Estas tecnologías podrían aumentar la resolución de los ensamblados y facilitar la recuperación de genomas microbianos más completos, aspecto clave para comprender las funciones ecológicas y metabólicas del microbioma del suelo. A su vez, el desarrollo de bases de datos más específicas para suelos subtropicales contribuiría a una mejor asignación taxonómica y funcional, y al descubrimiento de biomarcadores aplicables al monitoreo ambiental y al diseño de prácticas agrícolas sustentables.

Finalmente, una línea de trabajo especialmente prometedora involucra el estudio detallado de las asociaciones funcionales entre microorganismos que coexisten en el suelo. Si bien este estudio sugiere la presencia de consorcios microbianos implicados en procesos como la desnitrificación o la metanotrofía, será necesario diseñar experimentos específicos que permitan validar estas interacciones. Entre ellos se destacan los estudios de co-cultivo, los análisis de expresión génica bajo condiciones controladas y el uso de enfoques de redes de co-ocurrencia aplicadas a datos metagenómicos de mayor profundidad y mayor cantidad de muestras. También serían de gran utilidad en situaciones experimentales, como la presentada en este trabajo, la aplicación de técnicas de meta-transcriptómica, ya que permitiría evaluar cuáles son los genes más activos entre los que se detectan por metagenómica. Como contraparte, debe mencionarse el mayor costo y complejidad de trabajo de laboratorio de estas metodologías. Comprender con mayor precisión estas asociaciones permitiría avanzar hacia modelos más integrales de funcionalidad microbiana, en los que se incluyan tanto los taxones directamente

responsables de un proceso como aquellos que actúan como moduladores o facilitadores de las rutas metabólicas relevantes.

Capítulo 6. Bibliografía.

6. Bibliografía

- Aßhauer, K. P., Wemheuer, B., Daniel, R., & Meinicke, P. (2015). Tax4Fun: predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data. *Bioinformatics*, 31(17), 2882–2884.
- Andrews, S. (2010). FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data.
- Araujo, P. I., Piñeiro-Guerra, J. M., Yahdjian, L., et al. (2021). Drivers of N₂O emissions from natural forests and grasslands differ in space and time. *Ecosystems*, 24, 335–350.
- Aronson, E. M., Allison, S. D., & Helliker, B. R. (2013). Environmental impacts on the diversity of methane-cycling microbes and their resultant function. *Frontiers in Microbiology*.
- Basheer, S., Wang, X., Farooque, A. A., Nawaz, R. A., Pang, T., & Neokye, E. O. (2024). A review of greenhouse gas emissions from agricultural soil. *Sustainability*, 16(11), 4789.
- Ben Guerrero, E., Soria, M., Salvador, R., Ceja-Navarro, J. A., Campos, E., Brodie, E. L., & Talia, P. (2016). Effect of different lignocellulosic diets on bacterial microbiota and hydrolytic enzyme activities in the gut of the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). *Frontiers in Microbiology*, 7, 2093.
- Bender, S. F., Wagg, C., & van der Heijden, M. G. (2016). An underground revolution: biodiversity and soil ecological engineering for agricultural sustainability. *Trends in Ecology & Evolution*, 31(6), 440–452.
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., ... & Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable

and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37, 852–857.

- Bray, R. H., & Kurtz, L. T. (1945). Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil Science*, 59, 39–46.
- Bray, J. R., & Curtis, J. T. (1957). An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, 27(4), 325–349.
- Bremner, J. (1965a). Inorganic forms of nitrogen. In *Methods of soil analysis (Part 2, Agronomy 9, pp. 1179–1237)*.
- Bremner, J. M. (1965). Total nitrogen. In A. G. Norman (Ed.), *Methods of soil analysis: Part 2 Chemical and microbiological properties (pp. 1149–1178)*. American Society of Agronomy, Soil Science Society of America.
- 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.
- Cantalapiedra, C. P., Hernández-Plaza, A., Letunic, I., Bork, P., & Huerta-Cepas, J. (2021). eggNOG-mapper v2: functional annotation, orthology assignments, and domain prediction at the metagenomic scale. *Molecular Biology and Evolution*, 38(12), 5825–5829.
- Centro de Estudios Científicos y Aplicados de la Realidad (CECAR). (s.f.). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. <https://cecar.fcen.uba.ar/>
- Chalco Vera, J. (2022). Emisiones de óxido nitroso (N₂O) en sistemas de caña de azúcar: Efecto de la fertilización nitrogenada y la textura del suelo [Tesis doctoral, Universidad Nacional de Tucumán].

- Chalco Vera, J., & Acreche, M. M. (2018). Towards a baseline for reducing the carbon budget in sugarcane: three years of carbon dioxide and methane emissions quantification. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 267, 156-164.
- Chalco Vera, J., Portocarrero, R., Piñeiro, G., & Acreche, M. M. (2022). Increases in nitrogen use efficiency decrease nitrous oxide emissions but can penalize yield in sugarcane. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 122(1), 41–57.
- Chang, N., Yu, Y. C., & Huan, S. L. (2014). Multiple approaches to characterize the microbial community in a thermophilic anaerobic digester running on swine manure: A case study. *Microbiological Research*, 169, 717–724.
- Chaumeil, P.-A., Mussig, A. J., Hugenholtz, P., & Parks, D. H. (2020). GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. *Bioinformatics*, 36(6), 1925–1927.
- Costello, A. M., & Lidstrom, M. E. (1999). Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), 5066–5074.
- Ding, G. C., Piceno, Y. M., Heuer, H., Weinert, N., & Dohrmann, A. B. (2013). Changes of soil bacterial diversity as a consequence of agricultural land use in a semi-arid ecosystem. *PLoS ONE*, 8(3), e59497.
- Dini-Andreote, F., Stegen, J. C., van Elsas, J. D., & Salles, J. F. (2015). Disentangling mechanisms that mediate the balance between stochastic and deterministic processes in microbial succession. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(11), E1326–E1332.
- Domeignoz-Horta, L. A., Spor, A., Bru, D., Breuil, M. C., Bizouard, F., Léonard, J., & Philippot, L. (2015). The diversity of the N₂O reducers matters for the

$\text{N}_2\text{O}:\text{N}_2$ denitrification end-product ratio across an annual and a perennial cropping system. *Frontiers in Microbiology*, 6, 971.

- Douglas, G. M., Maffei, V. J., Zaneveld, J. R., Yurgel, S. N., Brown, J. R., Taylor, C. M., ... & Langille, M. G. I. (2020). PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nature Biotechnology*, 38(6), 685–688.
- Fierer, N., Jackson, J. A., Vilgalys, R., & Jackson, R. B. (2005). Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 4117–4120.
- Foley, J. A., De Fries, R., Asner, G. P., Barford, C., Bonan, G., et al. (2005). Global consequences of land use. *Science*, 309(5734), 570–574.
- Guerrero, E. B., Marrero Díaz de Villegas, R., Soria, M. A., Paz Santangelo, M., Campos, E., & Talia, P. M. (2020). Characterization of two GH5 endoglucanases from termite microbiome using synthetic metagenomics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 8351–8366.
- Hamonts, K., Trivedi, P., Garg, A., Janitz, C., Grinyer, J., Holford, P., & Singh, B. K. (2018). Field study reveals core plant microbiota and relative importance of their drivers. *Environmental Microbiology*, 20(1), 124–140.
- Henckel, T., Roslev, P., & Conrad, R. (1999). Effects of O_2 and CH_4 on presence and activity of methanotrophic bacteria in rice field soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(1), 305–312.
- Henry, S., Bru, D., Stres, B., Hallet, S., & Philippot, L. (2006). Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5181–5189.
- Henry, S., Baudoin, E., López-Gutiérrez, J. C., Martin-Laurent, F., Brauman, A., & Philippot, L. (2004). Quantification of denitrifying bacteria in soils by nirK

gene targeted real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 59(3), 327–335.

- Hollister, E. B., Engledow, A. S., Hammett, A. J. M., Provin, T. L., Wilkinson, H. H., & Gentry, T. J. (2010). Shifts in microbial community structure along an ecological gradient of hypersaline soils and sediments. *ISME Journal*, 4, 829–838.
- Hou, Y., Zhang, H., Miranda, L., & Lin, S. (2010). Serious overestimation in quantitative PCR by circular (supercoiled) plasmid standard: microalgal *pcnA* as the model gene. *PLoS ONE*, 5, e9545.
- Hutchinson, G. L., & Livingston, G. P. (2001). Vents and seals in non-steady-state chambers used for measuring gas exchange between soil and the atmosphere. *European Journal of Soil Science*, 52, 675–682.
- Instituto Argentino de Normalización y Certificación. (2009). Calidad ambiental–Calidad del suelo. Pretratamiento de muestras de suelo de uso agropecuario para análisis físicos y químicos con secado en estufa.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). (2022). *Climate Change 2022: Impacts, Adaptation and Vulnerability* (Report No. WGII AR6). Cambridge University Press.
- Jackson, M. L. (1958). *Soil Chemical Analysis*. Prentice Hall.
- Jones, C. M., Graf, D. R., Bru, D., Philippot, L., & Hallin, S. (2013). The unaccounted yet abundant nitrous oxide-reducing microbial community: A potential nitrous oxide sink. *The ISME Journal*, 7(2), 417–426.
- Jones, C. M., Spor, A., Brennan, F. P., Breuil, M. C., & Bru, D. (2014). Recently identified microbial guild mediates soil N₂O sink capacity. *Nature Climate Change*, 4, 801.

- Keeney, D. R., & Nelson, D. W. (1982). Methods of soil analysis. Part 2: Chemical and microbiological properties. American Society of Agronomy, Soil Science Society of America.
- Khan, A., Wei, Y., Adnan, M., Ali, I., & Zhang, M. (2023). Dynamics of rhizosphere bacterial communities and soil physiochemical properties in response to consecutive ratooning of sugarcane. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1197246.
- Lammel, D. R., Feigl, B. J., Cerri, C. C., & Nüsslein, K. (2015). Specific microbial gene abundances and soil parameters contribute to C, N, and greenhouse gas process rates after land use change in Southern Amazonian soils. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1057.
- Le Mer, J., & Roger, P. (2001). Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: A review. *European Journal of Soil Biology*, 37(1), 25–50.
- 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*.
- Linnenluecke, M. K., Nucifora, N., & Thompson, N. (2018). Implications of climate change for the sugarcane industry. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Climate Change*, 9(1), e498.
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550.
- Lozupone, C., & Knight, R. (2005). UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8228–8235.

- Luton, P. E., Wayne, J. M., Sharp, R. J., & Riley, P. W. (2002). The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology*, 148(11), 3521–3530.
- Mandakovic, D., Rojas, C., Maldonado, J., Latorre, M., Travisany, D., Delage, E., ... & González, M. (2018). Structure and co-occurrence patterns in microbial communities under acute environmental stress reveal ecological factors fostering resilience. *Scientific Reports*, 8(1), 5875.
- Marin, F. R., & Carvalho, G. L. D. (2012). Spatio-temporal variability of sugarcane yield efficiency in the state of São Paulo, Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47, 149-156.
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, 17(1), 10–12.
- Martin, B. D., Witten, D., & Willis, A. D. (2020). Modeling microbial abundances and dysbiosis with beta-binomial regression. *Annals of Applied Statistics*, 14(1), 94–115. [Corncob package]
- McCargo, P. D., Ianonne, L. J., Soria, M., & Novas, M. V. (2020). Diversity of foliar endophytes in a dioecious wild grass and their interaction with the systemic Epichloë. *Fungal Ecology*, 47, 100945.
- Mikheenko, A., Saveliev, V., & Gurevich, A. (2016). MetaQUAST: evaluation of metagenome assemblies. *Bioinformatics*, 32(7), 1088–1090.
- Moneda, A. P. C., de Carvalho, L. A. L., Teheran-Sierra, L. G., Funniceili, M. I. G., & Pinheiro, D. G. (2022). Sugarcane cultivation practices modulate rhizosphere microbial community composition and structure. *Scientific Reports*, 12(1), 19174.

- Montecchia, M. S., Chalco Vera, J. E., Acreche, M. M., Fernández de Ullivarri, E., & Correa, O. S. (2017). Comunidad bacteriana desnitrificante y emisión de óxido nitroso en suelos de caña de azúcar con labranza convencional y reducida. XI Reunión Nacional Científico-Técnica de Biología de Suelos – REBIOS, Corrientes.
- Montecchia, M. S., Correa, O. S., Soria, M. A., Frey, S. D., Garcia, A. F., & Garland, J. L. (2011). Multivariate approach to characterizing soil microbial communities in pristine and agricultural sites in Northwest Argentina. *Applied Soil Ecology*, 47, 176–184.
- Montecchia, M. S., Tosi, M., Soria, M. A., Vogrig, J. A., Sydorenko, O., & Correa, O. S. (2015). Pyrosequencing reveals changes in soil bacterial communities after conversion of Yungas forests to agriculture. *PLoS ONE*, 10(3), e0119426.
- Moraes, M. T., Debiasi, H., Franchini, J. C., Bonetti, J. A., Levien, R., Schnepf, A., & Leitner, D. (2019). Soil compaction impacts soybean root growth in an Oxisol from subtropical Brazil. *Soil and Tillage Research*, 186, 152–161.
- National Center for Biotechnology Information. (2024). Identical Protein Groups. National Library of Medicine. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ipg>
- Nazaries, L., Murrell, J. C., Millard, P., Baggs, L., & Singh, B. K. (2013). Methane, microbes and models: fundamental understanding of the soil methane cycle for future predictions. *Environmental Microbiology*, 15, 2395–2417.
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., & Solymos, P. (2019). *vegan: Community Ecology Package* (Version 2.5–6). <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>

- Palm, C., Blanco-Canqui, H., DeClerck, F., Gatere, L., & Grace, P. (2014). Conservation agriculture and ecosystem services: An overview. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 187, 87–105.
- Paradis, E., & Schliep, K. (2018). ape 5.0: An environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics*, 35(3), 526–528.
- Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2015). CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Research*, 25(7), 1043–1055.
- Pasolli, E., Truong, D. T., Malik, F., Waldron, L., & Segata, N. (2016). Machine learning meta-analysis of large metagenomic datasets: Tools and biological insights. *PLoS Computational Biology*, 12(7), e1004977.
- Pedregosa, F., Varoquaux, G., Gramfort, A., Michel, V., Thirion, B., Grisel, O., ... & Duchesnay, É. (2011). Scikit-learn: Machine learning in Python. *Journal of Machine Learning Research*, 12, 2825–2830.
- Philippot, L., & Hallin, S. (2005). Finding the missing link between diversity and activity using denitrifying bacteria as a model functional community. *Current Opinion in Microbiology*, 8(3), 234–239.
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., & R Core Team. (2023). nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-162. <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>
- Powlson, D. S., Gregory, P. J., Whalley, W. R., Quinton, J. N., Hopkins, D. W., Whitmore, A. P., Hirsch, P. R., & Goulding, K. W. T. (2011). Soil management in relation to sustainable agriculture and ecosystem services. *Food Policy*, 36, S72–S87.

- Prévost-Bouré, N. C., Christen, R., Dequiedt, S., Mougél, C., Lelièvre, M., Jolivet, C., ... & Ranjard, L. (2011). Validation and application of a PCR primer set to quantify fungal communities in the soil environment by real-time quantitative PCR. *PloS ONE*, 6(9), e24166.
- Rice, P., Longden, I., & Bleasby, A. (2000). EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics*, 16(6), 276–277.
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 43(7), e47.
- Romero Victorica, M., Soria, M. A., Batista Garcia, R. A., Ceja-Navarro, J. A., Vikram, S., Ortiz, M., ... & Talia, P. M. (2020). Neotropical termite microbiomes as sources of novel plant cell wall degrading enzymes. *Scientific Reports*, 10, 3864.
- Rotthauwe, J. H., Witzel, K. P., & Liesack, W. (1997). The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12), 4704–4712.
- R Core Team. (2025). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Schwartz, S. L., Momper, L., Rangel, L. T., Magnabosco, C., Amend, J. P., & Fournier, G. P. (2022). Novel nitrite reductase domain structure suggests a chimeric denitrification repertoire in the phylum Chloroflexi. *MicrobiologyOpen*, 11(1), e1258.

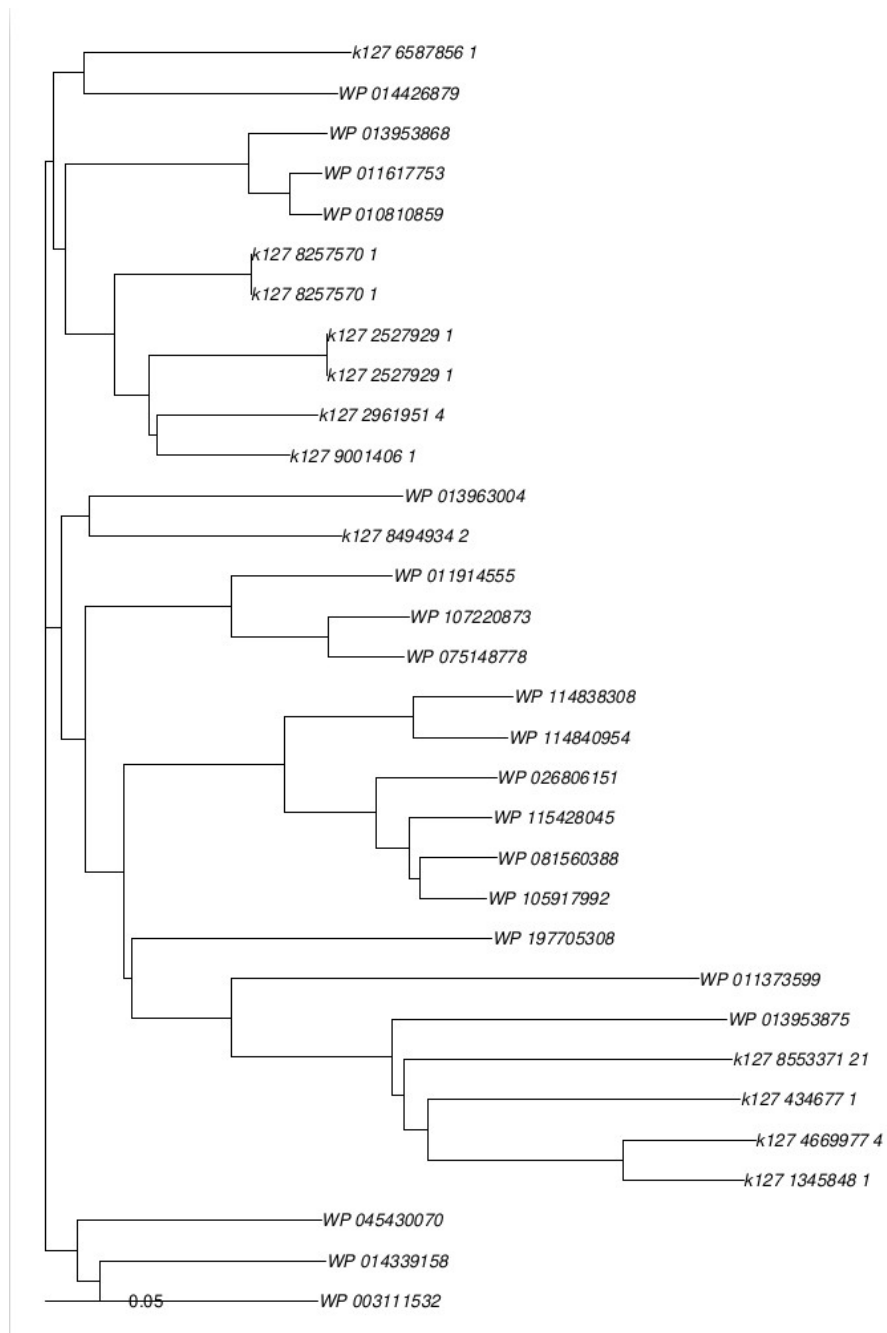
- Seqtk (2023). Seqtk: a fast and lightweight tool for processing sequences in the FASTA or FASTQ format. GitHub repository. <https://github.com/lh3/seqtk>
- Semenov, M. V. (2021). Metabarcoding and metagenomics in soil ecology research: Achievements, challenges, and prospects. *Biology Bulletin Reviews*, 11, 40–53.
- Serrano-Silva, N., Sarria-Guzmán, Y., Dendooven, L., & Luna-Guido, M. (2014). Methanogenesis and methanotrophy in soil: A review. *Pedosphere*, 24(3), 291–307.
- Setubal, J. C. (2021). Metagenome-assembled genomes: Concepts, analogies, and challenges. *Biophysical Reviews*, 13, 905–909.
- Steinberg, L. M., & Regan, J. M. (2008). Phylogenetic comparison of the methanogenic communities from an acidic, oligotrophic fen and an anaerobic digester treating municipal wastewater sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(21), 6663–6671.
- Smith, K. A., Ball, T., Conen, F., Dobbie, K. E., Massheder, J., & Rey, A. (2003). Exchange of greenhouse gases between soil and atmosphere: Interactions of soil physical factors and biological processes. *European Journal of Soil Science*, 54, 779–791.
- Smith, K. A., Ball, T., Conen, F., Dobbie, K. E., Massheder, J., & Rey, A. (2018). Exchange of greenhouse gases between soil and atmosphere: Interactions of soil physical factors and biological processes. *European Journal of Soil Science*, 69(1), 10–20.
- Soil Conservation Service USDA. (1972). Soil survey laboratory methods and procedures for collecting soil samples. U.S. Government Printing Office.

- Tesouro, M. O., Roba, M. A., Fernández de Ullivarri, E., Neiman, O. E., D'amico, J. P., Vallejo, J., & Donato, L. B. (2015a). Avances en el desarrollo de una alternativa tecnológica para la implantación de la caña de azúcar. *Ciencia y Tecnología de los Cultivos Industriales*, 5(7), 95–107.
- Tesouro, M. O., Roba, M. A., Romito, A., Fernández de Ullivarri, E., Donato, L., & Neiman, O. E. (2015b). Cultivo de caña en Famaillá: Estudio de caso. Parte 3: Requerimiento energético y consumo de combustible en su implantación (Informe Técnico N° 27). INTA.
- Throbäck, I. N., Enwall, K., Jarvis, A., & Hallin, S. (2004). Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiology Ecology*, 49, 401–417.
- Tosi, M. (2017). Aspectos estructurales y funcionales de las comunidades microbianas del suelo en una cronosecuencia de uso agrícola del pedemonte de Yungas [Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires].
- Tosi, M., Correa, O. S., Soria, M. A., Vogrig, J. A., Sydorenko, O., & Montecchia, M. S. (2016). Land-use change affects the functionality of soil microbial communities: A chronosequence approach in the Argentinian Yungas. *Applied Soil Ecology*, 108, 118–127.
- Vu, V. Q. (2011). ggbiplot: A ggplot2 based biplot. GitHub repository. <https://github.com/vqv/ggbiplot>
- Wei, T., & Simko, V. (2021). corrplot: Visualization of a Correlation Matrix. R package version 0.92. <https://cran.r-project.org/package=corrplot>
- Wemheuer, F., Taylor, J. A., Daniel, R., Johnston, E., Meinicke, P., Thomas, T., & Wemheuer, B. (2020). Tax4Fun2: Prediction of habitat-specific functional

profiles and functional redundancy based on 16S rRNA gene sequences. *Environmental Microbiome*, 15, 1–12.

- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant graphics for data analysis*. Springer.
- Wu, Y. W., Tang, Y. H., Tringe, S. G., Simmons, B. A., & Singer, S. W. (2014). MaxBin: An automated binning method to recover individual genomes from metagenomes using an expectation-maximization algorithm. *Microbiome*, 2, 26.
- Zeman, E. A. (2019). *Resumen agrometeorológico: Abril 2019*. Observatorio Agrometeorológico, INTA EEA Famaillá.

7. Anexo



FA1: Árbol filogenético de secuencias de proteínas tipo *nirS* recuperadas del metaproteoma, comparadas con secuencias de referencia funcional del grupo *Identical protein groups* (NCBI). Las secuencias que comienzan con “k” son las propias y el resto del NCBI.

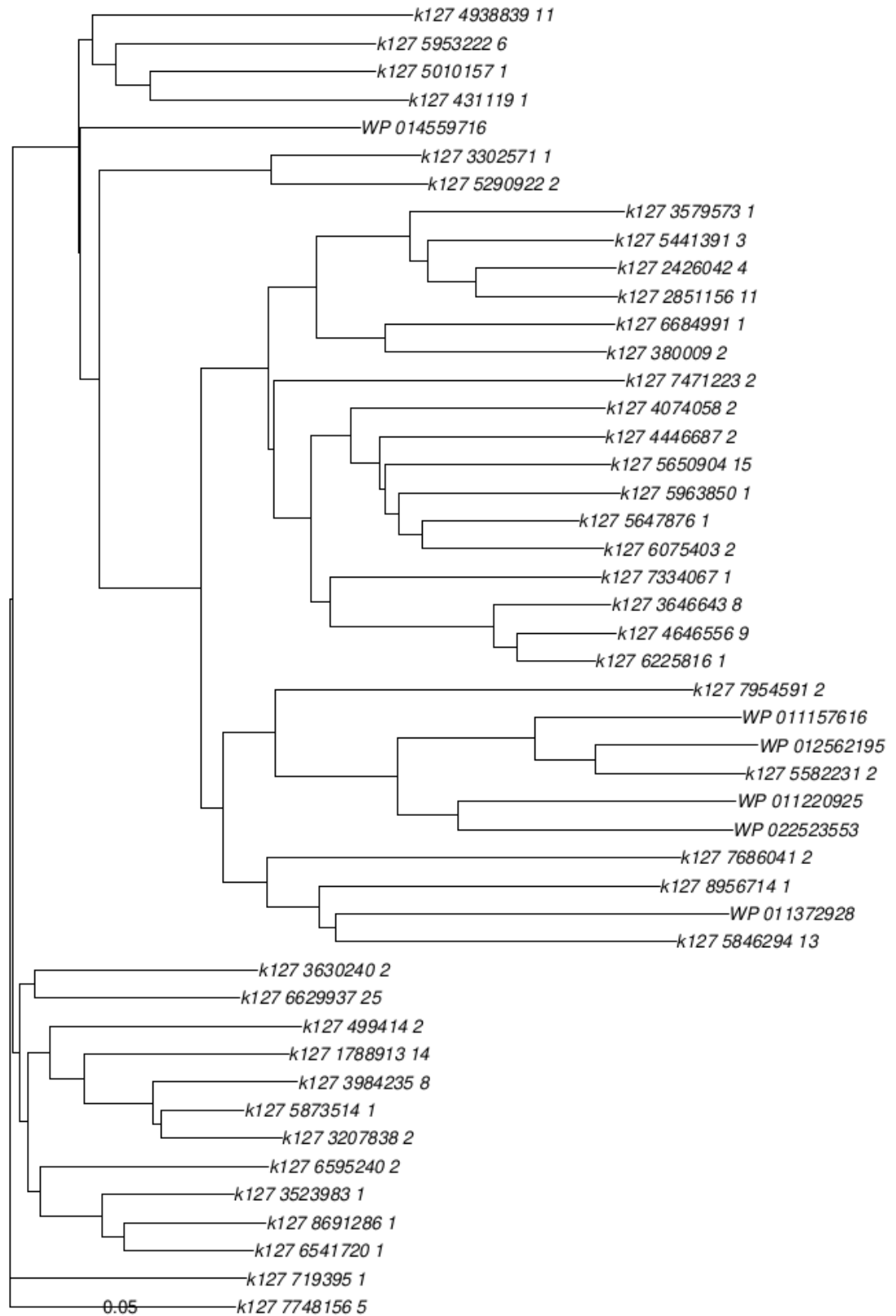


Figura A2. Árbol filogenético de secuencias anotadas como *nosZ* en el metaproteoma ensamblado, comparadas con secuencias de referencia funcional del grupo *Identical protein groups* (NCBI). Las secuencias que comienzan con “k” son las propias y el resto del NCBI.

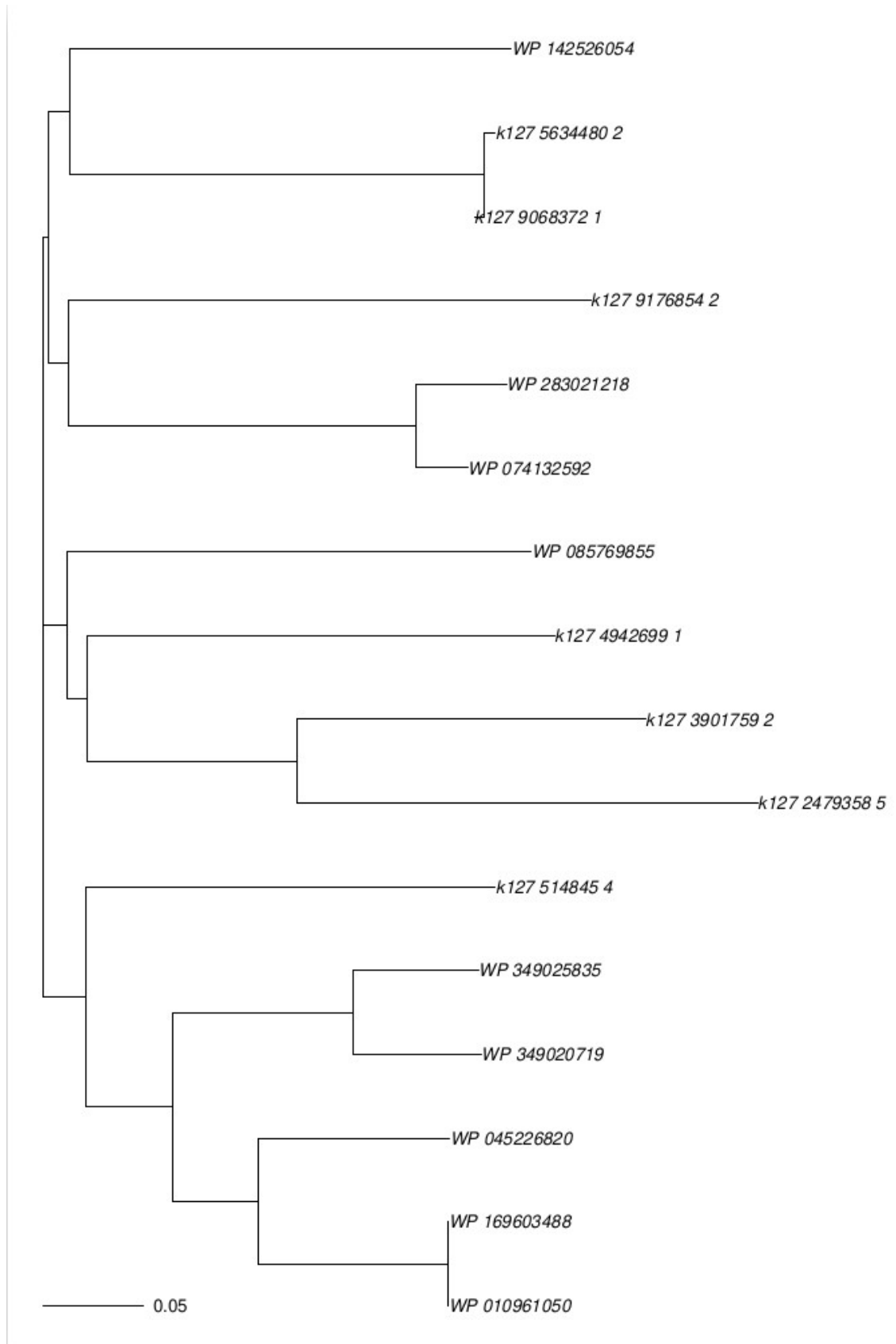


Figura A3. Relación filogenética de secuencias identificadas como *amoA* en el metaproteoma, comparadas con secuencias de referencia funcional del grupo *Identical protein groups* (NCBI). Las secuencias que comienzan con “k” son las propias y el resto del NCBI.

