UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

Efecto de la aplicación de biol sobre los cambios taxonómicos y funcionales del microbioma de la rizósfera del palto: Perspectivas desde el análisis de *shotgun metagenomics*

Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Ambiental

Autores

MARIA BELEN BALTA BLANCO

ALEN MIRKO ZIMIC SHEEN

Asesor

Dr. LUIS JULIO CESAR DE STEFANO BELTRAN

Co-Asesor

Dr. MIRKO JUAN ZIMIC PERALTA

Lima, Perú

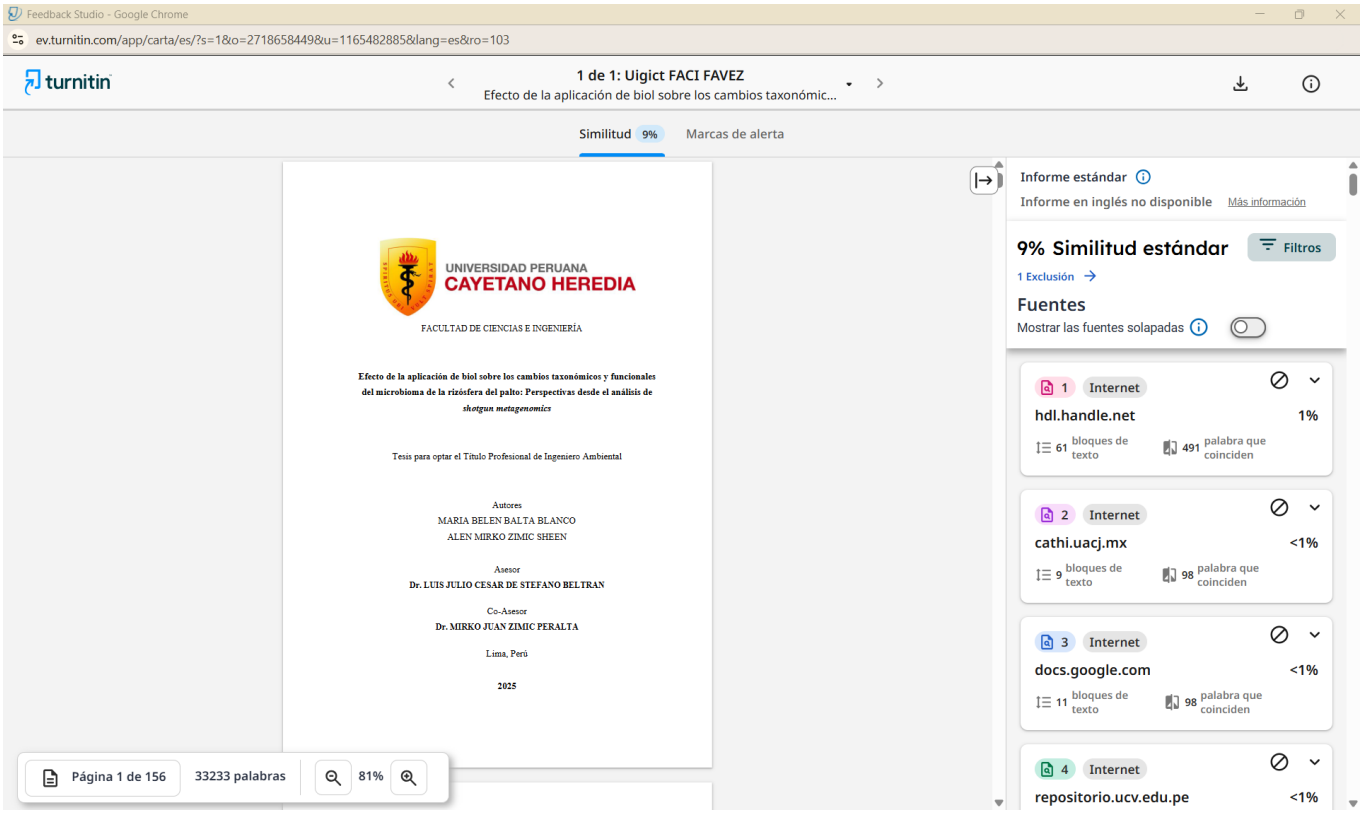
2025

Jurado calificador

Presidente: Mg. VICTOR ALBERTO HUANAMBAL SOVERO

Vocal: Dr. OSCAR ENRIQUE AGUINAGA VARGAS

Secretario: Mg. PAMELA MARUJA OBANDO CHAVEZ


Feedback Studio - Google Chrome
ev.turnitin.com/app/carta/es/?s=1&o=2718658449&u=1165482885&lang=es&ro=103
turnitin
1 de 1: Uigict FACI FAVEZ
Efecto de la aplicación de biol sobre los cambios taxonómic...
Similitud 9%
Marcas de alerta
UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA
Efecto de la aplicación de biol sobre los cambios taxonómicos y funcionales del microbioma de la rizósfera del palto: Perspectivas desde el análisis de shotgun metagenomics
Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Ambiental
Autores
MARIA BELEN BALTA BLANCO
ALEN MIRKO ZIMIC SHEEN
Asesor
Dr. LUIS JULIO CESAR DE STEFANO BELTRAN
Co-Asesor
Dr. MIRKO JUAN ZIMIC PERALTA
Lima, Perú
2025
Página 1 de 156
33233 palabras
81%
Informe estándar
Informe en inglés no disponible
Más información
9% Similitud estándar
Filtros
1 Exclusión
Fuentes
Mostrar las fuentes solapadas
1 Internet
hdl.handle.net
1%
61 bloques de texto
491 palabra que coinciden
2 Internet
cathi.uacj.mx
<1%
9 bloques de texto
98 palabra que coinciden
3 Internet
docs.google.com
<1%
11 bloques de texto
98 palabra que coinciden
4 Internet
repositorio.ucv.edu.pe
<1%

ÍNDICE

RESUMEN Pág 01

ABSTRACT Pág 02

I. **INTRODUCCIÓN** Pág 03

1.1. Desafíos globales y las limitaciones de la agricultura intensiva Pág 03

1.1.1 Alteraciones causadas por prácticas agrícolas Pág 03

1.1.2 Inducción de condiciones adversas en el suelo por la dependencia de fertilizantes químicos Pág 04

1.1.3 Efectos de los fertilizantes químicos en la microbiota del suelo Pág 07

1.1.4 Estados fenológicos del palto Hass y requerimientos nutricionales Pág 08

1.1.5 Interacciones planta-microbioma y su rol en la salud y funcionalidad del suelo Pág 10

1.2 Enmiendas orgánicas y agricultura sostenible Pág 12

1.2.1 Fuentes de enmiendas orgánicas Pág 12

1.2.2 Biol: definición y método de obtención Pág 13

1.2.3 Impacto de los biofertilizantes en las propiedades nutricionales y fisicoquímicas del suelo Pág 14

1.2.4 Impacto de los biofertilizantes en la estructura y diversidad de las comunidades microbianas en la rizósfera Pág 17

1.2.5 Técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS) y metagenómica *shotgun* para evaluar la diversidad taxonómica y funcional del suelo Pág 20

II. **JUSTIFICACIÓN** Pág 22

III. **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN** Pág 23

IV. **HIPÓTESIS** Pág 23

V. **OBJETIVOS** Pág 24
5.1 Objetivo General Pág 24
5.2 Objetivos Específicos Pág 24
VI. **MATERIALES Y MÉTODOS** Pág 26
6.1 Tipo de estudio Pág 26
6.2 Área de estudio Pág 26
6.3 Actividades Pág 27
6.3.1 Diseño experimental Pág 27
6.3.1.1 Descripción del biofertilizante Pág 27
6.3.1.2 Delimitación de tratamientos y muestreo de suelo Pág 28
6.3.2 Medición de nutrientes en el suelo y la savia del pecíolo y estimación de las propiedades químicas Pág 33
6.3.3 Extracción del ADN del suelo y del biofertilizante Pág 35
6.3.4 Purificación y secuenciación metagenómica *shotgun* de ADN Pág 35
6.3.5 Procesamiento y anotación de secuencias metagenómicas Pág 35
6.3.6 Análisis de la información Pág 37
6.3.6.1 Operacionalización de variables Pág 37
6.3.6.2 Análisis Estadístico Pág 39
VII **RESULTADOS** Pág 41
7.1 Riqueza de especies Pág 41
7.2 Índices alfa – diversidad de Shannon y Simpson Pág 42
7.3 Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) Pág 45
7.4 Abundancias relativas de especies Pág 47
7.5 Análisis de abundancia diferencial de especies con DESeq2 Pág 55

7.6 Cambio en el tiempo de lecturas normalizadas de especies y géneros microbianos enriquecidos Pág 60
7.7 Identificación de los clústeres de genes ortólogos (COGs) en los metagenomas de la rizósfera Pág 63
7.8 Análisis CCA (*Canonical Correlation Analysis*) Pág 65
7.9 Concentración de iones biodisponibles (NO_3^-, Ca^{2+}, K^+ y Na^+) en muestras de savia vegetal y suelo rizosférico de palto Pág 67
7.10 Concentración de parámetros edáficos en muestras de suelo rizosférico de palto Pág 70
VIII **DISCUSIÓN** Pág 71
8.1 Análisis de biodiversidad Pág 71
8.2 Análisis de agrupamiento y estructura microbiana Pág 72
8.3 Análisis taxonómico Pág 73
8.4 Análisis de enriquecimiento diferencial de especies Pág 75
8.5 Identificación y cuantificación de categorías funcionales asociadas a clústeres genéticos en los metagenomas Pág 81
8.6 Correlaciones entre perfiles metagenómicos y parámetros fisicoquímos del suelo Pág 84
8.7 Cambios en la composición microbiana microbiana del biol previo a su aplicación Pág 88
IX **CONCLUSIONES** Pág 91
X **LIMITACIONES** Pág 92
XI **RECOMENDACIONES** Pág 93
XII **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS** Pág 94
ANEXOS Pág 113

RESUMEN

Este estudio evaluó el impacto de la aplicación de biol sobre la diversidad y función microbiana en la rizósfera del palto (*Persea americana* var. Hass). Para ello, se emplearon diferentes volúmenes de biol (0, 0,75, 3 y 6 L/planta) en un ensayo de campo en el fundo Maquinaria Agrícola San José, El Carmen, Chincha, Ica. Las muestras de suelo rizosférico se recolectaron en tres momentos (línea base, 24 horas y 10 días tras la aplicación), y se secuenciaron mediante metagenómica *shotgun* de Oxford Nanopore para identificar la composición taxonómica y funcional. A las 24 h, el índice de diversidad de Shannon disminuyó de 4,31 ± 0,05 a 4,0 ± 0,04 ($p<0,01$), y la estructura comunitaria mostró diferencias significativas (PERMANOVA, $p<0,001$). A los 10 días, la diversidad se restableció a niveles cercanos a la línea base, indicando una respuesta transitoria. La abundancia de arqueas nitrificantes, como *Candidatus Nitrososphaera evergladensis* y N*itrososphaera viennensis*, aumentó en 120 y 150 lecturas normalizadas ($p<0,001$), respectivamente, 24h después del tratamiento. Las funciones relacionadas con transporte y metabolismo de aminoácidos, así como procesos de transcripción, variaron significativamente ($p<0,05$), reflejando cambios funcionales temporales. La correlación canónica (CCA) reveló que la composición microbiana se asoció con el calcio disponible en savia vegetal y el contenido de carbono orgánico total del suelo (reducción de 2,0% a 1,5% entre línea base y 24h; $p<0,05$). Estos hallazgos indican que el biol alteró inicialmente la comunidad microbiana hacia taxones copiótrofos y nitrificantes, promoviendo funciones metabólicas específicas. La aplicación de biol generó cambios temporales en la diversidad, estructura y función del microbioma rizosférico del palto Hass, modulados por la disponibilidad de nutrientes y condiciones edáficas, lo que sienta las bases para estrategias más sostenibles de manejo nutricional en cultivos frutales peruanos de importancia agroexportadora.

Palabras clave: biofertilizante, secuenciación metagenómica, agricultura sostenible, microbioma del suelo, genes funcionales, *Persea americana*

ABSTRACT

This study evaluated the impact of biol application on microbial diversity and function in the rhizosphere of avocado (Persea americana var. Hass). For this purpose, different volumes of biol (0, 0.75, 3 and 6 L/plant) were used in a field trial at the Maquinaria Agrícola San José farm, El Carmen, Chincha, Ica. Rhizospheric soil samples were collected at three time points (baseline, 24 h and 10 days after application), and sequenced by Oxford Nanopore shotgun metagenomics to identify taxonomic and functional composition. At 24 h, Shannon's diversity index decreased from 4.31 ± 0.05 to 4.0 ± 0.04 ($p<0.01$), and community structure showed significant differences (PERMANOVA, $p<0.001$). At 10 days, diversity was restored to near baseline levels, indicating a transient response. The abundance of nitrifying archaea, such as Candidatus Nitrososphaera evergladensis and Nitrososphaera viennensis, increased by 120 and 150 normalized readings ($p<0.001$), respectively, 24h after treatment. Functions related to amino acid transport and metabolism, as well as transcription processes, varied significantly ($p<0.05$), reflecting temporal functional changes. Canonical correlation (CCA) revealed that microbial composition was associated with available calcium in plant sap and total soil organic carbon content (reduction from 2.0% to 1.5% between baseline and 24h; $p<0.05$). These findings indicate that biol initially altered the microbial community towards coprotrophic and nitrifying taxa, promoting specific metabolic functions. The application of biol generated temporal changes in the diversity, structure and function of the rhizospheric microbiome of Hass avocado, modulated by nutrient availability and edaphic conditions, which lays the foundation for more sustainable nutritional management strategies in Peruvian fruit crops of agroexport importance.

Keywords: biofertilizer, metagenomics sequencing, sustainable agriculture, soil microbiome, functional genes, *Persea americana*

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Desafíos globales y las limitaciones de la agricultura intensiva

1.1.1 Alteraciones causadas por prácticas agrícolas

La agricultura mundial ha experimentado una verdadera revolución en los últimos 60 años. Sus éxitos se pueden apreciar en la capacidad de alimentar a una población mundial cada vez mayor. Así, desde el año 1960, la población mundial se ha incrementado en alrededor de 2,8 veces, desde los 2,980 millones hasta los 8,200 millones estimados para finales del 2024, con proyecciones que estiman cerca de 9,7 mil millones para 2050 [1]. Del mismo modo, el suministro diario de calorías per cápita promedio en el mundo ha aumentado en un 20%, desde 2360 kcal a mediados de los 60's hasta la actual 2800 kcal. Pero donde este aumento ha sido más dramático es en países como China que registra un incremento de 142% desde 1400 kcal en el año 1963 hasta 3400 kcal en el 2022 [2].

A pesar de estos logros, la agricultura tiene desafíos aún mayores. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, ONUAA, se requiere aumentar la producción de alimentos un 70% entre 2005 y 2050 para alcanzar la seguridad alimentaria mundial [2]. El aumento demográfico y el consumo calórico de la población mundial han incrementado la presión sobre la cadena de producción de cultivos alimentarios, lo que ha dado lugar a una mayor intensificación de prácticas agrícolas y al sometimiento del suelo a distintos tipos de perturbaciones antropogénicas, desde el uso excesivo de fertilizantes y pesticidas hasta técnicas de laboreo [3]. La necesidad mundial de alimentar a la creciente demanda ha dado paso no solo a un cambio de uso del suelo para incrementar las superficies de cultivos, sino particularmente a la tecnificación de las labores agrícolas tradicionales en una agricultura intensiva que permite aumentar considerablemente el rendimiento vegetal sin aumentar el área terrestre dedicada a actividades productivas [4]. Aunque la población mundial casi se triplicó entre 1950 y 2015, pasando de 2,5 a 7,3 millones de personas, la expansión de la superficie agrícola sobre el suelo global libre de hielo fue mínima, aumentando solo del 9,2% al 12,2%, mientras que la producción de cereales experimentó un aumento sustancial de casi un 400% entre 1961 y 2016, creciendo de 0,74 Gt a 2,9 Gt durante este periodo [2].

Como parte de la llamada "Revolución Verde", se produjo la intensificación de la producción debido principalmente a genotipos vegetales mejorados, fertilizantes y pesticidas [5]. Los fertilizantes químicos son de las tecnologías disruptivas más

importantes que permitieron obtener una mayor producción por unidad de superficie y evitar la expansión continua de la superficie de tierras cultivables [2], pero estas medidas tuvieron como consecuencia la aparición o intensificación de procesos degradativos del suelo. Se conoce que la aplicación excesiva de fertilizantes químicos perturba el equilibrio ecológico del suelo al afectar negativamente sobre las propiedades físicas y químicas de este e influir en la disponibilidad de nutrientes, dando lugar a problemas de acidificación y dureza, disminuyendo la cantidad de materia orgánica y la fertilidad general del suelo [5].

La degradación del suelo agrícola se manifiesta en tres dimensiones clave: la física, la química y la biológica. La degradación física implica un deterioro en la estructura del suelo, como el aumento de la compactación y los problemas de drenaje, así como procesos de lixiviación/volatilización; la degradación química se relaciona con procesos de acidificación o alcalinización debido a cambios en la concentración de sales y la acumulación de metales pesados u otros contaminantes, y finalmente, la degradación biológica está asociada con la pérdida de la materia orgánica del suelo, el aumento de la erosión de la capa vegetal natural orgánica y la eutrofización de acuíferos por fenómenos de escorrentía [4].

La intensificación actual de las prácticas agrícolas está provocando una degradación insostenible de los suelos, provocando la disminución en su capacidad a largo plazo para proporcionar servicios ecosistémicos a los seres humanos, incluida la producción futura de alimentos para una población todavía en expansión [5]. Es imperativo que se priorice la calidad de los suelos y se introduzcan prácticas agrícolas sostenibles que permitan que los suelos operen dentro de los límites de los ecosistemas gestionados agrícolas para mantener la productividad de plantas y animales, y mantener o mejorar la calidad del agua y del aire. Uno de los principales retos de la sostenibilidad agrícola es conservar la prestación de servicios ecosistémicos al tiempo que se optimiza el rendimiento agrícola [5].

1.1.2. Inducción de condiciones adversas en el suelo por la dependencia de fertilizantes químicos

Debido al uso desequilibrado e inadecuado de fertilizantes químicos, especialmente en lo que respecta a los nitrogenados y fosfatados, la capacidad de funcionamiento de muchos suelos productivos se ha visto mermada, como demuestran los indicadores químicos,

físicos y biológicos [3]. La aplicación intensiva y prolongada de fertilizantes químicos, especialmente los nitrogenados, es una de las principales causas de la lixiviación de nitrógeno a través del suelo hacia la roca madre profunda, un proceso que conduce a la pérdida significativa de nutrientes esenciales para las plantas y a la contaminación de la napa freática subterránea [3, 18].

Los fertilizantes nitrogenados, cuando son aplicados en exceso, son descompuestos por los microorganismos del suelo en formas solubles de nitrógeno, como el nitrato(NO_3^-) y el nitrito (NO_2^-), los cuales, al ser altamente móviles, percolan hacia las capas más profundas y tienen a formar compuestos tóxicos como nitrosaminas [5].

Se estima que los fertilizantes químicos nitrogenados tienen una eficiencia de uso de nutrientes (la eficiencia con la que las plantas absorben los nutrientes) por debajo del 30% [6], debido a su alta solubilidad, lo que provoca pérdidas sustanciales no solo a través de mecanismos como la lixiviación hacia aguas subterráneas, sino también a través de fenómenos como la volatilización a la atmósfera en forma de amoníaco, la reacción con otros compuestos orgánicos en el suelo y la escorrentía superficial [6]. Estos procesos no solo reducen la eficacia de los fertilizantes, sino que también contribuyen a la contaminación de las fuentes de agua y a la liberación de gases de efecto invernadero, lo que agrava el cambio climático y, a su vez, afecta la producción agrícola mediante una disminución a largo plazo de los rendimientos de los cultivos y un aumento en la frecuencia de eventos meteorológicos extremos [7].

Una investigación de Skorupka y Nosal [8] demostró que las prácticas agrícolas son responsables del 80-95% de las emisiones totales de amoniaco a la atmósfera, siendo la fertilización con nitrógeno mineral la responsable del 19-20,3% de las emisiones totales de amoniaco atribuidas a la agricultura [3]. La volatilización del amoníaco se produce cuando los fertilizantes nitrogenados, como la urea, son convertidos en amoníaco gaseoso y liberados a la atmósfera, especialmente bajo condiciones de pH elevado y alta temperatura. Estas emisiones pueden reaccionar con otros contaminantes, como óxidos de nitrógeno y dióxido de azufre, formando partículas finas (PM2.5) que afectan la calidad del aire y a la salud humana [9, 10, 11]. Además de las pérdidas por volatilización de amoniaco, la aplicación de fertilizantes nitrogenados contribuye de manera notable a las emisiones de óxido nitroso, un gas de efecto invernadero que es 298 veces más potente en términos de potencial de calentamiento en comparación al dióxido de carbono [2]. Se

le puede atribuir a los suelos agrícolas con la responsabilidad del 50% del flujo antropogénico mundial total de óxidos nitrosos hacia la atmósfera, y se conoce que existe una correlación entre incremento de la aplicación de fertilizantes nitrogenados con la tasa de emisión de óxido nitroso de los campos agrícolas [2].

Debido a fenómenos como la erosión, acidificación, salinización, contaminación y compactación, se estima que alrededor de un tercio de los suelos a nivel global presentan grados moderados o graves de degradación. En términos agrícolas, alrededor de la mitad de las tierras cultivables presentan deterioro significativo, lo que afecta la capacidad productiva y conlleva pérdidas globales estimadas en 400,000 millones de dólares anuales [12]. Si no se toman medidas para mitigar esta tendencia, se estima que en los próximos 25 años la degradación del suelo podría reducir la producción de alimentos en un 12%, con un consecuente incremento en el 30% de los costos [12]. La intensificación de las prácticas agrícolas modernas ha acelerado la mineralización y la pérdida de las capas de materia orgánica de los suelos (horizontes A y B) [13, 14]. Se sabe que una buena capa de materia orgánica actúa como depósito de carbono y otros nutrientes, mejora la infiltración del agua, favorece la capacidad de intercambio iónico y mantiene una adecuada agregación de minerales [5]. No obstante, prácticas agrícolas como el arado continuo y el excesivo uso de fertilizantes químicos han reducido las reservas de carbono del suelo entre un 30 y 60%, lo que ha provocado la liberación de dióxido de carbono, un gas de efecto invernadero comúnmente asociado al cambio climático antropogénico [2, 5, 15]. Las estimaciones indican que desde 1860 hasta 2010 se liberaron 50 Gt de CO_2 debido a la mineralización de carbono del suelo [2].

Además, la acidificación del suelo, principalmente vinculada al uso excesivo de fertilizantes nitrogenados, está agravando la degradación. Este proceso reduce el pH del suelo a través de la conversión de amonio en nitrato, incrementa las concentraciones de metales solubles fitotóxicos como el aluminio e interfiere en la elongación y el desarrollo de las raíces [13, 14]. El aluminio se une a las paredes celulares y afecta el transporte de macronutrientes como el calcio y el magnesio, exacerbando las deficiencias nutricionales adicionales en las plantas [14]. Adicionalmente, a largo plazo, la solubilización de aluminio y hierro causada por el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados puede reaccionar con el fósforo, formando compuestos insolubles y fijando o inmovilizando el fósforo en el suelo, disminuyendo su biodisponibilidad para las plantas [13, 14]. De esta

manera, se agrava la dependencia de los agricultores hacia los fertilizantes químicos, creando un ciclo de retroalimentación positiva de degradación del suelo, donde se necesita añadir cada vez más insumos químicos para mantener los niveles de producción. Se estima que el 30% de los suelos superficiales globales son ácidos, afectando gravemente la productividad agrícola [2]. En China, el pH de los suelos ha disminuido entre 0,13 y 0,80 unidades desde la década de 1980, mientras que, en Australia, alrededor de 13,3 millones de hectáreas dedicadas al cultivo de trigo se ven afectadas por la acidificación, lo que provoca pérdidas anuales de 400 millones de dólares [2].

1.1.3. Efectos de los fertilizantes químicos en la microbiota del suelo

Los fertilizantes químicos ocasionan perturbaciones sobre la abundancia de la microbiota, su composición y viabilidad, generando que algunos microorganismos se vuelvan funcionalmente redundantes, metabólicamente activos y resilientes a las condiciones cambiantes de un entorno más ácido [3]. Hay evidencia creciente de que los procesos productivos agrícolas intensivos reducen significativamente la complejidad de las cadenas tróficas del suelo al disminuir la biomasa de la fauna del suelo y la biodiversidad, comprometiendo la resiliencia de estos agrosistemas a largo plazo [2].

En el estudio de Zhang et al. (2022), se demostró que la aplicación de fertilizantes químicos afectó la diversidad y composición microbiana del suelo en el ecosistema agrícola arenoso, y que tuvo un impacto más pronunciado sobre la comunidad bacteriana del suelo en comparación con la comunidad fúngica [16], reflejando diferentes estrategias de adaptación en el agrosistema arenoso. Los fertilizantes químicos redujeron la diversidad bacteriana debido a la disminución del pH del suelo, causada por la nitrificación del amonio, lo que genera iones de hidrógeno y aumenta la acidez. Esta acidificación del suelo afecta directamente la actividad microbiana, limitando el crecimiento de ciertos taxones bacterianos [16]. Se notó una disminución de Firmicutes y Bacteroidetes con la aplicación de fertilizantes químicos, y un enriquecimiento de Chloroflexi y Gemmatimonadetes, bacterias oligotróficas que descomponen la materia orgánica. Los índices de biodiversidad de Shannon y Chao fueron más bajos para los tratamientos con fertilizantes químicos en comparación con los tratamientos sin

fertilización, con los tratamientos de estiércol y aquellos que combinaron estiércol con fertilizantes químicos [16].

El estudio realizado por Lian et al. (2022) analizó cómo la aplicación prolongada de estiércol (2,500, 60,000 y 42,000 kg por hectárea por año) y de fertilizantes inorgánicos (150, 276 y 300 kg de nitrógeno por hectárea por año) afectan la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas del suelo en tres tipos de suelos: Phaeozem, Cambisol y Acrisol [17].

Los resultados mostraron que el uso exclusivo de fertilizantes inorgánicos o la ausencia de fertilización reducen significativamente la abundancia de bacterias en comparación con el uso de estiércol. En suelos tratados con fertilizantes inorgánicos, el número de copias del gen 16S rRNA fue entre 1 y 4 veces menor en Phaeozem, 9 veces menor en Cambisol y entre 5.6% y 15.9% menor en Acrisol, en comparación con los suelos tratados con estiércol [17].

Respecto a la composición microbiana, los fertilizantes nitrogenados redujeron significativamente la presencia de Acidobacteria e incrementaron la abundancia de Anaerolineae, mientras que los tratamientos con estiércol aumentaron significativamente la presencia de Erysipelotrichia y disminuyeron Acidobacteria [17].Los autores correlacionaron la abundancia de Acidobacteria con el pH, destacando que existe una relación inversa entre acidez del suelo y la abundancia de acidobacterias. Sugieren que la adición de estiércol a los fertilizantes sintéticos que conlleva al aumento significativo de Acidobacteria se debe a la mitigación de la acidez del suelo por parte de la enmienda orgánica. En comparación a suelos solo tratados con fertilizantes químicos, la aplicación de estiércol aumentó significativamente la abundancia de Acidobacteria y Planctomycetes [17].

1.1.4 Estados fenológicos del palto Hass y requerimientos nutricionales

El Perú se ha situado en los últimos años como el tercer exportador mundial del palto o aguacate (*Persea americana*) de la variedad “Hass”, una fruta de muy alta demanda a nivel mundial. Según la Asociación de Productores de Palta Hass del Perú (ProHass), se

produjeron en la campaña de julio de 2023 casi 600,000 toneladas de palto de las cuales el 97% fueron de la variedad Hass [18], valoradas en US $7350 millones en total [19]. Este monto representa un aumento mayor del 24,2% con respecto a las 483,017 toneladas exportadas en la campaña agrícola del 2021 y a un aumento de más de 30% en comparación a la campaña del 2020 [20].

A noviembre de 2022, en nuestro país hay 60,091 hectáreas de palta Hass sembradas, lo que significa un aumento del 19% en comparación a las 50,699 hectáreas reportadas en el año 2021 [20]. En los últimos 5 años se ha prácticamente duplicado la extensión de área de palto Hass sembrada (tanto en producción como en crecimiento), al pasar de 33,964 hectáreas en 2018 a 60,132 hectáreas a inicios del 2023. Este crecimiento en extensión representó entre el 30 y 40% del crecimiento mundial de palta Hass [3]. Según el Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (MIDAGRI), en lo que va del 2024 el Perú continúa afianzando su posición como el segundo mayor exportador de palta a nivel mundial hacia los mercados europeos, asiáticos y americano [21].
La relevancia económica de este cultivo demanda un manejo nutricional preciso para asegurar una productividad óptima y diluir los efectos de alternancia productiva (alternancia heterogénea entre años de alta productividad y años de baja productividad). Para alcanzar volúmenes rentables en la cosecha del cultivo de la *Persea americana*, este manejo debe centrarse en promover un crecimiento vegetativo y radicular adecuado [22]. Los árboles de la variedad "Hass" típicamente exhiben una estructura de copa redondeada, resultado del crecimiento equilibrado entre yemas laterales y terminales [23]. Los brotes vegetativos se distinguen por tener un periodo prolongado de juventud, durante el cual la absorción de nutrientes es vital para alcanzar su madurez fisiológica y sintetizar carbohidratos y aminoácidos que serán transportados a otros tejidos en las etapas fenológicas posteriores. El sistema radicular del palto se distingue por ser superficial y altamente ramificado, condicionado a evolucionar hacia estas características por originarse en suelos con drenaje rápido y una capa orgánica superficial abundante, lo que ha llevado a que las raíces del palto tengan alta demanda de oxígeno y sensibilidad al encharcamiento [23, 24].

En los valles de climas subtropicales del hemisferio sur, como el valle de Chincha, el crecimiento de yemas reproductivas en el palto ocurre entre abril y julio, mientras que la

transición irreversible de la yema vegetativa a floral en los brotes de palto “Hass” se observa durante agosto-septiembre. En esta etapa ocurre la inducción floral de las yemas invernales, y tarda aproximadamente de dos a tres meses [25]. Posteriormente ocurre el cuajado, que se produce después de completar exitosamente la fertilización de las flores de palto. Lovatt (1990) establece que el éxito del cuajado en palto está directamente relacionado con condiciones que permitan la superposición temporal entre flores femeninas y masculinas abiertas, una alta actividad de insectos polinizadores, y una elevada tasa de germinación del polen y crecimiento del tubo polínico [25]. La maduración y desarrollo de la fruta y crecimiento radicular ocurre de agosto a noviembre y entre febrero y abril, debido a un aumento en la división y expansión celular mientras el fruto permanece en el árbol [25].

Los planes de fertilización para el palto son nitrógeno intensivos, con un rango de 75-300 kg/ha/año de este elemento para asegurar una buena producción. Se requiere además de 100-300 kg/ha/año de K_2O y 0-90 kg/ha/año de P_2O_5[25]. Debido a los requerimientos nutricionales intensivos del palto y a los estrictos criterios para el manejo de su fertilización, la adición de enmiendas orgánicas como los biofertilizantes asegura un suministro de nutrientes más equilibrado y constante para este cultivo. La utilidad de estas enmiendas orgánicas no se limita a un simple aporte nutricional, sino que va más allá al mejorar la estructura del suelo, aumentando su capacidad de retención de agua y aireación, lo que es crucial dado el sistema radicular relativamente superficial del palto en comparación con otros árboles frutales, y a su susceptibilidad a sufrir problemas radiculares [31].

1.1.5. Interacciones planta-microbioma y su rol en la salud y funcionalidad del suelo

Estudios recientes han demostrado la importancia de mantener una microbiota del suelo saludable para garantizar la capacidad productiva de las plantaciones en dicho ambiente. Las comunidades microbianas del suelo son actores clave que determinan la salud de las plantas, las características biogeoquímicas del suelo e influyen en el rendimiento y en los rasgos de calidad del cultivo [32, 33, 34]. La microbiota de los suelos agrícolas, aunque presenta una mayor diversidad de especies, tiene una menor abundancia comparada con las distribuciones taxonómicas de microbiotas encontradas en otros tipos de muestras

como aguas residuales, suelos forestales o intestinos [35]. Esta característica hace de los suelos agrícolas un ecosistema ecológicamente complejo, con relaciones entre organismos de diversos tipos que contribuyen a mantener el equilibrio de la comunidad [36].

En los ecosistemas terrestres agrícolas conviven bacterias, hongos y virus. Es responsabilidad del agricultor mantener este delicado equilibrio para que la buena salud del suelo genere efectos beneficiosos en el desarrollo de las plantas [37]. Existen varios mecanismos estudiados mediante los cuales esto puede suceder. Por ejemplo, hay bacterias en el suelo responsables de la fijación del nitrógeno atmosférico, otras que solubilizan el fósforo para hacerlo más biodisponible para las raíces de las plantas, y algunas que absorben y transforman metales pesados como el cadmio para reducir su disponibilidad y toxicidad [36]. Asimismo, encontramos una gran variedad de hongos como micorrizas del género *Trichoderma*, que promueven el crecimiento radicular, mejoran la absorción de nutrientes y suprimen el crecimiento de patógenos vegetales mediante la competencia por recursos y espacio [35].

No se deben ignorar los organismos patógenos presentes en estas comunidades microbianas. Existen hongos que reducen los nutrientes en el suelo, generando competencia con las plantas, y hongos que infectan las plantas cuando están bajo estrés. Además, hay bacterias que causan enfermedades radiculares y foliares, debilitando la salud de las plantas y disminuyendo su productividad [35].

La complejidad de la comunidad microbiana del suelo se define por los metabolitos específicos que las raíces de las plantas segregan en sus exudados. Estos exudados varían según el estado de salud de la planta, sus necesidades nutricionales y los estreses a los que esté sometida [38]. Esta secreción actúa como un mecanismo de “llamado” para atraer a los microorganismos necesarios que satisfacen sus requerimientos y establecen un equilibrio ecológico [39]. Sin embargo, la aplicación de fertilizantes químicos puede perturbar este delicado equilibrio. Aunque los fertilizantes aportan un cóctel de nutrientes externos, también contienen sustancias como nitratos, amoníacos y metales pesados, que pueden ser perjudiciales para ciertos organismos del suelo. Este impacto negativo en la microbiota afecta el equilibrio ecológico, lo que, a largo plazo, puede deteriorar la fertilidad del suelo y la salud general de las plantas [40].

1.2 Enmiendas orgánicas y agricultura sostenible

1.2.1 Fuentes de enmiendas orgánicas

Las enmiendas orgánicas (EO) se definen como cualquier material orgánico aplicado al suelo con el propósito de mejorar el rendimiento agrícola a través del desarrollo optimizado de las plantas [41]. Algunos ejemplos de EO incluyen residuos animales, biosólidos, biochar, compost, residuos agrícolas, lodo de desagüe, biofertilizantes y acondicionadores de suelo como polisacáridos [42, 43, 44].

Los diferentes tipos de EO varían principalmente en sus composiciones de materia orgánica, orígenes, composiciones químicas y en los efectos de su descomposición en el suelo [45]. Una vez presentes en el suelo, los microorganismos son los encargados de descomponer la materia orgánica y liberar los nutrientes presentes en ella, lo cual es crucial para los cambios en las comunidades microbianas del suelo [45]. Al aplicar enmiendas orgánicas (EO) al suelo, se generan cambios en sus propiedades físicas, químicas y biológicas: (1) reducción de pérdida de agua y nutrientes con el aumento de la capacidad de retención de agua y agregación del suelo, (2) estimulación de la actividad microbiana, favoreciendo en reciclaje de nutrientes, (3) aumento de la biodiversidad con el aumento de la materia orgánicas, (4) aumento de la porosidad y la infiltración de agua a través de la reducción de la densidad aparente, lo que mejora la aireación y estructura y (5) aumento del intercambio iónico, lo cual amortigua los cambios en la acidez del suelo [41, 46]. Las enmiendas orgánicas estimulan el crecimiento de las comunidades microbianas del suelo y potencian las actividades biológicas, debido a su alto contenido de carbono orgánico. La aplicación de estiércol bovino, por ejemplo, aumenta la disponibilidad de micro y macronutrientes, favoreciendo el crecimiento de determinadas comunidades microbianas que contienen enzimas hidrolíticas para descomponer compuestos orgánicos, y el aumento de la actividad enzimática microbiana, favoreciendo los indicadores de buena fertilidad [46].

La biomasa microbiana, especialmente la fúngica, desempeña un papel crucial en la estructura del suelo. Entre los hongos más estudiados para la estabilización del suelo se encuentran los micorrízicos, que mejoran la agregación del suelo a través de su influencia en las comunidades de plantas, las raíces y la producción de micelio y glomalina [47]. Sin embargo, el uso de inoculantes microbianos para mejorar directamente las propiedades

del suelo aún es poco común. Las bacterias que producen exopolisacáridos (EPS) presentan un gran potencial para crear un ambiente húmedo alrededor de los microorganismos y retener grandes cantidades de agua, mejorando la agregación del suelo y la adherencia de las raíces [48, 49]. Por ejemplo, *Pseudomonas putida* logra colonizar las raíces de girasol, aumentando la agregación del suelo y el crecimiento de las plantas al mantener un mayor potencial hídrico alrededor de las raíces [50]. Otros estudios han mostrado resultados similares con *Bacillus polymyxa* y *Pantoea agglomerans*, en los cuales también se observa una mejora en la estructura del suelo de la rizósfera del trigo [51, 52].

1.2.2 Biol: definición y método de obtención

El biol o digestato es un fertilizante orgánico líquido que se produce a partir de la digestión anaerobia de estiércol de animales en un biodigestor [53], proceso mediante el cual se producen dos subproductos: digestato sólido y líquido. Ambos tienen el potencial de ser utilizados en el campo como biofertilizantes o enmiendas sólidas del suelo en el manejo nutricional de cultivos. Los digestatos líquidos contienen cantidades importantes de elementos minerales como nitrógeno, fósforo, potasio y otros oligoelementos que favorecen el desarrollo vegetal, aumentan la cantidad de materia orgánica en el suelo y mejoran la disponibilidad de otros macronutrientes como el magnesio, el potasio y el calcio [53]. La fase líquida (biol) se caracteriza por su bajo contenido en materia seca, alto contenido de N (principalmente en forma de NH_4^+-N), disponibilidad de P y K [55]. En comparación al estiércol bovino sin tratar, el biol contiene proporciones más elevadas de nutrientes mineralizados disponibles para las plantas. Los digestatos contienen una concentración de nitrógeno amoniacal NH_4^+-N y nitratos NO_3^--N que están inmediatamente disponibles para las plantas; es decir, que son de rápida absorción por los tejidos vegetales [56, 57]. Algunos coautores señalan que el biol podría contener entre 10-70% más NH_4^+-N en comparación con el estiércol de vaca [56]. Esto permite que las plantas metabolicen el nitrógeno de manera más intensiva inmediatamente después de la aplicación del biol o después de la transformación del NH_4^+-N a NO_3^--N [56] en comparación con el estiércol.

El estiércol de ganado sólido, compuesto por una mezcla de heces, agua de lavado y orina, es inherentemente biodegradable [55]. Dentro del digestor anaerobio, se dan a cabo una

serie de procesos bioquímicos: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis, en las cuales se descomponen los compuestos orgánicos complejos en moléculas más simples, que finalmente se convierten en metano(CH_4^+). Durante la hidrólisis, las enzimas hidrolíticas del estiércol descomponen moléculas complejas como carbohidratos, proteínas y lípidos en sus componentes básicos; durante la etapa de fermentación, los productos solubles generados en la hidrólisis se fermentan en ácidos grasos volátiles, alcoholes y otros compuestos orgánicos; en la acetogénesis, los productos de la fermentación se convierten en acetato mediante oxidación anaeróbica y, finalmente, durante la metanogénesis bacterias metanógenas convierten el acetato en metano [54].

El estiércol de rumiantes, como el bovino, alberga bacterias metanogénicas que desempeñan un papel fundamental en las etapas iniciales de la degradación, ya que estas bacterias facilitan la descomposición de los componentes fácilmente degradables, dejando a la biomasa lignocelulósica y celulósica sin digerir. Asimismo, el estiércol es rico en nutrientes, necesarios para la proliferación de los microbios, y tiene una alta capacidad de amortiguación de pH. Además de la recuperación de nutrientes en el efluente líquido (o biol) que es adecuado como fertilizante orgánico, producto de la digestión anaerobia se genera biogás, por lo que se considera uno de los métodos de gestión de residuos orgánicos más sostenibles [54], capaces de mitigar las emisiones de gases de efecto invernadero asociadas a las técnicas convencionales de eliminación de estiércol animal.

Desde el punto de vista de la Ingeniería Ambiental, el biol encaja dentro del modelo de producción y consumo de la economía circular, un paradigma que se enfoca en optimizar y reciclar los recursos de las cadenas de producción y reducir los residuos generados. Al reutilizar residuos que normalmente se subutilizan o se desperdician, como la bosta, se reduce la huella ecológica pues se cierra el ciclo de nutrientes. El biol se enmarca en un enfoque integrado donde se refuerza la sostenibilidad agropecuaria, se promueve la valorización de subproductos orgánicos y se fomenta la protección de agroecosistemas.

1.2.3 Impacto de los biofertilizantes en las propiedades nutricionales y fisicoquímicas del suelo

A diferencia de los fertilizantes sintéticos más utilizados, como la urea y los fosfatos, las fertilizantes orgánicos (que incluyen abono de granja, compost de residuos vegetales, estiércol animal, etc.) y los biofertilizantes (formulaciones líquidas de microorganismos beneficiosos) no solo aumentan el aporte de nutrientes esenciales y el rendimiento de los cultivos, sino que desempeñan un papel fundamental en la mejora de las propiedades fisicoquímicas del suelo, como la estructura y grado de porosidad, la retención de agua, la capacidad de intercambio catiónico y las reservas de carbono del suelo [58, 59]. También se ha visto que los fertilizantes orgánicos aumentan la cantidad de N, P y K disponibles en los suelos, promoviendo la absorción y utilización de nutrientes a largo plazo [59].

Un estudio de Li et al. evaluó los efectos de abono orgánico comercial (0,75, 1,50 y 2,25 kg/m^2) sobre parámetros fisicoquímicos y nutricionales de tierras recién recuperadas para su conversión a suelos de cultivo. El estudio demostró que la aplicación de fertilizantes orgánicos comerciales mejoró significativamente la salud del suelo: se observó un incremento del 9,35% al 16,35% en el contenido de humedad, un aumento del H entre 11,56% y 18,72%, y un incremento de la materia orgánica del suelo entre 1,73 y 2,15 veces. Además, hubo un aumento significativo en la disponibilidad de fosfato (338,44%-491,41%), en el nitrógeno total (36,80%-48,14%), y en el nitrógeno de hidrólisis alcalina (95,32%-128,34%) [60].

En un estudio de Wan et al. [59], se observó que la aplicación de fertilizantes orgánicos en conjunto con fertirriego químico mejoró significativamente las propiedades fisicoquímicas del suelo, promovió la fotosíntesis foliar y, en última instancia, incrementó el rendimiento de los huertos de cítricos. Este estudio mostró que las combinaciones de fertilizantes orgánicos y químicos mejoraron la capacidad del suelo para retener nutrientes y agua, debido a la presencia de sustancias activas en los fertilizantes orgánicos, como el ácido húmico, aminoácidos y microorganismos. Estas sustancias ayudaron a formar agregados del suelo, haciéndolo más suelto y transpirable, y ayudaron a reducir la lixiviación de NO_3^--N y a mitigar su migración hacia capas más profundas del suelo. Además, las mediciones de parámetros como SPAD (contenido de clorofila), Pn (tasa de fotosíntesis), PIabs (eficiencia del fotosistema II en la fotosíntesis) y PItotal (eficiencia fotosintética total) en las plantas tratadas con fertilizantes orgánicas y bioorgánicos fueron superiores a las de aquellas tratadas solo con fertilizantes químicos, lo que sugiere que

estos tratamientos promovieron una mayor absorción de nutrientes, crecimiento foliar y actividad enzimática, mejorando así la fotosíntesis en las plantas [59].

En un estudio realizado durante tres años en la meseta Loess de China, se evaluaron los efectos de la integración de estrategias de fertilización química con la adición de estiércol orgánico (MO) en el cultivo de maíz. Los resultados indicaron que la aplicación de MO mejoró notablemente las propiedades del suelo, con una reducción significativa en la densidad aparente del suelo y aumentos del 11,9%, 18,7% y 97,8% en los contenidos de nitrógeno total, materia orgánica y fósforo disponible, respectivamente, en la capa superficial del suelo, en comparación con tratamientos que solo utilizaron fertilizantes químicos NPK. Además, la eficiencia en el uso del agua en el perfil del suelo mejoró, lo que favoreció un mejor desarrollo radicular, una mayor área foliar y una mayor biomasa de los brotes del maíz. En términos de rendimiento, la adición de estiércol orgánico también resultó en incrementos adicionales del 8,9% en el rendimiento del cultivo de maíz y del 5,8% en la eficiencia del uso del agua, lo que demuestra que el estiércol orgánico ayuda a optimizar las condiciones del suelo para el crecimiento del maíz y el reciclaje de nutrientes [61].

Asimismo, en un estudio realizado en el valle bajo del Río Colorado, Argentina, se evaluaron los efectos de diferentes dosis de compost de residuos de cebolla y estiércol bovino, así como de té de compost, sobre las propiedades fisicoquímicas del suelo, la actividad microbiana, y la producción de cebolla en un suelo arenoso. Los resultados mostraron que la mayor dosis de compost de cebolla y estiércol bovino (OMCT4) aplicada generó los efectos más pronunciados en el pH del suelo, la conductividad eléctrica y el contenido de nutrientes, mejorando significativamente el peso de los bulbos y el rendimiento de la cebolla. En comparación al tratamiento control (29.6 g/kg de materia orgánica, 1.65 g/kg de nitrógeno total y 13.3 mg/kg de fósforo extractable), el tratamiento OMCT4 obtuvo 30.6 g/kg de materia orgánica, 1.68 g/kg de nitrógeno total y 18.5 mg/kg de fósforo extractable. Además, aunque las actividades enzimáticas del suelo ya eran elevadas antes de la aplicación del compost, se observó un impacto positivo en la producción agroecológica de cebolla, comparable al de la fertilización convencional. Se concluyó que el uso de compost, en dosis de hasta 300 kg N ha^{-1}, puede garantizar altos rendimientos de cebolla y mejorar las propiedades del suelo de manera sostenible,

ya que la materia orgánica garantiza una liberación gradual y controlada de N inorgánico por la mineralización de microorganismos [62].

Finalmente, es importante destacar el estudio de Gallart el al. (2022) [63] en el que evaluó el impacto de la aplicación de un bioestimulante en la adquisición de nitrógeno por plántulas de palto (*Persea americana*). Específicamente, los autores investigaron el efecto de la combinación de fertilizantes orgánicos e inorgánicos, en conjunto con la inoculación con la bacteria promotora de crecimiento *Paraburkholderia*, sobre la eficiencia de absorción de nitrógeno y las propiedades fisicoquímicas del suelo. Las plántulas de palto inoculadas y fertilizadas con la combinación de fertilizantes mostraron una mayor concentración de nitrógeno foliar, destacando el papel de esta bacteria promotora del crecimiento en la eficiencia de la absorción nutricional del palto. La inoculación con *Paraburkholderia* aumentó en un 23% la eficiencia de absorción de nitrógeno en plántulas fertilizadas con la combinación de fertilizantes más la inoculación, comparado con el mismo tratamiento sin la bacteria; y en 120% la eficiencia de absorción de nitrógeno en comparación con plántulas fertilizadas solo con urea sin la bacteria [63]. Todos estos estudios destacan la importancia de las bacterias beneficiosas de biofertilizantes y bioestimulantes para la optimización del manejo nutricional de cultivos clave como el palto.

1.2.4 Impacto de los biofertilizantes en la estructura y diversidad de las comunidades microbianas en la rizósfera

Numerosos estudios han demostrado una alteración significativa en la diversidad y composición de las comunidades microbianas del suelo en la rizósfera de plantas después de la aplicación de biofertilizantes y otras enmiendas orgánicas. Por ejemplo, un estudio de Chekwube y Oluranti [3] en trigo demostró que mayores cantidades de abono orgánico (8 toneladas/ha) y menores cantidades de fertilizante nitrogenado (60 kg/ha) favorecieron la selección de Proteobacteria y Actinobacteria, mientras que el tratamiento con la menor cantidad de compost orgánico (4 toneladas/ha) aumentó la población de Bacteroidetes.

De igual forma, otro estudio sobre la aplicación de abono de paja de trigo en plantaciones de tabaco [37] mostró que el suelo tratado con 300 kg/mu de paja durante 60 días tuvo

como filos bacterianos predominantes a Proteobacteria, Actinobacteria y Verrucomicrobia, mientras que en las muestras de suelo tratadas con 200 kg/mu de paja durante 30 días se encontraron predominantemente los filos Cianobacteria, Basidiomycota y Chlorophyta. Estudios más específicos sobre las estructuras de las especies microbianas presentes en la rizósfera [3, 40] evidencian un aumento en la abundancia relativa de géneros potencialmente benéficos como *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Streptomyces* y *Mycobacterium* en los tratamientos que recibieron enmiendas orgánicas en comparación con el control.

El estudio de Lian et al. [17] evidenció que la aplicación prolongada de estiércol, en combinación con fertilizantes inorgánicos, alteró sustancialmente la estructura de las comunidades bacterianas en el suelo, promoviendo un aumento en la abundancia de bacterias copiotróficas, como Proteobacteria y Bacteroidetes. La abundancia de Proteobacteria aumentó en un 22%, mientras que Bacteroidetes mostró un incremento del 18%, en comparación con suelos que recibieron únicamente fertilizantes inorgánicos [17]. Este tratamiento también aumentó la actividad metabólica en un 25%, lo que refleja una mayor capacidad para la descomposición de la materia orgánica y la liberación de nutrientes. En contraste, los suelos que solo recibieron fertilizantes inorgánicos experimentaron una disminución del 15% en la diversidad bacteriana total, reduciendo así la capacidad del suelo para mantener funciones ecológicas esenciales. Además, en suelos enmendados con estiércol, la abundancia de Acidobacteria y Planctomycetes aumentó en un 12% y 10%, respectivamente, lo que resalta su papel clave en la nitrificación y la descomposición de compuestos orgánicos complejos. Estos incrementos estuvieron acompañados de una reducción del 17% en la acidificación del suelo, lo que indica que el estiércol no solo proporciona nutrientes, sino que también ayuda a mitigar los efectos adversos de la fertilización inorgánica sobre el pH del suelo. Asimismo, la aplicación de estiércol aumentó en un 30% la cantidad de carbono orgánico del suelo, mejorando la retención de nutrientes como nitrógeno y fósforo, y favoreciendo un ciclo de nutrientes más eficiente [17]. En resumen, la combinación de estiércol y fertilizantes inorgánicos no solo promueve una microbiota más diversa y funcional, sino que optimiza el ciclo de nutrientes y mejora la productividad agrícola a largo plazo, convirtiéndose en una estrategia sostenible para el manejo de suelos agrícolas.

Asimismo, otro estudio sobre el rendimiento de *Panax ginseng* con la aplicación de suspensiones de bioestimulantes demostró un aumento de las poblaciones de microbios promotores del crecimiento vegetal y una supresión simultánea del crecimiento de fitopatógenos [39]. Otros estudios han demostrado que las enmiendas orgánicas, como el estiércol, el biofertilizante líquido y los residuos vegetales compostados, inhiben el crecimiento de poblaciones de *Fusarium* al promover el crecimiento de poblaciones biocontroladoras en la rizósfera de la planta, que compiten por nichos ecológicos con especies fitopatógenas como *Fusarium*. Por ejemplo, algunos estudios demuestran que la aplicación de enmiendas de compost incrementó poblaciones de hongos benéficos, bacterias y actinomicetos, resultando en la supresión de la población de cepas causantes de marchitez por *Fusarium* en espinacas [64]. En otro estudio, se evidenció un aumento en la abundancia de *Gemmatimonas* y *Sphingomonas* tras la aplicación de fertilizantes bio-orgánicos, reduciendo la incidencia de la enfermedad de marchitez por *Fusarium* en plantaciones de plátanos.

En general, los suelos enmendados con fertilizantes orgánicos están dominados por grupos microbianos asociados a la degradación de compuestos orgánicos complejos, como los que se encuentran en el estiércol y en el compost [3, 65]. Debido a la alta disponibilidad de sustrato de carbono en los suelos enmendados, se estimula la proliferación de grupos bacterianos copiotrofos. La anotación funcional de los genes de las secuencias metagenómicas en estudios con enmiendas orgánicas reveló una rica presencia de genes relacionados con la producción de energía y el metabolismo de aminoácidos, así como una mayor abundancia de genes con funciones relacionadas con el ciclo de nutrientes, la degradación de compuestos orgánicos complejos y la supresión de enfermedades, cuando se compara el grupo que contenía abono orgánico con el grupo tratado con abono químico [3, 37].

Según el estudio de Yang et al., la aplicación de fertilizantes incorporados con residuos vegetales mejoró la disponibilidad de nutrientes en el suelo, favoreciendo el crecimiento del trigo. Específicamente, la aplicación de paja de trigo resultó en un incremento de los contenidos de fósforo y potasio disponibles en el suelo, especialmente en los tratamientos con 400 kg/mu de paja a los 60 días y 200 kg/mu a los 75 días [37]. En cuanto a cambios en la materia orgánica oxidable del suelo, no se observaron cambios estadísticamente

significativos durante los primeros 60 días; no obstante, sí se observó un incremento posterior para los grupos que contenían mayor concentración de paja de trigo (300 kg/mu y 400 kg/mu de paja).

La aplicación de biofertilizantes en el cultivo de paltos ha demostrado ser particularmente eficaz en la mejora de la salud del suelo y el control de enfermedades. Según Farooq et al., la incorporación de abonos orgánicos y mantillos basados en silicato en suelos de cultivos de palto infestados con *Phytophthora cinnamomi* resultó en una mayor diversidad y abundancia de comunidades bacterianas en la rizósfera [66]. Estos tratamientos, además de reducir el daño radicular, promovieron el crecimiento de grupos bacterianos beneficiosos como Proteobacteria y Actinobacteria, que desempeñan roles cruciales en la promoción del crecimiento vegetal y la supresión de patógenos [66].

1.2.5 Técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS) y metagenómica *shotgun* para evaluar la diversidad taxonómica y funcional del suelo

Extender el uso de productos biológicos que contribuyan a una agricultura sostenible constituye una de las principales soluciones a los retos mundiales relacionados con la pérdida de los servicios ecosistémicos agrícolas de los suelos y con la degeneración de la calidad y cantidad de los recursos naturales para los cultivos. Las técnicas de secuenciación de nueva generación con enfoque meta-ómico, tales como *Oxford Nanopore Technologies* e *Illumina Seq*, han permitido precisamente la identificación de microorganismos beneficiosos para la agricultura y sus funciones metabólicas, superando los métodos tradicionales microbiológicos, los cuales no son capaces de cultivar ni caracterizar entre el 90-99% de los microorganismos del suelo [67, 68, 69].

La técnica de secuenciación metagenómica *shotgun* involucra la secuenciación de todos los segmentos de ADN presentes en una muestra ambiental compleja [69]. En comparación con la técnica de secuenciación por amplicones 16S RNA, este método evita el sesgo de la amplificación por PCR y tiene una mayor resolución y precisión para clasificar los taxones, ya que puede diferenciar las especies o cepas que están estrechamente relacionadas [69]. No obstante, este método es computacionalmente

intenso, requiere de una compleja preparación de ADN previo y puede introducir sesgos de las plataformas de secuenciación [70]. El surgimiento de las nuevas técnicas de metagenómica ha hecho posible el análisis de genomas completos de miles de nichos ecológicos que realizan una amplia gama de procesos metabólicos en el suelo, sin necesidad de cultivar ningún microorganismo [71]. La técnica de secuenciación *shotgun* permite generar una vasta cantidad de datos genéticos para comprender la estructura de la comunidad microbiana no sólo en términos de variedad taxonómica (identidad y abundancia relativa de taxones) sino también en la composición genética funcional (genes de interés y predicción de rutas metabólicas) [69]. Un elemento clave en el análisis de metagenomas es la identificación de clústers de genes ortólogos (COGs), que corresponden a grupos de genes que están evolutivamente relacionados y conservados en múltiples organismos. En el análisis metagenómico, la presencia de COGs (y no su expresión) permite inferir las capacidades funcionales que podrían estar potencialmente disponibles en la comunidad microbiana. Habitualmente, se emplean bases de datos para mapear y clasificar los COGs en categorías funcionales estándar, como el metabolismo de carbohidratos, la síntesis de aminoácidos, el transporte de iones, la señalización, transducción y transcripción celular. Este enfoque ha demostrado ser una técnica apropiada para entender las distintas interacciones planta-suelo que ocurren en los terrenos agrícolas.

Con la exploración de genomas de muestras ambientales, tales como suelos inoculados con abonos orgánicos, se podrían desarrollar nuevos bioinoculantes y bioestimulantes que contengan bacterias con genes cuyos productos promuevan el crecimiento de las plantas y que puedan contribuir a la sostenibilidad agrícola [70]. Los resultados de los estudios metagenómicos, que han identificado taxones beneficiosos importantes, están contribuyendo al desarrollo de consorcios microbianos nativos y otras estrategias de fertilización que reduzcan la dependencia de fertilizantes químicos en el campo. Asimismo, se puede emplear la metagenómica funcional para la ingeniería de la rizósfera, mediante el remodelamiento y la redirección de las actividades microbianas en la rizósfera para alcanzar un estado de equilibrio entre la supresión de fitopatógenos y el reciclaje adecuado de nutrientes.

En síntesis, los enfoques metagenómicos para el tamizado de genes a partir de genomas del suelo son técnicas independientes de los cultivos que proporcionan una suerte de "huella dactilar" de la estructura de una comunidad microbiana bajo la influencia de distintos factores ambientales, como el uso de prácticas de manejo de la tierra, fertilizantes, pesticidas y sistemas de labranza [70, 69], lo cual permite comprender las interacciones microbianas y sus funciones bajo diferentes condiciones.

II. JUSTIFICACIÓN

La aplicación de enmiendas orgánicas, como los biofertilizantes, ha mostrado efectos significativos en la estructura de la comunidad microbiana y en las propiedades fisicoquímicas del suelo. Estudios previos sugieren que el aporte de materia orgánica influye directamente en el ciclo de carbono y, en consecuencia, en la diversidad y estructura filogenética de las comunidades microbianas [3, 32, 36, 37, 66]. Sin embargo, en el contexto peruano persiste la interrogante sobre cómo estos fertilizantes orgánicos impactan la abundancia y diversidad microbiana en la rizósfera del palto, un cultivo de alta relevancia económica y demanda de nutrientes.

Dentro de este panorama, el biol, un fertilizante orgánico líquido derivado principalmente de residuos animales, ha demostrado potenciar la salud del suelo y el crecimiento de diversos cultivos. Su aplicación en palto resulta particularmente interesante por la alta demanda nutricional de esta especie y su susceptibilidad a enfermedades radiculares. El uso de biol podría contribuir a optimizar la fertilidad del suelo y reforzar la resistencia de las plantas frente a patógenos, constituyéndose en una alternativa que disminuye la dependencia de fertilizantes químicos y atenúa los efectos ambientales derivados de su uso excesivo.

Además, la aplicación de biol como fertilizante se enmarca en el enfoque de economía circular, que busca aprovechar y reciclar recursos de forma eficiente para reducir el impacto ambiental y cerrar los ciclos de nutrientes. En lugar de desechar el estiércol bovino, se lo transforma en un insumo rico en nutrientes esenciales para la fertilidad agrícola.

No obstante, sigue siendo esencial determinar cuáles microorganismos procedentes del biol logran sobrevivir e integrarse a la microbiota del suelo y de qué forma se modifican los perfiles microbianos y fisicoquímicos en distintos momentos tras su aplicación. Hasta la fecha, en Perú no se han realizado estudios de campo que empleen metodologías de metagenómica (incluida la secuenciación de lecturas largas, como la de *Oxford Nanopore*) para investigar estos cambios en la rizósfera del palto. Este vacío de conocimiento limita el desarrollo de estrategias de manejo más sostenibles y basadas en evidencia local.

Por ello, esta investigación se centra en evaluar los cambios en la estructura y actividad del microbioma de la rizósfera del palto tras la aplicación de biol bovino, mediante la identificación de los microorganismos que sobreviven y la determinación de su impacto en la dinámica microbiana del suelo en dos momentos clave (24 horas y 10 días después de la aplicación). Desde una perspectiva ingenieril, los hallazgos permitirán proponer planes de manejo de suelo más sostenibles y productivos, al mismo tiempo que se minimiza el impacto ambiental.

III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto de la aplicación de biol sobre los perfiles microbianos y fisicoquímicos de la rizósfera del palto?

IV. HIPÓTESIS

H0: El tratamiento con diferentes volúmenes de biofertilizante no inducirá cambios significativos en la diversidad taxonómica, la biomasa microbiana ni en el perfil funcional de la rizósfera del palto en comparación con la línea base.

H1: El tratamiento con el volumen más elevado de biofertilizante inducirá una alteración significativa en la diversidad taxonómica, la biomasa microbiana y el perfil funcional de la rizósfera del palto en comparación con la línea base. Se anticipa un incremento en la abundancia de genes implicados en la fijación de nitrógeno, la producción de metabolitos microbianos, la solubilización de fósforo y la degradación de compuestos orgánicos

dentro de la rizósfera del palto tras la introducción del biofertilizante. Además, se espera que la introducción de microbios exógenos con el biol y la consecuente activación de la microbiota del suelo aumenten la biomasa microbiana y la diversidad en las fases iniciales después de la aplicación del biol al suelo (24 horas). Sin embargo, se prevé que la influencia de los microorganismos introducidos disminuirá con el tiempo (a los 10 días), debido a la estabilización del ecosistema microbiano y la competencia con la microbiota autóctona.

V. OBJETIVOS

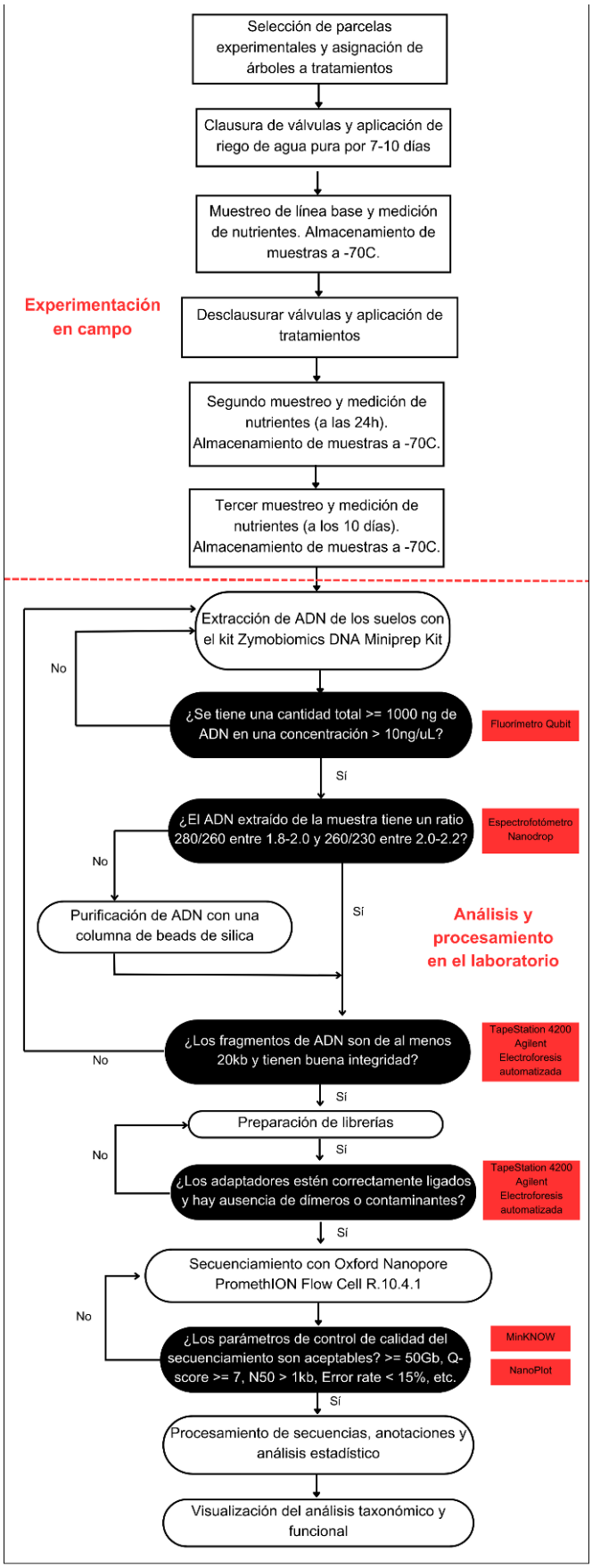
5.1. Objetivo General

Evaluar los perfiles fisicoquímicos y microbianos de la rizósfera del palto Hass sometida a diferentes volúmenes de biofertilizante líquido de bosta (biol) en condiciones de campo.

5.2. Objetivos Específicos

- Aplicar secuenciación metagenómica *shotgun* para caracterizar la abundancia relativa de la microbiota rizosférica de paltos antes y después de la aplicación de biol, empleando programas de clasificación taxonómica como Kraken2 y Bracken2.
- Identificar y cuantificar categorías funcionales asociadas a clústeres genéticos involucrados en procesos clave de interacción planta-microorganismo, evaluando su dinámica temporal en metagenomas.
- Establecer correlaciones estadísticas entre los perfiles metagenómicos obtenidos y los parámetros fisicoquímicos del suelo, los cuales incluyen concentraciones de iones potasio, calcio, y sodio, nitrógeno total, nitrógeno nítrico, fósforo total, fósforo disponible, carbono orgánico oxidable y los metales cadmio y plomo.
- Caracterizar la composición microbiana y el perfil funcional del biol previo a su aplicación sobre los cultivos utilizando la técnica de secuenciación metagenómica *shotgun*.

Fig. 1: Gráfico resumen del protocolo de investigación para evaluar el efecto de distintos tratamientos con bioestimulantes en la comunidad microbiana de la rizósfera del palto mediante metagenómica *shotgun*



VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Tipo de estudio

El estudio realizado presentó un carácter experimental, el cual está conformado por componentes explicativos y correlacionales en base a la estructura y objetivos definidos. El estudio se realizó de manera experimental en parcelas de cultivo en Chincha, Perú, con el objetivo de evaluar y controlar el efecto de las variables independientes (concentraciones de biol y fertilizantes inorgánicos) en las variables dependientes (variaciones taxonómicas y funcionales del microbioma de la rizósfera así como cambios en los parámetros fisicoquímicos del suelo) a través de la aplicación de distintos tratamientos de manera controlada y aleatorizada. Asimismo, este estudio guardó una naturaleza explicativa, ya que buscó formular y comprobar una hipótesis de tercer grado por medio del análisis de las condiciones y mecanismos subyacentes que explicaran las observaciones realizadas. Buscó explicar el por qué y cómo la aplicación de biol en conjunto con fertilizantes tradicionales puede afectar la diversidad taxonómica y funcionalidad del microbioma de la rizósfera de los paltos Hass. Finalmente, nuestro estudio también buscó tener una naturaleza correlacional mediante la evaluación de los efectos directos de los distintos tratamientos. Se identificaron correlaciones entre los perfiles metagenómicos con los parámetros fisicoquímicos del suelo y las concentraciones de nutrientes en el pecíolo de las hojas. Esto se realizó mediante análisis estadísticos como el Análisis de Componentes Principales (PCA) y el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA).

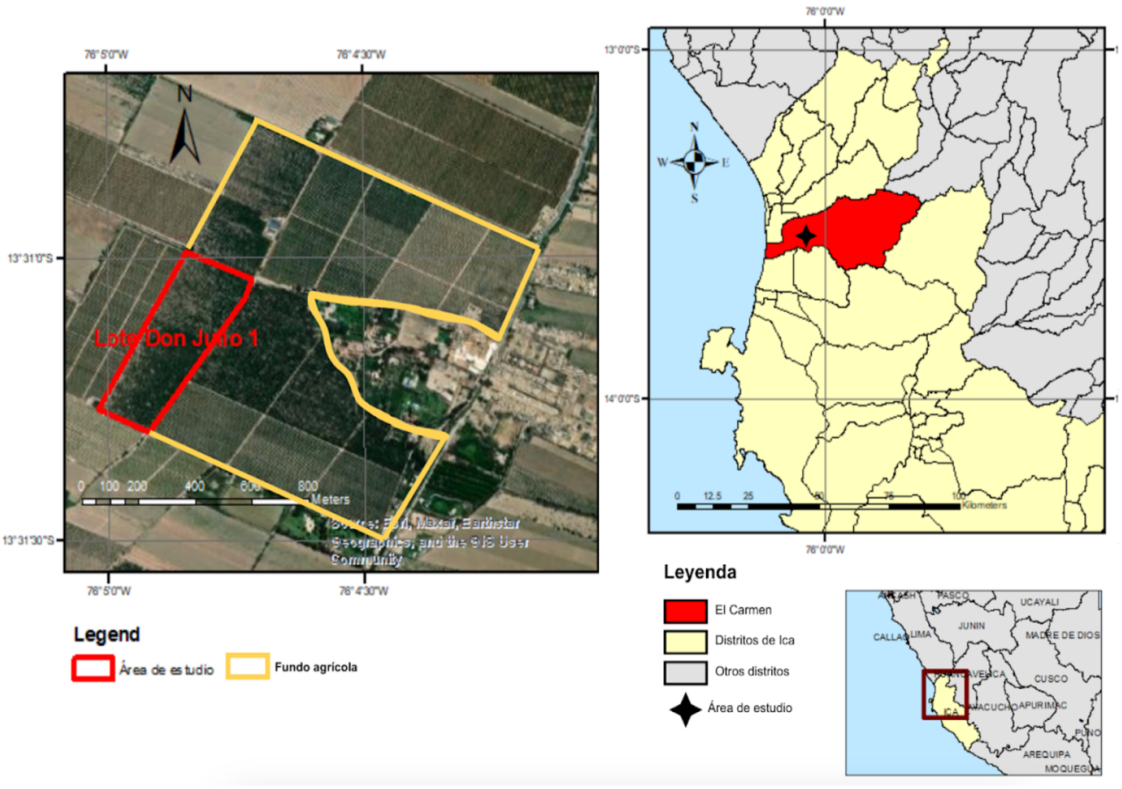
6.2 Área de estudio

El ensayo de campo se llevó a cabo en el lote de paltos Don Julio 1 del Fundo San José en el distrito de El Carmen, Chincha, Ica (13°31'8.32"S, 76° 4'51.84"W; elevación 114 m, temperatura media anual 19.8°C) [Fig. 2]. Según el último informe de análisis de suelo (10/06/22) realizado por el laboratorio de química agrícola Valle Grande, las propiedades básicas del suelo fueron las siguientes: tipo de suelo arcillo-arenoso (arena 44.12%, limo 34.85%, arcilla 21.03%), clase textural franco, 39.82% de saturación de agua, 1.32 dS/m

conductividad eléctrica a 25°C, pH 8.10, fósforo disponible 51.20 ppm, materia orgánica 1.79%, nitrógeno total 0.10% y potasio disponible 499.40 ppm [Anexo 9A y 9B]

Fig. 2: Mapa de ubicación de la zona de muestreo

PROYECTO DE TESIS			
TÍTULO: Mapa de ubicación del Fundo Maquinaria Agrícola San José en El Carmen, Chincha, Ica			
ELABORADO POR:	Belén Balta Alen Zimic	**FORMATO DE VISUALIZACIÓN:**	A4
PROYECCIÓN:	WGS84 UTM 18S	**FUENTE:**	Elaboración propia



6.3 Actividades

6.3.1 Diseño experimental

6.3.1.1 Descripción del biofertilizante

Se recogieron 200L de biol fresco a base de bosta bovina fermentada dentro de un digestor anaerobio en una granja lechera situada en El Carmen, Chincha, Ica. La granja cuenta con 3 biodigestores anaerobios que operan en base a procesos fermentativos (hidrólisis, acidogénesis y metanogénesis) para convertir la biomasa entrante en biol, el componente líquido, y el lodo o biosol, el componente sólido. Antes del muestreo, las 70 vacas Holstein recibieron su régimen alimenticio usual que consistió en chala de maíz fermentada, concentrado de granos de maíz, soya y afrecho, y restos de mandarina, piña y alcachofa. Los piensos para las vacas se cultivaron en campos propios sin aplicación de glifosato. Inmediatamente después de la recogida del biol, este se transportó al campo experimental y se introdujo en el suelo en un plazo no mayor de 24 horas desde su producción. Se almacenaron 100 mL de biol en tubos estériles a -70°C para la extracción de ADN y 100 mL a 4°C para el análisis de sus propiedades químicas.

6.3.1.2 Delimitación de tratamientos y muestreo de suelo

Se usaron 3 parcelas experimentales de 24 árboles cada una, sumando un total de 72 árboles para los 6 tratamientos. Las parcelas experimentales estuvieron distribuidas de forma sistematizada, de tal forma que ningún tratamiento se repitió en una misma hilera, con el fin de reducir fuentes de error o sesgos asociados a las condiciones del terreno [Fig 3]. Los grupos experimentales fueron tratados con distintos volúmenes de biol (0L/planta, 0.75L/planta, 3L/planta y 6L/planta) y fertilizantes inorgánicos [Tabla 1]. Al grupo control negativo solo se le aplicó el fertirriego inorgánico, el cual estuvo compuesto de una mezcla disuelta de sulfato de amonio, sulfato de magnesio, sulfato de potasio y suplementos vitamínicos [Anexo 5], mientras que el grupo de control positivo solo recibió el régimen actual de biol (3L/planta equivalente a 2000L/ha). El biol se aplicó uniformemente con regaderas manuales a la capa superficial del suelo, en un radio de 20-50 cm desde el centro del tronco, y posteriormente se regó por aspersión de 20-30 minutos, lo que equivale a regar 30L de agua por árbol. El grupo de tratamiento 6 constó de una prueba complementaria con un inóculo de *Rhizobium spp.* y *Pseudomonas spp.* de la marca Simbio, la cual era de interés comercial para el gerente del fundo agrícola. No obstante, este tratamiento no se considera dentro de los objetivos del presente estudio.

Fig. 3: Diagrama de delimitación de bloques experimentales

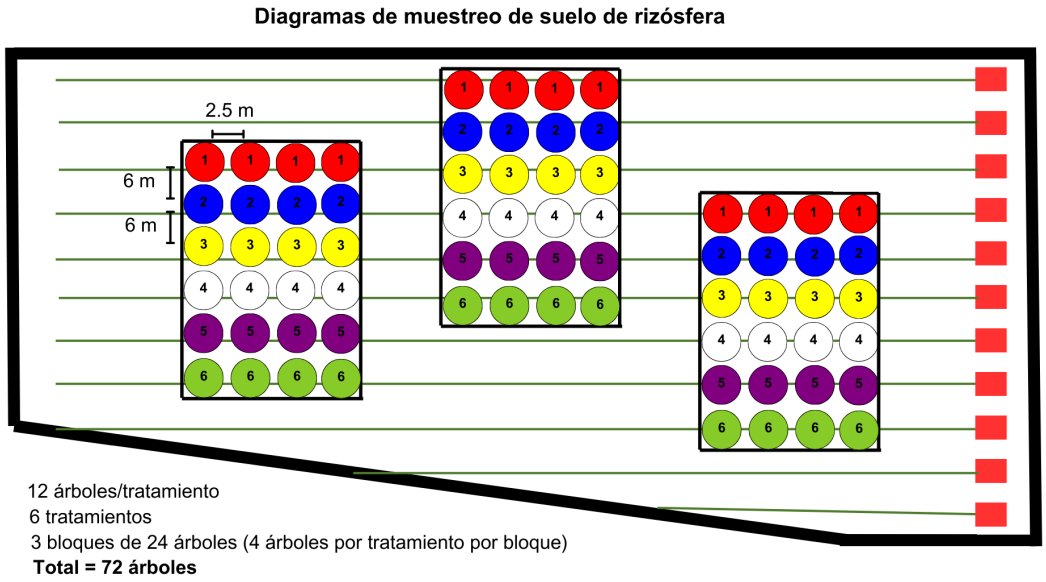


Tabla 1: Tabla de tratamientos que se aplicaron por grupo experimental

Grupo de Tratamiento	Nombre de tratamiento	Código	Régimen interdiario de NPK	Cantidad equivalente de biol (L/ha)	Cantidad de agua riego interdiario (L/planta)
1	Fertirriego inorgánico óptimo (FIO)	FIO	Sí	0	90
2	FIO + Biol 100%	FIOBL	Sí	2000	90
3	FIO + Biol 25%	FIOBL25	Sí	500	90
4	FIO + Biol 200%	FIOBL200	Sí	4000	90
5	FIO + Biol 25% + microorganismos Simbio	SMBIO	Sí	500	90
6	Solo biol 100%	BL	No	2000	90

Se eligieron árboles de palto Hass de 10 años con el mismo estado de salud y etapa fenológica (crecimiento y maduración del fruto). Se tomaron muestras de las 72 plantas (12 muestras × 6 tratamientos) divididas en los 3 bloques experimentales. La rizósfera de las muestras de suelo se recogió mediante calicatas de 10-20 cm de profundidad y 35-40 cm del centro del tronco, raspando la tierra adherida a la raíz del palto para que caiga en la bolsa Ziploc estéril [Fig 4.]. Por árbol se obtuvieron 3 submuestras en una sola muestra compuesta, cada submuestra proveniente de una calicata en un punto cardinal distinto alrededor del tronco. Las muestras de suelo recogidas en las bolsas de poliestireno estériles se colocaron en cajas frigoríficas con gel packs y se trasladaron al laboratorio a 4°C. Una vez en el laboratorio, los suelos se tamizaron con una malla de 2mm para eliminar raíces visibles, piedras y otros residuos. En un área estéril, se mezclaron las 12 muestras de cada tratamiento para formar una sola muestra compuesta uniforme por tratamiento, con lo que se obtuvieron sólo 6 muestras compuestas [Fig. 5]. Un código de barras representa el conjunto de 12 árboles que recibieron el mismo tratamiento de biol en un tiempo determinado y que se agruparon bajo una misma muestra compuesta para la secuenciación metagenómica. Una parte se almacenó en nuevas bolsas estériles o tubos Falcon estériles de 50mL a 4°C para los análisis de las propiedades fisicoquímicas mientras que la otra parte se almacenó a -70°C hasta la extracción de ADN y el análisis metagenómico. Se repitió este procedimiento para el muestreo de la rizósfera en 3 tiempos distintos [Tabla 2].

Fig. 4: Diagrama de muestreo del suelo de la rizósfera del palto

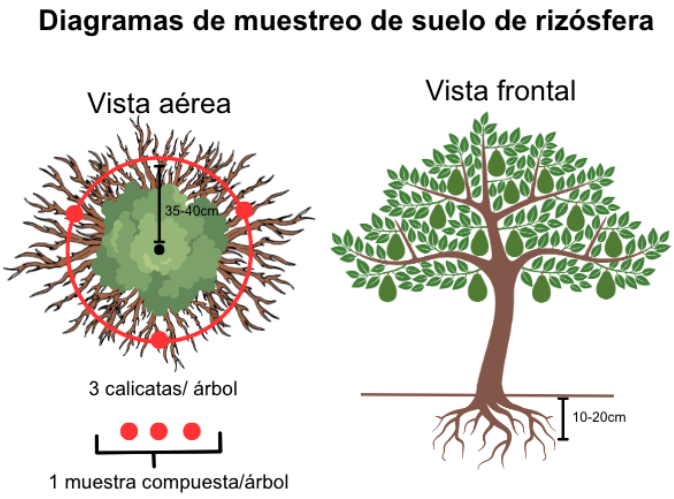


Fig. 5: Diagrama de la toma de muestras para el secuenciamiento metagenómico

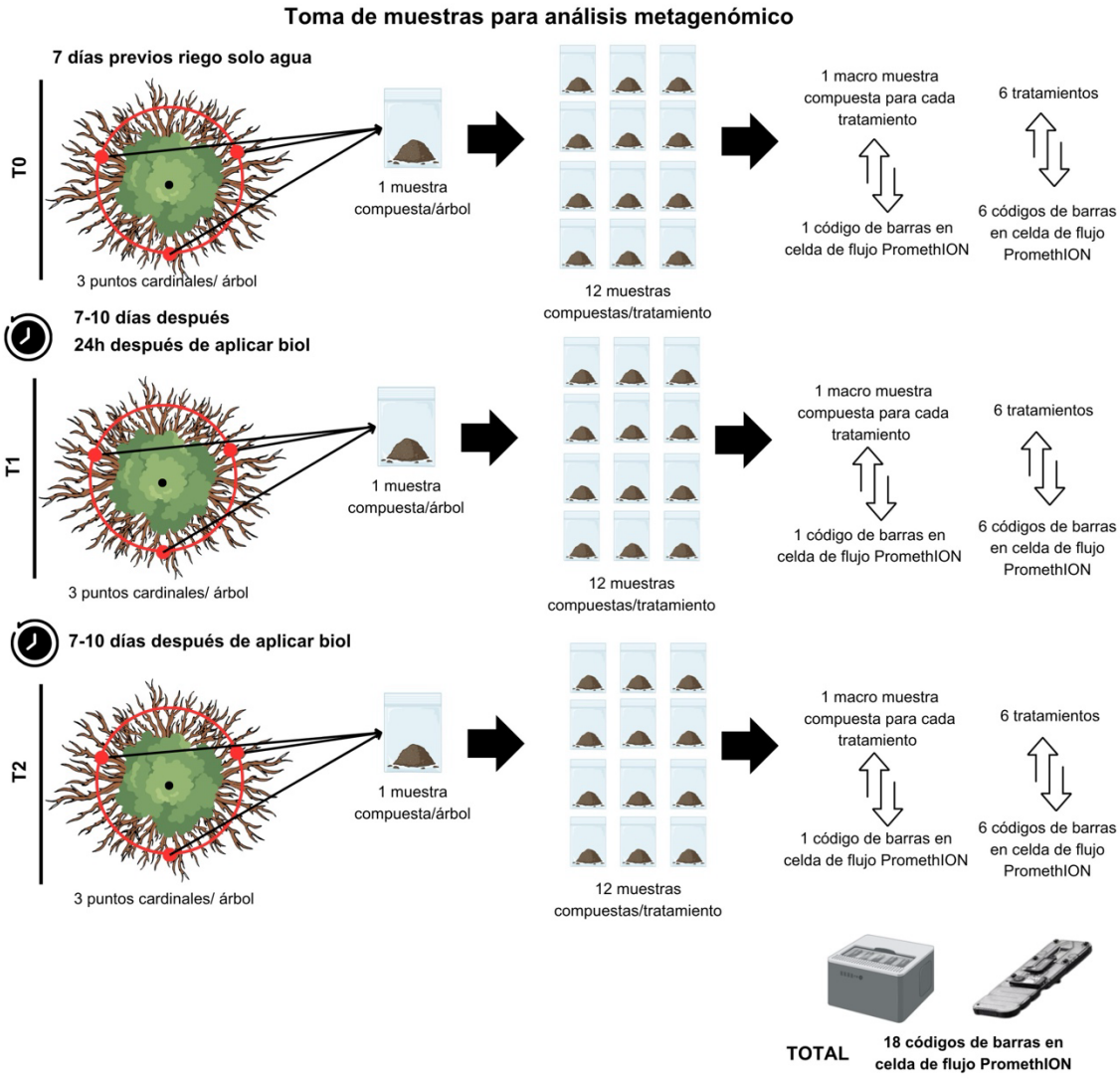
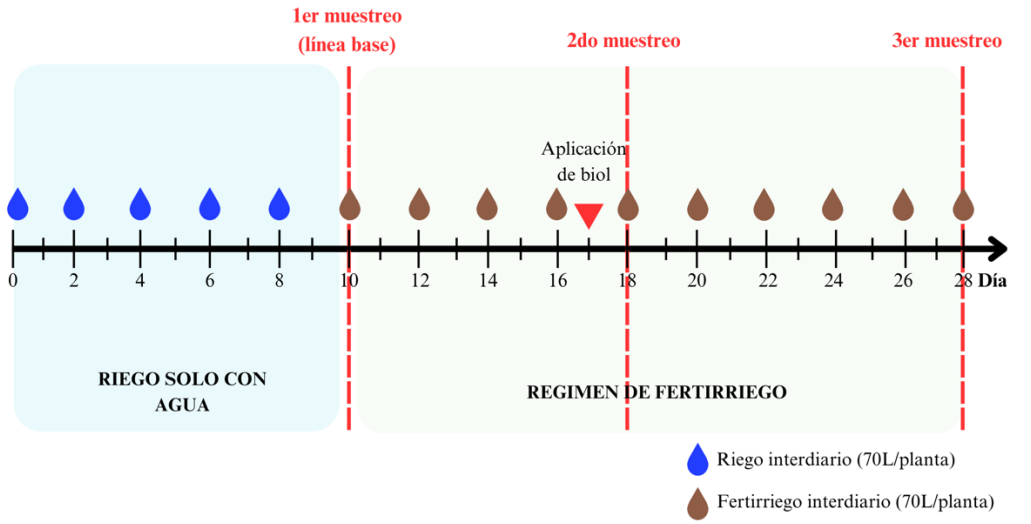


Tabla 2: Tabla de puntos temporales de muestreo

Número de muestreo	Objetivo	Descripción
1	Obtención de la línea base	Se clausuraron los aspersores de riego y solo se regó manualmente con agua durante 10 días antes del muestreo de la línea base
Inicio tratamientos de fertilización inorgánica		Durante los siguientes 7 días se abrieron las válvulas de los tratamientos correspondientes para empezar el riego de fertilizantes inorgánicos tres veces a la semana.
2	Obtención de los cambios inmediatos en la comunidad microbiana de la rizósfera	24h posterior a la aplicación de biol en sus distintos volúmenes
3	Obtención de los cambios a corto plazo en la comunidad microbiana de la rizósfera	10 días posterior a la aplicación de biol en sus distintos volúmenes

El tiempo experimental necesario para realizar las recolecciones de muestras fue de 28 días [Fig 6.]. Inicialmente se realizó la clausura de las válvulas de aguas durante 10 días para garantizar un mismo punto de partida de todos los árboles, aplicando un riego manual a 72 árboles sin la aplicación de ningún fertilizante, orgánico ni inorgánico. En el día 10 se realizó el primer muestreo y seguidamente las válvulas de los tratamientos requeridos se abrieron para reanudar su riego cada 3 días con fertilizantes inorgánicos. 7 días después de aperturada nuevamente la válvula, se realizó la aplicación del biol para los tratamientos correspondientes y 24 horas después se realizó el segundo muestreo. Finalmente, diez días después se realizó el tercer y último muestreo. El periodo de experimentación cubrió el estado fenológico de la fase de fructificación de la variedad de palto Hass.

Fig. 6: Puntos temporales de toma de muestras de suelo

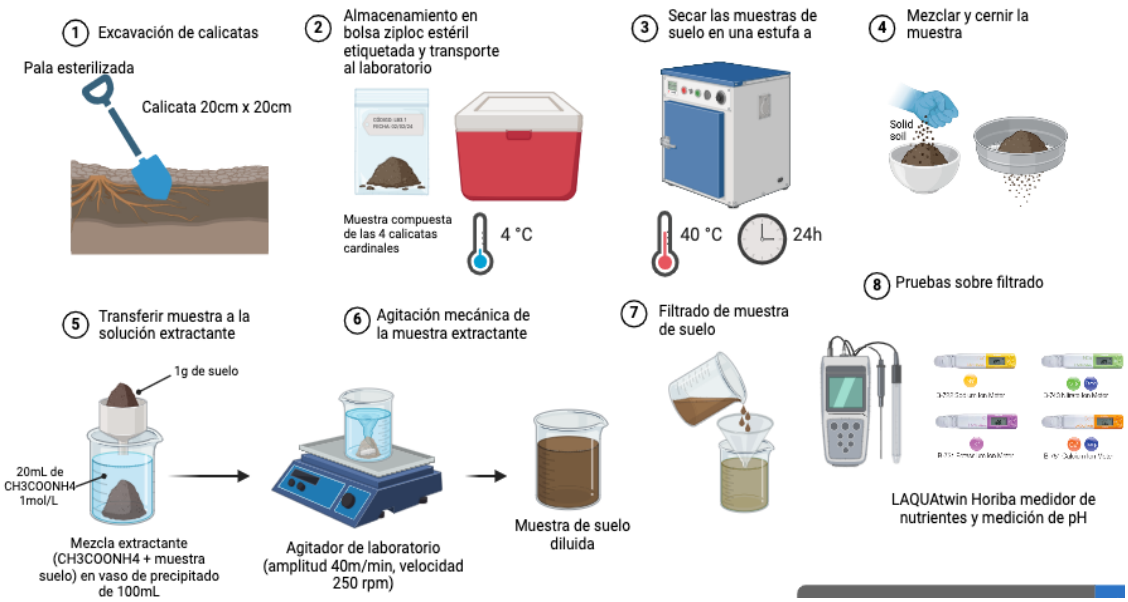


6.3.2 Medición de nutrientes en el suelo y la savia del pecíolo y estimación de las propiedades químicas

Se determinó el pH de las muestras de suelo en una proporción suelo/agua de 1:1 utilizando un medidor de pH (Intellical PHC10105, HACH, EE.UU) y un medidor multiparámetro portátil (HQ2200, HACH, EE.UU) previamente calibrado con un kit de soluciones buffer pH 4,01, 7,00 y 10,01 (HACH, EE.UU). La conductividad de las muestras de suelo se determinó con un sensor de conductividad (Intellical CDC10105, HACH, EE.UU). Para la medición de calcio intercambiable en suelos (Ca^{2+}), sodio intercambiable (Na^{+}), potasio disponible (K^{+}) e iones nitrato NO_3^- se utilizaron los medidores LaquaTWIN Horiba (Sodium Ion Meter LAQUATwin Na-11, Potassium Ion Meter LAQUATwin K-11, Nitrate Ion Meter LAQUATwin NO3-11 y Compact Calcium Ion Meter LAQUATwin Ca-11). Para ello, se secaron las muestras de suelo compuestas durante una semana (o por 24h a 40°C en una estufa) y se tamizaron con una malla de 2mm. Luego, se colocó 1 g de muestra de suelo en un vaso de vidrio de 100 ml y se añadieron 20 mL de $CH_3COONH_4$1mol/L al vaso de precipitado. Se agitó el vaso (amplitud 40m/min, velocidad 250 rpm) durante 1 hora para extraer nutrientes del suelo usando un agitador de laboratorio, y el líquido se filtró a través de papel de filtro JIS No.6. Por último, se calibraron los sensores LAQUAtwin con soluciones estándar que

contengan la misma concentración de CH_3COONH_4 como en las muestras filtradas, se colocó una pequeña muestra de la solución filtrada sobre las dos membranas del sensor y se midieron los iones disponibles [Fig. 7]. El contenido de nitrógeno total (TN) en las muestras de suelo se analizó por el método Kjeldahl, mientras que el contenido de carbono orgánico total (TOC) se analizó siguiendo la Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000 AS-07 Ítem 7.1.7, la cual establece el método de Walkley y Black para la determinación de materia orgánica del suelo. Para la medición de los nutrientes disponibles en la savia vegetal (Ca^{2+}, Na^{+}, K^{+} y NO_3^{-}) se emplearon los medidores LaquaTWIN Horiba anteriormente especificados. Se recogieron los pecíolos de 5 hojas recientemente maduras por árbol (60 hojas/ tratamiento). Posteriormente, los 60 pecíolos del mismo tratamiento se mezclaron y se cortaron con una tijera limpia, y los trozos se trituraron en un extractor de alimentos estéril. La savia de los peciolos se exprimió utilizando una prensa de ajo o prensa hidráulica de savia sobre un vaso de precipitado limpio. Antes de la medición de las muestras, se calibraron los sensores usando las dos soluciones estándar que vienen incluidas en los kits. Se tomó una muestra mínima de 0,3mL de muestra con una micropipeta limpia sobre ambas áreas del sensor y se midió la savia fresca a los 1-2 minutos después del prensado.

Fig. 7: Protocolo para la medición de los parámetros químicos en muestras de suelo con los medidores LaquaTWIN Horiba



6.3.3 Extracción del ADN del suelo y del biofertilizante

Se extrajo el ADN a partir de 0,25 g de cada muestra compuesta de suelo y réplica de biol utilizando el ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit (Zymo Research, Irvine, CA, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las concentraciones iniciales de ADN se determinaron utilizando el NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) y el Qubit® dsDNA HS Assay Kit de Life Technologies. La calidad y cantidad de ADN extraído se estimó con el bioanalizador 4150 TapeStation System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.) mediante electroforesis automatizada. Las muestras de ADN extraídas se almacenaron a -20°C para su posterior secuenciación.

6.3.4 Purificación y secuenciación metagenómica *shotgun* de ADN

Para la preparación de las librerías genéticas se utilizó el Ligation Sequencing gDNA - Native barcoding kit 24 V14 (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK) empleando un total de 600 ng de ADN extraído en un volumen total de 11L por muestra con el protocolo estándar. Para la purificación del ADN, previo a la ligación de los códigos de barras moleculares, se utilizó el protocolo de los AMPure XP Beads. Posteriormente, se hizo la ligación de los códigos de barras y de los adaptadores nativos. Se usaron 50ng de ADN para la preparación de las librerías y se cuantificó su concentración total de ADN con la ayuda del Qubit dsDNA HS Assay Kit de Life Technologies (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Asimismo, se determinaron los tamaños promedios de las librerías con el 4150 TapeStation System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.). Por último, se hizo el cebado y carga de la celda de flujo R10.4.1 FLO-PRO114M en el equipo PromethION (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK). Esta secuenciación se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular y Bioinformática (UPCH-LID, Lima, Perú).

6.3.5 Procesamiento y anotación de secuencias metagenómicas

Los datos brutos de Nanopore en POD5 fueron procesados con Dorado v0.7.3, utilizando el modelo "Super-accurate" (dna_r10.4.1_e8.2_400bps_sup@v5.0.0). Utilizamos Dorado y Fitlong v0.2.1 para recortar las secuencias adaptadoras, filtrar las lecturas de

baja calidad (Q < 10) y excluir las secuencias cortas (< 200 bp). Se utilizó este modelo de basecalling para obtener una mayor exactitud en las bases secuenciadas, logrando una media de calidad de lecturas superior a Q15.

Los datos de secuenciación se procesaron para filtrar las secuencias genómicas humanas, conservando las lecturas no humanas para el análisis posterior. El siguiente proceso bioinformático se implementó con Nextflow (CITAR) para garantizar la reproducibilidad y la escalabilidad. Las lecturas de secuenciación sin procesar en formato FASTQ se alinearon con el genoma humano T2T-CHM13 (ensamblaje GCA_009914755.4 de GenBank) utilizando Minimap2 versión 2.28 (CITAR). Minimap2 está optimizado para datos de secuenciación de lectura larga, y se utilizó el preajuste «map-ont» para acomodar las lecturas de Oxford Nanopore Technologies (ONT). El archivo BAM resultante se ordenó por nombre de lectura utilizando «Samtools sort» para facilitar los pasos de procesamiento posteriores (CITAR SAMTOOLS). Las estadísticas de alineación se generaron utilizando «Samtools flagstat» para proporcionar una visión general de los resultados del mapeo, incluyendo el total de lecturas, lecturas mapeadas y lecturas no mapeadas. Para aislar las lecturas que no se alineaban con el genoma humano, se utilizó «Samtools view» con la opción -f 4, que filtra las lecturas no mapeadas. Se generaron estadísticas de las lecturas no mapeadas para evaluar el número de lecturas no humanas extraídas. El archivo BAM no mapeado que contenía las lecturas no humanas se convirtió de nuevo al formato FASTQ utilizando «Samtools fastq» para compatibilizarlo con las aplicaciones posteriores.

La calidad de las lecturas fue verificada utilizando NanoPlot v1.43.0, herramienta que proporciona visualizaciones detalladas sobre la distribución de la longitud de los lecturas, la calidad de las bases y otros parámetros relevantes, confirmando que los lecturas cumplían con los estándares requeridos para el posterior ensamblaje.

El ensamblaje de las lecturas en *contigs* se realizó con MetaFlye v2.9.5, y se empleó Medaka v1.7.3 para llevar a cabo un pulido de los *contigs* con el fin de mejorar la calidad de los ensambles obtenidos. La verificación del ensamblaje se efectuó mediante Minimap2 v2.24, que mapea las lecturas originales contra los *contigs* ensamblados para evaluar la cobertura y la calidad del ensamblaje.

La asignación taxonómica de las lecturas se realizó con Kraken2/Bracken v2.1.2 con la base de datos PlusPF, actualizada el 5 de junio de 2024, la cual se basa en RefSeq y contiene secuencias de referencia correspondientes a arqueas, bacterias, virus, plásmidos, el genoma humano, protozoos y hongos.

Los *contigs* ensamblados y pulidos fueron sometidos a anotación genómica utilizando Bakta (v1.5.0), un programa bioinformático especializado en la anotación automática de genomas bacterianos y arqueales. Bakta identificó genes codificantes de proteínas, ARN ribosomales (rRNA), ARN de transferencia (tRNA) y otros elementos genómicos esenciales. Se empleó EggNOG-mapper v2 para realizar la anotación funcional de genes basándose en ortología, lo cual permitió clasificar los genes en clústers de ortólogos (COGs), al asignar cada gen a una o varias categorías funcionales estándar (ej. "Energía y conversión de compuestos", "Metabolismo de aminoácidos", "Señalización transducción", etc.). Cabe recalcar que para este estudio solo se detectó la presencia de COGs en el metagenoma, sin inferir su nivel de expresión o regulación, lo que no implica un uso activo del gen sino la capacidad potencial de la comunidad microbiana para realizar dichas funciones. Finalmente, para agrupar los *contigs* en bines basados en la abundancia y composición de las secuencias se utilizó MaxBin2 v2.2.7, MetaBAT2 v2.15 y CONCOCT v1.0.0. Finalmente, se empleó CheckM2 para evaluar la calidad de los bines en términos de completitud y contaminación.

6.3.6 Análisis de la información

6.3.6.1 Operacionalización de variables

Tabla 3: Tabla de operacionalización de variables

Variable	Tipo de variable	Definición conceptual	Definición operacional	Indicadores	Tipo y escala	Rango
Volumen de biofertilizante (biol)	Independiente	Cantidad de biol aplicado a cada planta [55]	Aplicación de diferentes volúmenes de biol en el suelo de la rizósfera del palto	Volumen de biol aplicado por planta (L/planta)	Cuantitativa, discreta	0L/planta 0,75L/planta 3L/planta 6L/planta

Aplicación de inóculo del bioestimulante Simbio RizoPRO	Independiente	Aplicación del bioestimulante Simbio RizoPRO [56]	Dosis de bioestimulante aplicado a la planta (4,85mL/planta)	-Sí -No	Categórica, nominal	No aplica
Tiempo de muestreo	Independiente	Períodos de tiempo en los que se muestreó el suelo [57]	Evaluación en tres momentos específicos: línea base, 24 horas después de la aplicación de biol y 10 días después de la aplicación.	Registro temporal de los distintos momentos de muestreo de suelo	Categórica, ordinal	Línea base 24h después 10 días después
Parámetros fisicoquímicos del suelo	Dependiente	Mediciones de los parámetros fisicoquímicos del suelo afectados por la aplicación de biol [58]	Evaluación de pH, conductividad eléctrica, contenido de nutrientes (Ca^{2+}, Na^{+}, K^{+}, NO_3^{-}), nitrógeno total, carbono orgánico total, y otros elementos químicos antes y después de la aplicación de biol	pH, conductividad eléctrica, concentración de nutrientes (Ca^{2+}, Na^{+}, $K+$, NO_3^{-}), nitrógeno total, carbono orgánico total	Cuantitativa, continua	Rango de valores medidos
Cambios taxonómicos del microbioma	Dependiente	Alteración en la composición y abundancia de especies microbianas en el suelo [59]	Evaluación de la abundancia relativa de la microbiota rizosférica de paltos antes y después de la aplicación de biofertilizantes utilizando secuenciación metagenómica shotgun.	Abundancia relativa de géneros y especies microbianas	Cuantitativa, continua	Rango de abundancia relativa

Cambios funcionales del microbioma	Dependiente	Alteración en la actividad y funciones metabólicas de las especies microbianas en el suelo. [59]	Análisis de genes clave implicados en procesos críticos para la interacción planta-microorganismo (e.g., fijación de nitrógeno, solubilización de fósforo, resistencia a enfermedades vegetales) antes y después de la aplicación de biofertilizantes	Abundancia de genes funcionales	Cuantitativa, continua	Rango de abundancia de genes

6.3.6.2 Análisis Estadístico

En la α-diversidad se evaluaron las curvas de rarefacción y los índices de Simpson y Shannon. Para el análisis estadístico de la α-diversidad se utilizó el test de Kruskal-Wallis empleando el paquete stats de R, mientras que la β-diversidad se determinó utilizando PERMANOVA con 999 permutaciones para comprobar si existen diferencias significativas en las comunidades bacterianas y fúngicas, considerando una diferencia estadísticamente significativa con valores $p < 0.05$. La β-diversidad se visualizó mediante un NMDS (Escalamiento Multidimensional No Métrico) utilizando la métrica de distancia de Bray-Curtis, empleando el paquete vegan de R.

Se coensamblaron los códigos de barras de los grupos tratados con biol y los no tratados tras verificar la robustez de las agrupaciones con el análisis PCoA, de la siguiente manera: muestras de línea base (códigos de barras 1-6), muestras luego de 24h de aplicar biol (códigos de barras 8, 9, 10 y 12) y muestras luego de 10 días de aplicar biol (códigos de barras 15, 16, 17 y 19). Para identificar las diferencias significativas en la abundancia relativa de especies microbianas específicas de interés agronómico entre ambos grupos, se empleó la prueba estadística LEfSe (*Linear Discriminant Analysis Effect Size*). Esta metodología permite detectar y cuantificar las variaciones relativas en la microbiota que

son estadísticamente significativas entre los grupos. LEfSe no solo permitió discernir las especies microbianas cuya presencia o abundancia se ve significativamente afectada por la aplicación de biol, sino también evaluar las diferencias relativas en la abundancia de genes de importancia agrícola.

El análisis de abundancia diferencial fue realizado con DESeq2 (v1.45.3) en R (v4.2.0). Los datos de conteo crudo de especies fueron filtrados para excluir aquellas cuya suma total de abundancia fue menor a 400 en todas las muestras, lo cual permitió enfocarse en aquellas especies con mayor representación en la base de datos. Los datos fueron normalizados utilizando los factores de tamaño de DESeq2 para corregir las diferencias en las profundidades de secuenciación entre las muestras. Un modelo lineal generalizado de binomial negativa fue ajustado con la fórmula de diseño - *Tratamiento*, comparando muestras tratadas con biofertilizante frente a los controles sin tratamiento. Los cambios en la abundancia se ajustaron mediante el método «apeglm» para obtener estimaciones más precisas del tamaño del efecto. La significancia estadística se evaluó mediante pruebas de Wald, con un umbral de alpha = 0.05 para el valor ajustado de p y un cambio de $\log_2$ absoluto mayor a 1 para considerar las especies diferencialmente abundantes. Los valores de p fueron ajustados mediante el procedimiento de Benjamini-Hochberg. Las especies que cumplieron estos criterios se clasificaron como diferencialmente abundantes entre los grupos de tratamiento.

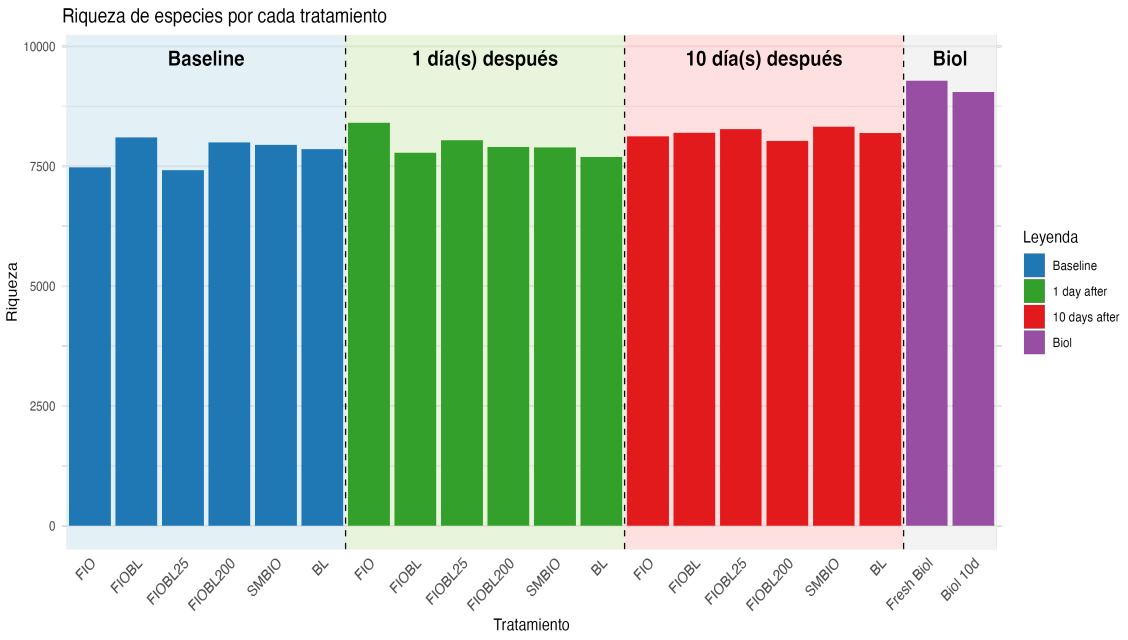
Adicionalmente, se realizó un análisis de correspondencia canónica (CCA) para evaluar la relación entre la estructura de la comunidad microbiana y las 19 variables ambientales del suelo (nitrógeno total, nitrógeno nítrico, fósforo total, fósforo disponible, carbono orgánico total, plomo, cadmio, pH del suelo y savia vegetal, conductividad eléctrica del suelo y savia vegetal, entre otros). Este análisis se llevó a cabo en R utilizando los paquetes vegan y readr. Se empleó la función *ordistep* para realizar una selección por pasos tanto hacia adelante como hacia atrás, iniciando con un modelo nulo (cca(abundances ~ 1, data = environmental)) y un modelo completo (cca(abundances ~ ., data = environmental)). La selección *stepwise* se realizó con un umbral de entrada (Pin) de 0.05 y de salida (Pout) de 0.1, utilizando 999 permutaciones para validar la significancia de las variables seleccionadas. El modelo final seleccionado fue resumido y

evaluado mediante pruebas de ANOVA para determinar la significancia de las variables ambientales en la estructuración de las comunidades microbianas.

VII. RESULTADOS

7.1 Riqueza de especies

Fig 8: Riqueza de especies en distintos tratamientos (BL = biol, FIO = fertirriego inorgánico sin biol, FIOBL = fertirriego inorgánico + biol 100%, FIOBL200 = fertirriego inorgánico + biol 200%, FIOBL25 = fertirriego inorgánico + biol 25%, SMBIO = fertirriego inorgánico + biol 25% + bioestimulante Simbio) a lo largo de tres puntos temporales (Línea base en azul, 24 horas después de aplicar biol en verde y 10 días después en rojo).



7.2 Índices alfa – diversidad de Shannon y Simpson

Fig 9: Índice de diversidad de Shannon en distintos tratamientos (BL = biol, FIO = fertirriego inorgánico sin biol, FIOBL = fertirriego inorgánico + biol 100%, FIOBL200 = fertirriego inorgánico + biol 200%, FIOBL25 = fertirriego inorgánico + biol 25%, SMBIO = fertirriego inorgánico + biol 25% + bioestimulante Simbio) a lo largo de tres puntos temporales (Línea base en azul, 24 horas después de aplicar biol en rojo y 10 días después en verde).

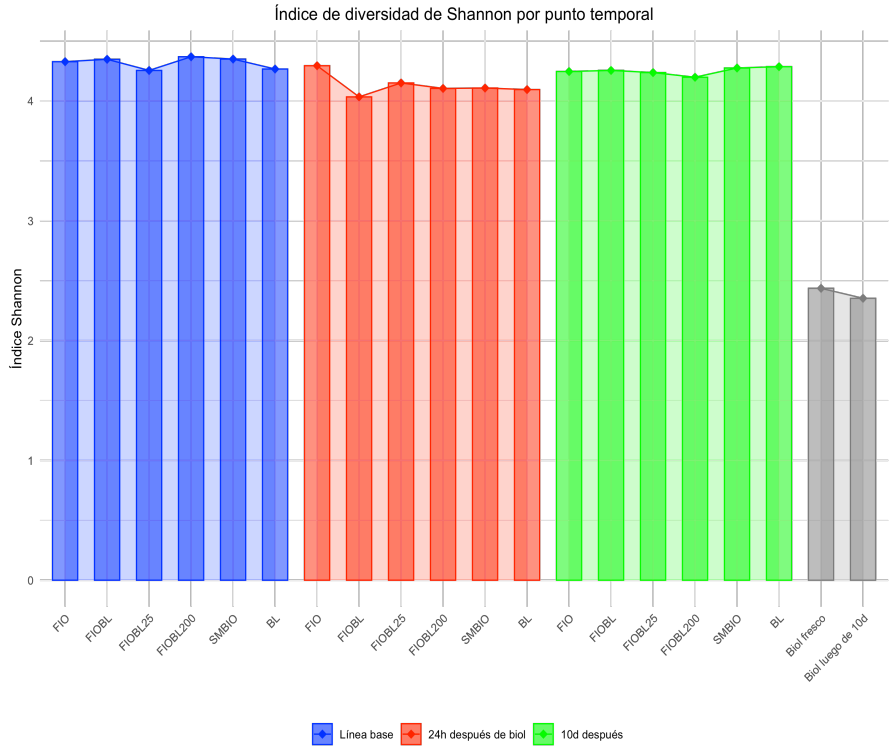
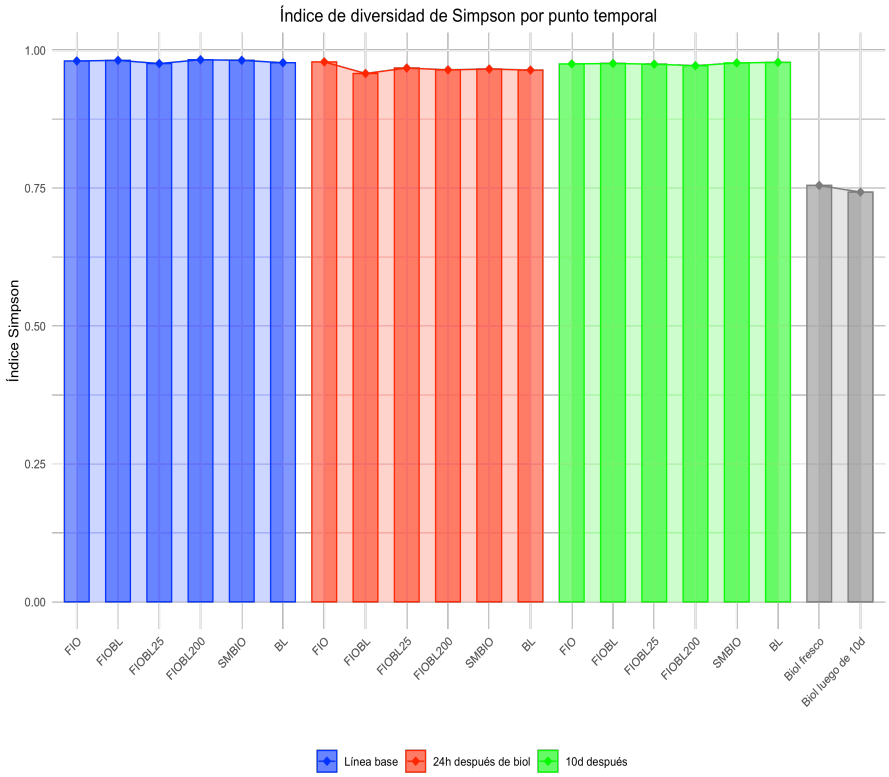


Fig 10: Índice de diversidad de Simpson en distintos tratamientos (BL = biol, FIO = fertirriego inorgánico sin biol, FIOBL = fertirriego inorgánico + biol 100%, FIOBL200 = fertirriego inorgánico + biol 200%, FIOBL25 = fertirriego inorgánico + biol 25%, SMBIO = fertirriego inorgánico + biol 25% + bioestimulante Simbio) a lo largo de tres puntos temporales (Línea base en azul, 24 horas después de aplicar biol en rojo y 10 días después en verde).



La figura del **Anexo 1** muestra las curvas de rarefacción para todos los tratamientos y grupos de muestras, en los que se evidencia que todos los grupos alcanzan un alto valor esperado de número de especies con un número de *lecturas* a partir de aproximadamente $2{,}5 \times 10^5$, valor a partir del cual se observa una meseta.

La **Figura 8**, muestra la riqueza de especies de cada uno de los grupos de tratamiento en los distintos puntos temporales. Es decir, el cálculo absoluto del total de especies detectadas en cada uno de los tratamientos, sin considerar la abundancia de estos mismos. Se puede observar que todos los tratamientos, independientemente de su punto temporal, ronda una riqueza de especies de aproximadamente 7500, no se observan cambios drásticos aparentes.

En la **Figura 9**, el índice de diversidad de Shannon para el grupo Línea base permanece constante alrededor de 4.3 en todos los tratamientos. Las muestras recolectadas a las 24 horas después de la aplicación de biol muestran una disminución en el índice de Shannon, alcanzando un valor mínimo de 4,0 en el tratamiento FIO. A los 10 días después de la aplicación de biol, el índice de Shannon aumenta, aproximándose a los valores de Línea base, con un rango entre 4,2 y 4,3 en todos los tratamientos. Se observa que 24 horas después de aplicar biol, los tratamientos BL (biol al 100%), FIOBL (fertirriego inorgánico + biol 100%), FIOBL200 (fertirriego inorgánico + biol 200%), son los de menor índice de Shannon, en particular el tratamiento de FIOBL.

En la **Figura 10**, el índice de diversidad de Simpson para el grupo Línea base se mantiene cercano a 1,0. A las 24 horas post-tratamiento, se observa una disminución notable en el índice de Simpson en los tratamientos BL y FIOBL, con valores entre 0,95 y 0,96. A los 10 días, el índice de Simpson muestra una recuperación, situándose nuevamente en valores cercanos a los observados en el grupo Línea base para todos los tratamientos.

7.3 Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS)

Fig 11: Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) que muestra la agrupación taxonómica bacteriana de los microbios de la rizósfera del suelo en 3 puntos temporales. NB = no biol o línea base, B24h = 24h luego de aplicar biol, B10d = 10 días luego de aplicar biol (n=6). El análisis se basó en la matriz de disimilitud de Bray-Curtis utilizando datos de abundancia relativa obtenidos a partir de una transformación del número de lecturas de microbios.

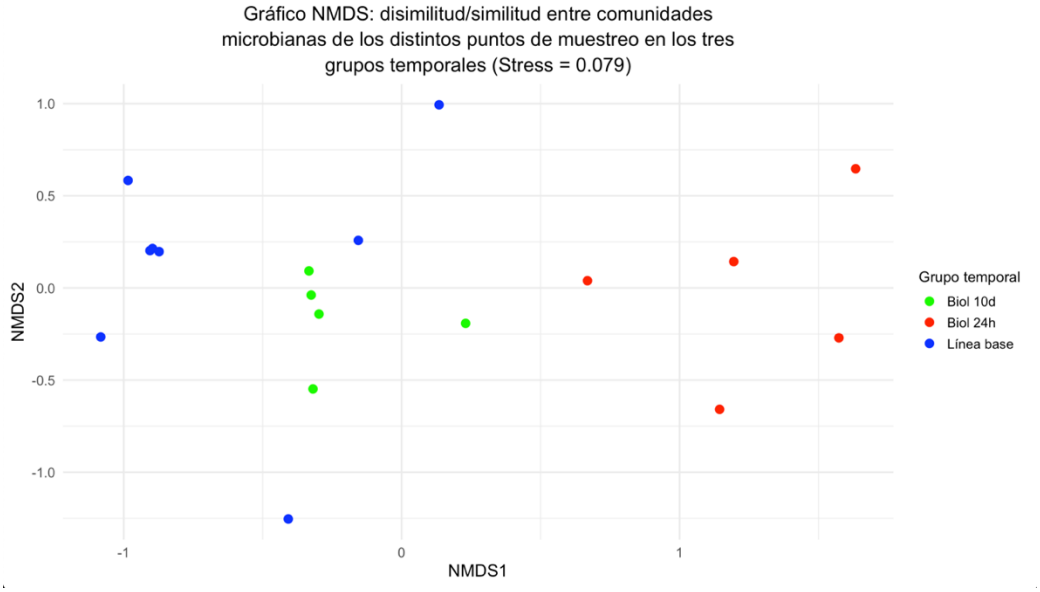


Tabla 5: Resultados de PERMANOVA globales para el NMDS

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio cuadrado	Modelo F	R2	Pr(>F)
Tratamiento	2	0,029061	0,014530	2,953676	0,282549	0,001
Residuales	15	0,073791	0,004919	NA	0,717451	NA
Total	17	0,102852	NA	NA	1,000000	NA

Tabla 6: Resultados de PERMANOVA por comparación por pares para el NMDS (Línea base vs 24h, Línea base vs 10d, 24h vs 10d)

Línea base vs 24h						
	Grados de libertad	**Suma de cuadrados**	**Promedio cuadrado**	**Modelo F**	**R2**	**Pr(>F)**
Tratamiento	1	0,0226663	0,022666302	4,326355	0,282821	0,001
Residuales	11	0,05763034	0,005239122	NA	0,717179	NA
Total	12	0,08029664	NA	NA	1,000000	NA

Línea base vs 10d						
	Grados de libertad	**Suma de cuadrados**	**Promedio cuadrado**	**Modelo F**	**R2**	**Pr(>F)**
Tratamiento	1	0,006798394	0,006798394	1,424168	0,1146289	0,058
Residuales	11	0,05250948	0,004773589	NA	0,8853711	NA
Total	12	0,059307874	NA	NA	1,000000	NA
24h vs 10d						
	Grados de libertad	**Suma de cuadrados**	**Promedio cuadrado**	**Modelo F**	**R2**	**Pr(>F)**
Tratamiento	1	0,0140052	0,014005203	2,992351	0,2722212	0,008
Residuales	8	0,03744268	0,004680335	NA	0,7277788	NA
Total	9	0,05144788	NA	NA	1,000000	NA

La **Figura 11** muestra el análisis NMDS basado en distancias de Bray-Curtis para la abundancia de especies, el cual obtuvo un valor de estrés de 0,0998 y un ajuste R^2 de 0,99, indicando una representación confiable en dos dimensiones.

En el análisis de ordenación no métrica por escalamiento multidimensional (NMDS), los ejes no son coordenadas físicas, sino que representan dimensiones abstractas que conservan las distancias de Bray-Curtis entre las muestras. El desplazamiento de un punto de muestreo hacia valores positivos o negativos a lo largo del eje NMDS1 indica que dos comunidades difieren progresivamente en el principal gradiente de disimilitud capturado por el algoritmo: los puntos muestrales más próximos comparten perfiles taxonómicos muy similares, mientras que aquellos puntos situados en extremos opuestos son los más disímiles entre sí. La orientación absoluta del eje es arbitraria; en otras palabras, invertir el gráfico en 180 grados no alteraría la interpretación ecológica. Por lo tanto, los lados "izquierda" y "derecha" deben entenderse únicamente como polos relativos de este gradiente.

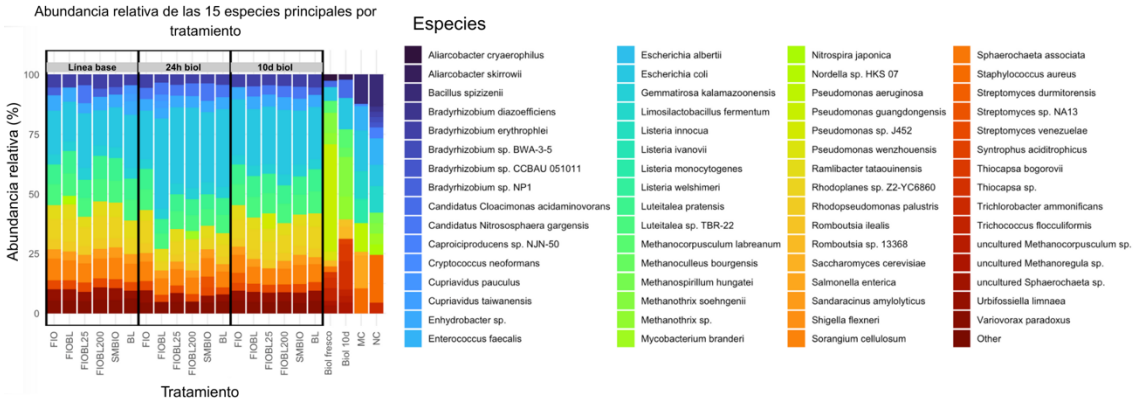
Se observa una mayor dispersión hacia la derecha en las muestras tomadas a las 24 horas después de aplicar biol (B24h, en rojo), mientras que las muestras de 10 días después de la aplicación de biol (B10d, en verde) y las de la línea base (NB, en azul) tienden a agruparse hacia el lado izquierdo del gráfico.

Para evaluar diferencias estadísticas entre grupos, se utilizó un análisis de varianza multivariado permutacional (PERMANOVA) mediante la función *adonis* del paquete

vegan en R. Los resultados globales explicaron el 28,25% de la variabilidad total con valores de F = 2,95, p = 0,001, R^2 = 0,2825 [**Tabla 5**]. Los resultados de PERMANOVA por comparación por pares para el NMDS revelaron que tanto las comparaciones de Línea base vs 24h y 24h vs 10d mostraron diferencias estadísticamente significativas (p=0,001 y p=0,008, respectivamente), mientras que Línea base vs 10d no presentó diferencias significativas (p=0,058, >0,05) [**Tabla 6**].

7.4 Abundancias relativas de especies

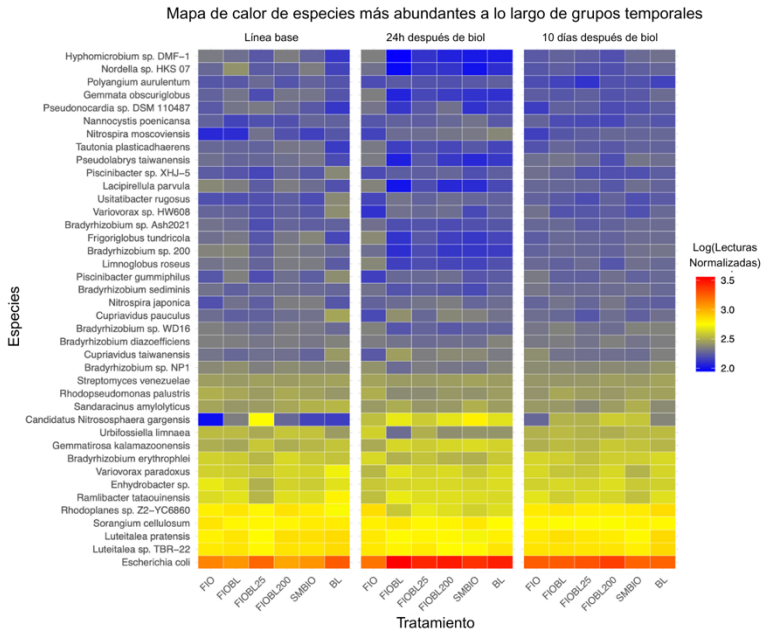
Fig 12: Gráfico de barras de abundancias relativas de las top 15 especies (bacterias, hongos, arqueas) en la rizósfera de palto por grupo de tratamiento. BL = biol, FIO = fertirriego inorgánico sin biol, FIOBL = fertirriego inorgánico + biol 100%, FIOBL200 = fertirriego inorgánico + biol 200%, FIOBL25 = fertirriego inorgánico + biol 25%, SMBIO = fertirriego inorgánico + biol 25% + bioestimulante Simbio (n=6). Las abundancias relativas <0,1% se combinaron en "Otros".



La **Figura 12** muestra la diferencia en abundancia relativa de las 15 especies más abundantes entre los distintos tratamientos. Se puede observar que, en todos los grupos de códigos de barras correspondientes al análisis metagenómico de la rizósfera, la bacteria más abundante con respecto al resto es *Escherichia coli*, con un porcentaje variado en un rango de entre 15-30%. La abundancia relativa de la *E. coli* se ve particularmente pronunciada en el grupo temporal de 24h después de aplicar biol. En el grupo de 24h después de aplicar biol, se ve una diferencia notoria entre los tratamientos FIO (fertirriego inorgánico sin biol) y BL (biol sin fertilizantes inorgánicos): la contribución relativa en la abundancia de especies como *Romboutsia sp.* y *Sphaerochaeta sp.* es mayor en el grupo de FIO, mientras la contribución relativa de *E. coli* es menor. Se observa una mayor dominancia de especies específicas en el grupo de biol puro fresco en comparación con

la muestra de biol tras 10 días de almacenamiento. El género *Pseudomona* domina la muestra de biol fresco (con especies como *Pseudomonas wenzhouensis, Pseudomonas sp. J452, Pseudomonas guangdongensis*). Particularmente, *P.guangdongensis* muestra una abundancia relativa de casi el 50% en la muestra de biol fresco. Por otro lado, especies como *Sphaerochaeta sp., Methanoregula p., Trichococcus flocculiformis* y *Thiocapsa sp.* tienen menor abundancia relativa en comparación a la muestra de biol después de 10 días.

Fig 13: Mapa de calor que muestra las principales especies microbianas con una abundancia relativa media > 0,05% en todas las muestras. Cambios en las especies microbianas en la rizósfera de palto por grupo de tratamiento: BL = biol, FIO = fertirriego inorgánico sin biol, FIOBL = fertirriego inorgánico + biol 100%, FIOBL200 = fertirriego inorgánico + biol 200%, FIOBL25 = fertirriego inorgánico + biol 25%, SMBIO = fertirriego inorgánico + biol 25% + bioestimulante Simbio (n=6). El eje x se divide en los 3 puntos temporales: Línea base (línea base), 24h (24 horas luego de aplicar biol) y 10d (10 días después de aplicar biol).



En específico, las especies *Thiocapsa sp.* y *Thiocapsa bogorovii* tienen una abundancia relativa de casi el 20% en la muestra de biol almacenada por 10 días y de menos del 9% en biol fresco. Esta tendencia también se refleja con las especies *Methanothrix sp.* y *Methanothrix soehngenii*, las cuales se encuentran en mayor proporción relativa (5% y 8%, respectivamente) en la muestra de biol 10d en comparación a la muestra de biol fresco (10% y 19%, respectivamente). Por otra parte, la especie *Pseudomonas guangdongensis* está prácticamente ausente luego de 10 días de almacenada la muestra.

La **Figura 13** muestra un mapa de calor de la abundancia relativa de las 40 especies más abundantes en una escala normalizada logarítmica en base al número de *lecturas* asociadas a cada especie en cada uno de los códigos de barras. A simple vista se puede observar que la especie más abundante es las *Escherichia coli,* asimismo se puede apreciar un aumento de abundancia relativa en la especie *Candidatus Nitrososphaera gargenesis* desde el grupo de línea base hasta el grupo de 24 horas, este aumento parece mantenerse en el grupo de 10 días después, con excepción del grupo control. Otra especie que a simple vista se ve enriquecida entre los mismos grupos es *Nitrospira moscoviensis***,** excepto en el grupo control. Por otro lado, parece que la especie *Nordella sp. HKS 07* se encuentra en menor abundancia relativa en los grupos después del tratamiento.

Fig 14: Gráfico de barras de abundancias relativas de los top 15 géneros eucariotas en la rizósfera de palto por grupo de tratamiento. BL = biol, FIO = fertirriego inorgánico sin biol, FIOBL = fertirriego inorgánico + biol 100%, FIOBL200 = fertirriego inorgánico + biol 200%, FIOBL25 = fertirriego inorgánico + biol 25%, SMBIO = fertirriego inorgánico + biol 25% + bioestimulante Simbio (n=6). Las abundancias relativas <0,1% se combinaron en "Otros".

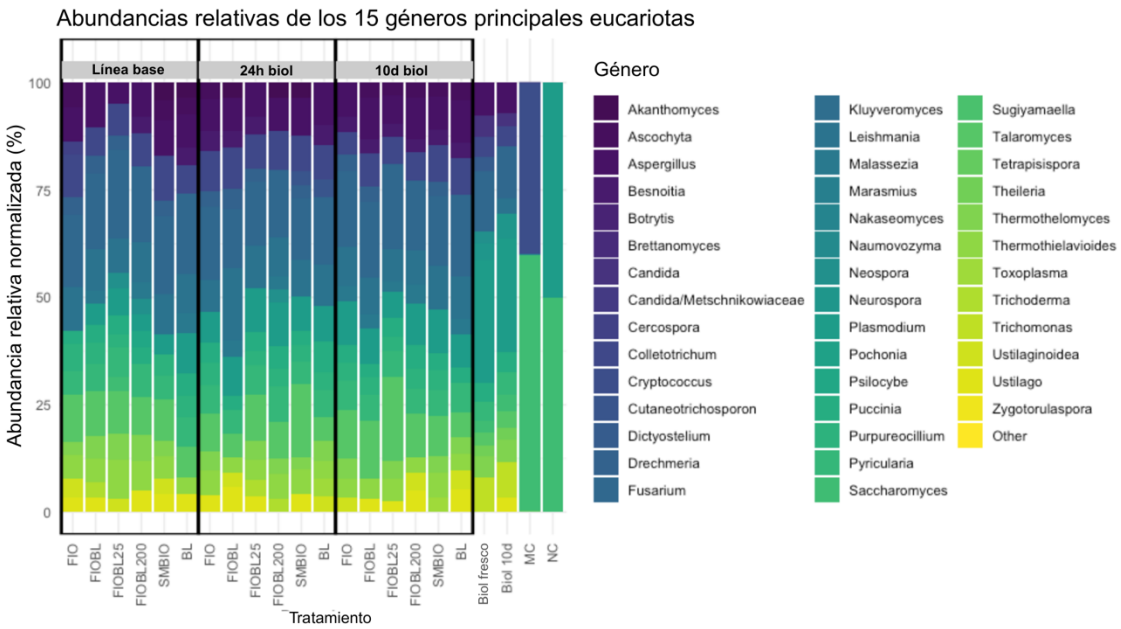


Fig 15: Gráfico de barras de abundancias relativas de los top 15 géneros de bacterias en la rizósfera de palto por grupo de tratamiento. BL = biol, FIO = fertirriego inorgánico sin biol, FIOBL = fertirriego inorgánico + biol 100%, FIOBL200 = fertirriego inorgánico + biol 200%, FIOBL25 = fertirriego inorgánico + biol 25%, SMBIO = fertirriego inorgánico + biol 25% + bioestimulante Simbio (n=6). Las abundancias relativas <0,1% se combinaron en "Otros".

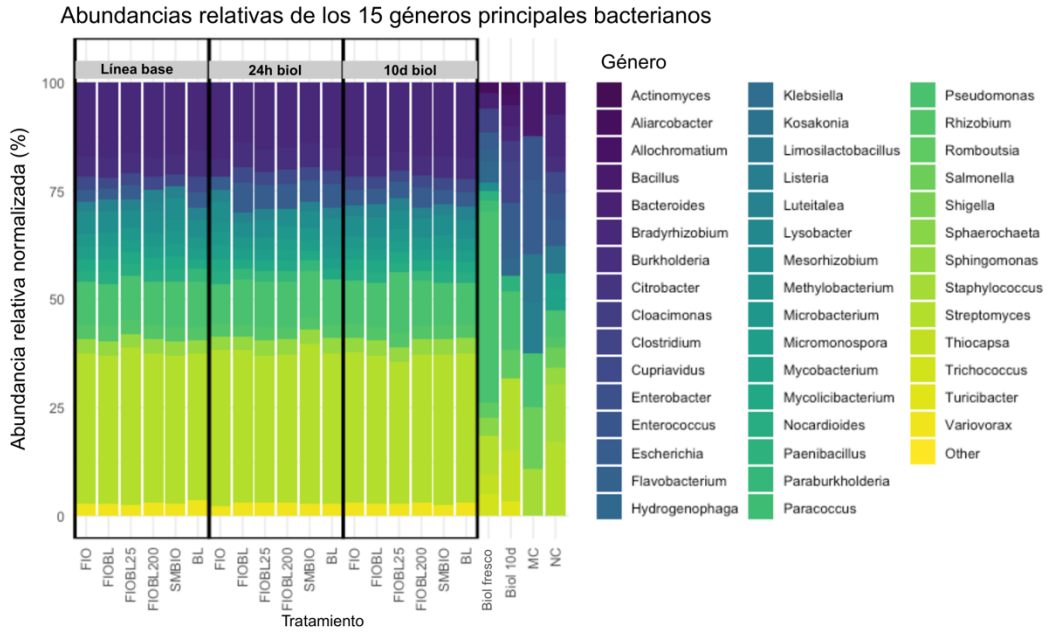


Fig 16: Gráfico de barras de abundancias relativas de los top 15 géneros de arqueas en la rizósfera de palto por grupo de tratamiento. BL = biol, FIO = fertirriego inorgánico sin biol, FIOBL = fertirriego inorgánico + biol 100%, FIOBL200 = fertirriego inorgánico + biol 200%, FIOBL25 = fertirriego inorgánico + biol 25%, SMBIO = fertirriego inorgánico + biol 25% + bioestimulante Simbio (n=6). Las abundancias relativas <0,1% se combinaron en "Otros".

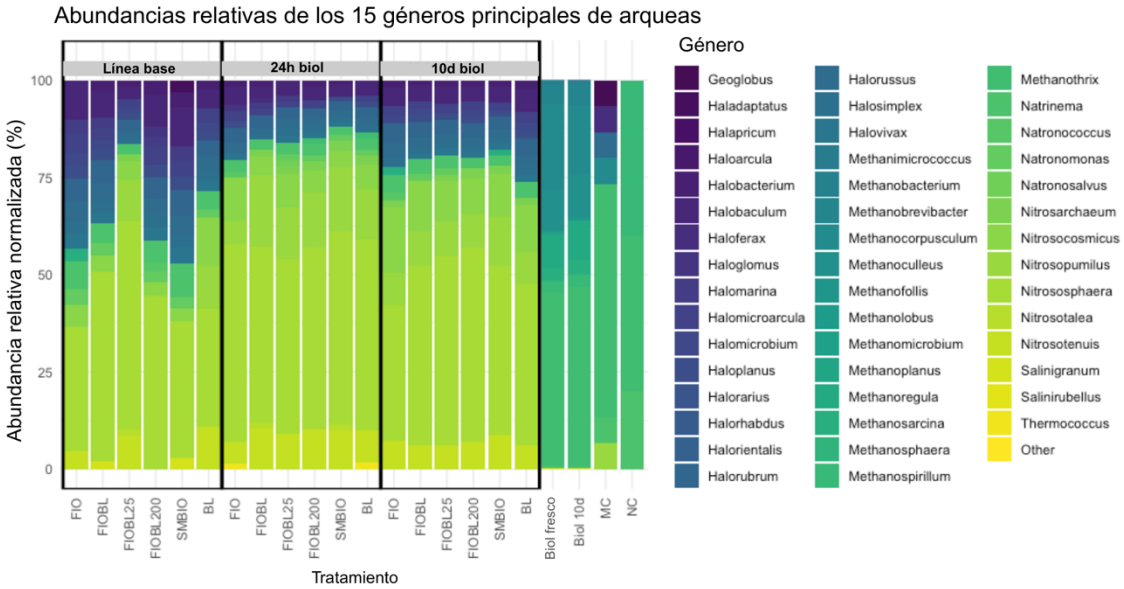


Fig 17: Gráfico de barras de abundancias relativas de los top 15 géneros de virus en la rizósfera de palto por grupo de tratamiento. BL = biol, FIO = fertirriego inorgánico sin biol, FIOBL = fertirriego inorgánico + biol 100%, FIOBL200 = fertirriego inorgánico + biol 200%, FIOBL25 = fertirriego inorgánico + biol 25%, SMBIO = fertirriego inorgánico + biol 25% + bioestimulante Simbio (n=6). Las abundancias relativas <0,1% se combinaron en "Otros".

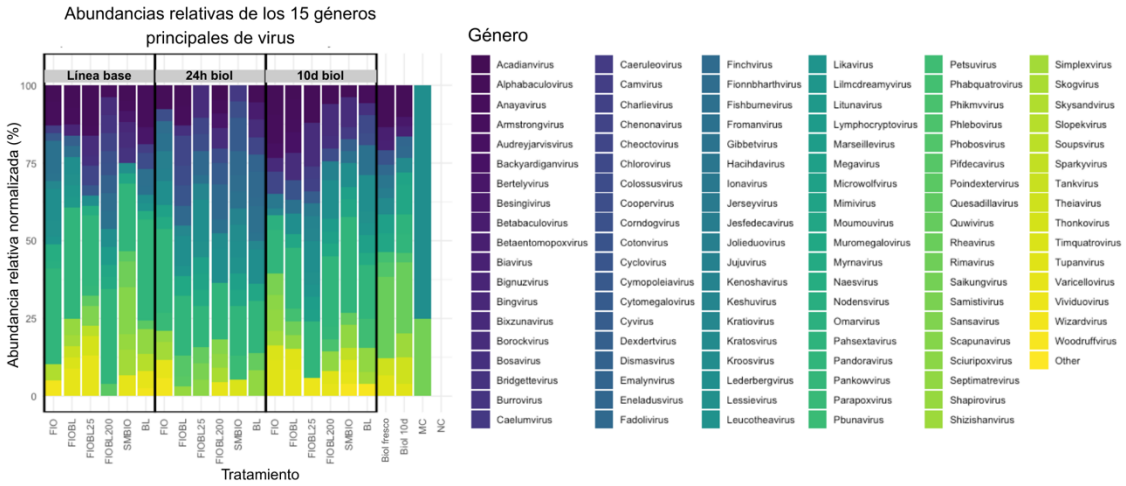
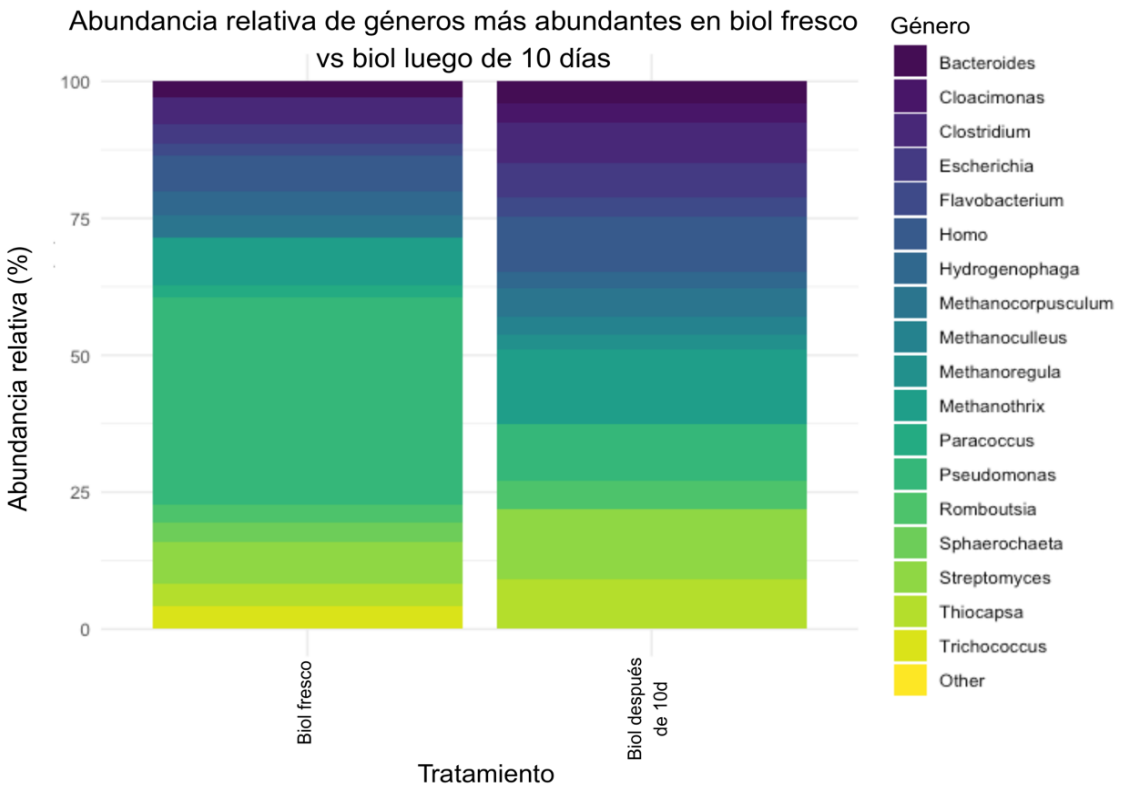


Fig 18: Gráfico de barras de abundancias relativas de los top 15 géneros y especies microbianas en muestras de biol puro fresco y biol puro luego de 10 días. BL = biol, FIO = fertirriego inorgánico sin biol, FIOBL = fertirriego inorgánico + biol 100%, FIOBL200 = fertirriego inorgánico + biol 200%, FIOBL25 = fertirriego inorgánico + biol 25%, SMBIO = fertirriego inorgánico + biol 25% + bioestimulante Simbio (n=6). Las abundancias relativas <0,1% se combinaron en "Otros".



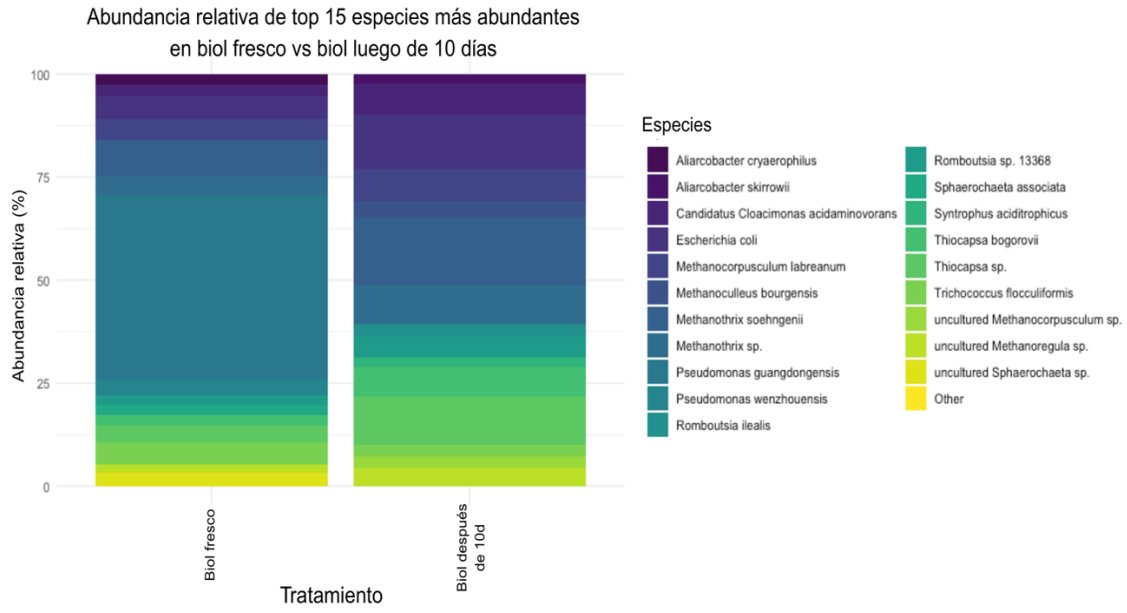
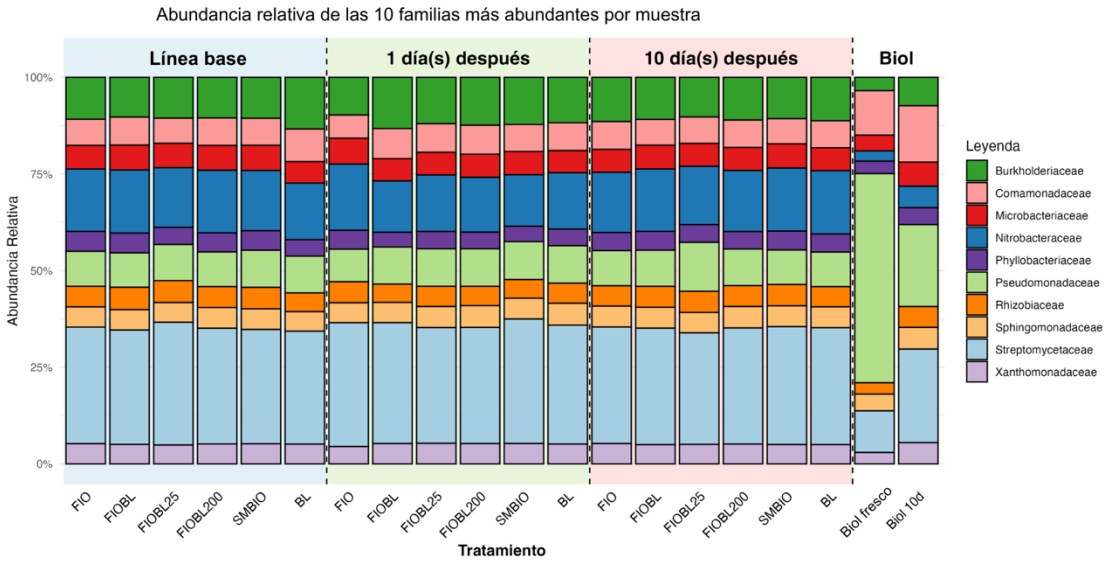


Fig 19: Gráfico de barras de abundancias relativas de las top 10 familias microbianas en la rizósfera de palto por grupo de tratamiento. BL = biol, FIO = fertirriego inorgánico sin biol, FIOBL = fertirriego inorgánico + biol 100%, FIOBL200 = fertirriego inorgánico + biol 200%, FIOBL25 = fertirriego inorgánico + biol 25%, SMBIO = fertirriego inorgánico + biol 25% + bioestimulante Simbio (n=6).



Las **Figuras 14-19** son gráficos de barra exploratorios de abundancias relativas de los top 15 géneros más abundantes segmentados por dominio biológico (dominio Bacteria, Eucarya, Archae y Virus). La gráfica 16 muestra relativa heterogeneidad de géneros bacterianos entre tratamientos y grupos temporales. Si observamos el grupo temporal de 24h después de la aplicación de biol, el género *Escherichia* mantiene una representación relativa dominante en los grupos FIOBL200, FIOBL, BL y FIOBL25, mientras que su contribución en el grupo FIO es ligeramente menor. Por otro lado, se observa una disminución en la proporción relativa del género *Bradyrhizobium* del grupo temporal de 24h después en comparación al grupo de línea base y al grupo de 10 días luego de aplicar biol.

La **Figura 14** muestra los cambios temporales de la abundancia relativa del género eucariota. Se observa, por ejemplo, que el género del parásito protozoario *Leishmania* se encuentra en una proporción consistentemente más abundante en los grupos de tratamiento a los cuales se les aplicó biol y se muestrearon luego de 24h (FIOBL, FIOBL25, FIOBL200, SMBIO, BL). Por otra parte, el gráfico de barras de la **Figura 16**

evidencia que tras 24h de la aplicación de biol, los géneros de arqueas que pertenecen a la familia *Halobacteriaceae* (*Halovivax, Halosimplex, Halorussus, Halorubrum, Halobaculum, Halobacterium*) se vieron disminuidos en proporción relativa mientras que *Nitrosopumilus, Nitrosocosmicus* y *Nitrosotenius* se vieron aumentados. Posteriormente, se observa una recuperación en la abundancia relativa de los géneros de la familia *Halobacteriaceae* y una disminución en la proporción relativa de géneros dentro de la familia *Nitrosopumilaceae*.

La **Figura 18** muestra la comparación de las abundancias relativas de los 15 géneros y especies microbianas más representativos en biol fresco y biol después de 10 días. En la condición de biol fresco, predomina el género *Pseudomonas*, representando colectivamente más del 35% de la comunidad microbiana. En el biol después de 10 días, se observa un incremento en la abundancia relativa de *Clostridium, Streptomyces* y *Methanothrix*, mientras que el género *Pseudomonas* muestra una drástica reducción hasta el 8% de representatividad de abundancia. En la **Figura 18** de especies, se observa con más alta resolución que mientras la especie de *Pseudomonas guangdongensis* representa casi el 30% de la abundancia relativa de las top 15 especies más abundantes mientras que desaparece completamente de las top 15 especies luego de 10 días de almacenamiento de la muestra con biol. En cambio, otras especies como *E. coli, Cloacimonas acidaminovorans, Methanocorpusculum labreanum, Methanothrix soehngenii* y *Trichococcus floccyliformis* incrementan la proporción relativa de su dominancia. En la **Figura 19**, observamos que las abundancias relativas de las 10 familias bacterianas más abundantes no presentan variaciones significativas en las muestras de suelo rizosférico. Por otro lado, sí se puede observar una disminución significativa en la familia Pseudomonadaceae entre el biol fresco y el biol después de 10 días. De manera inversa, la familia Streptomycetaceae aumenta entre el biol fresco y el biol después de 10 días.

7.5 Análisis de abundancia diferencial de especies con DESeq2

Fig 20: Gráfico volcán para el análisis diferencial de abundancias de especies con DESeq2 releva cambios taxonómicos entre los grupos de Línea base (línea base) vs 24h (24h después de aplicar biol). Puntos rojos = especies con cambios significativos y con significancia estadística. Puntos verdes = especies con cambios significativos, pero sin significancia estadística. Puntos grises = no significativos.

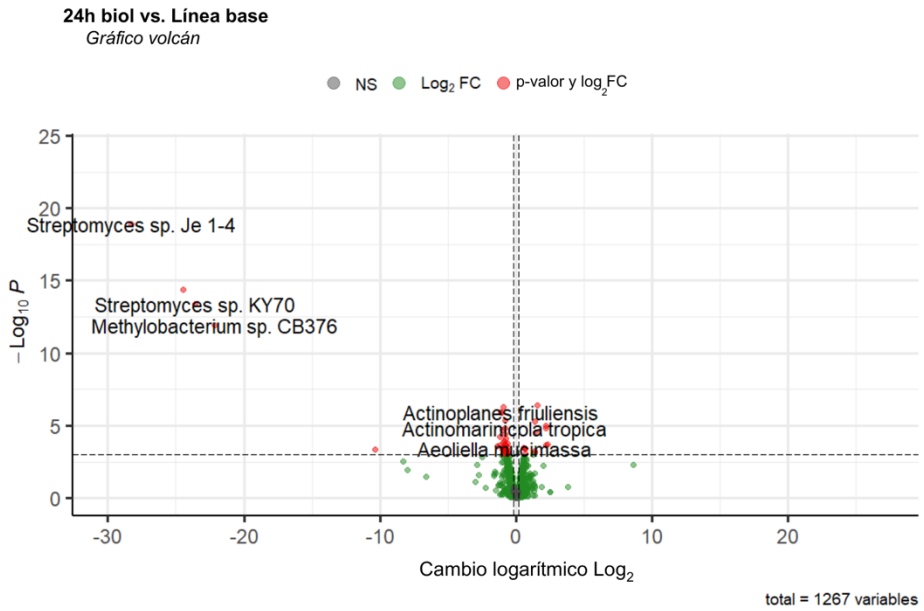
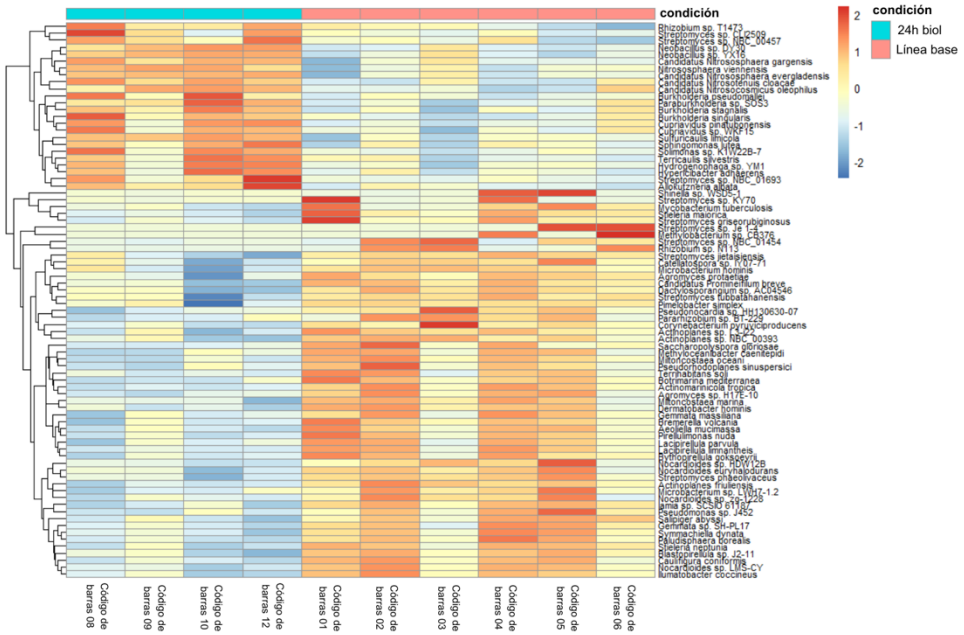


Fig 21: Mapa de calor del análisis diferencial taxonómico con DESeq2 releva cambios taxonómicos entre los grupos de Línea base (línea base) vs 24h (24h después de aplicar biol). Color de barra superior: rosa = línea base; celeste = 24h después.



En la **Figura 20** se observa que las especies *Streptomyces sp. Je 1-4, Streptomyces sp. KY70* y *Methylobacterium sp. CB376* presentan una reducción significativa en su abundancia relativa en 24 horas, con altos valores de -log10(p), indicando cambios estadísticamente robustos (puntos rojos en el cuadrante izquierdo). Por otro lado, especies como *Actinoplanes friuliensis, Actinomarinicola tropica* y *Aeoliella mucimassa* muestran leves disminuciones de abundancia, pero no alcanzan significancia estadística (puntos verdes cercanos al eje). En general, hay una mayor abundancia diferencial de especies en Línea base, con predominio de géneros del filo Actinobacteria. Sin embargo, el mapa de calor de la **Figura 21** revela que las bacterias como *Rhizobium sp. T1473, Nitrososphaera viennensis, Sulfuricaulis limicola, Cupriavidus sp.*, entre otros se ven significativamente más abundantes tras la condición de 24h luego de aplicar biol.

Fig 22: Gráfico volcán para el análisis diferencial de abundancias de especies con DESeq2 releva cambios taxonómicos entre los grupos 24h (24h después de aplicar biol) y 10d (10 días después de aplicar biol). Puntos rojos = especies con cambios significativos y con significancia estadística. Puntos verdes = especies con cambios significativos, pero sin significancia estadística. Puntos grises = no significativos.

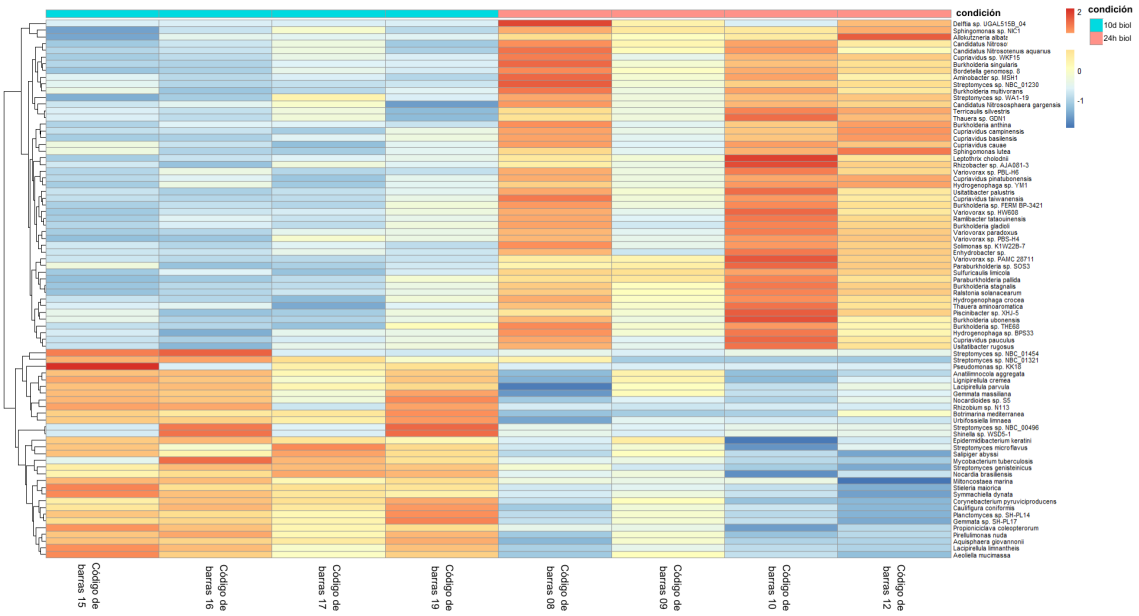


Fig 23: Mapa de calor del análisis diferencial taxonómico con DESeq2 releva cambios taxonómicos entre los grupos de 24h (24h después de aplicar biol) y 10d (10 días después de aplicar biol). Color de barra superior: rosa = 24h después de aplicar biol; celeste = 10d después de aplicar biol.

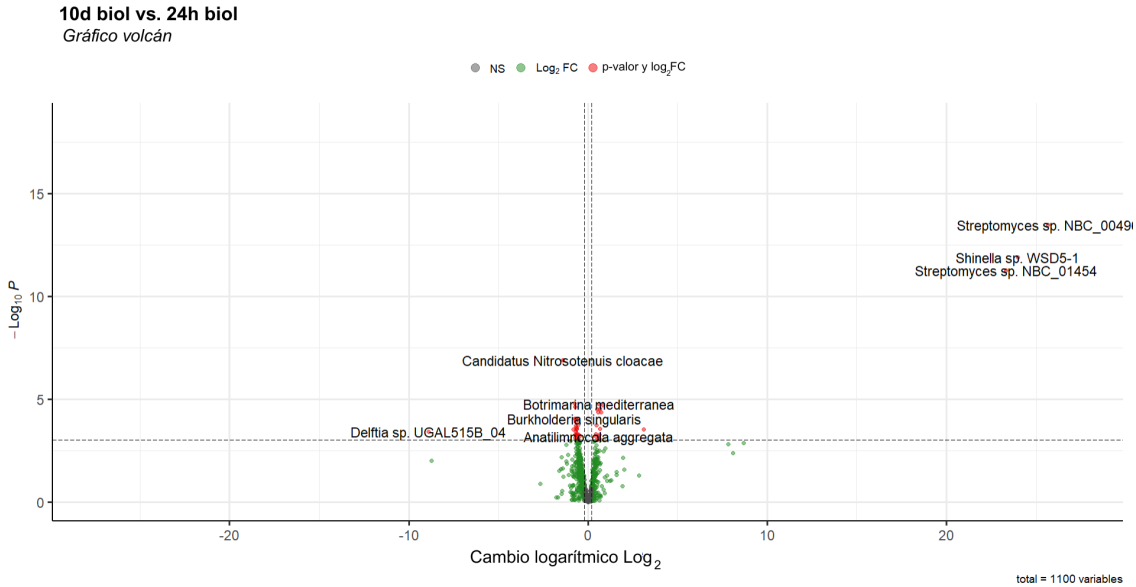


Fig 24: Gráfico volcán para el análisis diferencial de abundancias de especies con DESeq2 releva cambios taxonómicos entre los grupos Línea base (línea base) y 10d (10 días después de aplicar biol). Puntos rojos = especies con cambios significativos y con significancia estadística. Puntos verdes = especies con cambios significativos, pero sin significancia estadística. Puntos grises = no significativos.

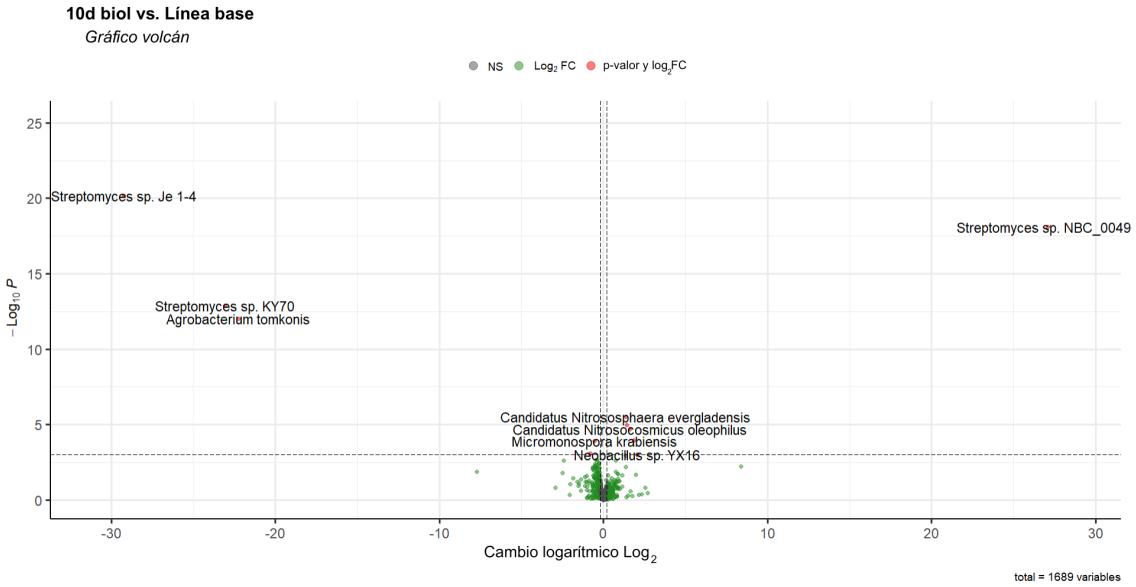
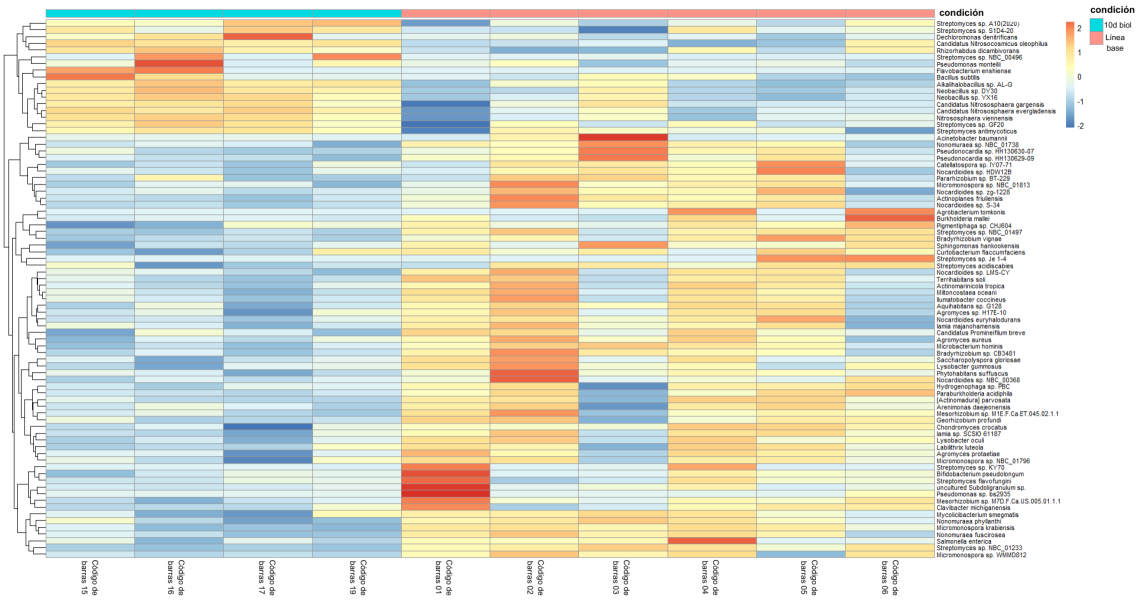


Fig 25: Mapa de calor del análisis diferencial taxonómico con DESeq2 releva cambios taxonómicos entre los grupos de Línea base (línea base) y 10d (10 días después de aplicar biol). Color de barra superior: rosa = línea base; celeste = 10d después de aplicar biol.



La **Figura 22** muestra el análisis diferencial de abundancias entre las especies presentes a las 24 horas y 10 días después de la aplicación de biol, realizado con DESeq2. En el

cuadrante derecho, especies como *Streptomyces sp. NBC_0049* y *Streptomyces sp. NBC_01454* destacan por su incremento significativo en abundancia relativa en el grupo de 10 días (log2FC positivo y valores de -log10(p) elevados). Asimismo, *Shinella sp. WSD5-1* muestra un aumento significativo. En contraste, en el cuadrante izquierdo, especies como *Delftia sp. UGAL515B_04* y *Botrimarina mediterranea* presentan reducciones significativas en su abundancia relativa en 10 días. En general, los cambios reflejan una reestructuración taxonómica con un predominio de géneros como *Streptomyces* tras 10 días. Por otro lado, las **Figuras 24 y 25** muestran que, en general, hay similitud en cuanto a las abundancias de especies en los grupos de Línea base y 10 días después de aplicar el biol. Esto se evidencia por las tonalidades semejantes en el mapa de calor y la poca cantidad de especies diferencialmente abundantes con significancia estadística. La **Figura 24** muestra el análisis diferencial de abundancias de especies entre la línea base (Línea base) y 10 días después de la aplicación de biol. En el cuadrante izquierdo, especies como *Streptomyces sp. Je 1-4, Streptomyces sp. KY70* y *Agrobacterium tomkonis* presentan una reducción significativa en abundancia relativa en el grupo de 10 días (log2FC negativo elevado y -log10(p) significativo). En el cuadrante derecho, *Streptomyces sp. NBC_0049* muestra un notable incremento en abundancia relativa (log2FC positivo elevado). Además, especies ubicadas cerca del centro del gráfico, como *Candidatus Nitrosocosmicus oleophilus, Candidatus Nitrososphaera evergladensis* y *Micromonospora krabiensis*, presentan cambios menos pronunciados en abundancia, con log2FC cercano a cero, pero con cierto nivel de significancia estadística (-log10(p) bajo a moderado).

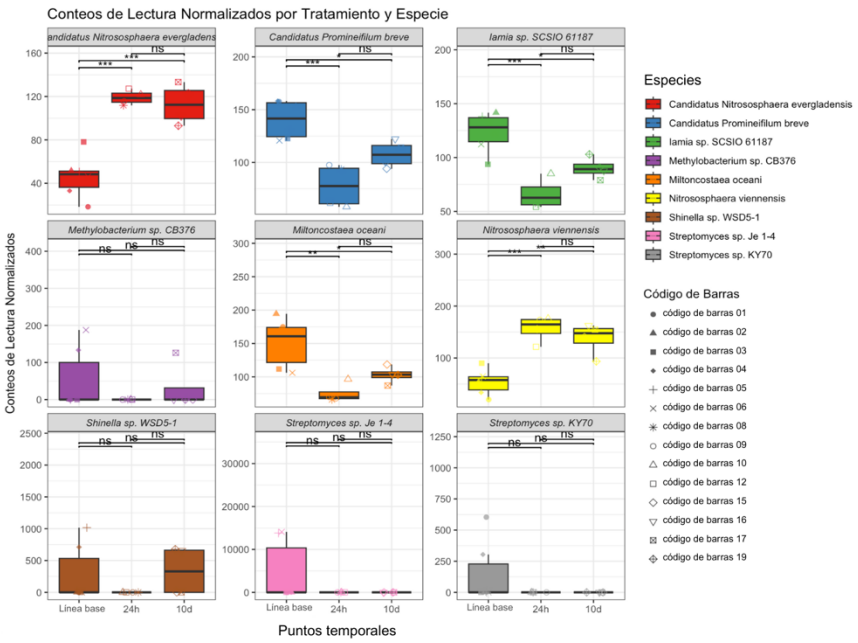
Tabla Nº 7: Valores de p ajustados del Tukey test para las especies enriquecidas

Especies	24h vs Línea Base	10d vs Línea base	10d vs 24h
Candidatus Nitrososphaera evergladensis	0,000101***	0,000225***	0,861000
Candidatus Promineifilum breve	0,000462***	0,036*	0,079000
Iamia sp. SCSIO 61187	0,0003**	0,0148*	0,110000
Methylobacterium sp. CB376	0,446000	0,865000	0,782000
Miltoncostaea oceani	0,00233**	0,0373*	0,329000
Nitrososphaera viennensis	0,000248***	0,00128**	0,592000
Shinella sp. WSD5-1	0,470000	0,980000	0,432000
Streptomyces sp. Je 1-4	0,336000	0,336000	1,000000
Streptomyces sp. KY70	0,386000	0,386000	1,000000

** p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001*

7.6 Cambio en el tiempo de lecturas normalizadas de especies y géneros microbianos enriquecidos

Fig 26: Diagrama de cajas de especies diferencialmente enriquecidas en tres tiempos experimentales (Línea base, 24 h y 10 días después de la aplicación de biol). La significancia estadística de las comparaciones entre grupos se evaluó mediante la prueba de Tukey. Los niveles de significancia se indican como *** p < 0.001, ** p < 0.01, * p < 0.05, y "ns" para diferencias no significativas.



Los diagramas de cajas de la **Figura 26** muestran cambios en la abundancia relativa (lecturas normalizadas) de diversas especies microbianas en tres puntos temporales (Línea base, 24 h y 10 días) después de la aplicación de biol. En términos generales, se observa que algunas especies experimentan enriquecimientos significativos tras el tratamiento, mientras que otras mantienen niveles de abundancia relativamente estables en el tiempo. Especies como *Candidatus Nitrososphaera evergladensis* y *Nitrososphaera viennensis* breve presentan aumentos significativos en abundancia a las 24 h, alcanzando lecturas normalizadas de aproximadamente 120 y 150, respectivamente, con diferencias estadísticamente significativas respecto a la línea base ($p < 0{,}001$ para ambas). *Iamia sp. SCSIO 61187, Candidatus Promineifilum breve* y *Miltoncostaea oceani* muestran un descenso significativo a las 24 h ($p < 0{,}01$) y a los 10 días ($p < 0{,}05$). En contraste, especies como *Methylobacterium sp. CB376, Shinella sp. WSD5-1,* y *Streptomyces sp. KY70* no muestran cambios significativos entre los tiempos, manteniéndose en niveles de abundancia bajos con lecturas normalizadas inferiores a 50.

Fig 27: Diagramas de cajas de géneros diferencialmente enriquecidos en tres tiempos experimentales (Línea base, 24 h y 10 días después de la aplicación de biol). La significancia estadística de las comparaciones entre grupos se evaluó mediante la prueba de Tukey. Los niveles de significancia se indican como *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, y "ns" para diferencias no significativas.

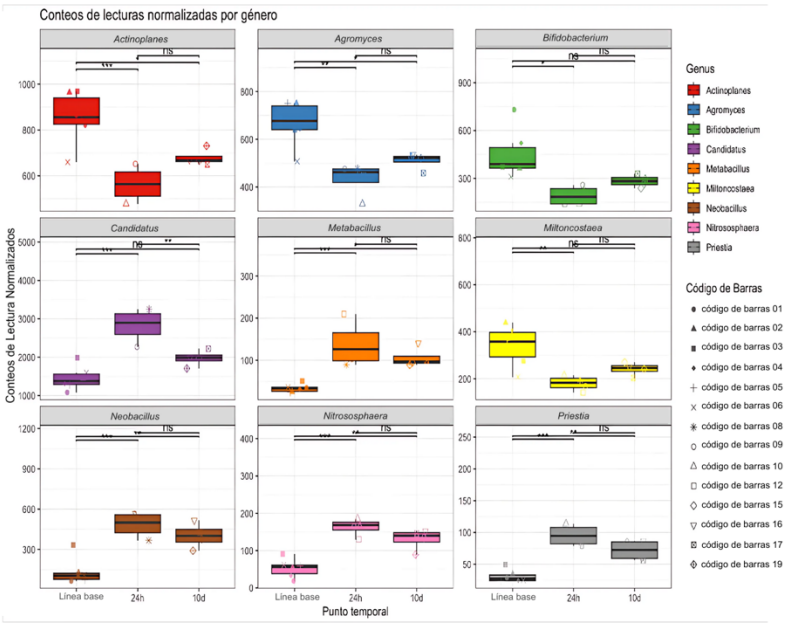


Tabla Nº 8: Valores de p ajustados del Tukey test para los géneros enriquecidos

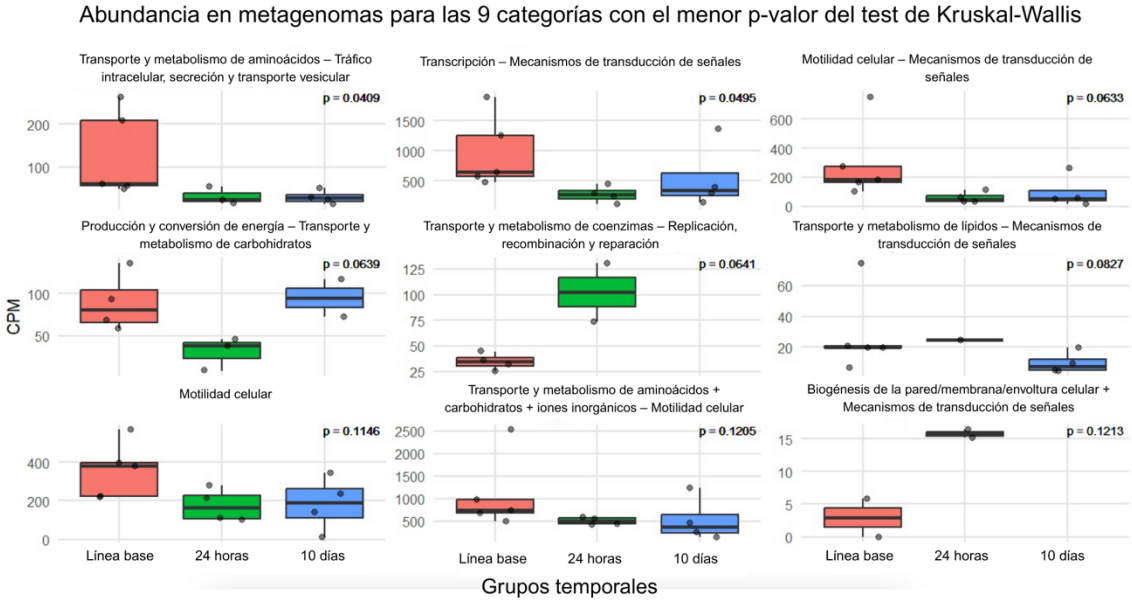
Género	24h vs Línea Base	10d vs Línea Base	10d vs 24h
Actinoplanes	0,000996***	0,0278*	0,205000
Agromyces	0,00128**	0,0185*	0,341000
Bifidobacterium	0,0101*	0,090700	0,492000
Candidatus	0,000128***	0,074800	0,00987**
Metabacillus	0,000922***	0,0119*	0,362000
Miltoncostaea	0,00542**	0,072500	0,380000
Neobacillus	0,000465***	0,00344**	0,498000
Nitrososphaera	0,000101***	0,00178**	0,220000
Priestia	0,0000473***	0,00207**	0,083600

** p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001*

La **Figura 27** también se observa que varios géneros presentan incrementos significativos en sus lecturas normalizadas a las 24 h en comparación con la línea base, seguido de una disminución o estabilización a los 10 días. *Actinoplanes* alcanza aproximadamente 900 lecturas normalizadas en la línea base y experimenta una reducción significativa a cerca de 600 lecturas luego de 24 horas post aplicación de biol ($p < 0,05$). *Agromyces* y *Metabacillus* también muestran incrementos importantes a las 24h, con alrededor de 600 y 300 lecturas, respectivamente, y luego disminuyen a valores más bajos hacia los 10 días ($p < 0,01$ y $p < 0,05$). *Neobacillus* presenta una tendencia similar, aumentando a aproximadamente 600 lecturas a las 24h y disminuyendo a 300 lecturas a los 10 días ($p < 0,01$). *Nitrososphaera* y *Priestia* alcanzan picos de 250 y 150 lecturas a las 24h y mantienen sus niveles elevados con diferencias significativas ($p < 0,001$ y $p < 0,01$, respectivamente). En contraste, géneros como *Bifidobacterium* y *Miltoncostaea* muestran incrementos moderados, sin cambios significativos entre los puntos temporales más tardíos.

7.7 Identificación de los clústeres de genes ortólogos (COGs) en los metagenomas de la rizósfera

Fig 28 Cuantificación de categorías funcionales asociadas a clústeres de genes en metagenomas evaluados en diferentes tiempos. La significancia estadística de las comparaciones entre grupos se evaluó mediante la prueba de Kruskal Wallis. CPM = conteo por millón de lecturas normalizadas.



En la **Figura 28** se muestran las abundancias diferenciales en conteo por millón más significativas de los clústeres de genes ortólogos (COGs) identificados en los metagenomas de la rizósfera en orden decreciente con respecto a su significancia estadística, marcado por el p-valor de cada análisis. Los COGs indican la función asociada de los genes identificados, de esta manera, se calcula la abundancia de las repeticiones de cada gen asociado a determinadas funciones a lo largo de los grupos Línea base, 24 horas y 10 días. Se puede observar que dos categorías funcionales tienen una significancia estadística con un p-valor menor a 0,05 y cuatro otras categorías funcionales tienen una significancia estadística marginal con un p-valor menor a 0,1. Para poder tener una visión más amplia de aquellas categorías que han variado de manera significativa, consideraremos aquellos p-valores entre 0,05 y 0,1 como marginalmente significativos.

La categoría funcional que varió entre los grupos temporales con una mayor significancia estadística, con un p-valor de 0,0409, fue la categoría de “Transporte y metabolismo de aminoácidos” y “Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular”. En este caso se han considerado dos categorías funcionales debido a que el programa EggNOG-mapper v2 ha observado que las secuencias asignadas comparten ambas funciones. En este diagrama de caja se puede observar una clara disminución de abundancia a lo largo del tiempo.

La categoría funcional que sigue en orden de significancia estadística es de “Transcripción y Mecanismo de transducción de señales”, con un p-valor de 0,0495. Se puede observar que esta categoría funcional disminuye desde el grupo de Línea base hasta el grupo de 24 horas y existe un leve aumento hasta el grupo 10 días después.

Los cuatro siguientes grupos son considerados como marginalmente significativos, empezando por una leve disminución desde el grupo Línea base hasta los grupos de 24 horas y 10 días en la categoría funcional de “Motilidad celular y Mecanismos de transducción de señales”, con un p-valor de 0,0633. Asimismo, en la categoría funcional de “Producción y conversión energética” y “Transporte y metabolismo de carbohidratos”, se puede observar una disminución desde el grupo Línea base hasta el grupo 24 horas y un aumento desde este último grupo hasta el de 10 días después, con un p-valor de 0,639. La siguiente categoría funcional es la de “Transporte y metabolismo de coenzimas” y “Replicación, recombinación y reparación”, con un p-valor de 0,0641, se puede observar un aumento en su abundancia desde el grupo Línea base hasta el grupo de 24 horas y una desaparición de lecturas mapeadas en el grupo de 10 días. Finalmente la categoría funcional de “Transporte y metabolismo de lípidos y Señal de mecanismos de transducción”, tienen un p-valor de 0,0827 y se puede apreciar un leve aumento en los dos primeros grupos y una disminución en el grupo de 10 días.

7.8 Análisis CCA (*Canonical Correlation Analysis*)

Fig 29: Relación entre la composición de la comunidad microbiana y las propiedades fisicoquímicas del suelo. Análisis de la correlación canónica CCA con la función *ordistep* entre la comunidad microbiana del suelo de la rizósfera de palto y factores edáficos. La longitud del vector azul indica la fuerza de correlación del parámetro ambiental. Los polígonos representan los 3 tiempos experimentales (rojo = línea base; verde = 24h después de aplicar biol ; naranja = 10 días después de aplicar biol).

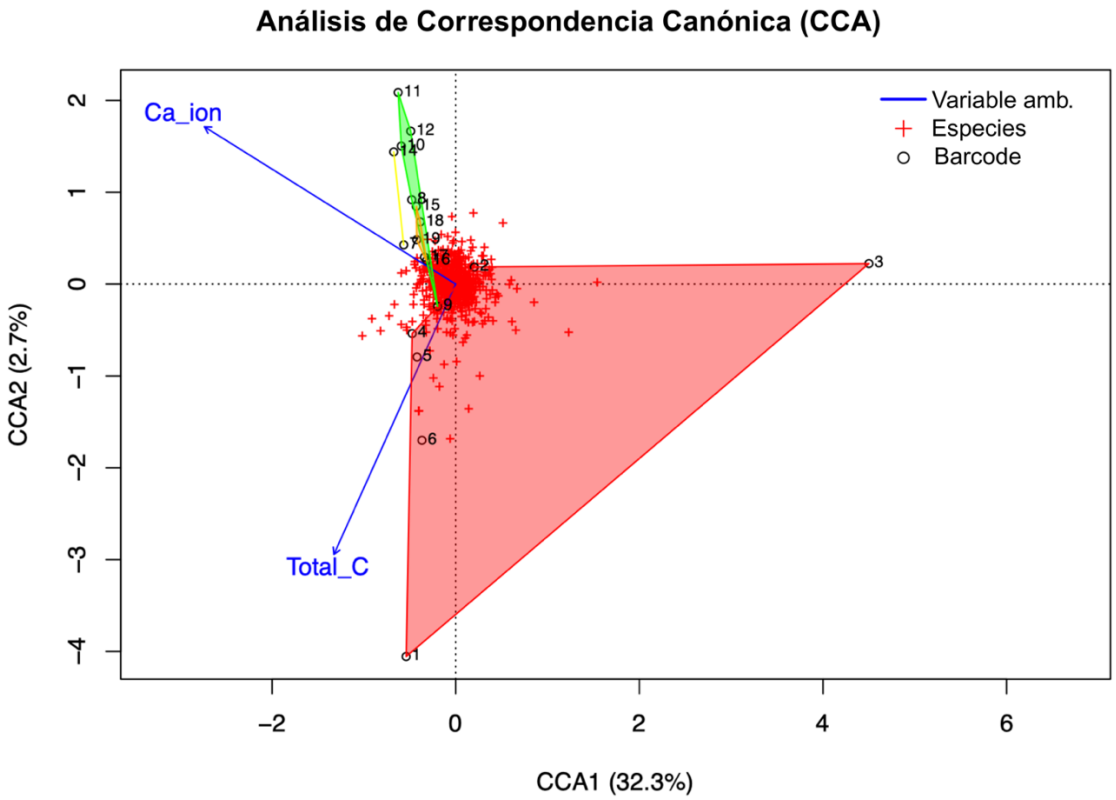


Tabla Nº 9: Resultados del ANOVA del análisis de correspondencia canónica (CCA) relacionando la composición de la comunidad microbiana con el carbono total del suelo y la concentración de ion calcio disponible en la savia de las hojas del palto

Variable	Df	AIC	F	P-valor	Significancia estadística
(a) Efecto de remover variables del modelo					
Carbono orgánico total (C mg/L)	1	-69,193	2,5572	0,012	*
Calcio disponible en savia vegetal (Ca2+ ppm)	1	-65,704	6,3120	0,007	**
(b) Efecto de añadir variables al modelo					
Calcio disponible en savia vegetal (Ca2+ ppm)	1	-69,193	5,0506	0,006	**

Carbono orgánico total (C mg/L)	1	-70,026	2,5572	0,044	*
(c) Modelo general	2		4,0497	0,007	**

** p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001*

El Análisis de Correspondencia Canónica (CCA, por sus siglas en inglés) es una técnica estadística multivariada que relaciona la distribución y abundancia de especies con las variables ambientales que podrían explicar dicha distribución. En ecología y estudios de biodiversidad, el CCA permite identificar cuáles factores ambientales (por ejemplo, propiedades fisicoquímicas del suelo) ejercen mayor influencia sobre la composición de comunidades biológicas y cómo varían estos ensambles biológicos bajo diferentes condiciones.

La **Figura 29** muestra el análisis de correspondencia canónica (CCA) con los ejes CCA1 y CCA2 que explican el 32,3% y el 2,7% de la varianza, respectivamente. Los vectores Ca_ion (Ca^{2+})y Total_C (carbono orgánico total) representan variables ambientales significativas en la distribución de las especies, cuya dirección indica su relación con las muestras: Ca_ion está asociado con variabilidad hacia el cuadrante superior izquierdo, mientras que Total_C hacia el cuadrante inferior derecho.

Los polígonos representan grupos de muestras, visualizando cómo según las condiciones ambientales los tratamientos de línea base (polígono rojo) se agrupan de manera distinta a los tratamientos 24h y 10 días después de aplicar biol (polígonos verde y naranja).. El análisis ANOVA muestra que SV_Ca2...ppm (p = 0,006) y Total_C (p = 0,044) son significativos en el modelo, indicando que ambas variables explican significativamente la distribución de especies. El modelo completo es significativo con p = 0,007 [**Tabla 9**].

7.9 Concentración de iones biodisponibles (NO_3^-, Ca^{2+}, K^+ y Na^+) en muestras de savia vegetal y suelo rizosférico de palto

Fig 30: Niveles en ppm de iones biodisponibles (NO3, Ca+, K+ y Na+) en savia vegetal de hoja de palto para los 3 tratamientos: línea base, 24h y 10d (n = 6).

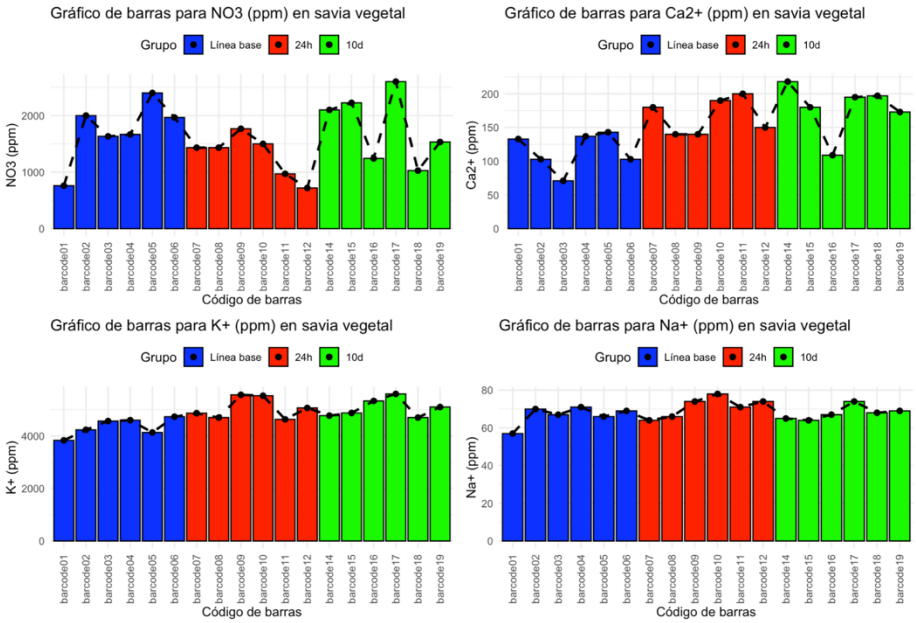


Tabla Nº 10: Comparación estadística (ANOVA de una vía) de niveles de iones en muestras de savia vegetal de hoja de palto para los 3 tratamientos (Línea base, 24h y 10d)

Ion	Prueba	Estadística-F	p valor	Significancia	Prueba Post-hoc de Tukey
NO_3^- (ppm)	ANOVA de una vía	1,534	0,2477	ns	No significativo
Ca^{2+} (ppm)	ANOVA de una vía	7,160	0,0066	**	24h- Línea base; 10d-Línea base
K^+ (ppm)	ANOVA de una vía	7,517	0,0055	**	24h- Línea base; 10d-Línea base
Na^+ (ppm)	ANOVA de una vía	1,474	0,2604	ns	No significativo

** p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001*

Según la **Fig. 30** y la **Tabla 10**, en los niveles de NO_3^- (ppm) de savia vegetal, no se observan diferencias significativas entre los puntos temporales (Línea base, 24h, 10d) según el análisis ANOVA (p = 0,2477) y respaldado por el análisis post-hoc de Tukey. Los códigos de barras con los valores más altos se encuentran en el código de barras 05, el código de barras 15 y el código de barras 17, mientras que los valores más bajos se observan en el código de barras 01 y el código de barras 12. Para Ca^{2+} (ppm) de la savia vegetal, los tratamientos 24h y 10d muestran niveles significativamente distintos en comparación con Línea base (p = 0,0066). Los código de barras 14, código de barras 13 y código de barras 18 presentan las concentraciones más elevadas, mientras que el código de barras 02, código de barras 03 y código de barras 06 muestran las concentraciones más bajas. En K^+ (ppm), también se observan diferencias significativas entre los periodos temporales 24h y 10d frente a Línea base (p = 0,0055). Los valores más pronunciados de K^+ se encuentran en el código de barras 01, código de barras 10, código de barras 16 y código de barras 17, mientras que los niveles más bajos se observan en el código de barras 01 y en el código de barras 05. Para Na^+ (ppm), no se identifican diferencias significativas entre los puntos temporales (p = 0,2604).

Fig 31: Niveles en ppm de iones biodisponibles (NO3, Ca+, K+ y Na+) en muestras de suelo de la rizósfera del palto para los 3 tratamientos: línea base, 24h y 10d (n = 6).

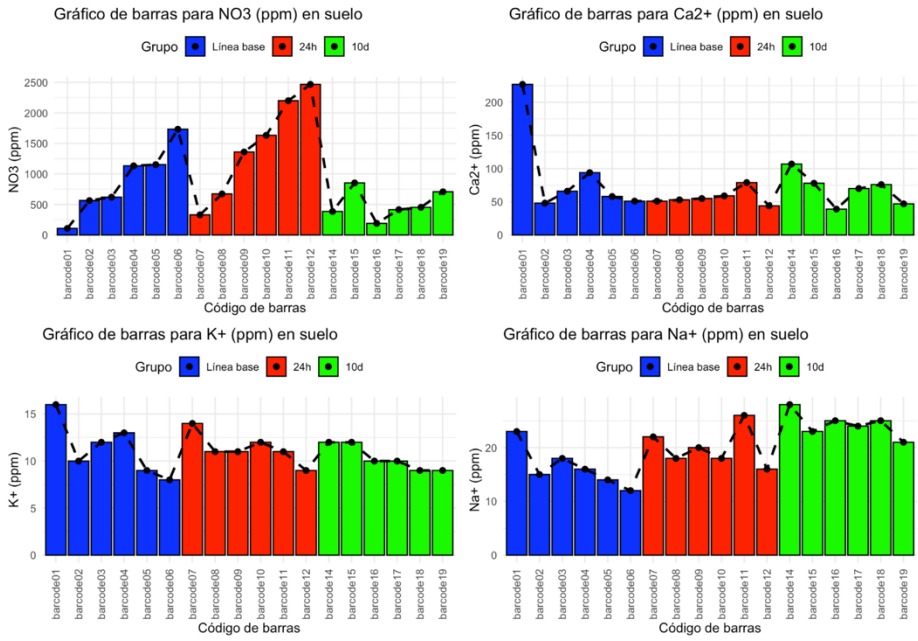


Tabla Nº 11: Comparación estadística (ANOVA de una vía o prueba de Kruskal-Wallis) de niveles de iones en muestras de rizósfera de suelo de palto para los 3 tratamientos (Línea base, 24h y 10d)

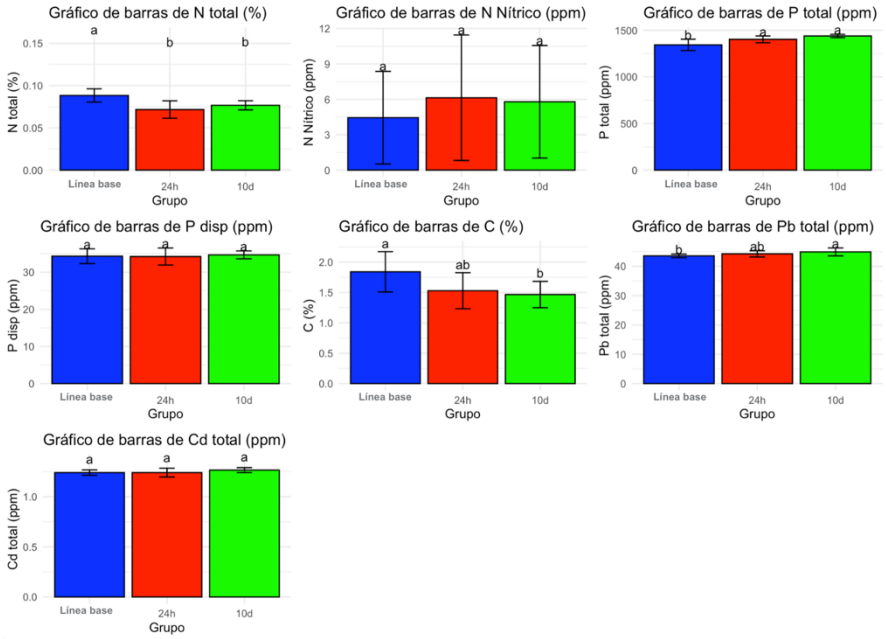
Ion	Prueba	Estadística-F o Kruskal-Wallis estadística chi-cuadrado	p-valor	Significancia	Prueba de Post-hoc Tukey
NO_3^- (ppm)	ANOVA de una vía	3,740	0,0481	*	10d-24h
Ca^{2+} (ppm)	Kruskal-Wallis	0,828	0,6609	ns	No significativo
K^+ (ppm)	ANOVA de una vía	0,455	0,6432	ns	No significativo
Na^+ (ppm)	ANOVA de una vía	8,765	0,0030	**	10d- Línea base

** $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$*

En base a la **Figura 31** y la **Tabla 11,** en las muestras de suelo de la rizósfera de palto, se observa que los niveles de NO_3^- (ppm) presentan diferencias significativas entre los grupos temporales, con valores más altos en el tratamiento de 24h comparado con 10d ($p = 0,0481$). Los códigos de barras con las concentraciones de NO_3^- más altas corresponden a los códigos de barras 10 y 11, mientras que los valores más bajos se observan en los códigos de barras asociados al grupo de 10 días después de la aplicación de biol. Para los iones Ca^{2+} (ppm) y K^+ (ppm) en la rizósfera de suelo, no se detectaron diferencias significativas entre los grupos temporales ($p = 0,6609$ y $p = 0,6432$, respectivamente). En cuanto a los niveles de Na^+ (ppm), el tratamiento de 10d muestra niveles significativamente más altos en comparación con Línea base ($p = 0,0030$). Las concentraciones más elevadas de Na^+ se observan en el código de barras 14, mientras que los niveles más bajos corresponden a los código de barras 05 y el código de barras 06.

7.10 Concentración de parámetros edáficos en muestras de suelo rizosférico de palto

Fig 32: Concentración de parámetros edáficos en muestras de la rizósfera de palto para los 3 puntos temporales: línea base, 24h y 10d. Los datos se presentan como media ± DE (n = 6). Letras minúsculas diferentes indican una diferencia significativa ($p < 0,05$).



La **Figura 32** evidencia que los parámetros edáficos en los que no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los puntos temporales de muestreo fueron cadmio total, fósforo disponible y nitrógeno nítrico. El parámetro de nitrógeno total (%) es estadísticamente distinto entre los grupos de línea base y 24h. Se observa una disminución significativa en el contenido de nitrógeno total entre la línea base y los puntos de 24 horas y 10 días, con la línea base presentando la mayor concentración de nitrógeno. Letras distintas entre estos grupos sugieren diferencias significativas ($p < 0,05$). La concentración de fósforo total es significativamente menor en la línea base en comparación con los puntos de 24 horas y 10 días, indicando un incremento post-aplicación de biol. Se observa una disminución significativa en el porcentaje de carbono en el tiempo de 10 días comparado con la línea base. Por último, los niveles de plomo total presentan un aumento significativo entre la línea base y los puntos de 10 días, mientras que el valor a las 24 horas se encuentra en un nivel intermedio sin diferencias significativas con los otros grupos.

VIII. DISCUSIÓN

8.1 Análisis de biodiversidad

La gráfica de riqueza de especies no presenta variaciones significativas ni entre tratamientos ni entre puntos temporales, esto puede deberse a que las variaciones en la microbiota no han llegado a adicionar o eliminar de manera significativa especies nuevas o ya existentes. Por el contrario, al ser un método de cuantificación de número de especies presentes, es posible que los cambios en la microbiota hayan afectado a la abundancia de las mismas, mas no a la presencia absoluta. El índice de diversidad de Shannon, el cual captura tanto riqueza como equitatividad de especies, y el índice de diversidad de Simpson, el cual captura equitatividad y dominancia de especies, muestran cambios significativos tras la aplicación de biol. En el grupo Línea base ambos índices permanecen estables (Shannon = 4,3 ± 0,1, Simpson = 1,0 ± 0,01), lo que refleja una comunidad equilibrada en ausencia de tratamiento con enmienda orgánica. Luego de 24 horas de la aplicación de biol, el índice de Shannon disminuye significativamente ($p = 0,009$), alcanzando un mínimo de 4,0 - 4,05 en el tratamiento FIOBL y FIOBL200, respectivamente, lo que indica una reducción en la diversidad. El índice de Simpson, también reducido a valores de 0,95-0,96 ($p = 0,009$) **[Anexo 2]**, sugiere un aumento en la dominancia de ciertas especies y una pérdida de equitatividad a corto plazo. No obstante, a los 10 días post adición de biol, ambos índices se aproximan nuevamente a niveles cercanos al grupo Línea base, lo cual sugiere una resiliencia de la comunidad microbiana. Este restablecimiento de la estructura comunitaria refleja un efecto transitorio del biol, y sugiere que se requieren de múltiples y frecuentes aplicaciones de este para modificar a largo plazo la microbiota del suelo. Este patrón es consistente con diversos estudios que documentan efectos transitorios en la estructura y biodiversidad microbiana del suelo con la adición de enmiendas orgánicas. Algunos estudios han reportado que la adición de enmiendas orgánicas, entre ellas el biol, introduce grandes cantidades de carbono y nutrientes al suelo, lo que puede favorecer el rápido crecimiento de ciertos grupos microbianos (heterótrofos y copiótrofos) que son capaces de utilizar más eficientemente el carbono disponible y que pueden desplazar a aquellos organismos menos competitivos oligotróficos [72, 73]. Asimismo, puede que ciertos compuestos o metabolitos secundarios presentes en el biol, tales como ácidos orgánicos, fenoles y antibióticos, ejerzan un efecto inhibitorio sobre ciertas especies microbianas, desplazando la

comunidad a favor de microorganismos resistentes [74]. Finalmente, las enmiendas orgánicas conllevan a la modificación de las condiciones fisicoquímicas del suelo (alteración del pH y conductividad, por ejemplo), limitando o favoreciendo el crecimiento de ciertos géneros microbianos [75]. La disminución de la diversidad puede ser transitoria, ya que la mayoría de las especies requiere de tiempo para adaptarse a nuevas condiciones ambientales, y la recuperación de la diversidad depende de la resiliencia del microbioma del suelo y de la capacidad de ciertos microorganismos para adaptarse o proliferar a medida que los compuestos del biol se metabolizan en el tiempo. En su conjunto, estos resultados destacan que el suelo agrícola bajo estudio tiene una buena capacidad adaptativa a las perturbaciones orgánicas, sugiriendo que los efectos del biol son temporales y que la estructura microbiana retorna a su estado basal en el tiempo.

En este sentido, la reducción temporal de la alfa diversidad no necesariamente implica un efecto negativo para el agroecosistema: puede favorecer a grupos funcionales benéficos que se adaptan rápidamente al nuevo aporte de nutrientes, a costa de desplazar a taxones menos competitivos. Desde un punto de vista agronómico-ambiental este fenómeno exige un manejo cuidadoso de dosis y frecuencia de aplicación del biol, de modo que se promuevan beneficios, como el aumento de biodisponibilidad de nutrientes, sin comprometer la estabilidad y resiliencia de la comunidad microbiana en el largo plazo.

8.2 Análisis de agrupamiento y estructura microbiana

El análisis de la estructura de la comunidad microbiana mediante NMDS y posterior PERMANOVA indica cambios estadísticamente significativos tras la aplicación de biol, específicamente entre el tiempo basal (NB) y las muestras recolectadas 24 horas después (B24h) ($p=0,001$), así como entre las muestras de 24 horas y 10 días después (B10d) ($p=0,008$). Mientras que los índices de Shannon y Simpson cuantifican la diversidad y equitatividad de especies, el NMDS destaca visualmente agrupamientos o separaciones que indican los cambios estructurales en la composición de especies. En este caso, el NMDS muestra una separación estadísticamente significativa de la comunidad a las 24 horas post-tratamiento y su tendencia a recuperarse hacia el estado basal a los 10 días, sugiriendo una alteración temporal en la comunidad microbiana del suelo que, aunque significativa en los primeros días, parece revertirse hacia una composición más cercana al estado basal tras un período de adaptación. Estos resultados acentúan la

transicionalidad del efecto del biol, rico en compuestos fácilmente degradables como ácidos orgánicos (ej. ácido láctico, ácido acético), azúcares y nutrientes inorgánicos, de muy fácil acceso para bacterias heterótrofas [76]. Estos compuestos pueden ser metabolizados en cuestión de horas por su alta biodisponibilidad, permitiendo que la comunidad vuelva a su estado basal. Por otra parte, se conoce que el biol contiene altas cantidades de nutrientes inorgánicos como nitrógeno amoniacal y nitrógeno nítrico que estimula temporalmente la actividad metabólica de ciertos microorganismos nitrificantes y desnitrificantes [77]. Tras el consumo y reciclaje de estos nutrientes, los niveles de la biodisponibilidad de nitrógeno disminuyen, ocasionando un retorno a la estructura de línea base. De la misma manera, compuestos fenólicos y metabolitos secundarios inhibitorios tienden a ser descompuestos o absorbidos en el suelo en pocos días, mitigando su efecto inhibitorio inicial [78]. Finalmente, si bien la aplicación de biol altera inicialmente las condiciones redox del suelo, promoviendo condiciones reductoras que favorecen a ciertos microbios anaerobios, con el tiempo se restablece la oxigenación natural del suelo y condiciones aeróbicas.

8.3 Análisis taxonómico

Las comunidades microbianas en el suelo experimentan cambios constantes en su composición, generalmente desencadenados por estímulos externos, ya sea a partir de interacciones con las raíces de las plantas de la superficie o debido a factores climáticos [79]. El análisis taxonómico de especies obtenido a través de metagenómica *shotgun* permite identificar la totalidad de especies presentes y, dependiendo de la calidad de la secuenciación, las cepas específicas del microbioma en la muestra de suelo analizada. Esta identificación representa la distribución relativa de especies en un único momento de muestreo, por lo que la composición podría variar en función del momento de recolección de la muestra.

En el contexto de esta investigación, los resultados nos permiten visualizar y analizar las diferencias en las abundancias relativas de especies entre cada grupo de tratamiento a lo largo de tres puntos temporales distintos. Como se observa en la **Figura 12**, los resultados respaldan la hipótesis de que se produjo un cambio en la distribución taxonómica del microbioma del suelo después de la aplicación del biofertilizante en los diferentes tratamientos. En particular, esta figura muestra un aumento relativo de *E. coli* en

comparación con las 64 especies más abundantes en el suelo, específicamente en el grupo de 24 horas después de la aplicación del biol. Esto podría atribuirse a que el biol no fue digerido de manera óptima durante el proceso anaeróbico en el biodigestor, resultando en una aplicación que contenía cantidades considerables de *E. coli*, las cuales fueron luego detectadas mediante secuenciación metagenómica en los campos de cultivo. Sin embargo, la proporción relativa de *E. coli* disminuye en el grupo de 10 días después de la aplicación del biol, lo que podría explicarse por un restablecimiento natural de las comunidades autóctonas del suelo. La competencia entre especies posiblemente redujo la abundancia relativa de *E. coli* a niveles cercanos a la línea base, aunque sin alcanzar los valores iniciales. Este efecto también es observable al comparar el grupo de biol fresco con el de Biol a los 10 días, donde la abundancia relativa de *E. coli* es mayor, probablemente porque el resto de las especies presentes en el biol no lograron establecerse en el mismo periodo.

Es importante señalar que el aumento visual de la abundancia relativa de *E. coli* respecto a otras especies no implica necesariamente un incremento absoluto de *E. coli*; también es posible que las demás especies hayan disminuido su abundancia absoluta, lo cual explicaría el aumento relativo de *E. coli*. De haber un aumento sustancial de organismos entéricos como *E. coli* en el suelo tras aplicación del biol, las implicancias serían cruciales para valorar la inocuidad del fertilizante. En el caso de cultivos frutales destinados al consumo humano que no están en contacto directo con el suelo, como el palto, el riesgo para la salud pública es menor [80]; no obstante, se requerirían establecer parámetros de control biológico, como periodos mayores de procesamiento en los digestores o tratamientos adicionales, y monitorear regularmente la carga microbiana del biol con el fin de reducir la contaminación por microorganismos entéricos [81]. No podemos asumir que las diferencias en los cambios de abundancia relativa de *E. coli* son significativas antes de llevar a cabo los análisis de significancia estadística que se describen a continuación.

En cuanto al proceso de nitrificación y su implicancia en la fertilidad del suelo, nuestro análisis taxonómico permitió detectar organismos que participan en la oxidación de amonio (e.g., *Candidatus Nitrososphaera gargensis*) y la posterior oxidación de nitrito (*Nitrospira japonica* , *Nitrospira moscoviensis*). Estos resultados sugieren que, tras la aplicación del biol, existen poblaciones microbianas capaces de transformar el NH^{4+} generado por la descomposición de la materia orgánica hacia NO^{2-}y finalmente NO^{3-} .

En general, el nitrato (NO^{3-}) suele ser la forma más comúnmente asimilada por las plantas, especialmente en cultivos de crecimiento rápido, aunque también hay especies vegetales que muestran preferencia por amonio (NH^{4+}) [83]. Desde la perspectiva agronómica, disponer de poblaciones nitrificantes puede favorecer la asimilación de nitrógeno por los cultivos, siempre y cuando no se den condiciones que promuevan la pérdida de nitrato por desnitrificación o lixiviación [84].

Por otro lado, no identificamos géneros típicos de bacterias ANAMMOX (e.g., *Brocadia*, *Kuenenia*, *Scalindua*) en los primeros 100 taxones más abundantes, por lo que no se evidencian poblaciones que realicen la oxidación anaeróbica de amonio (ANAMMOX) de manera significativa. En cuanto a organismos desnitrificadores, si bien no aparecen géneros prototípicos como *Paracoccus* o *Pseudomonas stutzeri*, algunos géneros presentes (*Pseudomonas* sp., *Bradyrhizobium*sp.) se sabe que pueden llevar a cabo parcial o totalmente la desnitrificación bajo condiciones específicas (por ejemplo, ambientes pobremente oxigenados) [85, 86]. De confirmarse su actividad desnitrificante, esto podría implicar la pérdida de nitrato como N_2 (o N_2O) y, por ende, una disminución en la disponibilidad final de nitrógeno para el cultivo [87]. Estas consideraciones resaltan la necesidad de regular el contenido de oxígeno y la humedad del suelo, de manera que se maximice la nitrificación benéfica para la planta y se minimice la desnitrificación, evitando pérdidas de nutrientes y emisiones de gases de efecto invernadero.

8.4 Análisis de enriquecimiento diferencial de especies

El análisis de abundancia diferencial de especies microbianas en la rizósfera del palto Hass, antes y después de la aplicación de biol, revela cambios significativos en la estructura y composición de la comunidad microbiana a corto y mediano plazo. Estos cambios pueden atribuirse tanto a los nutrientes como a los microorganismos introducidos con el biol, los cuales alteran el equilibrio microbiano en la rizósfera de las plantas. La **Figura 20** muestra un gráfico de volcán en el que las especies situadas a la izquierda están significativamente enriquecidas en el grupo de línea base, mientras que aquellas a la derecha presentan un enriquecimiento 24 horas después de la aplicación del biol. Entre las especies enriquecidas en la línea base destacan *Streptomyces sp. Je 1-4, Streptomyces sp. KY70 y Methylobacterium sp. CB376*. Estas especies son típicas de suelos agrícolas y se asocian comúnmente con funciones que incluyen la producción de compuestos

antimicrobianos y la degradación de materia orgánica, lo cual les permite competir eficazmente en un ambiente natural sin la influencia de insumos externos [88, 89, 90]. Por otro lado, entre las especies enriquecidas 24 horas después de la aplicación del biol se encuentran *Actinoplanes friuliensis, Actinomarinicola tropica* y *Aeoliella mucimassa*. Este enriquecimiento puede explicarse por la introducción de nutrientes y microorganismos con el biol, que crearon un ambiente favorable para estas especies en particular. Es probable que el biol haya aportado compuestos orgánicos o nutrientes que estas bacterias pudieron utilizar rápidamente, favoreciendo su proliferación inmediata en la rizósfera.

La **Figura 21**, que presenta un gráfico de calor de la abundancia diferencial de especies entre el grupo de línea base y el grupo de 24 horas post-aplicación, proporciona una visualización detallada de los efectos del biol en la estructura microbiana a corto plazo. En este gráfico, se observa un aumento en la abundancia relativa de especies como *Candidatus Nitrososphaera gargensis*, que es conocida por su capacidad para oxidar amonio en suelos [91], y *Nitrospira moscoviensis*, una bacteria implicada en el ciclo del nitrógeno a través de la nitrificación [92]. Estos resultados sugieren que el biol, al introducir nutrientes y microorganismos, ha creado condiciones que favorecen a organismos implicados en la transformación de nitrógeno, un proceso crítico en la rizósfera de plantas como el palto. La disponibilidad de compuestos nitrogenados del biol podría haber promovido la proliferación de estas bacterias especializadas, mejorando así su abundancia relativa en comparación con la comunidad original.

El gráfico de mapa de calor de la **Figura 23**, que compara las especies entre los grupos de 24 horas y 10 días post-aplicación, muestra un proceso de reestabilización de la comunidad microbiana. Las especies enriquecidas en el grupo de 24 horas incluyen *Delftia sp. UGAL515B_04* y *Candidatus Nitrosotenuis cloacae*, mientras que a los 10 días post-aplicación encontramos enriquecimiento de especies como *Streptomyces sp. NBC_00491* y *Shinella sp.WSD5-1*. *Delftia sp.* es conocida por su capacidad para resistir condiciones de estrés y participar en la degradación de compuestos orgánicos [93], mientras que *Candidatus Nitrosotenuis* es un organismo involucrado en la oxidación de amonio [94], similar a *Nitrososphaera sp*. La aparición de *Streptomyces sp.* y *Shinella sp.* a los 10 días sugiere que el microbioma está comenzando a reequilibrarse, con especies

autóctonas retomando su rol dominante. *Streptomyces sp.*, conocido por producir antibióticos naturales, podría estar actuando para controlar la proliferación de otros microorganismos introducidos, mientras que *Shinella sp.* podría estar aprovechando los restos de nutrientes proporcionados inicialmente por el biol.

La **Figura 24** presenta un análisis adicional mediante un gráfico de volcano, que compara la abundancia de especies entre la línea base y el grupo de 10 días post-aplicación. En el grupo de línea base, destacan especies como *Streptomyces sp. Je 1-4, Streptomyces sp. KY70* y *Agrobacterium tomkonis*, las cuales están comúnmente asociadas a suelos agrícolas y tienen funciones importantes en la supresión de patógenos y en la promoción del crecimiento vegetal [88, 89, 95]. La persistencia de estas especies en la línea base sugiere una comunidad microbiana estable, bien adaptada a las condiciones naturales del suelo. A los 10 días post-aplicación, se observa un enriquecimiento de especies como *Candidatus Nitrososphaera evergladensis, Candidatus Nitrosocosmicus oleophilus*, *Micromonospora krabiensis*. *Nitrososphaera* y *Nitrosocosmicus* son arqueas implicadas en la oxidación de amonio [96, 97], lo cual indica una posible mejora en la disponibilidad de nitrógeno en el suelo. *Micromonospora* es conocida por su capacidad de producir antibióticos y ayudar en la descomposición de materia orgánica [98], lo cual sugiere que el biol pudo haber inducido cambios que favorecieron a estos organismos adaptados a condiciones ricas en compuestos orgánicos, como los residuos del biol.

El gráfico de calor de la **Figura 25**, que también compara los grupos de línea base y 10 días post-aplicación, muestra una representación detallada de las respuestas divergentes de las especies. Aquí se observa que, además de las especies mencionadas anteriormente, *Nordella sp. HKS 07* disminuye en abundancia relativa en los grupos post-aplicación. Esta disminución podría deberse a la competencia con las nuevas especies introducidas o favorecidas por el biol, que probablemente encontraron en el suelo un ambiente más propicio para su proliferación. La diversidad de respuestas microbianas refleja que el biol no solo modifica el balance de nutrientes, sino que también induce una presión selectiva que reconfigura la estructura de la comunidad microbiana.

En conjunto, estos resultados indican que la aplicación de biol genera cambios significativos en la microbiota rizosférica de los paltos Hass. A corto plazo, el biol

enriquece el suelo con nutrientes y microorganismos que afectan directamente la composición microbiana, favoreciendo el crecimiento de especies como *Actinoplanes friuliensis, Actinomarinicola tropica* y *Candidatus Nitrososphaera gargensis*, las cuales pueden utilizar eficazmente los compuestos orgánicos y nitrogenados introducidos por el biol. A mediano plazo, se observa un proceso de reestabilización en el cual las especies autóctonas, como *Streptomyces* y *Shinella*, comienzan a retomar su papel dominante, desplazando parcialmente a los microorganismos inicialmente favorecidos por el biol. Este reequilibrio indica que el biol no solo actúa como un suplemento de nutrientes, sino que también modula la comunidad microbiana de la rizósfera, potenciando los mecanismos de interacción planta-microorganismo, los cuales son críticos para la salud del suelo y el crecimiento del cultivo.

La **Figura 26** muestra un enriquecimiento diferencial de varias especies. En particular, *Candidatus Nitrososphaera evergladensis*, una arquea oxidante de amoníaco, presenta una abundancia significativamente mayor en los grupos de 24 horas y 10 días después de la aplicación de biofertilizantes en conjunto con fertilizantes químicos en comparación con el grupo de línea base. No se observan diferencias significativas en su abundancia al comparar los grupos de 24 horas y 10 días. Estudios previos han aislado esta arquea en suelos agrícolas, asociándola con pérdidas de nitrógeno en el suelo, contaminación de cuerpos de agua y emisiones de gases de efecto invernadero [96]. Nuestro estudio muestra que el incremento en la abundancia de *C. Nitrososphaera evergladensis*, medido a través de lecturas normalizadas, ocurre de manera significativa tanto con la aplicación de biol como de fertilizantes químicos, ambos con concentraciones considerables de amoníaco, generando un ambiente favorable para el enriquecimiento de esta arquea.

Asimismo, en la misma **Figura 26** se muestra que *Nitrososphaera viennensis*, una arquea aerobia, mesófila y oxidante de amoníaco del filo Thaumarchaeota, incrementó significativamente su abundancia en los grupos de 24 horas y 10 días tras la aplicación combinada de biol y fertilizantes químicos en comparación con el grupo de línea base. Este aumento en la abundancia fue especialmente notable en condiciones donde el amoníaco estaba presente en concentraciones considerables, proporcionando un entorno favorable para el enriquecimiento de esta arquea. *Nitrososphaera viennensis* es conocida por oxidar amoníaco a nitrito de manera aeróbica y fijar CO_2, aunque su crecimiento

depende de pequeñas cantidades de ácidos orgánicos [99], lo que podría relacionarse con los componentes del biol. Estudios previos han reportado que esta especie está presente en suelos agrícolas, desempeñando un rol en el ciclo global del nitrógeno mediante la oxidación del amoníaco, y se ha sugerido que contribuye a la regulación de la disponibilidad de nitrógeno en el suelo [99, 100, 101] El incremento observado en *N. viennensis* podría indicar un potencial impacto en los procesos de nitrificación y, consecuentemente, en la eficiencia del uso del nitrógeno en el suelo tras la aplicación de estos biofertilizantes.

En cuanto a *Candidatus Promineifilum breve*, se observó una disminución significativa en su abundancia relativa en los grupos de 24 horas y 10 días en comparación con el grupo de línea base. No obstante, al comparar los grupos de 24 horas y 10 días, no se detectaron diferencias significativas en su abundancia. Esta bacteria, perteneciente al filo Chloroflexota, es destacable por poseer una versión modificada de la vía de mevalonato, comúnmente asociada a Archaea [102]. La reducción en la abundancia de *C. Promineifilum breve* podría indicar que las condiciones generadas por la aplicación de biol y fertilizantes químicos no son favorables para esta especie en particular, probablemente debido a una menor disponibilidad de nichos específicos o a la competencia con otras bacterias favorecidas por el aporte de nutrientes. La ausencia de cambios significativos entre los grupos de 24 horas y 10 días sugiere que, aunque su abundancia disminuye rápidamente tras la aplicación de biofertilizantes, la dinámica de esta especie se estabiliza en el tiempo, sin una mayor reducción en el mediano plazo.

En la **Figura 27**, nuestros resultados muestran una reducción significativa en los géneros *Actinoplanes* y *Agromyces* en los grupos evaluados a las 24 horas y a los 10 días después de la aplicación del biol, en comparación con el grupo base. Esta disminución en la abundancia de ambos géneros sugiere que la introducción de microorganismos beneficiosos presentes en el biol podría haber generado una competencia en la rizósfera. En el caso de *Actinoplanes,* que desempeña un rol importante en la promoción del crecimiento vegetal y en la supresión de enfermedades [103], su reducción podría estar relacionada con el incremento de otras actinobacterias competidoras favorecidas por los compuestos del biol, los cuales estimulan el desarrollo de cepas más eficientes en la colonización y defensa del entorno rizosférico. Por su parte, *Agromyces*, común en suelos

contaminados y con una notable resistencia a metales pesados, presenta una adaptación dependiente de su capacidad para metabolizar compuestos aromáticos o tolerar condiciones de estrés [104]. La disminución de su abundancia podría reflejar una menor ventaja competitiva en el entorno menos hostil promovido por el biol, en el cual otros microorganismos pueden prosperar más eficientemente.

El incremento significativo de *Metabacillus* desde el grupo de línea base hasta los grupos evaluados a las 24 horas y 10 días después de la aplicación de biol, sin diferencias significativas entre estos dos últimos puntos temporales, podría estar asociado con los cambios que el biol induce en el suelo, específicamente en su salinidad y conductividad. La aplicación de biol tiende a incrementar la salinidad del suelo, aumentando así su conductividad, lo cual favorece la colonización por microorganismos tolerantes a ambientes salinos, como es el caso de ciertas especies de *Metabacillus*. En estudios previos, se ha demostrado que *Metabacillus dongyingensis BY2G20*, un promotor del crecimiento vegetal aislado de suelos salinos-alcalinos, puede mejorar el desarrollo de *Zea mays* bajo estrés salino [105]. Este microorganismo posee mecanismos de adaptación a condiciones salinas, como la producción de ácido indol-3-acético y sistemas de transporte de cationes, que le permiten prosperar en ambientes con alta conductividad y favorecer el crecimiento de plantas. Por lo tanto, la aplicación de biol podría estar facilitando la expansión de *Metabacillus* al modificar las condiciones del suelo, potenciando su rol en la promoción del crecimiento vegetal en suelos con mayor salinidad.

La aplicación de biol en el suelo ha promovido un incremento tanto de *Metabacillus* como de *Nitrososphaera,* dos géneros con dinámicas de adaptación particulares en respuesta a los cambios químicos generados en el suelo. *Metabacillus*, conocido por su tolerancia a condiciones salinas y su capacidad para sobrevivir en ambientes con alta conductividad, se ha asociado con suelos que experimentan aumentos en estos parámetros, los cuales se ven incrementados tras la aplicación de biol [106]. Este aumento en salinidad y conductividad es favorable para *Metabacillus*, lo que sugiere que esta especie se adapta bien a ambientes con estrés osmótico. En contraste, *Nitrososphaera*, un arqueón involucrado en la oxidación de amonio, también incrementa su presencia tras la aplicación de biol, pero su fundamento biológico radica en su papel en el ciclo del nitrógeno. Según

[107], *Candidatus Nitrososphaera* prospera en suelos agrícolas debido a su capacidad de oxidar amonio en ambientes con niveles elevados de amoniaco y un pH más alto, características que se ven promovidas en la rizósfera del palto por la aplicación de biol. De este modo, el biol parece favorecer tanto a bacterias adaptadas a la alta conductividad como a arqueas nitrificantes, promoviendo distintas rutas metabólicas en el suelo y adaptaciones específicas al entorno agrícola.

8.5 Identificación y cuantificación de categorías funcionales asociadas a clústeres genéticos en los metagenomas

A partir de los resultados obtenidos en la identificación y cuantificación funcional, las variaciones observadas en las categorías de COGs (*Clusters of Orthologous Groups*) a lo largo de los periodos evaluados (Línea base, 24 horas y 10 días después de la aplicación de biol) evidencian una dinámica funcional transitoria y compleja en la rizósfera del palto. Estas fluctuaciones se asocian a los cambios temporales en la disponibilidad de nutrientes y condiciones microambientales, producto de la incorporación del biol al suelo, y reflejan procesos adaptativos y de competencia microbiana por nichos ecológicos específicos.

El grupo funcional con mayor significancia estadística ($p<0,05$) corresponde a la categoría combinada de "Transporte y metabolismo de aminoácidos" y "Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular". La reducción en conteo por millón temporal de estas funciones sugiere que, tras la adición de biol, las comunidades microbianas inicialmente modulan la expresión y/o presencia de genes relacionados con la importación de aminoácidos y la dinámica de vesículas, posiblemente debido a que los nutrientes fácilmente disponibles (aminoácidos libres, péptidos, ácidos orgánicos) favorecen inicialmente a microorganismos oportunistas (copiótrofos) que no requieren del mismo nivel de inversión en complejos sistemas de transporte. Una vez que los recursos más accesibles son consumidos y la comunidad entra en un proceso de reestructuración, la necesidad de estos complejos sistemas de transporte podría reducirse. Este patrón coincide con observaciones de respuesta a enmiendas orgánicas, donde la dinámica funcional microbiana se ajusta dependiendo de la calidad y cantidad de nutrientes [108, 109].

Otra categoría con cambios significativos es la de “Transcripción y Mecanismo de transducción de señales” ($p<0,05$). Este resultado sugiere que, tras el influjo inicial de nutrientes, las poblaciones microbianas pueden reducir temporalmente la expresión de genes asociados con la regulación global de la transcripción y la señalización intracelular, adaptando así su maquinaria regulatoria a las nuevas condiciones ambientales. Con el paso del tiempo (10 días), un leve aumento de estas funciones podría reflejar la reactivación de rutas regulatorias más complejas a medida que la comunidad retorna a un estado más cercano al basal. Esta plasticidad funcional se ha descrito en suelos con cambios repentinos en la disponibilidad de nutrientes, donde la comunidad ajusta su maquinaria metabólica y regulatoria para optimizar el uso de recursos [110, 111].

Los resultados marginalmente significativos ($0,05<p<0,1$) también aportan información relevante. Por ejemplo, la categoría funcional compuesta por “Motilidad celular y Mecanismos de transducción de señales” muestra una leve disminución desde el Línea base hasta los 24 horas y 10 días. La menor inversión en motilidad celular puede indicar una reducción en la necesidad de desplazamiento activo hacia parches de nutrientes, dado que los recursos del biol pueden haber sido rápidamente aprovechados, reduciendo gradualmente los gradientes químicos que promueven la quimiotaxis [112]. De igual forma, cambios en la señalización intracelular asociada a motilidad pueden implicar la estabilización de la comunidad conforme las condiciones vuelven a la normalidad.

La categoría de “Producción y conversión energética” y “Transporte y metabolismo de carbohidratos” muestra una dinámica en forma de U, disminuyendo inicialmente en las 24 horas y repuntando a los 10 días. Este patrón sugiere una adaptación inicial a una fuente de carbono fácilmente utilizable, seguida de un agotamiento parcial de dicho recurso y una eventual recuperación cuando la comunidad se estabiliza y comienza a utilizar fuentes de energía más recalcitrantes. Este tipo de respuesta se ha observado en suelos enmendados con materia orgánica, donde la comunidad microbiana experimenta un pulso inicial de actividades metabólicas seguido de una fase de reorganización funcional [113, 114].

Otra categoría marginalmente significativa es la de “Transporte y metabolismo de coenzimas” y “Replicación, recombinación y reparación”, la cual aumenta desde el Línea

base hacia las 24 horas, pero desaparece a los 10 días. Este aumento temprano podría reflejar la necesidad de maquinaria enzimática y de reparación del ADN ante el estrés inicial causado por la introducción de compuestos exógenos y microorganismos del biol. A medida que la comunidad se adapta, la presión selectiva por la reparación y mantenimiento genómico podría disminuir, resultando en una reducción de estas funciones [115].

Finalmente, la categoría de "Transporte y metabolismo de lípidos" y "Mecanismos de transducción de señales" exhibe un incremento moderado en los dos primeros grupos (Línea base a 24 horas) y luego una disminución a los 10 días. Esta respuesta sugiere la participación inicial de lípidos de membrana y compuestos señalizadores en la adaptación a las nuevas condiciones del suelo. Cambios en la composición lipídica y en la señalización mediada por moléculas anfipáticas pueden ser claves en la rápida respuesta celular, por ejemplo, modificando la fluidez de la membrana para adaptarse a las condiciones fisicoquímicas alteradas por el biol [116].

En conjunto, estos resultados demuestran naturaleza transitoria de los cambios funcionales inducidos por la aplicación del biol. Durante las primeras 24 horas, la comunidad microbiana responde con ajustes en funciones regulatorias, metabólicas y de transporte, reflejando un pico en el aprovechamiento de nutrientes accesibles y una reorganización rápida de las poblaciones. Con el paso de los días, la comunidad tiende a regresar hacia un estado funcional más parecido al basal, indicando resiliencia y capacidad de recuperación ante perturbaciones.

La significancia biológica de estos resultados radica en que las funciones microbianas no solo reflejan la composición taxonómica de la comunidad, sino también su capacidad de respuesta y adaptación a condiciones ambientales cambiantes. Estos hallazgos tienen implicaciones para la gestión sostenible de suelos agrícolas, pues resaltan la importancia de la estabilidad funcional del microbioma frente a perturbaciones transitorias asociadas a la aplicación de biofertilizantes. Además, las dinámicas funcionales descritas pueden orientar estrategias biotecnológicas para diseñar consorcios microbianos específicos que maximicen el aprovechamiento de nutrientes y la resiliencia del suelo, reduciendo la

dependencia de fertilizantes químicos y contribuyendo al mantenimiento de la salud del suelo y la productividad agrícola.

Por otro lado, la rápida reestructuración funcional y el retorno hacia estados más cercanos al basal destacan la importancia de la complejidad microbiana del suelo, que se expresa en la elevada diversidad taxonómica y la llamada "redundancia funcional". Este rasgo implica que múltiples taxones pueden desempeñar roles similares en la dinámica del ecosistema [117], lo cual resulta esencial para sostener la resiliencia y la multifuncionalidad del suelo. En consecuencia, aun cuando ciertas poblaciones disminuyan o cambien su actividad a lo largo del tiempo, otras pueden asumir las mismas funciones metabólicas [118], manteniendo procesos claves como el ciclo de nutrientes, la producción de compuestos de interés agronómico y el control biológico de patógenos. Esta redundancia taxonómica, combinada con la diversidad de rutas metabólicas presentes en el microbioma, garantiza que el aporte de biol no solo se traduzca en picos de actividad microbiana puntuales, sino también en una capacidad de recuperación que sostiene los servicios ecosistémicos esenciales en suelos agrícolas [119].

8.6 Correlaciones entre perfiles metagenómicos y parámetros fisicoquímos del suelo

La concentración promedio de iones Ca^{2+} en savia vegetal incrementó significativamente de 50-150 ppm en la línea base a 150-200 ppm en el grupo de 24 horas tras la aplicación de biol, mostrando un efecto aditivo del fertirriego inorgánico. Este aumento puede atribuirse al aporte de calcio del fertilizante inorgánico utilizado en el riego, dado que el tratamiento con biol puro (código de barras 12) mostró niveles inferiores en comparación con FIO (código de barras 7). Sin embargo, los tratamientos FIOBL200 (código de barras 10) y SMBIO (código de barras 11) presentan concentraciones cercanas a 200ppm, lo que sugiere un posible efecto sinérgico entre el biol y los fertilizantes inorgánicos. Estudios previos han indicado que el biol derivado de bosta bovina aporta calcio disponible, además de incrementar la disponibilidad de nutrientes a través de la estimulación microbiana en la rizósfera [120, 121]. El incremento sostenido de los niveles de calcio a los 10 días (e.g., código de barras 17) puede atribuirse a la liberación continua de calcio desde el biol y el fertilizante inorgánico, así como a la

actividad microbiana en la rizósfera que favorece la solubilización de este nutriente. Además, la interacción sinérgica entre los microorganismos del biol y el régimen de fertirriego podría estar promoviendo una mayor absorción de calcio por las raíces, relacionado a la demanda constante de calcio para el crecimiento vegetal y el mantenimiento de funciones estructurales y regulatorias en el palto.

El porcentaje de carbono orgánico total (COT) se mide como el porcentaje en masa de carbono orgánico (g de C) por cada 100g de suelo seco. Se observó que este disminuyó progresivamente de 2% en la línea base (grupo azul) a 1,5% en el grupo de 24 horas (grupo rojo) y 1,2% a los 10 días (grupo verde). Esta reducción sugiere una rápida mineralización de la materia orgánica tras la aplicación de biol, favorecida por la actividad microbiana estimulada. La oxidación de compuestos orgánicos por microorganismos en respuesta al biol ha sido previamente documentada como un mecanismo que reduce los niveles de carbono orgánico en el corto plazo, particularmente en sistemas con alta actividad microbiana [122, 123, 124]. Además, la estabilización en el grupo de 10 días sugiere que el ecosistema rizosférico comienza a alcanzar un nuevo equilibrio, caracterizado por una menor demanda de carbono como fuente energética.

En el gráfico CCA, las coordenadas de cada código de barras son ponderaciones lineales de las variables ambientales seleccionadas que maximizan la varianza explicada de la matriz de abundancias. En otras palabras, la ubicación de cada código de barras corresponde a una combinación lineal de los parámetros fisicoquímicos que mejor explica la varianza de su comunidad microbiana. Las muestras que aparecen próximas poseen comunidades microbianas con composición relativa muy similar y reaccionan de forma parecida a los mismos gradientes ambientales, mientras que las distantes albergan perfiles microbianos marcadamente distintos.

Las cruces rojas representan el centroide de abundancia ponderada de cada taxón o especie, cuya posición señala hacia los códigos de barras donde ese taxón es relativamente más frecuente. Cruces situadas cerca de un código de barras o en la misma dirección radial señalan taxones característicos de esa muestra o grupo de muestras. A la inversa, cruces alejadas o en dirección opuesta indican una baja abundancia (correlación negativa). La longitud radial de la cruz refleja la magnitud con la que el taxón está estructurado por los gradientes ambientales incluidos en el modelo: cruces próximas al origen son ubiquistas

o poco explicadas por las variables seleccionadas. Cuanto más lejos del origen se encuentra, mayor es la proporción de su variación explicada por las variables incluidas en el modelo.

Los vectores azules muestran la dirección e intensidad de los gradientes ambientales condicionados al modelo. Su ángulo con los ejes representa la correlación de la variable con cada eje canónico, y su longitud es proporcional a la raíz de la suma de cuadrados de las correlaciones (intensidad de la correlación).
Un código de barras proyectado en la dirección de un vector ambiental posee concentraciones relativamente altas de ese parámetro fisicoquímico. Puntos muestrales situados hacia la punta del vector poseen concentraciones relativamente altas; las situadas en el sentido contrario, bajas. Las cruces rojas o taxones que caen en la misma dirección de un vector ambiental se encuentran asociados ecológicamente a tales condiciones edáficas. Por ejemplo, taxones cuya cruz se alínea con el vector de "Ca_ion" se asocian a mayor calcio en savia. En conjunto, el gráfico CCA permite inferir de forma simultánea (i) la similitud de composición entre códigos de barras, (ii) los taxones asociados con cada código de barras y (iii) los gradientes ambientales que condicionan la estructura microbiana.

El análisis CCA global reveló una correlación estadísticamente significativa entre la estructura microbiana y los parámetros ambientales seleccionados: carbono orgánico total (F = 5,05, p = 0,006) y concentración de Ca^{2+} en savia vegetal (F = 6,31, p = 0,007). La longitud del vector correspondiente a Ca^{2+} indica una fuerte influencia de este ion sobre la composición microbiana, lo cual respalda la hipótesis de que el aporte de calcio modula la estructura de la comunidad, posiblemente al favorecer grupos funcionales que dependen de este nutriente [125, 126]. Según el artículo de Agaras et al., el calcio desempeña roles esenciales en las interacciones planta-microorganismo debido a su capacidad para actuar como un segundo mensajero y como un modulador estructural en procesos biológicos fundamentales, tanto en plantas como en bacterias promotoras del crecimiento vegetal. El calcio en la savia vegetal podría regular indirectamente la composición y funcionalidad de la microbiota al influir en procesos como la liberación de exudados radiculares ricos en calcio y la formación de gradientes iónicos en la rizósfera, favoreciendo el crecimiento de microorganismos adaptados a estas condiciones.

Por otro lado, la correlación con COT puede estar relacionada con la provisión de sustratos metabólicos por la materia orgánica degradada, lo cual impacta directamente en la diversidad y abundancia microbiana [127]. La relevancia estadística del ANOVA para el modelo CCA refuerza estas conclusiones, mostrando que ambos parámetros son determinantes clave en la dinámica de la rizósfera de los paltos bajo las condiciones experimentales estudiadas.

Además del análisis CCA que incluyó todos los puntos temporales (Figura 29), se realizaron CCAs separados para cada uno de los tres puntos temporales (Línea Base, 24 horas después de aplicar biol y 10 días después de aplicar biol) [Ver Anexo 17 en Material Suplementario]. En estos análisis individuales, se aplicó una selección de variables paso a paso (*ordistep*, Pin=0.05) para identificar únicamente los factores ambientales con una contribución estadísticamente significativa a la varianza de la composición comunitaria en cada fase temporal del estudio. Los análisis CCA individuales para cada punto temporal revelaron una sucesión en los factores ambientales que estructuran la comunidad microbiana de la rizósfera. En la Línea Base, el carbono orgánico total del suelo ("Total_C") fue la única variable retenida por el modelo CCA (CCA1: 62.3% varianza), sugiriendo que la disponibilidad de carbono endógeno condiciona la microbiota inicial. La variabilidad observada en "Total_C" podría reflejar heterogeneidades espaciales del suelo que influyen en la composición basal de la comunidad.

Luego de 24 horas de aplicar biol, el calcio en savia vegetal (“Ca_ion”) emergió como principal factor correlacionado con la estructura comunitaria (CCA1: 33.2% varianza). Este cambio coincide con el incremento de ion calcio en savia, posiblemente por el aporte del fertirriego en sinergia con el biol. El aumento de Ca^{2+} en la planta moduló la exudación radicular y, consecuentemente, el microambiente rizosférico, favoreciendo taxones específicos. A los 10 días post-aplicación de biol el factor estructurador más dominante fue la concentración de potasio en el suelo rizosférico (“R_K”) (CCA1: 44.8% varianza). Tras el consumo de los componentes más fácilmente degradables del biol, la dinámica del potasio, macronutriente clave para funciones microbianas y vegetales influenciado por la mineralización de materia orgánica, pudo volverse un factor selectivo determinante para la estructuración microbiana durante esta fase de reestabilización a corto plazo.

8.7 Cambios en la composición microbiana microbiana del biol previo a su aplicación

La marcada presencia de *Pseudomonas* en el biol fresco y su posterior reducción tras 10 días de almacenamiento, así como la falta de un incremento significativo en la rizósfera tras su aplicación, indican un escenario complejo donde la dinámica de este género está condicionada por factores tanto abióticos como bióticos, incluyendo disponibilidad de nutrientes, condiciones de almacenamiento y competencia microbiana en el suelo. *Pseudomonas* es un género cosmopolita y versátil que incluye numerosas especies con potencialidades metabólicas diversas, tales como la degradación de compuestos orgánicos complejos, producción de sideróforos y promoción del crecimiento vegetal (Compant et al., 2005; Dimkpa et al., 2009). Estas características le confieren ventajas competitivas en entornos ricos en sustratos fácilmente degradables, como el biol fresco, donde su alta proporción relativa (cerca del 30-35%) sugiere que las condiciones iniciales favorecen su proliferación rápida y eficiente.

En el biol fresco, la elevada carga de nutrientes disponibles, el pH favorable y la ausencia de una comunidad microbiana altamente competitiva podrían explicar la dominancia inicial de *Pseudomonas*. Además, el proceso de obtención del biol—usualmente una fermentación anaeróbica incompleta de estiércoles—puede enriquecer en microorganismos oportunistas que se benefician de fuentes simples de carbono y nitrógeno [128]. La capacidad de *Pseudomonas* para crecer rápidamente bajo condiciones fluctuantes de oxígeno, la presencia de metabolitos fácilmente asimilables y su plasticidad metabólica le permiten colonizar tempranamente el medio, alcanzando altas abundancias relativas.

No obstante, tras 10 días de almacenamiento en condiciones anaeróbicas simuladas, la comunidad microbiana del biol sufre una reestructuración significativa. La desaparición de *Pseudomonas guangdongensis* de las especies más abundantes y la disminución drástica de la representatividad de este género (de >35% a 8%) indican que los recursos inicialmente disponibles probablemente fueron consumidos, o que se han generado condiciones que favorecen a otros taxones más adaptados a la madurez del sustrato o a

un contexto más reducido en oxígeno (como *Clostridium*, *Methanothrix* u otros organismos estrictamente anaeróbicos). Este tipo de cambios temporales se han documentado en sistemas de almacenamiento de enmiendas orgánicas, en los que la dinámica sucesional obedece a la disponibilidad decreciente de sustratos fácilmente degradables y al establecimiento de microorganismos especializados en la degradación de compuestos más refractarios [129, 130].

Un factor clave para comprender el rol de *Pseudomonas* en la rizósfera es que, si bien este género es común en suelos agrícolas y puede actuar como promotor del crecimiento vegetal (131, 132), su éxito al ser introducido exógenamente mediante enmiendas no está garantizado. La rizósfera del palto, un entorno altamente dinámico, posee una microbiota residente que ha coevolucionado con la planta, generando una comunidad microbiana relativamente estable y resiliente [133, 134]. Cuando el biol rico en *Pseudomonas* es aplicado al suelo, estos microorganismos exógenos enfrentan competencia intensa con la microbiota autóctona, la cual está adaptada a las condiciones locales, la calidad del exudado radical y los niveles de nutrientes del suelo. Asimismo, factores abióticos del suelo, como pH, disponibilidad hídrica, salinidad y presencia de metales, pueden no resultar favorables para la persistencia a mediano plazo de las *Pseudomonas* provenientes del biol [135].
La introducción de microorganismos beneficiosos (PGPB) no siempre conlleva un aumento sostenido de su abundancia en el suelo ni su incorporación estable en la rizósfera del cultivo [136, 137]. Además, la resiliencia del microbioma del suelo hace que cualquier perturbación introducida—como la aplicación de biol—tienda a diluirse con el tiempo, retornando la comunidad a su estado basal o a un estado funcionalmente similar, sin cambios drásticos en la composición dominada por la microbiota autóctona [138].

En el análisis a nivel de especies, se observa que *Escherichia coli*, *Cloacimonas acidaminovorans*, *Methanocorpusculum labreanum* y *Trichococcus floccyliformis* incrementan su proporción relativa tras 10 días de almacenamiento del biol, y que las especies *Pseudomonas guangdongensis* y *Pseudomonas wenzhouensis* disminuyen drásticamente en abundancia relativa. Hasta ahora, ninguna de estas especies del género *Pseudomonas* han sido asociadas con comportamientos patógenos en plantas. Ambas especies han sido descritas como aislados ambientales, sin reportarse manifestaciones de

patogenicidad en contextos agrícolas. Esto sugiere que podrían considerarse neutras o potencialmente con algún rol beneficioso en interacciones planta-microbio. No obstante, su potencial como promotoras de crecimiento vegetal requiere de evaluaciones adicionales.

La presencia de *E. coli* puede ser indicativa de contaminación fecal residual en el biol, lo que subraya la importancia de procesos de tratamiento adecuados para minimizar riesgos sanitarios [139]. *Cloacimonas acidaminovorans* es conocida por su capacidad para metabolizar aminoácidos bajo condiciones anaeróbicas, lo que podría explicar su proliferación en el biol almacenado [140].

Methanocorpusculum labreanum es otro arqueón metanógeno que participa en la producción de metano a partir de monóxido de carbono e hidrógeno [141]. Su aumento sugiere una intensificación de los procesos metanogénicos en el biol almacenado, lo cual podría afectar la calidad del fertilizante en términos de emisiones de gases de efecto invernadero y la disponibilidad de nutrientes para las plantas. Finalmente, *Trichococcus floccyliformis* es una bacteria Gram-positiva capaz de fermentar una variedad de azúcares y aminoácidos, contribuyendo a la descomposición de materia orgánica compleja en el biol [142]. Su incremento indica una mayor actividad degradativa, facilitando la liberación de nutrientes que pueden ser posteriormente utilizados por la microbiota del suelo y las plantas de palto.

En conjunto, estos cambios en la composición microbiana del biol tras 10 días de almacenamiento reflejan una dinámica sucesional donde microorganismos especializados en la degradación anaeróbica y fermentativa se vuelven predominantes. Esta reestructuración puede influir significativamente en la eficacia del biol como biofertilizante, afectando tanto la disponibilidad de nutrientes como la salud microbiana de la rizósfera del palto. Es necesario considerar el estado de maduración del biol, las condiciones de almacenamiento y las características del suelo receptor. Futuras investigaciones podrían enfocarse en establecer condiciones de almacenamiento del biol que retengan poblaciones elevadas de *Pseudomonas*, así como en el estudio de formulaciones y coadyuvantes que faciliten su establecimiento y persistencia en la rizósfera. Estas aproximaciones permitirían explotar más eficientemente el potencial de

este género como biofertilizante o agente promotor del crecimiento en sistemas agrícolas sostenibles.

IX. CONCLUSIONES

- La aplicación de biol generó alteraciones significativas, pero transitorias, en la comunidad microbiana de la rizósfera del palto. A las 24 horas, se observó una reducción en la diversidad (índices de Shannon y Simpson) y una variación en la composición taxonómica, con un aumento transitorio en la abundancia relativa de microorganismos copiótrofos y nitrificantes. Sin embargo, a los 10 días, la comunidad tendió a reestablecerse hacia un estado más cercano a la línea base, lo que subraya la resiliencia y capacidad de restablecimiento del microbioma del suelo.
- Las funciones microbianas relacionadas con la transducción de señales, el transporte de aminoácidos y la motilidad celular experimentaron cambios funcionales de carácter transitorio, manifestándose a corto plazo tras la aplicación de biol. Este patrón sugiere que la comunidad responde con rapidez ante aportes súbitos de nutrientes y compuestos orgánicos, optimizando recursos a corto plazo. A mediano plazo, estas funciones retornan a niveles cercanos a los basales, indicando una adaptación dinámica frente a las condiciones ambientales inducidas por la enmienda orgánica.
- El análisis multivariado (CCA) y las correlaciones con parámetros fisicoquímicos del suelo y savia vegetal evidenciaron que factores como el carbono orgánico total y el contenido de calcio en savia vegetal comodulan la composición microbiana. Estos resultados sugieren que la estructura comunitaria en la rizósfera es el resultado de la interacción compleja entre insumos orgánicos exógenos como el biol, nutrientes inorgánicos del fertirriego y factores edáficos, influyendo en la funcionalidad del microbioma.
- La composición microbiana del biol varió notablemente tras 10 días de almacenamiento, con una marcada reducción de *Pseudomonas* y una mayor presencia de microorganismos anaerobios fermentativos y metanógenos. Aunque numerosas especies de *Pseudomonas*, como *P. putida, P. fluorescens, P. protegens y P. chlororaphis* pueden comportatse como bacterias promotoras del

crecimiento vegetal (PGPR) y agentes de biocontrol al producir sideróforos, fitohormonas o antibióticos, otras cepas del mismo género - incluyendo *Pseudomonas guangdongensis* o *Pseudomonas wenzhouensis* reportadas en el presente estudio – aún requieren caracterizaciones adicionales para reportar su rol en contextos agrícolas. Este cambio en la microbiota del biol puede afectar su eficacia como biofertilizante; por ende, es necesario manejar las condiciones de almacenamiento y el tiempo de aplicación para maximizar su impacto positivo en la rizósfera.

- La evidencia obtenida aporta un conocimiento valioso para el desarrollo de biofertilizantes específicos y la optimización de su aplicación. Comprender la respuesta transitoria del microbioma a la introducción de biol, junto con su interacción con nutrientes inorgánicos, sienta las bases para diseñar consorcios microbianos y manejos agronómicos más eficientes, reduciendo la dependencia en fertilizantes químicos y promoviendo la resiliencia del suelo.

X. LIMITACIONES

- El número reducido de réplicas biológicas dificultó la obtención de resultados estadísticamente robustos y requirió que se coensamblaran los códigos de barras con distintos volúmenes de biol, lo cual limitó la precisión del análisis taxonómico y funcional a nivel de especies.
- La ventana temporal evaluada de 28 días no permitió observar cambios a largo plazo en la estructura y función del microbioma ni capturar ciclos estacionales o la influencia de factores climáticos. La dinámica del palto, un cultivo que se caracteriza por su fenología compleja en campo, requiere periodos de estudio más amplios y múltiples campañas agrícolas.
- La heterogeneidad genética del palto y la variabilidad espacial del suelo generaron líneas base microbianas diversas, limitando la extrapolación de los hallazgos a otros lotes o condiciones edafoclimáticas.
- Las muestras de biol analizadas en el secuenciación metagenómico carecieron de réplicas técnicas por ser un análisis exploratorio. La falta de réplicas técnicas adecuadas en el biol, así como el uso de un único punto temporal para su análisis fresco y otro a los 10 días, impidieron realizar pruebas estadísticas concluyentes sobre su dinámica microbiológica, restringiendo el análisis a inferencias parciales.

XI. RECOMENDACIONES

- Futuros estudios podrían contemplar extender el período de seguimiento más allá de 28 días, abarcando ciclos fenológicos completos del palto, lo que permitirá evaluar respuestas de largo plazo, su estacionalidad y efectos acumulativos. Asimismo, se sugiere incrementar el número de réplicas biológicas y técnicas, tanto en suelo como en biol, para mejorar la potencia estadística y la fiabilidad de las conclusiones, permitiendo análisis diferenciados por tratamiento y condición edafoclimática.
- Se sugiere integrar un enfoque multi-ómico a través de la incorporación de técnicas complementarias, como metatranscriptómica, metabolómica y metaproteómica, con el fin de proporcionar información funcional más detallada sobre la actividad metabólica real de la comunidad microbiana.
- Para el fundo Fundo Agrícola San José, se sugiere desarrollar protocolos estandarizados de producción y almacenamiento del biol que mantengan la estabilidad de poblaciones microbianas clave, evitando la deriva sucesional hacia comunidades menos eficientes. También se podría experimentar con aditivos o consorcios microbianos complementarios que mejoren la persistencia de géneros benéficos (como *Pseudomonas* o *Streptomyces*) y reduzcan la prevalencia de patógenos u organismos no deseados.
- Por otro lado, es conveniente que el fundo lleve un control continuo de las condiciones edafoclimáticas, contenido de humedad, pH, salinidad y nutrientes disponibles, para relacionar con mayor precisión las dinámicas microbianas.
- Finalmente, se recomiendan aplicaciones de biol de mayor frecuencia y no necesariamente de muy altos volúmenes, para asegurar de que los cambios en la estructura de la comunidad microbiana persistan en el tiempo, y que especies microbianas benéficas exógenas puedan colonizar nuevos nichos ecológicos.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. World Population Prospects 2023: Summary of Results [Internet]. 2023. Available from: https://population.un.org/wpp/

2. Kopittke PM, Dalal RC, Finn D, Menzies NW. El suelo y la intensificación de la agricultura para la seguridad alimentaria mundial. Environ Int. 2019;132:105078. Available from: https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105078

3. Enebe MC, Babalola OO. Effects of Inorganic and Organic Treatments on the Microbial Community of Maize Rhizosphere by a Shotgun Metagenomics Approach. Ann Microbiol. 2020;70(1). Available from: https://doi.org/10.1186/s13213-020-01591-8

4. Bedolla-Rivera HI, Zambrano-Monserrate MA, Armas-Cruz Y, Carrión-Paladines V, Rodríguez-Moreno C, Paredes-Urroz C. Analyzing the Impact of Intensive Agriculture on Soil Quality: A Systematic Review and Global Meta-Analysis of Quality Indexes. Agronomy. 2023;13(8):2166–2166. Available from: https://doi.org/10.3390/agronomy13082166

5. Wan L, Tian Y, He M, Zheng Y, Lyu Q, Xie R, Ma Y, Deng L, Yi S. Effects of chemical fertilizer combined with organic fertilizer application on soil properties, citrus growth physiology, and yield. Agriculture. 2021;11(12):1207. Available from: https://doi.org/10.3390/agriculture11121207

6. Mansouri H, Ait Said H, Noukrati H, Oukarroum A, Ben youcef H, Perreault F. Advances in controlled release fertilizers: Cost-effective coating techniques and smart stimuli-responsive hydrogels. Adv Sustainable Syst. 2023;7(9). Available from: https://doi.org/10.1002/adsu.202300149

7. Arafa EG, Sabaa MW, Mohamed RR, Elzanaty AM, Abdel-Gawad OF. Preparation of biodegradable sodium alginate/carboxymethylchitosan hydrogels for the slow-release of

urea fertilizer and their antimicrobial activity. React Funct Polym. 2022;174:105243. Available from: https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2022.105243

8. Skorupka M, Nosalewicz A. Ammonia volatilization from fertilizer urea—A new challenge for agriculture and industry in view of growing global demand for food and energy crops. Agriculture. 2021;11(9):822. Available from: https://doi.org/10.3390/agriculture11090822

9. Huang M, Gu C, Bai Y. Effect of fertilization on methane and nitrous oxide emissions and global warming potential on agricultural land in China: A meta-analysis. Agriculture. 2023;14(1):34. Available from: https://doi.org/10.3390/agriculture14010034

10. Kitamura R, Sugiyama C, Yasuda K, Nagatake A, Yuan Y, Du J, Yamaki N, Taira K, Kawai M, Hatano R. Effects of three types of organic fertilizers on greenhouse gas emissions in a grassland on Andosol in southern Hokkaido, Japan. Front Sustain Food Syst. 2021;5. Available from: https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.649613

11. Marija GALIC, Mesic M, Zgorelec Z. Influence of Organic and Mineral Fertilization on Soil Greenhouse Gas Emissions. A Review. Agric Conspec Sci. 2019;85(1).

12. Key messages | Global symposium on soil erosion | Food and agriculture organization of the United Nations [Internet]. 2015. Available from: https://www.fao.org/about/meetings/soil-erosion-symposium/key-messages/en/

13. Kuśmierz S, Skowrońska M, Tkaczyk P, Lipiński W, Mielniczuk J. Soil organic carbon and mineral nitrogen contents in soils as affected by their pH, texture and fertilization. Agronomy. 2023;13(1):267. Available from: https://doi.org/10.3390/agronomy13010267

14. Martínez-Dalmau J, Berbel J, Ordóñez-Fernández R. Nitrogen fertilization. A review of the risks associated with the inefficiency of its use and policy responses. Sustainability. 2021;13(10):5625. Available from: https://doi.org/10.3390/su13105625

15. Jiang Z, Zhong Y, Yang J, Wu Y, Li H, Zheng L. Effect of nitrogen fertilizer rates on carbon footprint and ecosystem service of carbon sequestration in rice production. Sci Total Environ. 2019;670:210–217. Available from: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.188

16. Zhang R, Li Y, Zhao X, Allan Degen A, Lian J, Liu X, Li Y, Duan Y. Fertilizers have a greater impact on the soil bacterial community than on the fungal community in a sandy farmland ecosystem, Inner Mongolia. Ecol Indic. 2022;140:108972. Available from: https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.108972

17. Lian J, Wang H, Deng Y, Xu M, Liu S, Zhou B, Jangid K, Duan Y. Impact of long-term application of manure and inorganic fertilizers on common soil bacteria in different soil types. Agric Ecosyst Environ. 2022;337:108044. Available from: https://doi.org/10.1016/j.agee.2022.108044

18. Wang L, Xin J, Nai H, Zheng X. Effects of different fertilizer applications on nitrogen leaching losses and the response in soil microbial community structure. Environ Technol Innov. 2021;23:101608. Available from: https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101608

19. TEAM S. Blog | Campaña 2023: El crecimiento de la palta hass peruana es cero [Internet]. 2023. Available from: https://web.splogistics.com/blog/post/937/campana-2023-el-crecimiento-de-la-palta-hass-peruana-es-cero#:~:text=A%20noviembre%20de%202022%2C%20Per%C3%BA,los%20datos%20que%20maneja%20SENASA

20. ProHass: Actualmente existen 60.091 hectáreas de palta hass en nuestro pais, representando UN aumento de 19% frente a 2021 [Internet]. Agraria.pe Agencia Agraria de Noticias. Available from: https://agraria.pe/noticias/prohass-actualmente-existen-60-091-hectareas-de-palta-hass-e-29908

21. MIDAGRI: Exportación de palta superó las 36 mil toneladas en primer bimestre de 2024 [Internet]. Available from: https://www.gob.pe/institucion/agromercado/noticias/930071-midagri-exportacion-de-palta-supero-las-36-mil-toneladas-en-primer-bimestre-de-2024

22. Bisonó PS, Hernández BJ. Guía tecnológica sobre el cultivo del aguacate. Consejo Nacional de Competitividad, Santo Domingo, República Dominicana; 2008. 51 p.

23. Curzel V, Buono S, Achem V. El cultivo de palto. INTA, Argentina. Boletín de fruticultura N° 13; 2019. 20 p.

24. Lemus S, Valdebenito B, Osorio J, et al. Cultivo del palto [en línea]. Quillota: Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias; 2005. Boletín INIA no. 129.

25. Caballero C. Criterios a considerar en el manejo nutricional de palto (Persea americana) 'Hass' bajo condiciones de Cañete [Trabajo de suficiencia profesional de licenciatura]. Lima, Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2021. Available from: https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/39489/Ver_Documento_39489.pdf

26. Whiley A. Interpretación de la fenología y fisiología del palto para obtener mayores producciones. Curso Internacional de Producción, Pos Cosecha y Comercialización de Paltas. Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía, Viña del Mar, Chile; 1990.

27. Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú (SENAMHI). Manual de Observaciones Fenológicas. Lima, Perú; 2017. Available from: https://hdl.handle.net/20.500.12542/272

28. Herrera M, Narrea M. Manejo Integrado de Palto. Universidad Nacional Agraria La Molina y Agrobanco, Lima, Perú; 2011.

29. Lovatt CJ, Rosecrance R, Witney G. Nitrogen Fertilization Strategies for the 'Hass' Avocado that Increase Total Yield Without Reducing Fruit Size. HortTechnology. 2016;26(4):555–559.

30. Meyer JL, Witney G, Yates M, et al. Irrigation and fertilization management of avocados. Proceedings of the Second World Avocado Congress. 1992;281–288.

31. Ministerio de Agricultura y Riego del Perú. Estudio de palta en el Perú y el Mundo. Dirección General de Información Agraria, Lima, Perú; 2008.

32. Semenov MV, Kudeyarov VN, Bang, Chertkov O, Ivanko V, Tuflikova N, van Bruggen AHC. Does Fresh Farmyard Manure Introduce Surviving Microbes into Soil or Activate Soil-Borne Microbiota? J Environ Manage. 2021;294:113018. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113018

33. Mitter EK, Tosi M, Obregón D, Dunfield KE, Germida JJ. Rethinking Crop Nutrition in Times of Modern Microbiology: Innovative Biofertilizer Technologies. Front Sustain Food Syst. 2021;5:606815. https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.606815

34. O'Callaghan M, Ballard RA, Sterling JD, Pither-Joyce MD, Read MC, Ronson CW, et al. Soil Microbial Inoculants for Sustainable Agriculture: Limitations and Opportunities. Soil Use Manag. 2022;38(3):430–442. https://doi.org/10.1111/sum.12811

35. Pascale A, Proietti S, Pantelides IS, Stringlis IA. Modulation of the Root Microbiome by Plant Molecules: The Basis for Targeted Disease Suppression and Plant Growth Promotion. Front Plant Sci. 2020;10:1741. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01741

36. Bonilla N, Gutiérrez-Barranquero JA, de los Santos B, Vicente AD, Cazorla FM. Organic Amendments and Land Management Affect Bacterial Community Composition, Diversity and Biomass in Avocado Crop Soils. Plant Soil. 2012;357(1–2):215–226. https://doi.org/10.1007/s11104-012-1155-1

37. Yang Y, Ren S, Niu J, Li G, Liu Y, Yu Y, et al. Metagenomic Insights into Effects of Wheat Straw Compost Fertiliser Application on Microbial Community Composition and Function in Tobacco Rhizosphere Soil. Sci Rep. 2019;9(1):42667. https://doi.org/10.1038/s41598-019-42667-z

38. Enebe M, Babalola O. Metagenomics Assessment of Soil Fertilization on the Chemotaxis and Disease Suppressive Genes Abundance in the Maize Rhizosphere. Genes (Basel). 2021;12(4):535. https://doi.org/10.3390/genes12040535

39. Dong L, Xu J, Li Y, Fang H, Nuerlan M, Zhang X, et al. Biofertilizers Regulate the Soil Microbial Community and Enhance Panax Ginseng Yields. Chin Med (UK). 2019;14(1):41. https://doi.org/10.1186/s13020-019-0241-1

40. Lu H, Zhu Y, Shen Q, Xuan J, Fu Q, Xu Y, et al. Rs-198 Liquid Biofertilizers Affect Microbial Community Diversity and Enzyme Activities and Promote Vitis vinifera L. Growth. Biomed Res Int. 2020;2020:8321462. https://doi.org/10.1155/2020/8321462

41. Hueso-González P, Muñoz-Rojas M, Martínez-Murillo JF. The role of organic amendments in drylands restoration. Curr Opin Environ Sci Health. 2018;5:1–6.

42. Bonanomi G, De Filippis F, Zotti M, Idbella M, Cesarano G, Al-Rowaily S, Abd-ElGawad A. Repeated applications of organic amendments promote beneficial microbiota, improve soil fertility and increase crop yield. Appl Soil Ecol. 2020;156:103714.

43. Boldt-Burisch K, Schillem S, Schneider BU, Hüttl RF. The effect of nitrogen-modified lignite granules on mycorrhization and root and shoot growth of Secale cereale (winter rye) in a nutrient-deficient, sandy soil. Arch Agron Soil Sci. 2020;68(8):1117–1130.

44. Rahman G, Rahman MM, Alam MS, Kamal MZ, Mashuk H, Datta R, Meena RS. Biochar and organic amendments for sustainable soil carbon and soil health. In: Datta R, Meena R, Pathan S, Ceccherini M, editors. Carbon and Nitrogen Cycling in Soil. Singapore: Springer; 2020. p. 45–85.

45. Hernández T, Chocano C, Moreno JL, García C. Use of compost as an alternative to conventional inorganic fertilizers in intensive lettuce (Lactuca sativa L.) crops—Effects on soil and plant. Soil Tillage Res. 2016;160:14–22.

46. Ayangbenro AS, Chukwuneme CF, Ayilara MS, Kutu FR, Khantsi M, Adeleke BS, Glick BR, Babalola OO. Harnessing the rhizosphere soil microbiome of organically amended soil for plant productivity. Agronomy. 2022;12(12):3179. https://doi.org/10.3390/agronomy12123179

47. Gupta VV, Germida JJ. Distribution of microbial biomass and its activity in different soil aggregate size classes as affected by cultivation. Soil Biol Biochem. 1988;20:777–786.

48. Sandhya V, Ali SZ. EPS-producing bacteria: Their role in combating drought stress. Agric Ecosyst Environ. 2015;25:1–10.

49. Amellal N, Burtin G, Bartoli F, Heulin T. Colonization of wheat rhizosphere by EPS-producing Pantoea agglomerans and its effect on soil aggregation. Appl Environ Microbiol. 1998;64:3740–3747.

50. Sandhya V, SkZ A, Grover M, Reddy G, Venkateswarlu B. Effect of plant growth promoting Pseudomonas spp. on compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress. Plant Growth Regul. 2009;58:150–162.

51. Gouzou L, Burtin G, Philippy R, Bartoli F, Heulin T. Effect of inoculation with Bacillus polymyxa on soil aggregation in the wheat rhizosphere: preliminary examination. Geoderma. 1993;56:479–490.

52. Amellal N, Burtin G, Bartoli F, Heulin T. Colonization of wheat rhizosphere by EPS-producing Pantoea agglomerans and its effect on soil aggregation. Appl Environ Microbiol. 1998;64:3740–3747.

53. Gil Ramírez LA, Leiva Cabrera FA, Lezama Escobedo MK, Bardales Vásquez CB, León Torres CA. Biofertilizante “biol”: Caracterización física, química y microbiológica. Rev Alfa. 2023;7(20):336–345. https://doi.org/10.33996/revistaalfa.v7i20.219

54. Kadam R, Jo S, Lee J, Khanthong K, Jang H, Park J. A review on anaerobic co-digestion of livestock manures in the context of sustainable waste management [Preprint]. 2023. https://doi.org/10.20944/preprints202312.1832.v1

55. Valentinuzzi F, Cavani L, Porfido C, Terzano R, Pii Y, Cesco S, Marzadori C, Mimmo T. The fertilising potential of manure-based biogas fermentation residues: Pelleted vs. liquid digestate. Heliyon. 2020;6(2):e03325. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03325

56. Pranckietienė I, Navickas K, Venslauskas K, Jodaugienė D, Buivydas E, Žalys B, Vagusevičienė I. The effect of digestate from liquid cow manure on spring wheat chlorophyll content, soil properties, and risk of leaching. Agronomy. 2023;13(3):626. https://doi.org/10.3390/agronomy13030626

57. Li Y, Zhao J, Krooneman J, Euverink GJ. Strategies to boost anaerobic digestion performance of cow manure: Laboratory achievements and their full-scale application potential. Sci Total Environ. 2021;755:142940. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142940

58. Krasilnikov P, Terekhin EA, Ilinykh AV, et al. Fertilizer Use, Soil Health and Agricultural Sustainability. Agriculture. 2022;12(4):462. https://doi.org/10.3390/agriculture12040462

59. Wan L, Tian Y, He M, Zheng Y, Lyu Q, Xie R, Ma Y, Deng L, Yi S. Effects of chemical fertilizer combined with organic fertilizer application on soil properties, citrus growth physiology, and yield. Agriculture. 2021;11(12):1207. https://doi.org/10.3390/agriculture11121207

60. Li X, Su Y, Ahmed T, Ren H, Javed MR, Yao Y, et al. Effects of different organic fertilizers on improving soil from newly reclaimed land to crop soil. Agriculture. 2021;11(6):560. https://doi.org/10.3390/agriculture11060560

61. Wang X, Yan J, Zhang X, Zhang S, Chen Y. Organic manure input improves soil water and nutrients use for sustainable maize (Zea mays L.) productivity on the Loess Plateau. PLoS One. 2020;15(8):e0238042. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238042

62. Orden L, Ferreiro N, Satti P, Navas-Gracia LM, Chico-Santamarta L, Rodríguez RA. Effects of onion residue, bovine manure compost and compost tea on soils and on the agroecological production of onions. Agriculture. 2021;11(10):962. https://doi.org/10.3390/agriculture11100962

63. Gallart M, Paungfoo-Lonhienne C, Trueman SJ. Effects of a growth-promoting Paraburkholderia species on nitrogen acquisition by avocado seedlings. Sci Hortic. 2022;295:110767. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110767

64. Escuadra GME, Amemiya Y. Suppression of Fusarium wilt of spinach with compost amendments. J Gen Plant Pathol. 2008;74:267–274.

65. Mącik M, Grytner M, Frąc M. The Status of Soil Microbiome as Affected by the Application of Phosphorus Biofertilizer: Fertilizer Enriched with Beneficial Bacterial Strains. Int J Mol Sci. 2020;21(21):8003. https://doi.org/10.3390/ijms21218003

66. Farooq Q, Hardy GE, McComb JA, Thomson PC, Burgess TI. Changes to the bacterial microbiome in the rhizosphere and root endosphere of Persea americana (avocado) treated with organic mulch and a silicate-based mulch or phosphite, and infested with Phytophthora cinnamomi. Front Microbiol. 2022;13:870900. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.870900

67. Aguirre-von-Wobeser E, Castro-Longoria E, Hernández-López O, Xoconostle-Cázares B, Benítez M, González-Garay ML, et al. Barks from Avocado Trees of Different Geographic Locations Have Consistent Microbial Communities. Arch Microbiol. 2021;203(7):4593–4607. https://doi.org/10.1007/s00203-021-02449-6

68. Bejarano-Bolívar AA, Obregón-Molina G, Cardona-Alfonso C, Domínguez-Gordillo A, Restrepo S, López-Villamor H, et al. Shifts in the Structure of Rhizosphere Bacterial

Communities of Avocado after Fusarium Dieback. Rhizosphere. 2021;18:100333. https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100333

69. Iquebal MA, Jaiswal S, Sharma P, Parida SK. Potential Use of Microbial Community Genomes in Various Dimensions of Agriculture Productivity and Its Management: A Review. Front Microbiol. 2022;13:708335. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.708335

70. Nwachukwu BC, Babalola OO. Metagenomics: A Tool for Exploring Key Microbiome with the Potentials for Improving Sustainable Agriculture. Front Sustain Food Syst. 2022;6:886987. https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.886987

71. Jia B, Wang L, Liu Y, Li J, Zhou D, Qiu Z, et al. Metagenomic Analysis of Rhizosphere Microbiome Provides Insights into Occurrence of Iron Deficiency Chlorosis in Field of Asian Pears. BMC Microbiol. 2022;22(1):1–13. https://doi.org/10.1186/s12866-021-02432-7

72. Cui X, Zhang Y, Gao J, Peng F, Gao P. Long-term combined application of manure and chemical fertilizer sustained higher nutrient status and rhizospheric bacterial diversity in reddish paddy soil of central South China. Sci Rep. 2018;8(1):34685. https://doi.org/10.1038/s41598-018-34685-0

73. Fierer N, Bradford MA, Jackson RB. Toward an ecological classification of soil bacteria. Ecology. 2007;88(6):1354–1364. https://doi.org/10.1890/05-1839

74. Rusli LS, Abdullah R, Yaacob JS, Osman N. Organic amendments effects on nutrient uptake, secondary metabolites, and antioxidant properties of Melastoma malabathricum L. Plants. 2022;11(2):153. https://doi.org/10.3390/plants11020153

75. Zhong W, Gu T, Wang W, Zhang B, Lin X, Huang Q, Shen W. The effects of mineral fertilizer and organic manure on soil microbial community and diversity. Plant Soil. 2009;326(1-2):511–522. https://doi.org/10.1007/s11104-009-9988-y

76. Liu W, Yang Z, Ye Q, Peng Z, Zhu S, Chen H, et al. Positive effects of organic amendments on soil microbes and their functionality in agro-ecosystems. Plants. 2023;12(22):3790. https://doi.org/10.3390/plants12223790

77. Ali S, Hamid N, Rasul G, Mehnaz S, Malik KA. Contribution of non-leguminous biofertilizers to rice biomass, nitrogen fixation and fertilizer-N use efficiency under flooded soil conditions. In: Nitrogen Fixation with Non-Legumes. Dordrecht: Springer; 1998. p. 61–73. https://doi.org/10.1007/978-94-011-5232-7_7

78. Tharayil N, Bhowmik PC, Xing B. Preferential sorption of phenolic phytotoxins to soil: implications for altering the availability of allelochemicals. J Agric Food Chem. 2006;54(8):3033–3040. https://doi.org/10.1021/jf053167q

79. Castro HF, Classen AT, Austin EE, Norby RJ, Schadt CW. Soil Microbial Community Responses to Multiple Experimental Climate Change Drivers. Appl Environ Microbiol. 2010;76(4):999–1007.

80. Warriner, K., Huber, A., Namvar, A., & Fan, W. (2009). Sources and significance of microbial contamination of fruits and vegetables. En A. L. Moyes & M. P. Pilot (Eds.), *Microbial Contamination of Fruits and Vegetables* (pp. 1-54). Nova Science Publishers.

81. U.S. Environmental Protection Agency. (1993). *Standards for the Use or Disposal of Sewage Sludge; Final Rules*. 40 CFR Part 503. Federal Register, 58(32), 9248-9415. (Esta es una regulación de EEUU para lodos residuales, pero los principios de reducción de patógenos y monitoreo son aplicables al concepto de inocuidad de fertilizantes orgánicos). O también: Sahlström, L. (2003). A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants. *Bioresource Technology, 87*(2), 161-166.

82. Marschner, P. (Ed.). (2012). *Marschner's mineral nutrition of higher plants* (3rd ed.). Academic Press. (Este es un libro de texto fundamental en nutrición vegetal que discute la asimilación de diferentes formas de nitrógeno).

83. Norton, J. M. (2008). Nitrification in agricultural soils. En J. S. Schepers & W. R. Raun (Eds.), *Nitrogen in agricultural systems* (pp. 173-197). ASA-CSSA-SSSA.

84. Philippot, L., Hallin, S., & Schloter, M. (2007). Ecology of denitrifying prokaryotes in agricultural soil. *Advances in Agronomy, 96*, 249-305. (Este review discute la ecología de desnitrificadores, incluyendo *Pseudomonas* en suelos agrícolas).

86. Bueno, E., Bedmar, E. J., & Richardson, D. J. (2012). The versatile lifestyles of rhizobia: A cornerstone for sustainable agriculture. En D. L. Sparks (Ed.), *Advances in Agronomy* (Vol. 111, pp. 1-68). Academic Press. (Menciona la capacidad de desnitrificación en algunos *Bradyrhizobium*).

87. Tiedje, J. M. (1988). Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. En A. J. B. Zehnder (Ed.), *Biology of anaerobic microorganisms* (pp. 179-244). John Wiley & Sons.

88. Tistechok S, Datsyuk Y, Fedorenko V, Gromyko O. Actinomycetes strain Streptomyces sp. Je 1-42: phylogenetic analysis, biological activity and secondary metabolite profile. Faktori Eksperimental'noi Evolucii Organizmiv. 2020;27:276–281. https://doi.org/10.7124/FEEO.v27.1338

89. Buzón Durán L, Lebeña E, Martín-Gil J, Sánchez M, Martin-Ramos P. Applications of Streptomyces spp. Enhanced Compost in Sustainable Agriculture. In: Sustainable Soil Management. Singapore: Springer; 2020. p. 221–238. https://doi.org/10.1007/978-3-030-39173-7_13

90. Sy A, Giraud E, Jourand P, Garcia N, Willems A, de Lajudie P, et al. Methylotrophic Methylobacterium bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. J Bacteriol. 2001;183(1):214–220. https://doi.org/10.1128/JB.183.1.214-220.2001

91. Kim J, Jung M, Park S, Rijpstra WI, Sinninghe Damsté J, Madsen E, Min D, Kim J, Kim G, Rhee S. Cultivation of a highly enriched ammonia-oxidizing archaeon of

thaumarchaeotal group I.1b from an agricultural soil. Environ Microbiol. 2012;14(6):1528–1543.

92. Daims H, Lebedeva EV, Pjevac P, Han P, Herbold CW, Albertsen M, et al. Complete nitrification by Nitrospira bacteria. Nature. 2015;528:504–509.

93. Lenchi N, Kebbouche-Gana S, Servais P, Gana ML, Llirós M. Diesel Biodegradation Capacities and Biosurfactant Production in Saline-Alkaline Conditions by Delftia sp. NL1, Isolated from an Algerian Oilfield. Geomicrobiol J. 2020;37:454–466.

94. Lehtovirta-Morley LE, Sayavedra-Soto LA, Gallois N, Schouten S, Stein LY, Prosser JI, Nicol GW. Identifying Potential Mechanisms Enabling Acidophily in the Ammonia-Oxidizing Archaeon "Candidatus Nitrosotalea devanaterra". Appl Environ Microbiol. 2016;82:2608–2619. https://doi.org/10.1128/AEM.08264-16

95. Singh NK, Lavire C, Nesme J, Vial L, Nesme X, Mason CE, Lassalle F, Venkateswaran K. Comparative Genomics of Novel Agrobacterium G3 Strains Isolated From the International Space Station and Description of Agrobacterium tomkonis sp. nov. Front Microbiol. 2021;12:765943. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.765943

96. Zhalnina K, Dias R, Leonard MT, Dorr de Quadros P, Camargo FA, Drew JC, Farmerie WG, Daroub SH, Triplett EW. Genome sequence of Candidatus Nitrososphaera evergladensis from group I.1b enriched from Everglades soil reveals novel genomic features of the ammonia-oxidizing archaea. PLoS One. 2014;9(7):e101648. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101648

97. Han S, Kim S, Sedlacek CJ, Farooq A, Song C, Lee S, Liu S, Brüggemann N, Rohe L, Kwon M, Rhee S, Jung M. Adaptive traits of Nitrosocosmicus clade ammonia-oxidizing archaea. mBio. 2024;15:e02169-24. https://doi.org/10.1128/mBio.02169-24

98. Carro L, Nouioui I, Sangal V, Meier-Kolthoff JP, Trujillo ME, Montero-Calasanz MD, Şahin N, Smith DL, Kim KE, Peluso P, Deshpande S, Woyke T, Shapiro N, Kyrpides NC, Klenk H, Göker M, Goodfellow M. Genome-based classification of

micromonosporae with a focus on their biotechnological and ecological potential. Sci Rep. 2018;8:1–15.

99. Stieglmeier M, Klingl A, Alves RJE, Rittmann SKR, Melcher M, Leisch N, Schleper C. Nitrososphaera viennensis gen. nov., sp. nov., an aerobic and mesophilic, ammonia-oxidizing archaeon from soil and a member of the archaeal phylum Thaumarchaeota. Int J Syst Evol Microbiol. 2014;64(Pt 8):2738–2752. https://doi.org/10.1099/ijs.0.063172-0

100. Kerou M, Offre P, Valledor L, Abby SS, Melcher ML, Nagler M, Weckwerth W, Schleper C. Proteomics and comparative genomics of Nitrososphaera viennensis reveal the core genome and adaptations of archaeal ammonia oxidizers. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113:E7937–E7946.

101. Zhalnina K, de Quadros PD, Gano KA, Davis-Richardson AG, Fagen JR, Brown CT, Giongo A, Drew JC, Sayavedra-Soto LA, Arp DJ, Camargo FA, Daroub SH, Clark IM, McGrath SP, Hirsch PR, Triplett EW. Ca. Nitrososphaera and Bradyrhizobium are inversely correlated and related to agricultural practices in long-term field experiments. Front Microbiol. 2013;4:104. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00104

102. Kanno K, Kuriki R, Yasuno Y, Shinada T, Ito T, Hemmi H. Archaeal mevalonate pathway in the uncultured bacterium Candidatus Promineifilum breve belonging to the phylum Chloroflexota. Appl Environ Microbiol. 2024;90:e01106-24. https://doi.org/10.1128/aem.01106-24

103. Palaniyandi SA, Yang SH, Zhang L, Suh JW. Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. Appl Microbiol Biotechnol. 2013;97:9621–9636. https://doi.org/10.1007/s00253-013-5206-1

104. Liu ZS, Wang KH, Cai M, Yang ML, Wang XK, Ma HL, Yuan YH, Wu LH, Li DF, Liu SJ. Agromyces chromiiresistens sp. nov., Novosphingobium album sp. nov., Sphingobium arseniciresistens sp. nov., Sphingomonas pollutisoli sp. nov., and Salinibacterium metalliresistens sp. nov.: Five new members of Microbacteriaceae and

Sphingomonadaceae from polluted soil. Front Microbiol. 2023;14:1289110. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1289110

105. Yin Z, Wang X, Hu Y, Zhang J, Li H, Cui Y, Zhao D, Dong X, Zhang X, Liu K, Du B, Ding Y, Wang C. Metabacillus dongyingensis sp. nov. Is Represented by the Plant Growth-Promoting Bacterium BY2G20 Isolated from Saline-Alkaline Soil and Enhances the Growth of Zea mays L. under Salt Stress. mSystems. 2022;7(2):e0142621. https://doi.org/10.1128/msystems.01426-21

106. Valencia-Marin MF, Chávez-Avila S, Guzmán-Guzmán P, Orozco-Mosqueda MDC, de Los Santos-Villalobos S, Glick BR, Santoyo G. Survival strategies of Bacillus spp. in saline soils: Key factors to promote plant growth and health. Biotechnol Adv. 2024;70:108303. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108303

107. Zhalnina K, de Quadros PD, Gano KA, Davis-Richardson A, Fagen JR, Brown CT, Giongo A, Drew JC, Sayavedra-Soto LA, Arp DJ, Camargo FA, Daroub SH, Clark IM, McGrath SP, Hirsch PR, Triplett EW. Ca. Nitrososphaera and Bradyrhizobium are inversely correlated and related to agricultural practices in long-term field experiments. Front Microbiol. 2013;4:104. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00104

108. Nannipieri P, et al. Microbial diversity and soil functions. Eur J Soil Sci. 2017;63(1):12-20.

109. Fierer N, Bradford MA, Jackson RB. Environmental controls on the landscape-scale biogeography of stream bacterial communities. Ecology. 2007;88(6):2162–2173. https://doi.org/10.1890/06-1362.1

110. Schimel JP, Bennett J. Nitrogen mineralization: challenges of a changing paradigm. Ecology. 2004;85(3):591–602.

111. Philippot L, Griffiths BS, Langenheder S. Microbial Community Resilience across Ecosystems and Multiple Disturbances. Microbiol Mol Biol Rev. 2021;85(2):e00026-20. https://doi.org/10.1128/MMBR.00026-20

112. Lucas JM, McBride SG, Strickland MS. Trophic level mediates soil microbial community composition and function. Soil Biol Biochem. 2020;143:107756. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107756

113. Ai C, et al. Distinct responses of soil bacterial and fungal communities to changes in fertilization regimes and crop rotation. Soil Biol Biochem. 2018;121:12–21. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.05.017

114. Elbasiouny H, El-Ramady H, Elbehiry F, Rajput VD, Minkina T, Mandzhieva S. Plant Nutrition under Climate Change and Soil Carbon Sequestration. Sustainability. 2022;14(2):914. https://doi.org/10.3390/su14020914

115. Coughlan LM, Cotter PD, Hill C, Álvarez-Ordoñez A. Biotechnological applications of functional metagenomics in the food and pharmaceutical industries. Front Microbiol. 2015;6:1–17.

116. Van Mooy BAS, Fredricks HF, Pedler BE, Dyhrman ST, Karl DM, Koblízek M, et al. Phytoplankton in the ocean use non-phosphorus lipids in response to phosphorus scarcity. Nature. 2009;458(7234):69–72.

117. Louca, S., Polz, M. F., Mazel, F., Albright, M. B. N., Huber, J. A., O'Connor, M. I., ... & Knight, R. (2018). Function and functional redundancy in microbial systems. *Nature Ecology & Evolution, 2*(6), 936–943.

118. Delgado-Baquerizo, M., Maestre, F. T., Reich, P. B., Jeffries, T. C., Gaitan, J. J., Encinar, D., ... & Singh, B. K. (2016). Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems. *Nature Communications, 7*, 10541.

119. Bhardwaj, D., Ansari, M. W., Sahoo, R. K., & Tuteja, N. (2014). Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial Cell Factories, 13*, 66.

120. Limeira da Silva F, de Araújo TV, Gomes de Sousa G, Caminha S. Yield of common fig fertigated with bovine biofertilizer in the semiarid region of Ceará. Rev Caatinga. 2016;29(2):415–428. https://doi.org/10.1590/1983-21252016v29n219rc

121. Ferreira L, Coelho FT, Gustavo de Luna A, Ferreira MA, Soares de Lima G, Da Silva JF. Biofertilizers in horticultural crops. Comunic Sci. 2019;10(4):415–428. https://doi.org/10.14295/CS.v10i4.3058

122. Liyanage LR, Sulaiman MF, Ismail R, Gunaratne GP, Dharmakeerthi RS, Rupasinghe MG, Mayakaduwa AP, Hanafi MM. Carbon mineralization dynamics of organic materials and their usage in the restoration of degraded tropical tea-growing soil. Agronomy. 2021;11(6):1191. https://doi.org/10.3390/agronomy11061191

123. Koritschoner J, Giannini Kurina F, Hang S, Balzarini M. Site-specific modelling of short-term soil carbon mineralization in central Argentina. Geoderma. 2022;406:115487. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2021.115487

124. Angers D, Arrouays D, Cardinael R, Chenu C, Corbeels M, Demenois J, Farrell M, Martin M, Minasny B, Recous S, Six J. A well-established fact: Rapid mineralization of organic inputs is an important factor for soil carbon sequestration. Eur J Soil Sci. 2022;73(3). https://doi.org/10.1111/ejss.13242

125. Agaras BC, Grossi CE, Ulloa RM. Unveiling the secrets of calcium-dependent proteins in plant-growth promoting Rhizobacteria: An abundance of discoveries awaits. Preprints. 2023. https://doi.org/10.20944/preprints202309.0573.v1

126. Bossolani JW, Crusciol CA, Leite MF, Merloti LF, Moretti LG, Pascoaloto IM, Kuramae EE. Modulation of the soil microbiome by long-term Ca-based soil amendments boosts soil organic carbon and physicochemical quality in a tropical no-till crop rotation system. Soil Biol Biochem. 2021;156:108188. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108188

127. Hamamoto T. Effect of organic amendment on soil carbon dynamics in agricultural ecosystems. Sapporo, Japan: Hokkaido University; 2020. 157 p.

128. Petersen HH, Enemark HL, Olsen A, Amin MG, Dalsgaard A. Transport of Cryptosporidium parvum oocysts in soil columns following applications of raw and separated liquid slurries. Appl Environ Microbiol. 2012;78(17):5994–6000. https://doi.org/10.1128/AEM.07829-11

129. García-Orenes F, Guerrero C, Roldán A, Mataix-Solera J, Cerdà A, Campoy M, Zornoza R, Bárcenas GM, Caravaca F. Soil microbial biomass and activity under different agricultural management systems in a semiarid Mediterranean agroecosystem. Soil Tillage Res. 2010;109:110-115.

130. You X, Wang S, Du L, Wu H, Wei Y. Effects of organic fertilization on functional microbial communities associated with greenhouse gas emissions in paddy soils. Environ Res. 2022;113706. https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113706

131. Berg G, Grube M, Schloter M, Smalla K. The plant microbiome and its importance for plant and human health. Front Microbiol. 2014;4:1–9.

132. Mendes LW, Kuramae EE, Navarrete AA, van Veen JA, Tsai SM. Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. ISME J. 2014;8:1577–1587.

133. Philippot L, Raaijmakers JM, Lemanceau P, van der Putten WH. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. Nat Rev Microbiol. 2013;11:789–799.

134. Trivedi P, Leach JE, Tringe SG, Sa T, Singh BK. Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. Nat Rev Microbiol. 2020;18(11):607–621.

135. Müller DB, Vogel C, Bai Y, Vorholt JA. The plant microbiota: systems-level insights and perspectives. Annu Rev Genet. 2016;50:211–234.

136. Pantigoso HA, Newberger D, Vivanco JM. The rhizosphere microbiome: Plant-microbial interactions for resource acquisition. J Appl Microbiol. 2022;133(5):2864–2876. https://doi.org/10.1111/jam.15686

137. Bakker PAHM, Berendsen RL, Van Pelt JA, Vismans G, Yu K, Li E, Van Bentum S, Poppeliers SWM, Sanchez Gil JJ, Zhang H, Goossens P, Stringlis IA, Song Y, de Jonge R, Pieterse CMJ. The soil-borne identity and microbiome-assisted agriculture: looking back to the future. Mol Plant. 2020;13(10):1394–1401. https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.09.017

138. Allison SD, Martiny JBH. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(Suppl 1):11512–11519.

139. Litt PK, Kelly A, Omar A, Johnson G, Vinyard BT, Kniel KE, Sharma M. Temporal and Agricultural Factors Influence Escherichia coli Survival in Soil and Transfer to Cucumbers. Appl Environ Microbiol. 2021;87(7):e02418-20. https://doi.org/10.1128/AEM.02418-20

140. Johnson LA, Hug LA. Cloacimonadota metabolisms include adaptations in engineered environments that are reflected in the evolutionary history of the phylum. Environ Microbiol Rep. 2022;14:520–529. https://doi.org/10.1111/1758-2229.13061

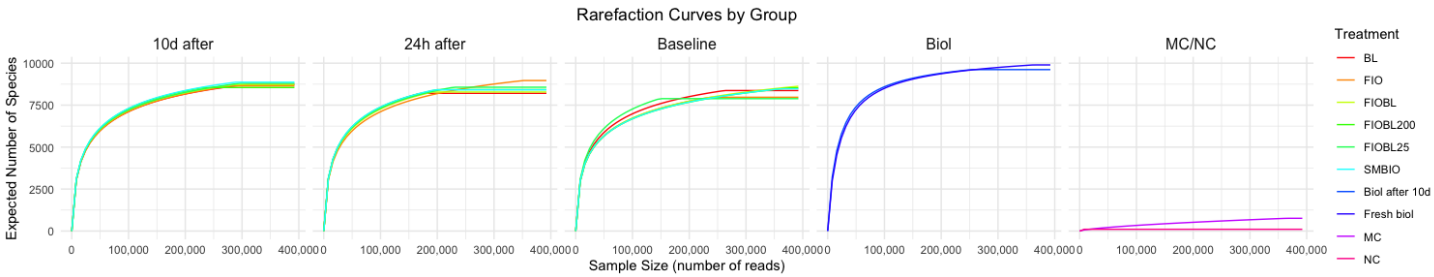
141. Wang J, Yin Y. Clostridium species for fermentative hydrogen production: an overview. Int J Hydrogen Energy. 2021. Available from: [URL not provided]

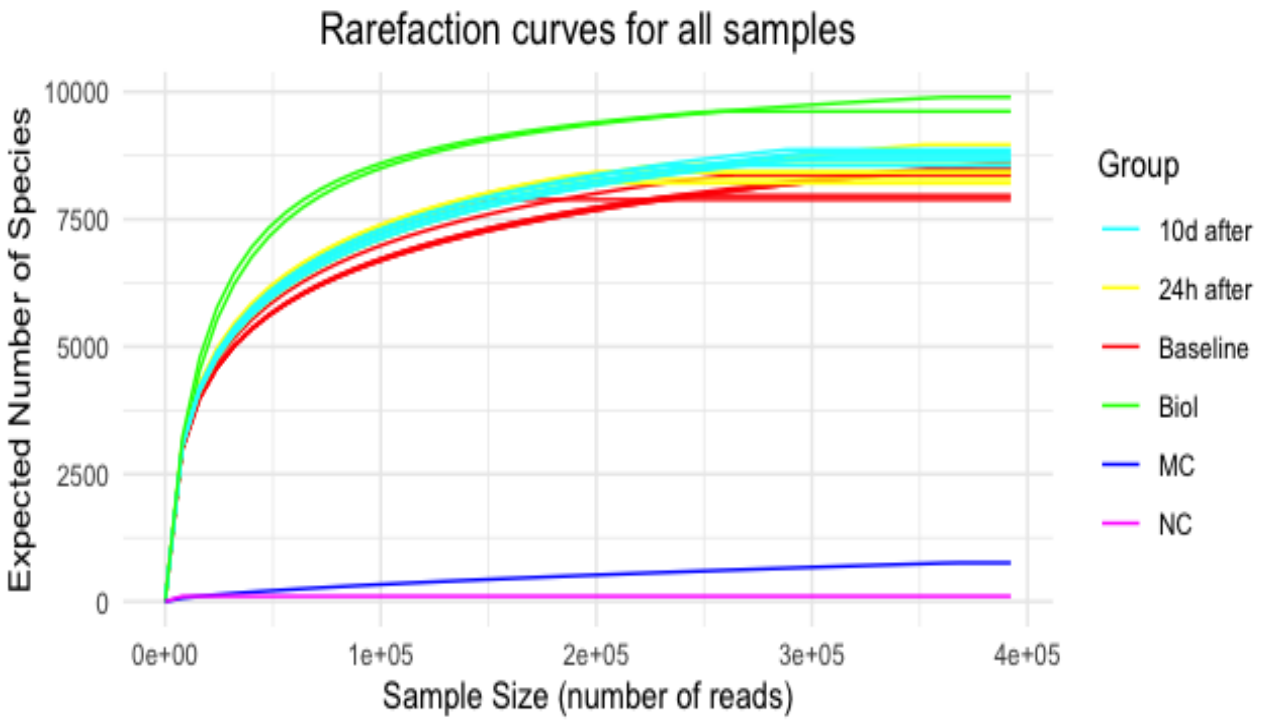
142. Scheff G, Salcher O, Lingens F. Trichococcus flocculiformis gen. nov. sp. nov. A new gram-positive filamentous bacterium isolated from bulking sludge. Appl Microbiol Biotechnol. 1984;19:114–119. https://doi.org/10.1007/BF00302451

ANEXOS

Anexo 1: Curvas de rarefacción

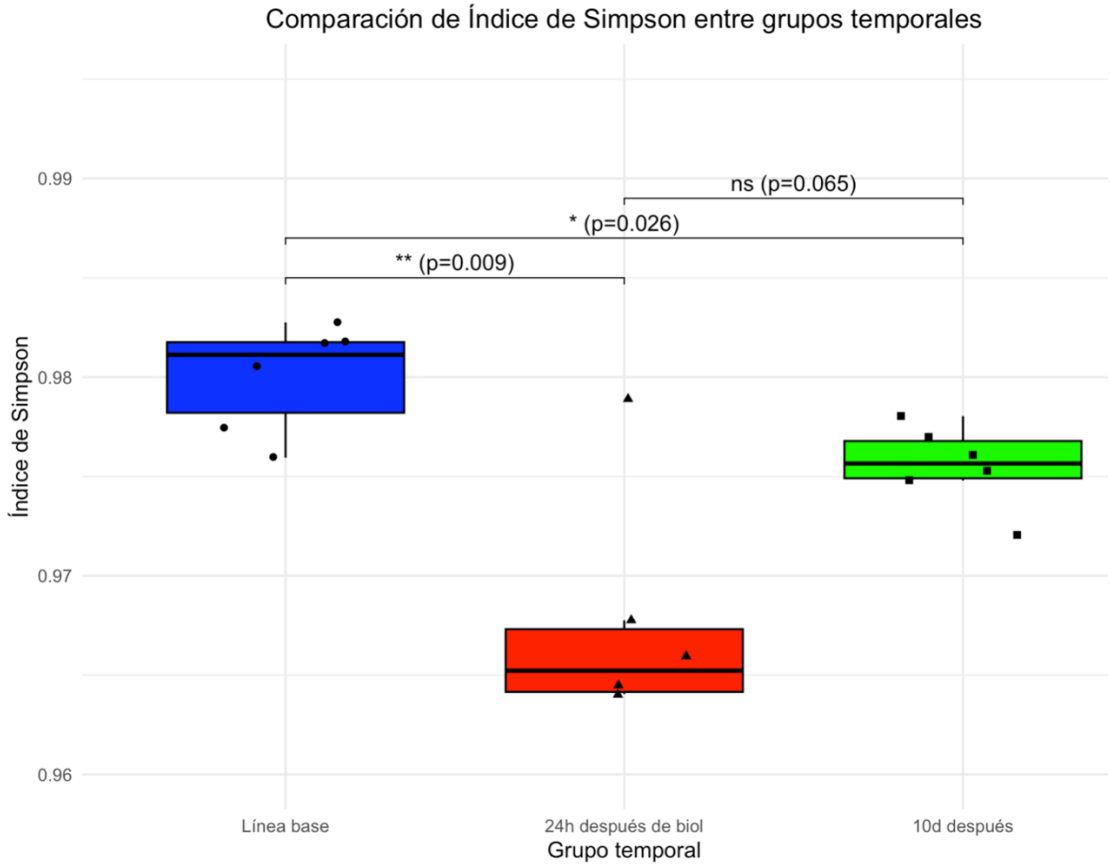
Anexo 1: Curvas de rarefacción para estimar la riqueza de especies en diferentes grupos de tratamiento. Las curvas de rarefacción muestran el número esperado de especies en función del tamaño de la muestra (número de lecturas) para cada grupo de tratamiento: "10 días después" (celeste), "24 horas después" (amarillo), "Línea de base" (rojo), "Biol" (verde), "MC" = Mock Community (azul) y "NC"= Control Negativo (rosado). Estas curvas permiten evaluar la profundidad de secuenciación necesaria para captar la diversidad microbiana y comparan la riqueza de especies entre tratamientos.



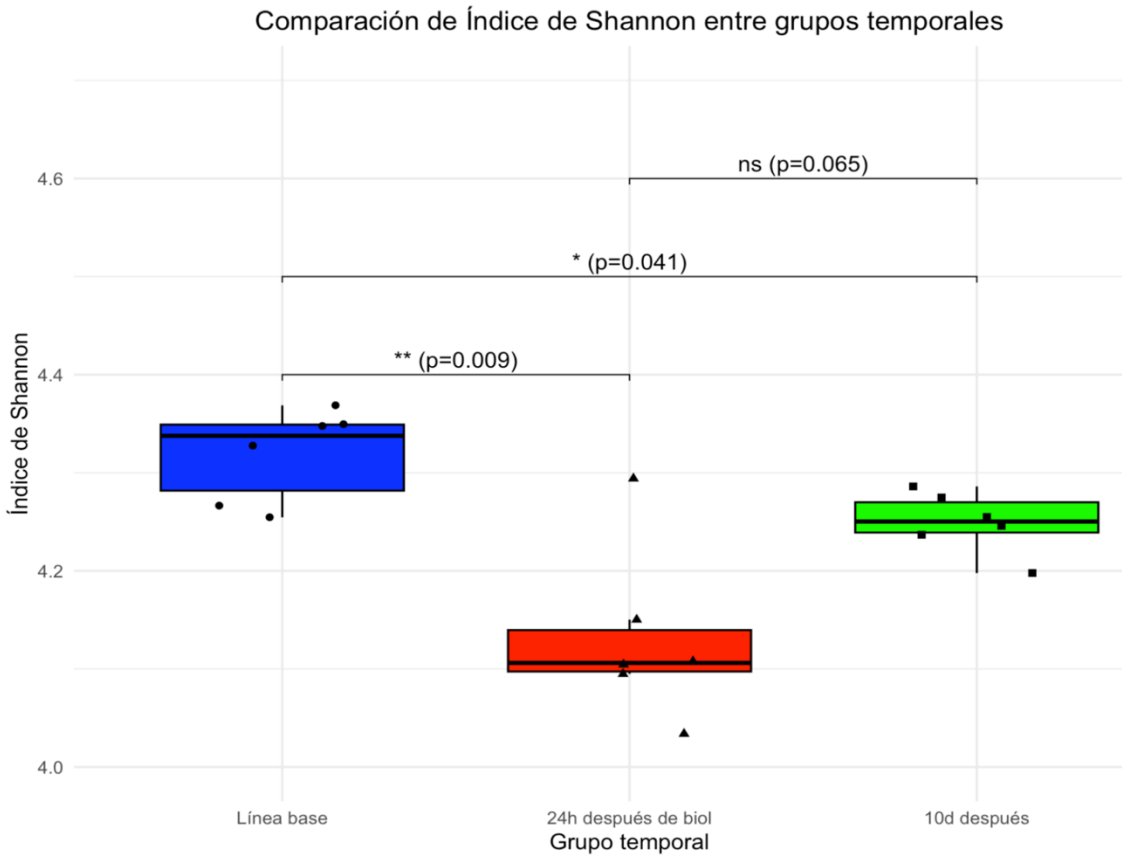


Anexo 2: Significancia estadística de alfa-diversidad

Anexo 2A: Significancia estadística del índice de diversidad de Simpson, excluyendo al código de barras09 (biol 25%), en muestras bajo tratamiento con biol en tres tiempos (Línea base = azul, 24 h después = rojo, 10 días después = verde). Los asteriscos (*, **, ***) indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$) y "ns" denota no significancia, basado en pruebas de comparación múltiple de Pairwise Wilcoxon. La línea dentro de caja caja representa el valor de la mediana. Los valores anómalos se muestran como puntos.



Anexo 2B: Significancia estadística del índice de diversidad de Shannon, excluyendo al código de barras09 (biol 25%), en muestras bajo tratamiento con biol en tres tiempos (Línea base = azul, 24 h después = rojo, 10 días después = verde). Los asteriscos (*, **, ***) indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$) y "ns" denota no significancia, basado en pruebas de comparación múltiple de Pairwise Wilcoxon. La línea dentro de caja caja representa el valor de la mediana. Los valores anómalos se muestran como puntos.



Anexo 3: Tabla de registro de árboles

Número de sujeto	Código	Bloque	Grupo de Tratamiento	Color
1	FIO1	1	1	Rojo
2	FIO2			
3	FIO3			
4	FIO4			
5	FIO5	2		
6	FIO6			
7	FIO7			
8	FIO8			
9	FIO9	3		
10	FIO10			
11	FIO11			
12	FIO12			
1	FIOBL1	1	2	Azul
2	FIOBL2			
3	FIOBL3			
4	FIOBL4			
5	FIOBL5	2		
6	FIOBL6			
7	FIOBL7			
8	FIOBL8			
9	FIOBL9	3		
10	FIOBL10			
11	FIOBL11			
12	FIOBL12			

1	FIOBL251	1	3	Amarillo
2	FIOBL252			
3	FIOBL253			
4	FIOBL254			
5	FIOBL255	2		
6	FIOBL256			
7	FIOBL257			
8	FIOBL258			
9	FIOBL259	3		
10	FIOBL2510			
11	FIOBL2511			
12	FIOBL2512			
1	FIOBL2001	1	4	Blanco
2	FIOBL2002			
3	FIOBL2003			
4	FIOBL2004			
5	FIOBL2005	2		
6	FIOBL2006			
7	FIOBL2007			
8	FIOBL2008			
9	FIOBL2009	3		
10	FIOBL20010			
11	FIOBL20011			
12	FIOBL20012			
1	SMBIO1	1	5	Morado
2	SMBIO2			

3	SMBIO3			
4	SMBIO4			
5	SMBIO5	2		
6	SMBIO6			
7	SMBIO7			
8	SMBIO8			
9	SMBIO9	3		
10	SMBIO10			
11	SMBIO11			
12	SMBIO12			
1	BL1	1	6	Verde
2	BL2			
3	BL3			
4	BL4			
5	BL5	2		
6	BL6			
7	BL7			
8	BL8			
9	BL9	3		
10	BL10			
11	BL11			
12	BL12			

Anexo 4: Tabla de coordenadas de ubicación GPS de árboles

			Coordenadas de ubicación GPS			
Número de Bloque	Número de sujeto	Código	Latitud	Longitud	Grupo de Tratamiento	Tipo de suelo
1	1	FIO1	-13,503693	-76,082766	1	Franco
	2	FIO2			1	
	3	FIO3			1	
	4	FIO4			1	
	1	FIOBL1			2	
	2	FIOBL2			2	
	3	FIOBL3			2	
	4	FIOBL4			2	
	1	FIOBL251			3	
	2	FIOBL252			3	
	3	FIOBL253			3	
	4	FIOBL254			3	
	1	FIOBL2001			4	
	2	FIOBL2002			4	
	3	FIOBL2003			4	
	4	FIOBL2004			4	
	1	SMBIO1			5	

	2	SMBIO2			5	
	3	SMBIO3			5	
	4	SMBIO4			5	
	1	BL1			6	
	2	BL2			6	
	3	BL3			6	
	4	BL4			6	
2	5	FIO5	-13,517784	-76,079475	1	Franco
	6	FIO6			1	
	7	FIO7			1	
	8	FIO8			1	
	5	FIOBL5			2	
	6	FIOBL6			2	
	7	FIOBL7			2	
	8	FIOBL8			2	
	5	FIOBL255			3	
	6	FIOBL256			3	
	7	FIOBL257			3	
	8	FIOBL258			3	
	5	FIOBL2005			4	
	6	FIOBL2006			4	

	7	FIOBL2007			4	
	8	FIOBL2008			4	
	5	SMBIO5			5	
	6	SMBIO6			5	
	7	SMBIO7			5	
	8	SMBIO8			5	
	5	BL5			6	
	6	BL6			6	
	7	BL7			6	
	8	BL8			6	
3	9	FIO9	-13,504105	-76,084857	1	Franco
	10	FIO10			1	
	11	FIO11			1	
	12	FIO12			1	
	9	FIOBL9			2	
	10	FIOBL10			2	
	11	FIOBL11			2	
	12	FIOBL12			2	
	9	FIOBL259			3	
	10	FIOBL2510			3	
	11	FIOBL2511			3	

	12	FIOBL2512			3	
	9	FIOBL2009			4	
	10	FIOBL20010			4	
	11	FIOBL20011			4	
	12	FIOBL20012			4	
	9	SMBIO9			5	
	10	SMBIO10			5	
	11	SMBIO11			5	
	12	SMBIO12			5	
	9	BL9			6	
	10	BL10			6	
	11	BL11			6	
	12	BL12			6	

Anexo 5: Cronograma de fertilización

Última fertilización antes del segundo y tercer muestreo

16 febrero	primer muestreo
27 febreo	segundo muestreo
7 marzo	tercer muestreo

Fecha	Producto	Cantidad (kg/ha)
19/02/2024	PHOS MAX	5.32
19/02/2024	SULFATO AMONIO * 50	159.57
19/02/2024	SULFATO DE MAGNESIO * 25	79.79
21/02/2024	CALCIUM	1.86
21/02/2024	YARATERA CALCINIT	319.15
23/02/2024	SULFATO DE MAGNESIO * 25	132.98
23/02/2024	YARATERA CALCINIT	265.96
26/02/2024	SULFATO AMONIO * 50	159.57
26/02/2024	SULFATO DE MAGNESIO * 25	79.79
26/02/2024	SULFATO DE POTASIO * 25	79.79
26/02/2024	SUPER K	5.32
28/02/2024	ALGAEX	18.62
28/02/2024	ZURICH	19.15
01/03/2024	COPPER	10.64
01/03/2024	SULFATO AMONIO * 50	132.98
01/03/2024	SULFATO DE MAGNESIO * 25	93.09
02/03/2024	BOROMAX	7.98
02/03/2024	COPPER	7.98
02/03/2024	PHOS MAX	7.98
02/03/2024	SULFATO AMONIO * 50	53.19
02/03/2024	SUPER K	2.13
02/03/2024	YARATERA CALCINIT	93.09
05/03/2024	BOROMAX	5.32
05/03/2024	COPPER	7.98
05/03/2024	SULFATO AMONIO * 50	132.98

07/03/2024	SULFATO AMONIO * 50	372.34
07/03/2024	SULFATO DE MAGNESIO * 25	53.19
07/03/2024	ULTRAFERRO	34.57

Anexo 6: Cálculos de riego y de fertirriego inorgánico

	Número de ha
Lote Don Julio 1	23,3

Cálculo de riego

Cantidad	Unidad de medida
60	m^3/ ha
666	plantas/ha
0,09	m^3/planta
90,09	L/planta

Cálculo de fertilizantes inorgánicos

	Cantidad (kg/ha)			
Nombre del fertilizante	lunes 12 feb	mié 14 feb	jue 15 feb	sáb 17 feb
Sulfato de amonio	12,87	12,87	12,87	12,87
Boromax	0,43			
Super K	0,34			
Sulfato de magnesio		2,14	6,43	6,43

	Cantidad (g/planta)			
Nombre del fertilizante	lunes 12 feb	mié 14 feb	jue 15 feb	sáb 17 feb
Sulfato de amonio	19,32	19,32	19,32	19,32
Boromax	0,65			
Super K	0,51			
Sulfato de magnesio		3,21	9,65	9,65

	Cantidad (g/grupo tratamiento)			
Nombre del fertilizante	lunes 12 feb	mié 14 feb	jue 15 feb	sáb 17 feb
Sulfato de amonio	231,89	231,89	231,89	231,89
Boromax	7,75			
Super K	6,13			
Sulfato de magnesio		38,56	115,86	115,86

Anexo 7: Parámetros de extracción de ADN

LightCycler Nanodrop - ZymoBIONICS

Número de tratamiento	Kit	Código de muestra	Fecha	Concentración de ADN	Concentración promedio de ADN	Cantidad total de ADN en 50 uL (ng)	Unidad	A260	A280	260/280	260/230
1	ZymoBIONICS DNA Miniprep Kit	Z1	22/02/24	49,3	48,7	2435	ng/uL	0,987	0,508	1,94	1,26
				48,1				0,963	0,495	1,94	1,23
2	ZymoBIONICS DNA Miniprep Kit	Z2	22/02/24	29,4	28,8	1437,5	ng/uL	0,587	0,301	1,95	1,18
				28,1				0,562	0,286	1,97	1,14
3	ZymoBIONICS DNA Miniprep Kit	Z3	22/02/24	19,9	19,9	995	ng/uL	0,397	0,201	1,98	0,79
				19,9				0,398	0,203	1,96	0,77
4	ZymoBIONICS DNA Miniprep Kit	Z4	22/02/24	33,7	33,5	1675	ng/uL	0,674	0,349	1,93	1,34
				33,3				0,666	0,34	1,96	1,33
5	ZymoBIONICS DNA Miniprep Kit	Z5	22/02/24	30,3	29,95	1497,5	ng/uL	0,607	0,314	1,94	1,32
				29,6				0,593	0,298	1,99	1,31
6	ZymoBIONICS DNA Miniprep Kit	Z6	19/02/24	36,2	35,8	1790	ng/uL	0,724	0,361	2,01	1,43
				35,4				0,707	0,344	2,06	1,46

Qubit 4 Fluorímetro - ZymoBIONICS

Número de tratamiento	Kit	Código de muestra	Concentración ADN 1 (ng/uL)	Concentración ADN 2 (ng/uL)	Concentración ADN promedio (ng/uL)	Volumen elución (uL)
1	ZymoBIONICS DNA Miniprep Kit	Z1	69,6	64,2	66,9	50

2	ZymoBIONICS DNA Miniprep Kit	Z2	43,0	41,4	42,2	50
3	ZymoBIONICS DNA Miniprep Kit	Z3	15,7	26,4	21,1	50
4	ZymoBIONICS DNA Miniprep Kit	Z4	59,0	47,8	53,4	50
5	ZymoBIONICS DNA Miniprep Kit	Z5	51,8	45,8	48,8	50
6	ZymoBIONICS DNA Miniprep Kit	Z6	45,0	-	45,0	50

LightCycler Nanodrop - ZymoBIONICS

Número de tratamiento	Kit	Código de muestra	Fecha	Concentración de ADN	Concentración promedio de ADN (ng/uL)	Cantidad total de ADN en 100 uL (ng)	A260	A280	260/280	260/230
1	ZymoBIONICS DNA Miniprep Kit	Z1	01/03/24	8,4	8,4	1227,5	0,169	0,078	2,16	0,44
				8,3			0,166	0,077	2,15	0,44
		Z1_O	01/03/24	16,4	16,2		0,328	0,159	2,06	0,62
				16,0			0,320	0,164	1,95	0,60
2	ZymoBIONICS DNA Miniprep Kit	Z2	01/03/24	8,9	8,7	1662,5	0,178	0,083	2,15	0,65
				8,5			0,170	0,075	2,27	0,63

		Z2_O	29/02/23	24,4	24,6		0,488	0,260	1,88	1,28
				24,7			0,494	0,260	1,90	1,36
3	ZymoBIONICS DNA Minipre p Kit	Z3	29/02/23	24,7	24,4	2477,5	0,494	0,267	1,85	0,58
				24,1			0,482	0,263	1,83	0,56
		Z3_O	29/02/23	25,0	25,2		0,500	0,264	1,89	0,96
				25,3			0,505	0,261	1,93	0,98
4	ZymoBIONICS DNA Minipre p Kit	Z4	29/02/23	30,0	29,9	2680	0,601	0,319	1,89	1,34
				29,8			0,596	0,317	1,88	1,37
		Z4_O	29/02/23	23,9	23,7		0,477	0,253	1,88	1,37
				23,5			0,471	0,243	1,94	1,36
5	ZymoBIONICS DNA Minipre p Kit	Z5	29/02/23	24,2	24,2	2045	0,485	0,25	1,94	1,36
				24,2			0,485	0,263	1,84	1,20
		Z5_O	29/02/23	16,8	16,7		0,335	0,177	1,90	0,70
				16,6			0,332	0,168	1,98	0,70
6	ZymoBIONICS	Z6	29/02/23	19,0	19,1	1977,5	0,379	0,199	1,90	0,70

	DNA Miniprep Kit			19,2			0,384	0,204	1,88	0,69
		Z6_O	29/02/23	20,6	20,5		0,413	0,218	1,90	0,78
				20,3			0,406	0,215	1,89	0,78
BIOL1	ZymoBIONICS DNA Miniprep Kit	B1	29/02/23	11,2	11,1	2990	0,224	0,115	1,95	0,58
				11,0			0,219	0,115	1,91	0,56
		B1_O	04/03/24	21,0	20,7		0,419	0,203	2,06	0,72
				20,3			0,406	0,197	2,07	0,70
		B1_OO	04/03/24	28,4	28,1		0,569	0,283	2,01	0,79
				27,7			0,553	0,270	2,05	0,77

Qubit 4 Fluorímetro - ZymoBIONICS

Número de tratamiento	Kit	Código de muestra	Concentración ADN (ng/uL)	Volumen elución (uL)	Cantidad de ADN en 50 uL (ng)	Cantidad total de ADN en 100 uL (ng)
1	ZymoBIONICS DNA Miniprep Kit	Z1	6,52	50	326	1031
		Z1_O	14,10	50	705	
2	ZymoBIONICS DNA Miniprep Kit	Z2	6,26	50	313	1503
		Z2_O	23,80	50	1190	
3	ZymoBIONICS	Z3	23,60	50	1180	2290

	DNA Miniprep Kit	Z3_O	22,20	50	1110	
4	ZymoBIONICS DNA Miniprep Kit	Z4	30,60	50	1530	2480
		Z4_O	19,00	50	950	
5	ZymoBIONICS DNA Miniprep Kit	Z5	24,00	50	1200	1970
		Z5_O	15,40	50	770	
6	ZymoBIONICS DNA Miniprep Kit	Z6	16,20	50	810	1620
		Z6_O	16,20	50	810	
BIOL1	ZymoBIONICS DNA Miniprep Kit	B1	10,00	50	500	3470
		B1_O	22,60	50	1130	
		B1_OO	36,80	50	1840	
BIOL2	ZymoBIONICS DNA Miniprep Kit	B2	5,20	50	260	260

LightCycler Nanodrop - ZymoBIONICS

Número de tratamiento	Kit	Código de muestra	Fecha	Concentración de ADN	Concentración promedio de ADN (ng/uL)	Cantidad total de ADN en 100 uL (ng)	A260	A280	260/280	260/230
1	ZymoBI	Z1	08/03/24	22,2	21,8	4900	0,445	0,225	1,98	0,91

	ONICS DNA Minipre p Kit			21,4			0,428	0,213	2,01	0,88
		Z1_O	11/03/24	76,6	76,2		1,531	0,790	1,94	1,45
				75,8			1,517	0,780	1,95	1,46
2	ZymoBI ONICS DNA Minipre p Kit	Z2	08/03/24	14,0	13,8	3230	0,280	0,138	2,02	0,33
				13,6			0,271	0,135	2,00	0,31
		Z2_O	11/03/24	50,9	50,8		1,018	0,525	1,94	1,59
				50,7			1,015	0,529	1,92	1,58
3	ZymoBI ONICS DNA Minipre p Kit	Z3	08/03/24	10,2	10,15	3005	0,205	0,094	2,18	0,08
				10,1			0,202	0,087	2,32	0,08
		Z3_O	11/03/24	50,1	50,0		1,002	0,506	1,98	1,32
				49,8			0,996	0,505	1,97	1,31
4	ZymoBI ONICS DNA Minipre p Kit	Z4	08/03/24	18,6	18,2	3610	0,372	0,174	2,14	1,00
				17,8			0,356	0,168	2,12	0,97
		Z4_O	11/03/24	54,2	54,0		1,085	0,548	1,98	1,35
				53,8			1,075	0,537	2,00	1,36
5	ZymoBI ONICS DNA Minipre p Kit	Z5	08/03/24	11,6	11,55	3742,5	0,233	0,111	2,11	0,86
				11,5			0,229	0,106	2,17	0,84
		Z5_O	11/03/24	63,5	63,3		1,271	0,650	1,96	1,31
				63,1			1,262	0,646	1,95	1,32
6	ZymoBI ONICS DNA Minipre p Kit	Z6	08/03/24	10,3	10,25	3592,5	0,205	0,079	2,59	0,70
				10,2			0,204	0,086	2,37	0,69
		Z6_O	11/03/24	62,0	61,6		1,239	0,635	1,95	1,25
				61,2			1,223	0,627	1,95	1,23
BIOL10	ZymoBI ONICS DNA Minipre p Kit	B10	11/03/24	24,5	24,1	2372,5	0,490	0,241	2,03	0,78
				23,7			0,474	0,235	2,01	0,71
		B10_O	11/03/24	23,3	23,4		0,466	0,221	2,11	0,74
				23,4			0,467	0,229	2,04	0,73

Qubit 4 Fluorímetro - ZymoBIONICS						
Número de tratamiento	**Kit**	**Código de muestra**	**Concentración ADN (ng/uL)**	**Volumen elución (uL)**	**Cantidad de ADN en 50 uL (ng)**	**Cantidad total de ADN en 100 uL (ng)**
1	ZymoBIONICS DNA Miniprep Kit	Z1	22,40	50	1125	4875
			22,60	50		
		Z1_O	75,00	50	3750	
			75,00	50		
2	ZymoBIONICS DNA Miniprep Kit	Z2	14,20	50	710	2835
			14,20	50		
		Z2_O	57,40	50	2835	
			56,00	50		
3	ZymoBIONICS DNA Miniprep Kit	Z3	10,40	50	520	2820
			10,40	50		
		Z3_O	45,80	50	2300	
			46,20	50		
4	ZymoBIONICS DNA Miniprep Kit	Z4	18,60	50	930	3840
			18,60	50		
		Z4_O	58,40	50	2910	
			58,00	50		
5	ZymoBIONICS DNA	Z5	13,20	50	662,5	4047,5

	Miniprep Kit		13,30	50		
		Z5_O	67,80	50	3385	
			67,60	50		
6	ZymoBIONICS DNA Miniprep Kit	Z6	11,60	50	570	3875
			11,20	50		
		Z6_O	65,80	50	3305	
			66,40	50		
BIOL10	ZymoBIONICS DNA Miniprep Kit	B10	24,20	50	1210	2187,5
			24,20	50		
		B10_O	19,40	50	977,5	
			19,70	50		

Anexo 8: Parámetros de purificación de ADN

Código de muestra	Fecha	Concentración de ADN (ng/uL)	Concentración promedio de ADN (ng/uL)	Cantidad total de ADN en 18uL (ng)	A260	A280	260/280	260/230
Z1E1	3/4/24	132,4	132,6	2385,9	2,648	1,404	1,89	1,89
		132,7			2,654	1,398	1,90	1,96
Z2E1	3/4/24	77,8	77,6	1396,8	1,555	0,818	1,90	2,02
		77,4			1,549	0,818	1,89	2,03
Z3E1	4/4/24	38,7	38,7	696,6	0,773	0,412	1,88	2,66
Z4E1	3/4/24	98,5	98,1	1765,8	1,970	1,032	1,91	2,03
		97,7			1,953	1,020	1,91	2,05
Z5E1	3/4/24	88,7	88,5	1593	1,775	0,943	1,88	1,98
		88,3			1,766	0,933	1,89	1,99
Z6E1	3/4/24	185,1	184,5	3321	3,702	1,958	1,89	2,02
		183,9			3,678	1,949	1,89	2,01
Z1E2	4/4/24	56,7	56,7	1020,6	1,134	0,600	1,89	2,19
Z2E2	4/4/24	52,8	52,8	950,4	1,056	0,558	1,89	1,98
Z3E2	4/4/24	58,6	58,6	1054,8	1,171	0,625	1,87	2,20
Z4E2	4/4/24	62,9	62,9	1132,2	1,257	0,670	1,88	1,89
Z5E2	4/4/24	67,8	60,3	1085,4	1,355	0,715	1,89	2,17
		52,8			1,056	0,558	1,89	1,98
Z6E2	4/4/24	94,1	94,1	1693,8	1,882	0,995	1,89	2,24
B1E2	4/4/24	56,1	56,1	1009,8	1,123	0,594	1,89	2,18
Z1E3	4/4/24	197,8	197,8	3560,4	3,957	2,090	1,89	2,06
Z2E3	4/4/24	138,0	138,0	2484	2,760	1,446	1,91	2,05
Z3E3	4/4/24	126,8	126,8	2282,4	2,536	1,330	1,91	2,23
Z4E3	4/4/24	142,0	142,0	2556	2,840	1,493	1,90	2,00
Z5E3	4/4/24	159,6	159,6	2872,8	3,193	1,678	1,90	2,14
Z6E3	4/4/24	161,6	161,6	2908,8	3,231	1,703	1,90	2,18
B10E3	4/4/24	50,9	50,9	916,2	1,018	0,539	1,89	1,95

Anexo 9: Parámetros del presecuenciamiento metagenómico

Tape Station	Número	Código	Concentración (ng/uL)	Factor dilución	Concentración real (ng/uL)	vol	Total DNA	Vol sample seq DNA 600 ng	vol h20 / 11 ul	DIN	PEAK SIZE
05/04/2024	1	Z1E1	120,0	1	120,0	14	1680	5,0	6,0	6,5	9514
	2	Z2E1	71,2	1	71,2	14	996,8	8,4	2,6		
04/04/2024	3	Z3E1	77,8	1	77,8	14	1089,2	7,7	3,3	6,4	9397
	4	Z4E1	81,4	1	81,4	14	1139,6	7,4	3,6		
	5	Z5E1	80,6	1	80,6	14	1128,4	7,4	3,6		
05/04/2024	6	Z6E1	19,1	10	191,0	14	2674	3,1	7,9	6,5	9553
	7	Z1E2	62,4	1	62,4	14	873,6	9,6	1,4		
	8	Z2E2	58,2	1	58,2	14	814,8	10,3	0,7		
05/04/2024	9	Z3E2	67,8	1	67,8	14	949,2	8,8	2,2	6,5	11228
	10	Z4E2	67,2	1	67,2	14	940,8	8,9	2,1		
04/04/2024	11	Z5E2	45,4	1	45,4	14	635,6	13,2	-2,2	6,4	9500
	12	Z6E2	10,0	10	100,0	14	1400	6,0	5,0		
05/04/2024	13	B1E2	64,2	1	64,2	14	898,8	9,3	1,7	6,4	7442
05/04/2024	14	Z1E3	19,4	10	194,0	14	2716	3,1	7,9	6,3	9241
	15	Z2E3	14,6	10	146,0	14	2044	4,1	6,9		
	16	Z3E3	13,3	10	133,0	14	1862	4,5	6,5		
	17	Z4E3	16,2	10	162,0	14	2268	3,7	7,3		
05/04/2024	18	Z5E3	15,7	10	157,0	14	2198	3,8	7,2	6,4	9510
	19	Z6E3	17,3	10	173,0	14	2422	3,5	7,5		
04/04/2024	20	B10E3	54,8	1	54,8	14	767,2	10,9	0,1	7	11425
	21	MC	79,0	1	79,0	12	948	7,6	3,4		

Anexo 10: Parámetros de secuenciamiento

				Basado en SIZE INICIO							
Sample of extraction	**Código de barras**	**Pre-pooling (ng/uL)**	**SIZE INICIO**	**molar conc (pmol/uL)**	**max vol**	**moles (pmol)**	**FMOL**	**vol DNA required (uL)**		**vol H20 required (uL)**	**ng**
Z1E1	1	68,8	9514	0,0110	7,5	0,0822	82,18	4,9	336,0	2,6	336
Z2E1	2	61,2	9706	0,0096	7,5	0,0717	71,65	5,6	342,8	1,9	343
Z3E1	3	61,8	9397	0,0100	7,5	0,0747	74,73	5,4	331,9	2,1	332
Z4E1	4	69,4	9706	0,0108	7,5	0,0813	81,25	4,9	342,8	2,6	343
Z5E1	5	62,6	9706	0,0098	7,5	0,0733	73,29	5,5	342,8	2,0	343
Z6E1	6	54,2	9553	0,0086	7,5	0,0645	64,47	6,2	337,4	1,3	337
Z1E2	7	51,6	9706	0,0081	7,5	0,0604	60,41	6,6	342,8	0,9	343
Z2E2	8	50,8	9706	0,0079	7,5	0,0595	59,48	6,7	342,8	0,8	343
Z3E2	9	57,6	11228	0,0078	7,5	0,0583	58,30	6,9	396,5	0,6	397
Z4E2	10	56,4	9706	0,0088	7,5	0,0660	66,03	6,1	342,8	1,4	343
Z5E2	11	61,8	9500	0,0099	7,5	0,0739	73,92	5,4	335,5	2,1	336
Z6E2	12	59,4	9706	0,0093	7,5	0,0695	69,54	5,8	342,8	1,7	343
B1E2	13	49,8	7442	0,0101	7,5	0,0760	76,04	5,3	262,8	2,2	263
Z1E3	14	54,8	9241	0,0090	7,5	0,0674	67,39	6,0	326,4	1,5	326
Z2E3	15	58,4	9706	0,0091	7,5	0,0684	68,37	5,9	342,8	1,6	343
Z3E3	16	52,2	9706	0,0081	7,5	0,0611	61,11	6,6	342,8	0,9	343
Z4E3	17	50,2	9706	0,0078	7,5	0,0588	58,77	6,8	342,8	0,7	343
Z5E3	18	54,4	9510	0,0087	7,5	0,0650	65,00	6,2	335,9	1,3	336
Z6E3	19	49,6	9706	0,0077	7,5	0,0581	58,07	6,9	342,8	0,6	343
B10E3	20	53,8	11425	0,0071	7,5	0,0535	53,51	7,5	403,5	0,0	404
MC	21	21,2	16912	0,0019	7,5	0,0142	14,24	7,5	159,0	0,0	159
x	21	30,6	16912	0,0027	7,5	0,0206	20,56	7,5	229,5	0,0	230
M0	22	BAJO		-	7,5	-	-	7,5	-	0,0	-

After código de barras cleaning		After adapter cleaning									
qubit ng/ul	**size (bases) tapestation**	**qubit ng/ul**	**size (bases) tapestation**		**molar conc (pmol/ul)**	**ul**	**pmol**	**fmol**	**final fmol to load**	**vol DNA Req**	**EB**
129	18196	113	18196	0,66	0,00941	23	0,216	216,415	75	7,97	24,03
					0,00941	15	0,141	141,140	90	9,56	22,44
					0,00941	6	0,056	56,456	56	5,95	26,05

Anexo 11A: Mediciones de parámetros fisicoquímicos del suelo

			Nutriente					
Fecha de análisis	**Color de tratamiento**	**Número de tratamiento**	**NO3-/ ppm**	**Ca2+/ ppm**	**K+/ ppm**	**Na+/ ppm**	**pH**	**Conductividad uS/cm**
22/02/24	Rojo	1	108	227	16	23	7,35	385
22/02/24	Azul	2	563	48	10	15	7,73	324
22/02/24	Amarillo	3	620	66	12	18	7,63	391
22/02/24	Blanco	4	1133	94	13	16	7,47	418
22/02/24	Morado	5	1153	58	9	14	7,56	483
22/02/24	Verde	6	1733	51	8	12	7,60	311

			Nutriente					
Fecha de análisis	**Color de tratamiento**	**Número de tratamiento**	**NO3-/ ppm**	**Ca2+/ ppm**	**K+/ ppm**	**Na+/ ppm**	**pH**	**Conductividad uS/cm**
01/03/24	Rojo	1	330	51	14	22	7,59	409
01/03/24	Azul	2	673	53	11	18	7,65	347
01/03/24	Amarillo	3	1360	55	11	20	7,57	368
01/03/24	Blanco	4	1633	59	12	18	7,5	347
01/03/24	Morado	5	2200	79	11	26	7,65	490
01/03/24	Verde	6	2467	44	9	16	7,7	295

			Nutriente					
Fecha de análisis	**Color de tratamiento**	**Número de tratamiento**	**NO3-/ ppm**	**Ca2+/ ppm**	**K+/ ppm**	**Na+/ ppm**	**pH**	**Conductividad uS/cm**
11/03/24	Rojo	1	385	107	12	28	7,81	436
11/03/24	Azul	2	853	78	12	23	7,66	394
11/03/24	Amarillo	3	190	39	10	25	7,74	392
11/03/24	Blanco	4	415	70	10	24	7,68	382
11/03/24	Morado	5	453	76	9	25	7,69	406
11/03/24	Verde	6	708	47	9	21	7,76	296

Anexo 11B: Mediciones de parámetros fisicoquímicos de la savia vegetal

			Nutriente				pH	Conductividad/ mS
Fecha de análisis	Color de tratamiento	Número de tratamiento	NO3-/ ppm	Ca2+/ ppm	K+/ ppm	Na+/ ppm		
15/02/24	Rojo	1	760	133	3833	57	5,26	10,52
15/02/24	Azul	2	2000	103	4233	70	5,22	10,71
15/02/24	Amarillo	3	1633	71	4567	67	5,30	11,21
14/02/24	Blanco	4	1667	137	4600	71	5,25	10,50
15/02/24	Morado	5	2400	143	4133	66	5,15	10,30
15/02/24	Verde	6	1967	103	4733	69	5,23	11,62

			Nutriente				pH	Conductividad/ mS
Fecha de análisis	Color de tratamiento	Número de tratamiento	NO3-/ ppm	Ca2+/ ppm	K+/ ppm	Na+/ ppm		
27/02/24	Rojo	1	1433	180	4867	64	5,12	9,25
27/02/24	Azul	2	1433	140	4700	66	5,34	10,37
27/02/24	Amarillo	3	1767	140	5567	74	5,36	10,40
27/02/24	Blanco	4	1500	190	5533	78	5,34	11,21
27/02/24	Morado	5	970	200	4633	71	5,24	10,25
27/02/24	Verde	6	720	150	5067	74	5,49	11,11

			Nutriente				pH	Conductividad/ mS
Fecha de análisis	Color de tratamiento	Número de tratamiento	NO3-/ ppm	Ca2+/ ppm	K+/ ppm	Na+/ ppm		
05/03/24	Rojo	1	2100	218	4775	65	5,11	11,23
05/03/24	Azul	2	2225	180	4875	64	5,08	11,55
05/03/24	Amarillo	3	1243	109	5333	67	5,02	11,70

05/03/24	Blanco	4	2600	195	5600	74	5,00	12,51
05/03/24	Morado	5	1027	197	4700	68	4,78	10,98
05/03/24	Verde	6	1533	173	5100	69	5,02	12,01

Anexo 12A: Informe de análisis de suelo-salinidad de Valle Grande del Lote Don Julio 1

VALLE GRANDE
Laboratorio de Química Agrícola

SOLICITANTE : MAQUINARIA AGRICOLA SAN JOSE SAC
PREDIO : FUNDO SAN JOSE
MATRIZ : SUELO AGRICOLA

ANÁLISIS N° : 643 - 02S - 2022
LUGAR : CHINCHA
FECHA DE RECEP. : 11/06/2022

INFORME DE ANÁLISIS DE SUELO - SALINIDAD
MUESTRA : LOTE DON JULIO 1 - PALTO - HASS - 10-06-22

PARÁMETRO	RESULTADO	UNIDAD	MÉTODO	TÉCNICA
Textura				
Arena	44.12	%		
Limo	34.85	%		
Arcilla	21.03	%	MES - 001	Bouyoucos
Clase Textural	FRANCO			
Porcentaje de Saturación de Agua	39.82	%	MES - 002	Gravimétrico
Carbonato de Calcio Total	1.76	%	MES - 003	Gravimétrico
Conductividad Eléctrica (E.S) a 25 °C.	1.32	dS / m	MES - 004	Electrométrico
pH (1/1) a Temp = 19.2 °C	8.10		MES - 005	Electrométrico
Fósforo Disponible	51.20	ppm	MES - 006	Olsen
Materia Orgánica	1.79	%	MES - 007	Walkley y Black
Nitrógeno Total	0.10	%	MES - 008	Kjeldahl
Potasio Disponible	499.40	ppm	MES - 009	Acetato de Amonio
Cationes Cambiables				**Extractante:Ac. Amonio**
Calcio	11.78	mEq / 100 g	MES - 010	FAAS
Magnesio	1.70	mEq / 100 g	MES - 011	FAAS
Sodio	0.30	mEq / 100 g	MES - 012	FAAS
Potasio	1.22	mEq / 100 g	MES - 013	FAAS
P.S.I	2.01	%	MES - 015	Cálculo Matemático
C.I.C.E	15.00	mEq / 100 g	MES - 017	Cálculo Matemático
Sales Disueltas				
Cloruro	3.18	mEq / L	SM 4500 CL - B	Argentométrico
Sulfato	6.93	mEq / L	EPA 375.4	Turbidimétrico
Nitrato	1.39	mEq / L	MEA - 001	Colorimétrico
Carbonato	< 0.02	mEq / L	SM 2320 B	Volumétrico
Bicarbonato	3.47	mEq / L	SM 2320 B	Volumétrico
Calcio	7.16	mEq / L	EPA 215.1	FAAS
Magnesio	1.79	mEq / L	EPA 242.1	FAAS
Sodio	3.89	mEq / L	EPA 273.1	FAAS
Potasio	1.49	mEq / L	EPA 258.1	FAAS
Boro	1.04	ppm (*)	ISO 9390.1990	Colorimétrico

DONDE:
E.S : Extracto de Saturación.
(1 / 1) : Relación Masa del Suelo / Volumen del Agua.
P.S.I : Porcentaje de Sodio Intercambiable.
C.I.C.E. : Capacidad de Intercambio Catiónico Efectivo.
% : Masa / Masa.
ppm : mg / Kg.
ppm(*) : mg / L.

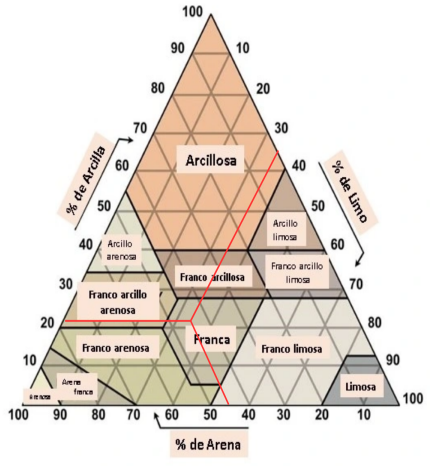
MES y MEA : Método Propio del Laboratorio.
SM : Standar Methods
EPA : Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos.
ISO : International Organization for Standarización.
FAAS : Espectrometría de Absorción Atómica por Llama.

NOTA:
1: Los resultados presentados corresponden sólo a la muestra indicada.
2: Se prohibe la reproducción parcial o total del presente informe sin la autorización del Laboratorio de Química Agrícola.

MSc. Quím. Alexis Saucedo Chacón
JEFE DEL LABORATORIO

LABORATORIO DE QUIMICA AGRICOLA - Cañete - Valle Grande -

MSc. Agr. Julio Castro Lazo
DIRECTOR DEL LABORATORIO



Promotora de Obras Sociales y de Instrucción Popular
Panamericana Sur Km. 144, San Vicente de Cañete, Lima - Perú
Teléfono: (511) 581 2261 I Celular: 991 692 563
Email: laboratorio@vallegrande.edu.pe I Web: www.vallegrande.edu.pe

Anexo 12B: Informe de análisis nutricional foliar de Valle Grande del Lote Don Julio 1

VALLE GRANDE
Laboratorio de Química Agrícola

SOLICITANTE : MAQUINARIA AGRICOLA SAN JOSE SAC
PREDIO : FUNDO SAN JOSE
MATRIZ : HOJAS DE PALTO

ANÁLISIS Nº : 643-02F -2022
LUGAR : CHINCHA
FECHA DE RECEP. : 11/06/2022

INFORME DE ANÁLISIS FOLIAR - NUTRICIONAL

MUESTRA : LOTE DON JULIO 1 - PALTO - HASS - 10-06-22

PARAMETRO		RESULTADO	UNIDAD	MÉTODO	TÉCNICA
Nitrógeno Total	(N_T)	1.73	%	MEF - 001	Dumas
Fósforo Total	(P)	0.12	%	MEF - 002	Colorimétrico
Potasio Total	(K)	1.17	%	MEF - 003	FAAS
Calcio Total	(Ca)	2.18	%	MEF - 004	FAAS
Magnesio Total	(Mg)	0.29	%	MEF - 005	FAAS
Azufre Total	(S)	0.31	%	MEF - 006	Turbidimétrico
Sodio Total	(Na)	0.02	%	MEF - 007	FAAS
CloroTotal	(Cl)	0.56	%	MEF - 008	Argentométrico
Cobre Total	(Cu)	7.55	ppm	MEF - 009	FAAS
Zinc Total	(Zn)	28.05	ppm	MEF - 010	FAAS
Manganeso Total	(Mn)	179.40	ppm	MEF - 011	FAAS
Hierro Total	(Fe)	92.00	ppm	MEF - 012	FAAS
Boro Total	(B)	68.00	ppm	MEF - 013	Colorimétrico
Materia Seca		37.53	%	MEF - 014	Gravimétrico

Los resultados están expresados en muestra seca a 65°C.

DONDE:

% : Masa / Masa
ppm : mg / Kg
FAAS : Espectrometría de Absorción Atómica por Llama
MEF : Método Propio del Laboratorio.

NOTA:
1: Los resultados presentados corresponden sólo a la muestra indicada.
2: Se prohibe la reproducción parcial o total del presente informe sin la autorización del Laboratorio de Química Agrícola.

MSc. Quim. Alexis Saucedo Chacón
JEFE DEL LABORATORIO

LABORATORIO DE QUIMICA AGRICOLA - Cañete - Valle Grande -

MSc. Agr. Julio Castro Lazo
DIRECTOR DEL LABORATORIO

Promotora de Obras Sociales y de Instrucción Popular
Panamericana Sur Km. 144, San Vicente de Cañete, Lima - Perú
Teléfono: (511) 581 2261 I Celular: 991 692 563
Email: laboratorio@vallegrande.edu.pe I Web: www.vallegrande.edu.pe

Anexo 12C: Informe de análisis nutricional de agua de irrigación de Valle Grande del Lote Don Julio 1

VALLE GRANDE
Laboratorio de Química Agrícola

SOLICITANTE : MAQUINARIA AGRICOLA SAN JOSE SAC
PREDIO : FUNDO SAN JOSE
MATRIZ : AGUA DE RIEGO

ANÁLISIS Nº : 643 - 01A - 2022
LUGAR : CHINCHA
FECHA DE RECEP. : 11/06/2022

INFORME DE ANÁLISIS DE AGUA - NUTRICIONAL
MUESTRA : MUESTRA N° 01

PARÁMETRO		RESULTADO	UNIDAD	MÉTODO	TÉCNICA
pH a 20.2 °C		7.31		EPA 150.1	Electrométrico
Conductividad Eléctrica a 25 °C.		0.97	mS / cm	EPA 120.1	Electrométrico
Calcio	(Ca)	6.99	mEq-g / L	EPA 215.1	FAAS
Magnesio	(Mg)	0.92	mEq-g / L	EPA 242.1	FAAS
Sodio	(Na)	2.69	mEq-g / L	EPA 273.1	FAAS
Potasio	(K)	0.07	mEq-g / L	EPA 258.1	FAAS
Amonio	(NH_4^+)	< 0.01	mEq-g / L	UNE 77028:1983	Volumétrico
Cloruro	(Cl^-)	3.18	mEq-g / L	SM 4500 Cl- B	Argentométrico
Sulfato	(SO_4^{-2})	3.37	mEq-g / L	EPA 375.4	Turbidimétrico
Nitrato	(NO_3^-)	0.36	mEq-g / L	MEA - 001	Colorimétrico
Carbonato	(CO_3^{-2})	< 0.02	mEq-g / L	SM 2320 B	Volumétrico
Bicarbonato	(HCO_3^{-1})	4.03	mEq-g / L	SM 2320 B	Volumétrico
Fósforo	($H_2PO_4^{-1}$)	< 0.01	mEq-g / L	SM 4500-P B,E	Colorimétrico
Cobre	(Cu)	< 0.01	ppm	EPA 220.1	FAAS
Zinc	(Zn)	< 0.01	ppm	EPA 289.1	FAAS
Manganeso	(Mn)	0.03	ppm	EPA 243.1	FAAS
Hierro	(Fe)	< 0.01	ppm	EPA 236.1	FAAS
Boro	(B)	0.54	ppm	ISO 9390 : 1990	Colorimétrico
R. A. S.		1.35		MEA - 002	Cálculo Matemático

DONDE:

R.A.S. : Relación de Adsorción de Sodio.
ppm : mg / L
MEA : Método propio del Laboratorio.
FAAS : Espectrometría de Absorción Atomica.

NOTA:
1: Los resultados presentados corresponden sólo a la muestra indicada.
2: Se prohibe la reproducción parcial o total del presente informe sin la autorización del Laboratorio de Química Agrícola.

MSc. Quim. Alexis Saucedo Chacón
JEFE DEL LABORATORIO

LABORATORIO DE QUIMICA AGRICOLA - Cañete - Valle Grande

MSc. Agr. Julio Castro Lazo
DIRECTOR DEL LABORATORIO

Promotora de Obras Sociales y de Instrucción Popular
Panamericana Sur Km. 144, San Vicente de Cañete, Lima - Perú
Teléfono: (511) 581 2261 I Celular: 991 692 563
Email: laboratorio@vallegrande.edu.pe I Web: www.vallegrande.edu.pe

Anexo 13: Informe de análisis de la rizósfera de palto Hass por LASPAF-UNALM

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE AGRONOMIA
LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES

INFORME DE ANALISIS ESPECIAL EN SUELO

SOLICITANTE : MARIA BELEN BALTA BLANCO

PROCEDENCIA : ICA/ CHINCHA/ EL CARMEN/ SAN JOSÉ

REFERENCIA : H.R. 82518

BOLETA : 6534

FECHA : 29/04/2024

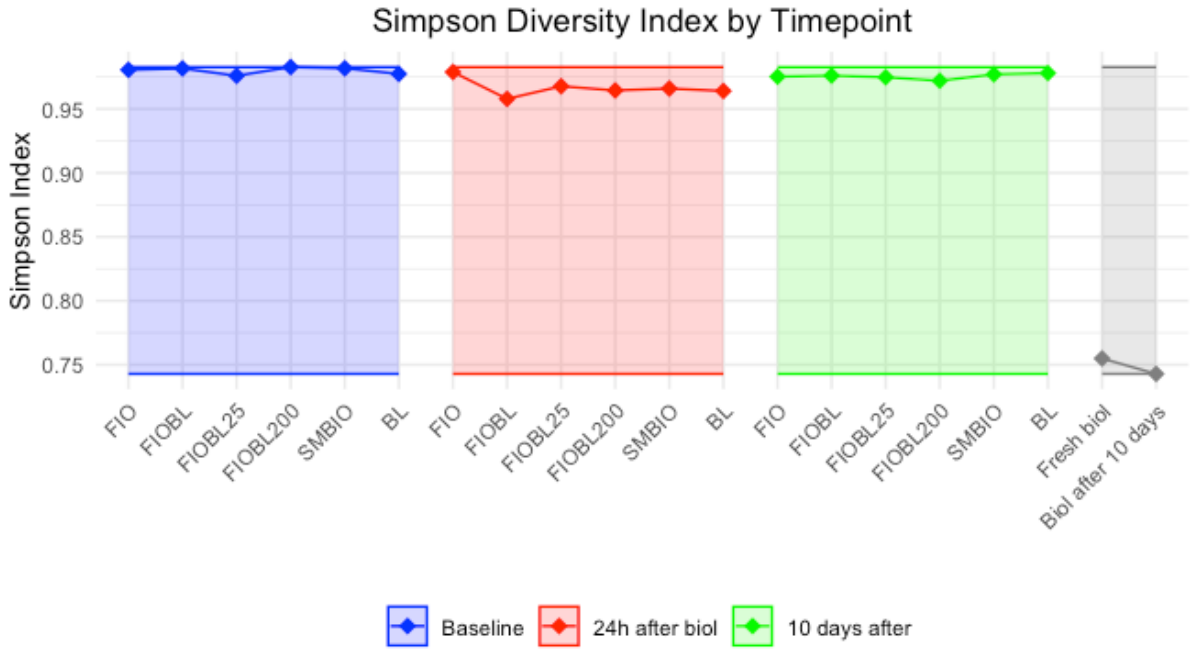
Número Muestra		N	N	P	P	C	Pb	Cd
Lab	Claves	total %	Nitrico ppm	total ppm	disp. ppm	%	total ppm	total ppm
2481	1	0.10	11.44	1343	36.30	2.06	43.51	1.25
2482	2	0.09	4.08	1291	32.91	1.60	43.46	1.24
2483	3	0.08	3.35	1448	33.33	1.33	43.45	1.26
2484	4	0.09	4.87	1331	32.91	1.86	43.71	1.25
2485	5	0.08	2.35	1290	33.33	2.06	42.64	1.19
2486	6	0.09	0.57	1359	37.15	2.13	44.51	1.25
2487	7	0.07	12.17	1364	34.61	1.86	44.17	1.20
2488	8	0.06	3.88	1395	34.61	1.53	43.93	1.23
2489	9	0.07	6.33	1452	35.45	1.73	44.47	1.25
2490	10	0.09	0.96	1434	35.45	1.66	44.78	1.27
2491	11	0.07	12.17	1371	29.83	1.26	42.54	1.19
2492	12	0.07	1.29	1402	35.45	1.13	45.55	1.30
2493	13	0.08	9.32	1424	35.88	1.73	46.90	1.26
2494	14	0.08	1.63	1424	34.61	1.53	43.39	1.26
2495	15	0.07	6.73	1441	32.91	1.40	45.25	1.26
2496	16	0.08	3.22	1440	34.61	1.60	44.85	1.28
2497	17	0.07	12.56	1436	35.45	1.13	43.59	1.23
2498	18	0.08	1.29	1471	34.61	1.40	45.44	1.30

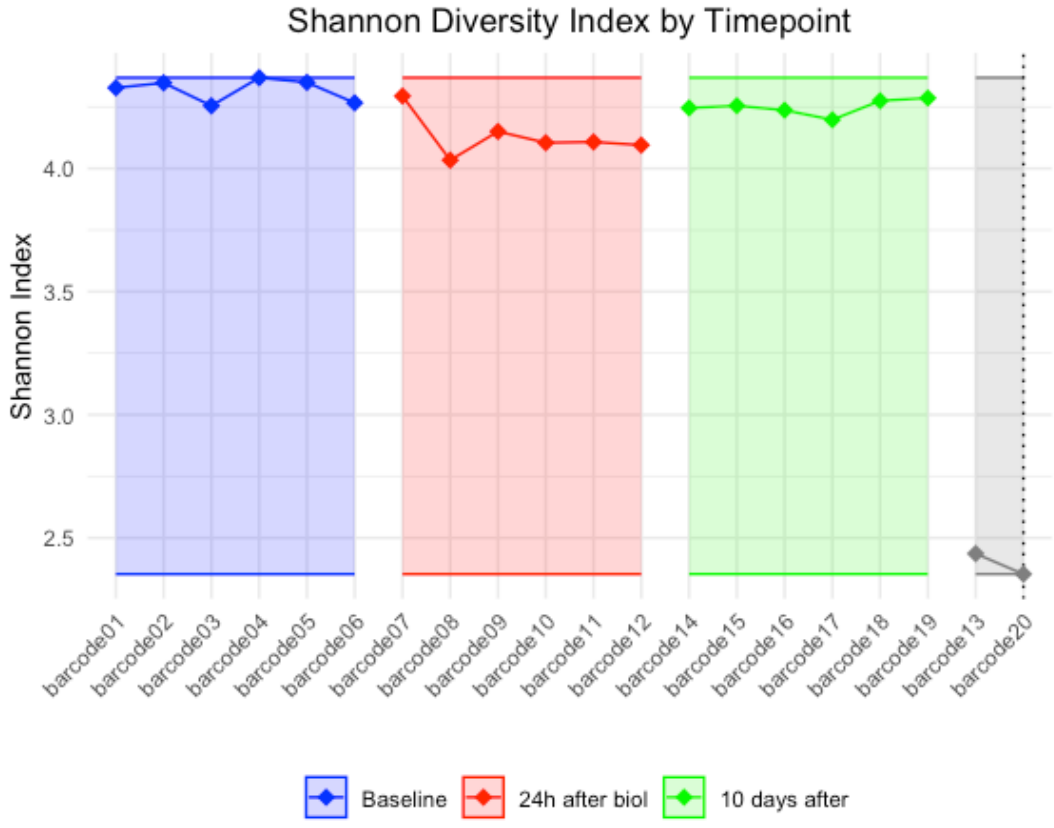
Lab. Análisis de Suelos, Agua y Plantas LASPAF UNALM

Dra. Lily Tello Peramás
Jefa del Laboratorio

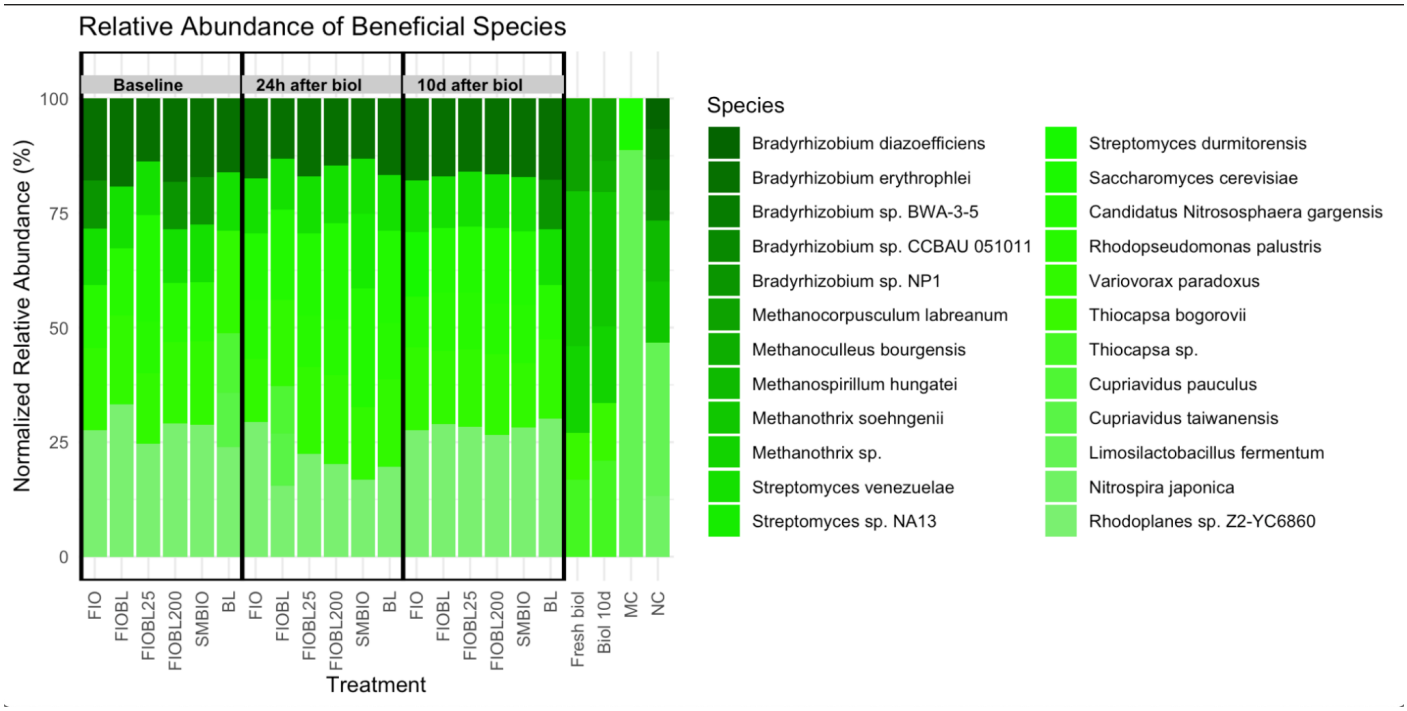
Av. La Molina s/n Campus UNALM
Telf.: 614-7800 Anexo 222 Teléfono Directo: 349-5622
Celular: 946-505-254
e-mail: labsuelo@lamolina.edu.pe

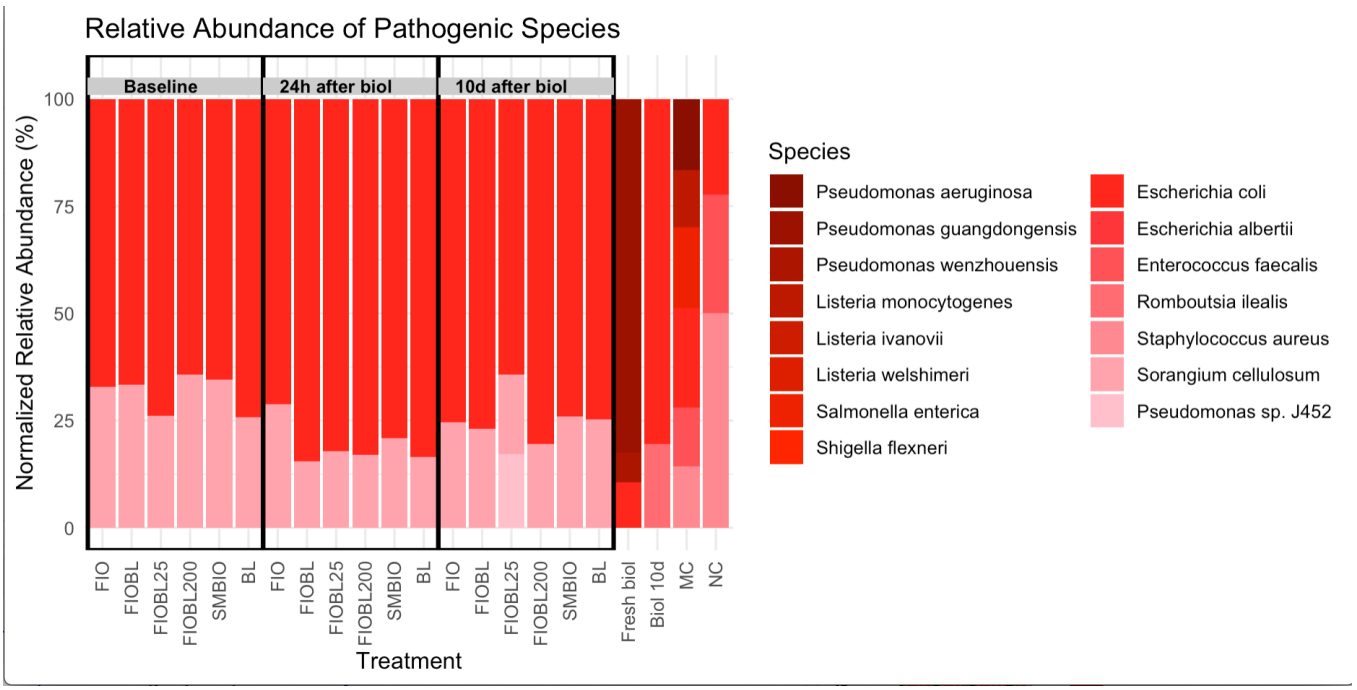
Anexo 14: Visualización adicional de índices de diversidad de Simpson y Shannon





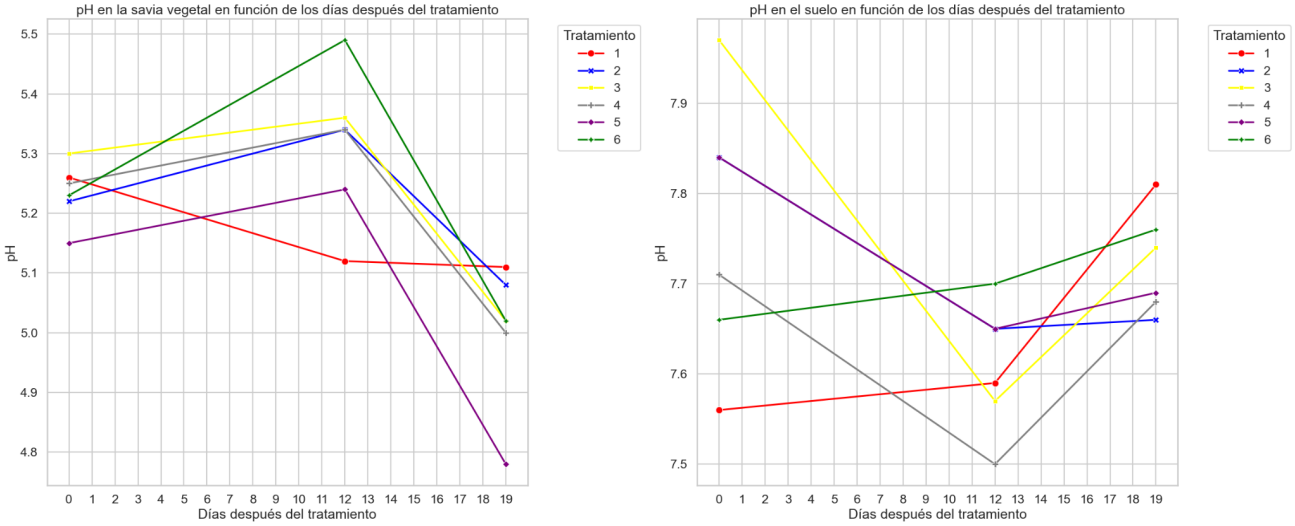
Anexo 15: Abundancias relativas de especies microbianas beneficiosos y patógenas



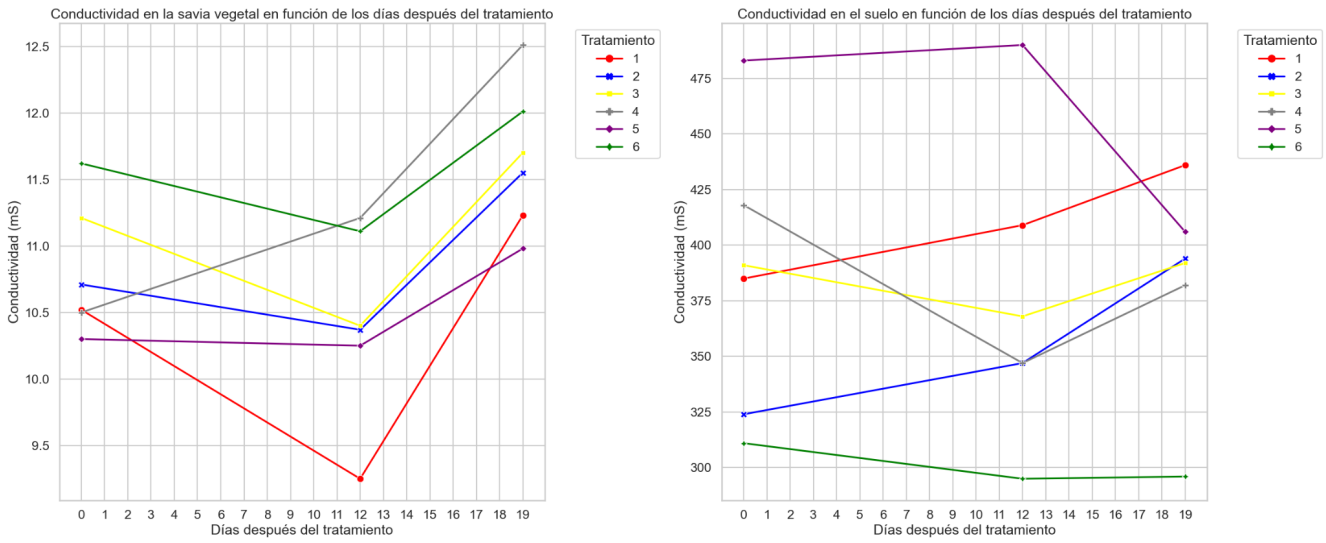


Anexo 16: Cambios en el pH y conductividad eléctrica

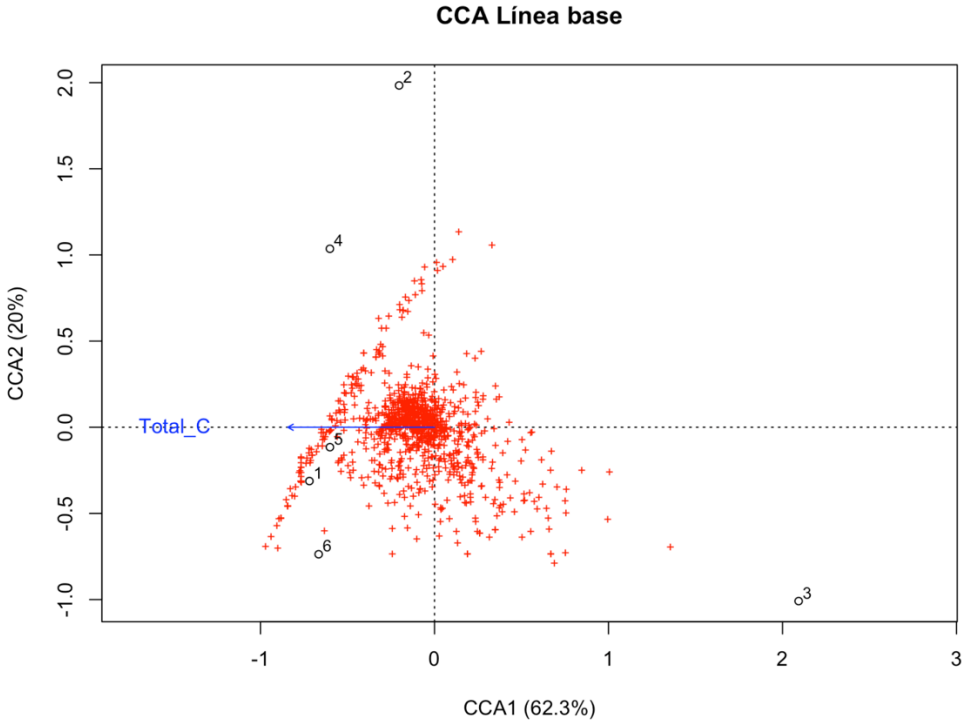
Anexo 16A: Cambios en el pH del suelo de la rizósfera de palto y savia vegetal a lo largo de los 19 días de experimentación para los 6 tratamientos con biol. 1 = fertirriego inorgánico sin biol, 2 = fertirriego inorgánico + biol 100%, 3 = fertirriego inorgánico + biol 25%, 4 = fertirriego inorgánico + biol 200%, 5 = fertirriego inorgánico + biol 25% + bioestimulante Simbio, 6 = solo biol.

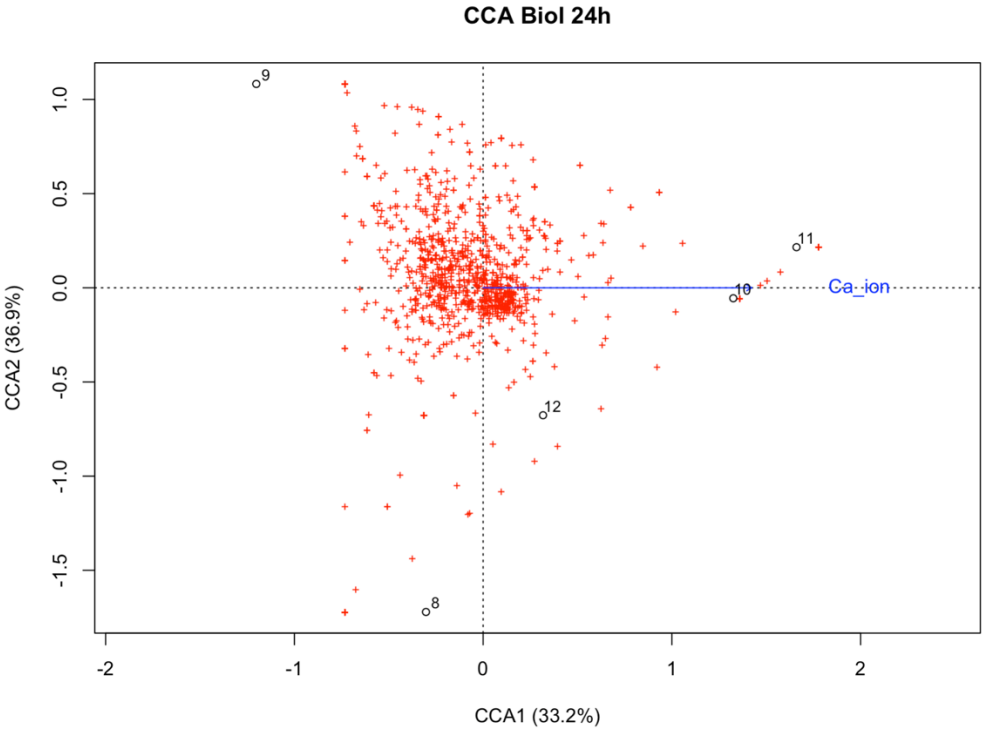


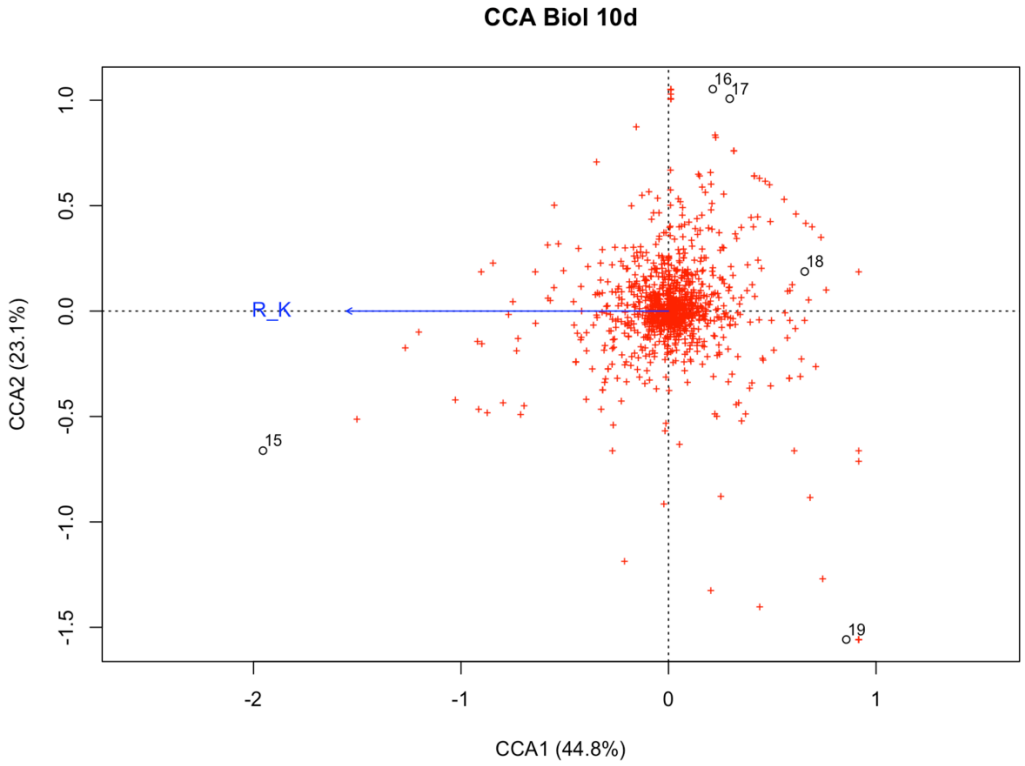
Anexo 16B: Cambios en la conductividad eléctrica (mS) del suelo de la rizósfera de palto y savia vegetal a lo largo de los 19 días de experimentación para los 6 tratamientos con biol. 1 = fertirriego inorgánico sin biol, 2 = fertirriego inorgánico + biol 100%, 3 = fertirriego inorgánico + biol 25%, 4 = fertirriego inorgánico + biol 200%, 5 = fertirriego inorgánico + biol 25% + bioestimulante Simbio, 6 = solo biol.



Anexo 17: Análisis de Correlación Canónica (CCA) por puntos temporales individuales






CCA Biol 10d
CCA2 (23.1%)
CCA1 (44.8%)
R_K
15
16
17
18
19
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
-2
-1
0
1