



UNIVERSIDAD DE  
COSTA RICA

FACULTAD DE INGENIERÍA  
ESCUELA DE INGENIERÍA DE BIOSISTEMAS

“Efecto en la variabilidad composicional de los perfiles de las comunidades microbianas en la capacidad suplidora de nitrógeno del suelo a *Brachiaria Brizantha* fertilizada con aguas verdes y vermicompost a nivel de mesocosmos”

Trabajo Final de Graduación presentado ante la Escuela de Ingeniería de Biosistemas como requisito para optar por el grado de:

Licenciatura en Ingeniería de Biosistemas

**Juan José Ortega Ilama**

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio  
San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica

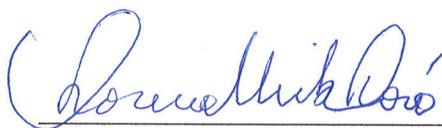
2023

Trabajo Final de Graduación sometido a revisión por la Comisión de Trabajos Finales de Graduación de la Escuela de Ingeniería de Biosistemas de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Costa Rica, como requisito para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Agrícola y de Biosistemas



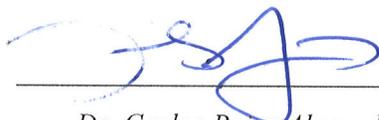
*Juan José Ortega Ilama*

Postulante



*MSc. Lorena Uribe Lorío*

Directora del proyecto



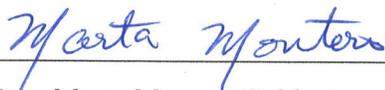
*Dr. Carlos Rojas Alvarado*

Comité Asesor



*Dr. Juan Chin Pampillo*

Comité Asesor



*Dra. Marta Montero Calderón*

Directora de la Escuela

de Ingeniería y de Biosistemas

y Miembro del Tribunal Examinador



*Dr. Ronald Aguilar Álvarez*

Miembro del Tribunal Examinador

y Lector Adicional

## **DEDICATORIA**

*A mi madre, padre, hermanos y hermanas.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A mis familiares por el apoyo durante todo mi transcurso universitario.*

*A mis amigos que han estado presente en todo momento siendo un gran apoyo y compañía durante este proceso.*

*A mi directora del proyecto. MSc. Lorena Uribe Lorío por su paciencia y dedicación conmigo. Por el apoyo incondicional en este proyecto y todo el conocimiento transmitido.*

*A los profesores el Dr. Carlos Rojas Alvarado y el Dr. Juan Chin Pampillo por el acompañamiento y ayuda brindada en el proyecto.*

*A mis compañeras Laura, Fiore y Daniela del Laboratorio del Grupo Diversidad y Microbiología de Ambientes Extremos del Área Microbiología Ambiental y Prospección Génica del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, por el apoyo, el acompañamiento y motivación que siempre tuvieron hacia mí.*

*Al personal del Laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA, UCR) por las oportunidades brindadas y el cariño mostrado.*

*Al profesor Rodolfo WingChin Jones de la Escuela de Zootecnia por la ayuda brindada.*

## RESUMEN

La degradación de los suelos afecta su productividad, debido a pérdidas en su estructura, su capacidad de ciclaje de nutrientes y conducción del agua. Las causas de este fenómeno pueden ser naturales como precipitaciones altas y fuertes corrientes de viento causando erosión, o antrópicas, como el exceso de laboreo y abuso en el uso de fertilizantes químicos. Como alternativa para hacerle frente a la situación crítica de los suelos, se encuentra la aplicación de abonos orgánicos como fuentes a largo plazo de nutrientes. Estos abonos se derivan de la revalorización de residuos de origen animal y vegetal, como las aguas verdes y la producción de vermicompost en fincas lecheras, donde se emplean como complemento en los programas de nutrición del pasto forrajero. Sin embargo, existen pocos reportes sobre el impacto específico de estos abonos en el crecimiento de pastos y en la microbiota del suelo. Por lo tanto, en este estudio se evaluó el efecto de dos abonos orgánicos, las aguas verdes y el vermicompost, en la estructura de las comunidades bacterianas del suelo, así como en el rendimiento de la biomasa y N foliar del pasto *Brachiaria brizantha* en comparación con un suelo sin fertilización.

Para esto, se establecieron en invernadero 6 mesocosmos con suelo de bosque que fue sembrado con semillas de *B. brizantha*, y se dividieron en tres tratamientos (suelo control, suelo con fertilizado con aguas verdes y suelo con vermicompost). Se realizó un programa de fertilización con ambos abonos siguiendo el utilizado en la Finca los Lirales (Coronado), durante los 8 meses del período experimental. A los 0, 4 y 8 meses los suelos de los tratamientos fueron muestreados para su caracterización química, y para el análisis de las comunidades bacterianas mediante secuenciación masiva. Este proceso se realizó también a los abonos orgánicos provenientes de la misma finca. Además, se cuantificó el rendimiento de masa seca producida y el N foliar del forraje.

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en los parámetros químicos evaluados, pero sí en el tiempo de experimentación, que mostró diferencias en el pH, CICE, Mg, Ca, Zn y Mn. La aplicación de abonos orgánicos tendió a aumentar la disponibilidad de C, N y MO. Al cuarto mes evaluado se obtuvo el mayor rendimiento de materia seca, la mayor cantidad observada (0,128 kg/m<sup>2</sup>) en el suelo con vermicompost,

seguido del suelo con aguas verdes ( $0.107 \text{ kg/m}^2$ ), y por último el suelo control con  $0,098 \text{ kg/m}^2$ . En este mismo muestreo se obtuvo el mayor porcentaje de N foliar con  $2,15 \%$  en el suelo con aguas verdes, seguido del suelo control con  $1,83 \%$  y el suelo con vermicompost con  $1,72 \%$ . Las comunidades bacterianas en los suelos fueron dominadas por los filos Proteobacteria, Actinobacteria y Bacteroidetes variando su proporción en los tratamientos, siendo las Proteobacterias más abundantes en los suelos con aguas verdes, las Actinobacterias en los suelos con vermicompost, y los Bacteroidetes en los suelos no aplicados. En el cuarto mes, los suelos tratados con abonos orgánicos exhibieron una mayor diversidad de géneros de bacterias relacionadas con el ciclo del nitrógeno, lo que podría relacionarse con un rendimiento superior en el forraje evaluado. Sin embargo, en las condiciones experimentales de este estudio, se observó que, a pesar de la influencia de los abonos orgánicos evaluados en las comunidades bacterianas del suelo, no se lograron diferencias significativas ni en los parámetros químicos del suelo ni en el rendimiento de los pastos con respecto a la fertilización, pero sí en el tiempo de muestreo, ya que al cuarto mes afectó significativamente algunos valores con comparación al final del período experimental.

## ÍNDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	10
1.1 Área de estudio y justificación .....	10
1.2 Delimitación del problema .....	13
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	16
2.1 Marco conceptual .....	16
2.1.1 El suelo y el ciclaje N y P .....	16
2.1.2 Forraje Brachiaria sp. ....	19
2.1.3 Abonos orgánicos .....	20
2.1.4 Secuenciación y análisis de microbiomas .....	22
2.2 Antecedentes .....	23
2.2.1 Relación de los nutrientes con las comunidades microbianas .....	23
2.2.2 Abonos orgánicos en forrajes .....	25
2.2.3 Análisis del ARNr 16S para microbiomas asociados a la respuesta de las comunidades microbianas por fertilización orgánica .....	25
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	27
<b>4. METODOLOGÍA</b> .....	28
4.1 Material experimental .....	28
4.2 Caracterización química de los suelos de los mesocosmos y abonos orgánicos .....	31
4.3 Determinación de la estructura de las comunidades bacterianas.....	32
4.4 Determinación de la producción de masa seca del forraje .....	34
4.5 Análisis estadísticos .....	34
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	36
5.1 Análisis químicos .....	36
5.2 Análisis foliares.....	40
5.3 Análisis de las comunidades bacterianas.....	43
5.3.1 Comunidades bacterianas en los abonos orgánicos.....	45
5.3.2 Comunidades bacterianas en los suelos.....	46
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	55
<b>7. RECOMENDACIONES</b> .....	56
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	57
<b>9. ANEXOS</b> .....	74

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Distribución de los seis mesocosmos establecidos por tratamiento .....	31
<b>Tabla 2.</b> Resultados de los análisis químicos de suelos realizados a los 0, 4 y 8 meses del proyecto (SC_0: suelo inicial, SC_4: suelo control a los cuatro meses, SAV_4: suelos + aguas verdes a los cuatro meses, SVC_4: suelos + vermicompost a los cuatro meses, S SC_8: suelo control a los ocho meses, SAV_8: suelos + aguas verdes a los ocho meses y SVC_8: suelos + vermicompost a los ocho meses).....	37
<b>Tabla 3.</b> Cambios porcentuales de los nutrientes presentes en los diferentes tratamientos analizados durante el período de análisis .....	38
<b>Tabla 4.</b> Análisis químicos de los abonos orgánicos utilizados en los tratamientos fertilizados de los períodos de 0 a los 4 meses y de los 4 a 8 meses (N/D: no determinado).....	39
<b>Tabla 5.</b> Resultados del porcentaje en masa de N foliar presente en el forraje de los diferentes tratamientos al cuarto y octavo mes de muestreo.....	42
<b>Tabla 6.</b> Resultados del índice de Shannon para la diversidad de las comunidades bacterianas presentes en los diferentes tratamientos durante el período de muestreo.....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Resumen del ciclo del nitrógeno (Modificado de Bear et al., 2022) .....	17
<b>Figura 2.</b> Reserva del P en el suelo .....	18
<b>Figura 3.</b> Resumen de procedimiento basado en la secuenciación y amplificación del gen 16 s (modificado de Anahtar, Brouman y Kwon, 2016).....	23
<b>Figura 4.</b> Configuración de siembra del forraje <i>Brachiaria brizantha</i> en cada mesocosmo (elaboración propia) .....	32
<b>Figura 5.</b> Electroforesis de agarosa con muestras de ADN extraído por el protocolo de fenolcloroformo de muestras de suelos (SC, SAV y SVC) y abonos utilizados (VC y AV). 1. Escalera, 2. SC #1, 3. SC #2, 4. SC #3, 5. SAV #1, 6. SAV #2, 7. SVC #1, 8. SVC #2, 9. VC #1, 10. AV #1 y 11. AV #2.....	33
<b>Figura 6.</b> Comportamiento del rendimiento de materia seca producida ( $\text{kg/m}^2$ ) durante el período experimental de los mesocosmos. Muestras SC: suelo control (color amarillo); SAV: suelo + aguas verdes (color verde) y SVC: suelo + vermicompost (color rojo).....	41
<b>Figura 7.</b> Abundancia relativa de los distintos filos con una presencia mayor al 1 % de la abundancia total de los abonos orgánicos utilizados en los tratamientos de suelo con fertilización. AV: Aguas verdes, VC: Vermicompost. 0-4: Abonos utilizados en el período del inicio del experimento a los 4 meses. 4-8: Abonos utilizados de los 4 a los 8 meses .....	46
<b>Figura 8.</b> Abundancia relativa de los distintos filos con una presencia mayor al 1 % de la abundancia total de los diferentes tratamientos de fertilización y según el tiempo de muestreo .....	48
<b>Figura 9.</b> Escalamiento multidimensional no métrico obtenido de la matriz de similitud de Bray-Curtis de las comunidades bacterianas a nivel de ASV's de las muestras de suelo de los diferentes tratamientos .....	50
<b>Figura 10.</b> Gráfico de sombra de la distribución de los 25 ASV's identificados a nivel de especie que tienen mayor significancia en la disimilitud entre las muestras analizadas. Una tonalidad de color más oscura indica mayor abundancia relativa de las especies en las muestras .....	51
<b>Figura 11.</b> Gráfico de sombra de la distribución de los 36 ASV's identificados a nivel de especies relacionadas al ciclo de nitrógeno que tienen mayor significancia en la disimilitud entre las muestras analizadas, donde entre mayor concentración de color mayor abundancia relativa en las muestras .....	54

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Área de estudio y justificación

Actualmente la agricultura se ha intensificado con el objetivo de aumentar la productividad de los suelos. Sin embargo, esta intensificación conlleva en ocasiones el uso descontrolado de sustancias químicas, entre ellas fertilizantes. Además, varias prácticas agrícolas propician efectos negativos a la estructura de la superficie edáfica, lo que genera situaciones de erosión, pérdida de fertilidad y sobrecarga de contaminantes en el suelo (Hernández et al., 2010).

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO por sus siglas en inglés, 2016), entre el período de 1961 al 2000 la producción alimentaria aumentó un 146 %. Además de esto, con el crecimiento poblacional el área de cultivo disponible per cápita disminuyó de 0,45 a 0,25 ha. Sin embargo, los rendimientos de los cultivos aumentaron hasta el doble siendo el incremento de insumos agrícolas como fertilizantes minerales la clave de este acrecimiento.

Para el año 2015 se estimó que, a consecuencia del mal manejo del recurso edáfico en las prácticas agrícolas, un 33 % de los suelos presentaban niveles moderados o altos de degradación (FAO, 2015<sup>1</sup>). Un suelo degradado afecta la productividad directamente debido a que pierde su estructura y su capacidad de ciclaje de nutrientes y conducción del agua (Espinosa et al., 2011; Torres et al., 2003). Las causas de este fenómeno pueden ser naturales como las altas precipitaciones y fuertes corrientes de viento que causan erosión, o antrópicas como el exceso de laboreo y abuso de la aplicación de fertilizantes químicos (FAO, 2015<sup>1</sup>; Cartes, 2013).

Dentro de las alternativas que se ha implementado para hacerle frente a la situación crítica de los suelos y el uso excesivo de agentes químicos es el uso de abonos orgánicos. Estos funcionan como fuente a largo plazo de materia orgánica (MO), nitrógeno (N) y otros nutrientes esenciales para los cultivos (Garro, 2016). Con esta estrategia, se pretende recuperar área cultivable debido a que este tipo de abonos actúan además como agentes de biorremediación en la recuperación de la productividad y nutrientes de los suelos agrícolas (Nieto et al., 2002).

Los abonos orgánicos surgen de la valorización de residuos de origen animal y vegetal como medio para la reincorporación de los nutrientes ya aprovechados durante el período productivo al suelo (Garro, 2016). Estos macro y micronutrientes son el N mineral, el carbono (C), el fósforo (P), el potasio (K) y el calcio (Ca); y en menor nivel el hierro (Fe), el magnesio (Mg), el cobre (Cu), el manganeso (Mn), el zinc (Zn) y el boro (B). Este tipo de abonos contribuyen además en el mejoramiento de ciertas propiedades físicas y químicas del suelo, tales como los niveles de MO, retención de humedad y de pH, y mejoran el transporte de agua, entre otros (Ramos y Terry, 2014).

Por otra parte, el metabolismo y la dinámica de las comunidades microbianas en el suelo son los principales reguladores del ciclo de nutrientes e influyen en la descomposición de la materia que consecuentemente lleva a la liberación, disponibilidad y retención de estos. La incorporación de nutrientes específicos mediante el metabolismo y transformación de estos es gracias a las comunidades de bacterias y hongos presentes en el suelo (Pacasa et al., 2017; Beare et al., 1997).

Por ello, muchas fincas ganaderas y avícolas emplean diversos procesos aeróbicos para tratar los residuos generados, como los estiércoles. Estos residuos son sometidos a un proceso de descomposición de la materia, en el cual los microorganismos desempeñan un papel fundamental. Este proceso metabólico de los microorganismos resulta en la producción de enmiendas orgánicas. En el caso de la producción pecuaria y lechera, los abonos obtenidos son reciclados en los campos forrajeros para la alimentación del ganado (Labrador, 2001, como se cita en Hernández et al., 2010). Sin embargo, se conoce poco sobre el rendimiento de los forrajes y el impacto de la capa microbiana existente en los suelos agrícolas (Francioli et al., 2016; Elizondo, 2007).

En Costa Rica, el pasto representa en gran parte el aporte nutricional más significativo para los bovinos en fincas de ganado (Rodríguez et al., 2011, como se cita en Laiton, 2019). En la productividad de pastos el N es el macronutriente que determina la capacidad propia de desarrollo. Según WingChing, Rojas y Quan (2005), en Costa Rica la proteína cruda (PC), la eficiencia del uso de N y la producción de materia seca (MS) son las variables que se asocian al efecto de los distintos tipos de fertilización nitrogenada aplicadas en los cultivos forrajeros.

Pastos del género *Brachiaria*, en los últimos años se han utilizado como una de las fuentes principales de alimento para ganado en los sistemas de producción bovina en América Central y Suramérica, ya que dentro de sus características posee su gran adaptabilidad en diferentes regiones (Cuadrado, Torregrosa y Garcés, 2005).

Por lo tanto, surge como necesidad evaluar la relación que existe entre el efecto de los microorganismos aportados por abonos orgánicos al suelo y el desarrollo de pastos forrajeros. Y para esto, una herramienta en la ecología que ha tomado popularidad es el uso de mesocosmos; ya que permiten llevar a cabo experimentos a baja escala y en escenarios con condiciones controlados permitiendo dilucidar la correlación de variables con una alta complejidad biológica donde a nivel de campo es difícil identificar relaciones entre ellas. Sin embargo, puede presentar algunas limitaciones ya que puede carecer de realismo cuando se vaya a replicar a niveles más altos principalmente por aislamiento de otras relaciones o condiciones que existan y que no sean controlados en el mesocosmos (Stewart et al., 2013).

Basándose en lo anterior, al describir la existencia de prácticas agrícolas y pecuarias poco eficientes según los estándares modernos y el uso de abonos orgánicos como una estrategia para paliar lo que se ha hecho; surge la interrogativa en este proyecto de que a pesar de que estos funcionan, cuáles son sus efectos sobre el crecimiento de un pasto y qué sucede con las comunidades bacterianas de la microbiota del suelo. Por lo tanto, el enfoque de esta investigación en el género *Brachiaria*, aportaría información de importancia para el sector ganadero y forrajero, debido a que se evalúa el efecto de los abonos orgánicos tanto en la estructura de las comunidades bacterianas en el suelo como el rendimiento de la biomasa producida del material vegetativo centrándose en la identificación de la diversidad e identificación de los perfiles composicionales de las comunidades bacterianas, la disposición de N en el suelo, así como el N foliar y biomasa producida del forraje. Los resultados de este estudio tienen el potencial de proporcionar información para mejorar las prácticas agrícolas y pecuarias, al tiempo que promueven un manejo sostenible de los recursos naturales.

## 1.2 Delimitación del problema

Cerrato, Leblanc y Kameko (2007), indican que uno de los principales retos en usar los abonos orgánicos es la determinación de la dosis que se aplica, ya que no se controla la concentración de N y la disponibilidad de este mineral en el suelo. También, estos mismos autores recalcan la importancia de la relación C:N ya que esta determina la capacidad de la mineralización de N y reproducción de las comunidades microbianas. Lo anterior debido a que el C es usado como energía por los microorganismos, y para sintetizar proteínas y componentes de la estructura celular junto al N.

De acuerdo con Trejo et al. (2013), los abonos orgánicos como purines y aguas verdes obtenidos a partir de estiércol bovino pueden ser una de las principales fuentes de N y MO al suelo destacando que la aplicación de estos debe tener un monitoreo durante sus aplicaciones. Sin embargo, en etapas tempranas de la aplicación de los abonos provenientes de estiércoles, estos poseen una relación de C:N entre el rango de 30 a 40 lo que complica así la mineralización de este elemento ya que las condiciones adecuadas son dentro del rango de 20 a 30.

Por otra parte, Francioli et al. (2016) indican que el uso de abonos de origen orgánico como los purines tiene influencia en los suelos tanto a corto como a largo plazo. Además, la variación de la estructura de las comunidades microbianas y la abundancia de varios microorganismos del suelo tanto perjudiciales como beneficiosos para las plantas, influyen en gran parte en la productividad y la estabilidad de los recursos que componen el agroecosistema.

Parte de la fracción de sólidos de los estiércoles que no se utilizan ni en purines ni aguas verdes, es sometida al proceso de compostaje en el cual mediante el metabolismo de algunas especies de lombrices se obtiene otros abonos orgánicos comunes como el vermicompost o lombricompost, que se caracterizan por sus aportes significativos de nutrientes y MO al suelo (Durán y Henríquez, 2007).

El proceso de vermicompostaje se caracteriza por una fase activa donde las lombrices en conjunto a microorganismos presentes procesan los sustratos. Primeramente, las lombrices triturarán los residuos orgánicos al pasarlos por su molleja aumentando la superficie de

contacto de la materia orgánica impulsando el crecimiento de microorganismos que incluye bacterias, hongos y otros que interactúan con la materia orgánica descomponiéndola a compuestos más simples. A medida que las lombrices consumen estos microorganismos, liberan nutrientes esenciales como nitrógeno, fósforo y potasio; además de, mejorar la disposición de la materia orgánica (Gómez-Brandón et al., 2012; Ibrahim et al., 2016). Sin embargo, la utilización de vermicompost tiene como limitante su lenta capacidad para suplir los nutrientes que contengan al suelo (Chaoui y Zibilske, 2003).

El N se considera uno de los nutrientes con más impacto sobre la productividad de cultivos. Por lo tanto, la actividad fijadora del N en el suelo es un indicador de la sustentabilidad y desarrollo de cultivos como lo son los pastos forrajeros. Las plantas absorben el N proveniente del suelo en sus formas químicas como nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) (Celaya y Castellano, 2011; Boschini y Elizondo, 2005). Sin embargo, como mencionan Córdova et al. (2013), los cultivos con un alto potencial de producción forrajera, que se espera que tengan buenos rendimientos para su uso en el sector ganadero, a menudo requieren más N del que está naturalmente disponible en la capa superficial del suelo. Por lo tanto, es necesario recurrir a fuentes externas de N para satisfacer las necesidades nutricionales de estos cultivos.

Dentro de las primeras etapas de la incorporación de N mediante abonos orgánicos a partir del estiércol bovino las plantas no pueden aprovechar este nitrógeno y aumenta la probabilidad de que este elemento se escape del sistema agrícola por lixiviación o volatilización. La boñiga es rica en N mineral y debe pasar el proceso de mineralización para disponer de este nutriente en las formas absorbibles por el cultivo (Hernández et al., 2007). Por lo tanto, la conservación y el acondicionamiento del ambiente edafológico para las bacterias nitrificantes y heterotróficas encargadas de la mineralización del N podrían acelerar el proceso y aprovechar la incorporación del nutriente a una escala mayor (Verhagen, Duyts y Laanbroek, 1992).

Además, es fundamental destacar que la utilización de abonos orgánicos como fuentes de nutrientes en sistemas agrícolas conlleva numerosos beneficios. Estos abonos orgánicos contribuyen a un mejor manejo de los recursos del suelo, mejorando sus condiciones físicas, químicas y biológicas. Esto, a su vez, ayuda a estabilizar la salud del suelo, lo que tiene un efecto positivo en la reducción de la necesidad de insumos minerales y, de manera

importante, en la disminución de las emisiones de gases de efecto invernadero, como el metano y el dióxido de carbono (Tulio et al., 2023).

En este proyecto, se llevará a cabo la evaluación de la variación en la estructura de las comunidades bacterianas presentes en el suelo en respuesta a la aplicación de dos abonos orgánicos como fuentes de nutrientes en el forraje *Brachiaria brizantha*. Este enfoque no solo busca evidenciar la eficiencia de los abonos orgánicos en la mejora de la producción agrícola forrajera, sino también promover información de estas prácticas agrícolas sostenibles y su repercusión en los suelos.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Marco conceptual

#### 2.1.1 El suelo y el ciclaje N y P

El suelo, desde un punto de vista agroecológico, se considera como un sistema vivo que alberga gran diversidad de microorganismos y mesofauna. Además, cumple el rol como intermediario en el ciclaje de nutrientes con los sistemas vegetativos y la atmosfera siendo así un sistema de gran importancia (Garro, 2016). El nitrógeno es uno de los nutrientes más importante que aporta el suelo a los ecosistemas dependientes como son los campos de cultivos y bosques (Liu et al., 2018).

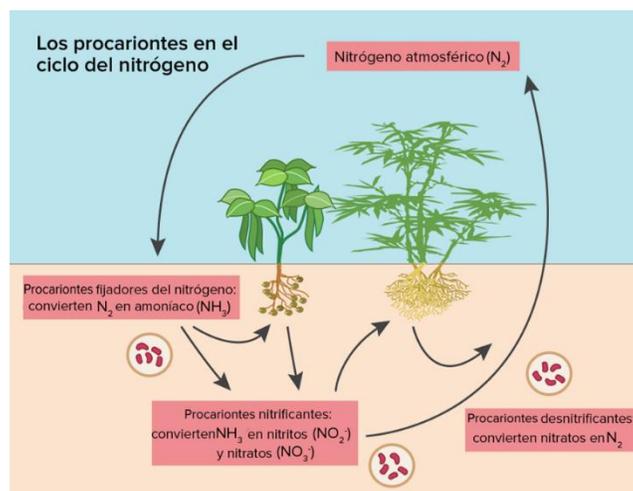
En la Figura 1, se muestra el ciclo del nitrógeno y sus transformaciones resultantes de los procesos que se llevan a cabo. El primer proceso corresponde a la fijación, la cual se puede dar mediante dos vías, ya sea química o biológica. En cuanto a la última vía, distintos organismos y microorganismos fijan el  $N_2$  atmosférico y lo incorporan en su metabolismo para ser depositado posteriormente en el suelo como amoníaco ( $NH_3$ ). Dentro de las principales bacterias que están involucradas en este proceso están los géneros de *Anabaena*, *Clostridium*, *Azotobacter*, *Rhizobium* y *Azospirillum* (Bernhard, 2010).

Simultáneamente, la mineralización química ocurre a nivel de suelo siendo determinante para la disposición de este nutriente para los seres vivos que lo requieren. En esta etapa el N presente en la materia orgánica de las distintas fuentes es movilizado mediante la descomposición de esta. Este proceso es llevado a cabo exclusivamente por organismos procariontes en condiciones aeróbicas, y el principal producto que se obtiene es el amoníaco ( $NH_3$ ), por esto también se conoce como amonificación. El amoníaco, cuando reacciona con el agua, pasa a su forma ionizada de  $NH_4^+$  (Aczel, 2019; Bernhard, 2010; Huang y Cheng, 2010).

Seguido, ocurre la nitrificación donde el  $NH_4^+$  que es transformado en nitritos ( $NO_2^-$ ) o nitratos ( $NO_3^-$ ). Este proceso se da en dos vías según sea el producto final, pero ambas se dan en presencia de  $O_2$  por distintas especies microbianas. El nitrito es producido por grupos de bacterias nitrificantes u oxidante de amonio (BOA), luego este se oxida y se forma nitrato

mediante la actividad enzimática de bacterias oxidantes de nitrito (BON). Dentro de estos últimos grupos se encuentra dominante los géneros de *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrobacter*, *Nitrococcus* y *Nitrospina* (Benimeli, et al. 2019, Bernhard, 2010) y bacterias de la familia Nitrobacteraceae (Yu et al.2022). En este proceso se producen las formas en las que las plantas pueden asimilar el N del suelo (Benimeli, et al., 2019; Celaya y Castellano, 2011).

A nivel de suelo se da la inmovilización del N, en la que los microorganismos transforman el  $\text{NH}_4^+$  y nuevamente a nitrógeno orgánico. Especies de bacterias como *Bacillus*, *Paracoccus*, y *Pseudomonas* convierten el  $\text{NO}_3$  a  $\text{N}_2$  mediante la desnitrificación, y este es devuelto a la atmósfera. El suelo puede perder N mediante la lixiviación del nitrato y la fácil capacidad del amonio de volatilizarse. Ambos procesos pueden ser perjudiciales para los ecosistemas ya que en el primero, el elemento se filtra a cuerpos de aguas provocando eutrofización, y con la volatilización el amonio se acumula en la capa de ozono con su alto potencial de gas de efecto invernadero (Aczel, 2019; Benimeli, et al. 2019; Bernhard, 2010).



**Figura 1.** Resumen del ciclo del nitrógeno (Modificado de Bear et al., 2022)

Otro de los elementos importantes en los sistemas productivos a nivel de suelo es el P, el cual se encuentra en depósitos y rocas minerales y es liberado por procesos de mineralización, meteorización, erosión y lixiviación. Además, en procesos industriales se extrae y es incorporado a los sistemas mediante fertilización inorgánica. Otra de las principales fuentes de P corresponde a los residuos de plantas, animales y microorganismos liberando al suelo

compuestos orgánicos como los ácidos nucleicos, fosfolípidos y ésteres que constituyen entre un 30 a 60 % del P total (Cerón y Aristizábal, 2012; Prasad y Chakraborty, 2019).

La dinámica del ciclo de P está influenciada por diversas propiedades como lo es la humedad y el tipo de suelo, la temperatura y el pH, además de la actividad de las comunidades microbianas presentes. Los procesos de mineralización e inmovilización del P en el suelo son los determinantes para que este macronutriente tenga disponibilidad de ser absorbido por las plantas, llevándose a cabo mediante el metabolismo de diferentes grupos de las comunidades de microorganismos en el suelo y el intercambio iónico relacionado al Fe, Cu y Al (Prasady Chakraborty, 2019; Penn y Camberato, 2019).

En la Figura 2, se observa cómo se encuentra el P en el suelo en sus diferentes formas de absorción y disponibilidad. El primer grupo se conoce como grupo fijo o no lábil que se caracteriza por ser la mayor fracción de P presente en el suelo, y que se encuentra de manera inorgánica insoluble. En el centro se encuentra la reserva de P activa o lábil, que posee el P con mayor facilidad de mineralización y por último la reserva de solución de suelo, compuesta por fracciones de P inorgánico y pequeñas cantidades de P orgánico, y es la forma en que puede ser absorbido por la planta. Estos procesos son regulados principalmente por la mineralización e inmovilización mediante la actividad iónica influenciada por el pH y la actividad de los microorganismos presentes (Prasad Y Chakraborty, 2019; Penn y Camberato, 2019).



**Figura 2.** Reserva del P en el suelo

### 2.1.2 Forraje *Brachiaria* sp.

*Brachiaria* es un género de pastos proveniente de África tropical, clasificado como gramíneas anuales o perennes dependiendo la especie. Este forraje pertenece a la familia de las *Poaceae* y puede alcanzar una altura entre los 0,5 a 1,5 metros (Olivera, Manchado y Pozo, 2006). En Centro y Suramérica distintas especies de este género se han adoptado como forraje para alimentación de ganado en gran parte de las fincas ganaderas. Dentro de las especies más utilizadas se encuentran *B. decumbes*, *B. brizantha*, *B. humidicola* y *B. ruziziensis* (Olivera, Manchado y Pozo, 2006; Cuadrado, Torregrosa y Garcés, 2005).

Algunas características adaptativas del pasto *Brachiaria* sp., son su capacidad de desarrollarse en diversas condiciones edafo-climáticas y su habilidad de crecer en suelos de baja acidez y de poca fertilidad. Estos pastos acumulan alta cantidad de biomasa y muestran buena palatabilidad por parte de los animales, lo que permite que se consideren de alta calidad (Olivera, Manchado y Pozo, 2006).

La edad fenológica se considera uno de los factores más influyentes en la calidad de forrajes debido a que los niveles de biomasa producida, materia seca (MS) y, contenido de proteína cruda (PC), entre otros, dependen de dicha edad (Merlo et al., 2017). Según Costa et al. (2007), la edad de defoliación o corte debe darse en un punto donde el contenido de MS y el valor nutritivo esté en equilibrio. Si el corte se realiza en largos lapsos después de siembra hay acumulación de materia fibrosa en el forraje y se disminuye su valor nutritivo. Al contrario, si se da a muy temprana edad el forraje no ha desarrollado todo su potencial nutritivo.

Diversos estudios analizaron la edad de corte para ciertas especies de *Brachiaria* donde se equilibran la MS y el valor nutricional del forraje y estimaron que el rango ideal es de 15 – 60 días. Con respecto a la MS, pueden variar de 1.7 T MS hasta los 4.5 T MS por hectárea. Además, se reportaron fluctuaciones en el porcentaje de proteína cruda de 7.2 % hasta los 14 %, destacando que ambos parámetros evaluados tienen una alta dependencia de las condiciones climáticas (Merlo, et al., 2017; Costa et al., 2007; Jakelaitis, Da Silva y Ferreira, 2005; Lascano et al., 2002).

### 2.1.3 Abonos orgánicos

La fertilidad de los suelos se basa mayoritariamente por la presencia del humus proveniente de las distintas fuentes de materia orgánica ya sea de origen animal y vegetal. Los microorganismos presentes en el suelo integran en su metabolismo la materia orgánica y por procesos complejos se mineralizan las sustancias nutritivas hasta estar disponibles y ser asimiladas por las raíces de las plantas. Mediante la manipulación y acondicionamiento de la materia orgánica en procesos biológicos se obtiene como resultado los abonos orgánicos, que se caracterizan por su composición mineral siendo un material relativamente estable parecido al humus (Pizarro, 2015; Guamán, 2020).

Los abonos orgánicos son fertilizantes derivados de materia animal o vegetal, que comúnmente son desechos revalorizados mediante distintos procesos que se caracterizan por su composición química que suministra nutrientes a los sistemas productivos. Entre la materia prima utilizada para la formulación de abonos orgánicos se destacan los rastrojos vegetales, cáscaras de frutas y excrementos animales (Assefa y Tadesse, 2019). De estos, los más utilizados son los purines y las aguas verdes, la gallinaza, el lombricompost y el vermicompost.

Se considera que un abono orgánico debe contener una relación carbono-nitrógeno (C:N) entre 25 a 35 para que la fertilización sea de calidad (Garro, 2016). Además, la relación C:N de estos abonos está correlacionada directamente con los procesos de mineralización o inmovilización de N en el suelo. Esto porque la capacidad suplidora como fuente de nitrógeno de los abonos orgánicos y la actividad metabólica de las comunidades microbianas en el suelo depende de la relación entre C:N (Monsalve, Gutiérrez y Cardona, 2017; Espinoza et al., 2012; Mubarak et al., 2010). Sin embargo, al utilizar los abonos orgánicos como enmiendas de integración de nutrientes al suelo, su dosificación suele ser más alta en comparación a la fertilización inorgánica, ya que presentan una menor tasa de kilogramos de nutrientes por cada tonelada de material aplicado, por lo que se consideran abonos de bajas concentraciones (Durán y Henríquez, 2007).

Los purines y las aguas verdes son abonos orgánicos constituidos a partir de excretas de origen animal, específicamente de las granjas de crianza de ganado lechero donde el estiércol

y la orina del ganado, además de las aguas de lavados de los establos son mezclados y recolectados para la obtención de una materia prima para sistemas de compostaje y fertirriego. La diferencia entre purines y aguas verdes radica en la cantidad de materia seca que se encuentra en la fracción de líquido, donde existe aproximadamente entre un 5 a 15 % en purines, mientras que las aguas verdes son más diluidas con menos de 5 %. Estos se caracterizan por ser fuentes con alto nivel de N debido a que la alimentación del ganado se basa en forrajes ricos de este elemento. Este tipo de abono, además, posee una relación de C:N entre 10 a 25 y es eficiente para el suelo (Monsalve, Gutiérrez y Cardona, 2017; Garro, 2016). Sin embargo, dentro de los procesos que existen para la obtención de las aguas verdes y purines hay una separación de fases entre los sólidos en suspensión y la fracción líquida, siendo esta última la cual se integra en los sistemas de aplicación. Por otra parte, los sólidos separados se agregan a sistemas de compostaje donde la disponibilidad de nutrientes es mayor pero su proceso de reintegración a los sistemas productivos se ve influenciada por los tiempos de mineralización prologando y la disponibilidad para los cultivos (Salas, 2017).

El vermicompost es un abono biológico que se da como el resultado de la actividad metabólica de especies de lombrices en conjunto de otros microorganismos en el proceso de descomposición de la materia orgánica. El proceso de descomposición se da mediante la bio-oxidación y estabilización de sustratos y nutrientes (Henríquez, 2009). Según Durán y Henríquez (2007), el resultado del proceso de vermicompostaje depende de la materia prima con la que se vaya a alimentar el sistema. Además, en este caso hay un aporte significativo en la degradación de la MO y los minerales beneficiosos para la fertilidad de los suelos.

Existen grupos de bacterias que tienen un papel muy importante en el vermicompost debido que aportan beneficios que se asocian al uso de estos abonos orgánicos, como la producción de metabolitos que disponen los nutrientes en la forma absorbible para las plantas, efecto antagónico contra parásitos mediante sustancias antifúngicas, antibióticas o insecticidas. Por lo tanto, la importancia del estudio de las comunidades microbianas presentes en este tipo abonos orgánicos amplía su mejor control y uso. El estudio de estas comunidades se realiza actualmente mediante la secuenciación de su ADN mediante metagenómica y posteriormente análisis con herramientas bioinformáticas (Moreno et al., 2018).

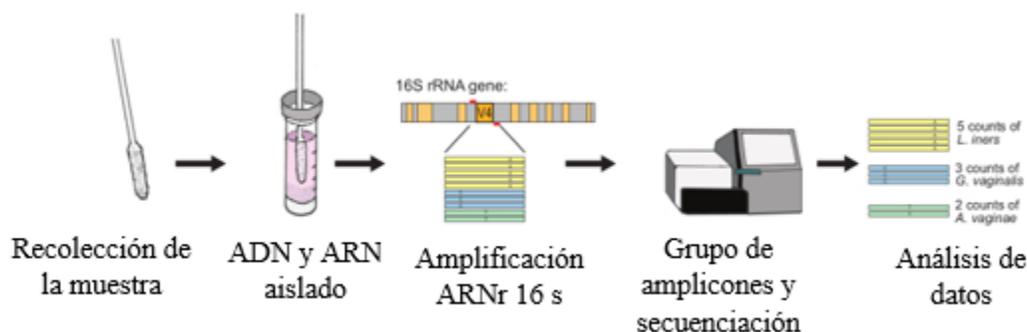
#### 2.1.4 Secuenciación y análisis de microbiomas

Actualmente, el estudio de las comunidades microbianas se lleva cabo mediante el análisis metagenómico a partir de información molecular sin requerir el cultivo individual de los microorganismos que las componen (Hernández et al, 2014). Los estudios metagenómicos permiten reconstruir la composición y filogenia de comunidades microbianas, así como su abundancia en distintos lugares de estudio, por lo que las herramientas bioinformáticas son de suma importancia para entender estos complejos análisis (Nayfach, et al., 2020).

La metagenómica abarca el análisis del ADN genómico a nivel de comunidades. Además, constituye una estrategia que interconecta tres grandes niveles para la obtención de la información requerida. Estos son: a) el procesamiento de las muestras de la matriz a analizar, b) la secuenciación de su ADN y, por último, c) su análisis de diversidad taxonómica y funcional. Uno de los objetivos finales de los análisis metagenómicos se basa en obtener una visión compleja que integra la composición y funcionamiento de las comunidades microbianas en diversos ecosistemas, comprendiendo de una mejor manera su comportamiento y evolución ecológica en un nicho ambiental en específico como los son el suelo, las aguas profundas, los biodigestores, los ecosistemas intestinales y otros (Wilson y Piel, 2013; Hernández et al, 2014).

La metagenómica es una técnica que ofrece información con una mayor resolución en el estudio de perfiles de la microbiota y microbioma en lugares específicos. El microbioma se refiere únicamente a la identificación del conjunto de microorganismos (arqueas, bacterias, hongos, virus, protistas, entre otros) que se encuentra en la muestra analizada (Costas, 2022; López, 2018; Moreno, Valladares y Halabe, 2018). Para su estudio, se utilizan las librerías de información molecular siendo las bases para la reconstrucción de un microbioma. Además, son el punto de partida para los análisis que tienen como objetivo vincular la diversidad microbiana, su relación funcional y su influencia en el medio donde se encuentra. Las librerías se construyen a partir del estudio de marcadores moleculares como el ARNr 16s en el caso de metagenomas asociados al estudio de comunidades de bacterias y Archaea (EZBioCloud, 2019; Hernández et al., 2014).

Las técnicas de biología molecular como la metagenómica generan grandes volúmenes de datos, por lo que existe la necesidad de integrar la manipulación y análisis de estos datos. La bioinformática surge como una herramienta que integra la minería de datos, la inteligencia artificial y la estadística para realizar estudios comprender que sugieran la interacción entre datos biológicos, análisis estadísticos en conjunto con las ciencias computacionales (Gómez, Silva y Pérez, 2010; Zhang et al., 2019).



**Figura 3.** Resumen de procedimiento basado en la secuenciación y amplificación del gen 16 s (modificado de Anahtar, Brouman y Kwon, 2016)

## 2.2 Antecedentes

### 2.2.1 Relación de los nutrientes con las comunidades microbianas

Diferentes estudios han demostrado que el proceso de la mineralización de nutrientes en el suelo no solo depende de la actividad de los grupos taxonómicos de las comunidades microbianas presentes, sino que también depende de algunas de las propiedades fisicoquímicas del suelo como la capacidad de retener humedad, el pH, la textura y su estructura, el contenido de materia orgánica, la concentración de nutrientes y la temperatura (Liu et al., 2018; Monsalve, Gutiérrez y Cardona, 2017; Huang y Chen, 2010; Mubarak et al., 2010).

Por otro lado, varios estudios han demostrado que las comunidades microbianas se pueden ver afectadas por la dosis de N aplicada en el desarrollo de los cultivos. En un estudio realizado por Becker et al. (2020) se evaluó el impacto del N en las comunidades microbianas en un campo de cultivo de canola, observándose que un aumento excesivo en la dosis de N

mineral afecta sustancialmente la composición de las comunidades bacterianas presentes en el suelo. Los autores señalaron que, al comparar dos dosis diferentes (una de 60 kg/ha y otra de 150 kg/ha), la dosis más baja favoreció a los microorganismos, aumentando su actividad en la descomposición de fuentes de C que contenían N; resaltando la importancia del manejo adecuado de la fertilización con N para preservar y fomentar la salud del suelo y las comunidades microbianas asociadas en los sistemas agrícolas. Por otra parte, Francioli et al, (2016) indica que, debido a la aplicación de abonos orgánicos, en un período de cuatro años se da una variación de la estructura de las comunidades microbianas con respuesta a estas aplicaciones.

Cheng et al. (2020), el P es una de las variables principales que regulan la composición microbiana ya que mediante una aplicación moderada de este nutriente puede mejorar la relación de las comunidades bacterianas involucradas en el ciclo de C y P, promoviendo así su ciclo, así como participar en la acción sinérgica del N-P. Wang et al. (2018) observaron que la entrada de N y P como fertilizantes tienen un efecto en el comportamiento de las comunidades microbianas, recalando que el P por sí solo no tiene un efecto significativo mientras que el N disminuye la abundancia de diversos grupos de bacterias y favorece a otros como las Proteobacterias y Actinobacterias presentes en el suelo.

Ramírez et al., (2010) indica que la biomasa de las comunidades microbianas en el suelo decrece en ciertos taxones cuando se aplican fuentes de fertilización nitrogenadas. Esta disminución la asocian al cambio de pH en el suelo por el aumento de N inorgánico y no directamente a la disposición de N. Así mismo, Ochoa (2017) señala que altas aplicaciones de N en el suelo afectan negativamente ciertos filos taxonómicos como Acidobacteria y Euryarchaeota, y favorece a otros que generalmente constituyen grupos copiótrofos. Estos últimos, se caracterizan por su adaptabilidad de desarrollarse en ambientes con altos niveles de nutrientes y alta tasa de crecimiento y producción de biomasa de sus poblaciones (Sylvia et al., 2005).

Zhang et al. (2020), evaluó el efecto del N de las distintas fuentes químicas u orgánicas, en las comunidades microbianas una vez fertilizado el suelo. Los autores identificaron que las enmiendas orgánicas favorecieron el crecimiento y mantenimiento de las comunidades microbianas, regulando su estructura. Sin embargo, aclaran que un excedente de N en el suelo

puede someter a estrés ciertos grupos de bacterias como los Firmicutes, disminuyendo su abundancia. Por otra parte, los cambios de los grupos taxonómicos de las comunidades microbianas se ven influenciados por la relación de los nutrientes que contienen las fuentes de mineralización, destacando el impacto del C, N y P (Wei et al., 2020).

### 2.2.2 Abonos orgánicos en forrajes

El N se considera como el macronutriente más importante para la producción forrajera. Espinoza et al. (2012) señala que la capacidad de un fertilizante de suplir N al suelo y que este sea aprovechable para los cultivos está directamente relacionado con la cantidad de N orgánico mineralizado. Además, mediante el análisis de la materia seca y de biomasa producida en un lapso de un año en *Urochloa humidicola*, se ha visto que el mayor rendimiento está asociado con fertilizantes que aportan mayor cantidad de N orgánico y una alta capacidad de mineralización.

Guzmán et al., (2020) indican que la mayoría de fertilizantes orgánicos poseen altas concentraciones de C, N y P debido a la materia prima utilizada para su producción, y destaca que en pastos forrajeros la deficiencia de N repercute negativamente en el desarrollo.

### 2.2.3 Análisis del ARNr 16s para microbiomas asociados a la respuesta de las comunidades microbianas por fertilización orgánica

Gulzar, et al. (2021), mediante la secuenciación del marcador ARNr 16s comparó el efecto que tiene diferentes tratamientos de fertilización tanto orgánica como inorgánica en suelos de arroz inundado en la diversidad bacteriana, obteniendo que el pH, la conductividad eléctrica y la cantidad de materia orgánica son responsables de variabilidad de las comunidades bacterianas en los diferentes tratamientos. Además, al agregar fórmulas altas en K y P al suelo, refleja una relación limitante en la diversidad ya que los suelos fertilizados con sistemas NPK presentaron la menor diversidad a nivel de filo del estudio.

Wei et al. (2020), observaron que las comunidades microbianas varían significativamente con relación a los sistemas de fertilización aplicadas, específicamente con relación a la forma de que se dispone los nutrientes diferenciando así entre la fertilización orgánica y la inorgánica. Estos resultados se obtuvieron a partir de la secuenciación las regiones

hipervariables bacterianas V3–V4 del gen ARNr 16s. Otros estudios han demostrado que, al evaluar las comunidades microbianas del suelo con respuesta al tipo de fertilización aplicada, los sistemas donde existe el adicionamiento de enmiendas orgánicas favorecen mayoritariamente el incremento de la diversidad microbiana, mientras que, en sistemas de fertilización inorgánicos favorece a grupos específicos funcionales (Yan et al., 2023; Tao et al., 2020; Wang et al., 2017).

### 3. OBJETIVOS

#### *Objetivo general*

Evaluar la variabilidad de la composición estructural de las comunidades microbianas y la relación con la absorción de nitrógeno en el forraje de *Brachiaria brizantha*, con base a la aplicación de vermicompost y aguas verdes como fertilizantes.

#### *Objetivos específicos:*

- Caracterizar químicamente el suelo utilizado en los mesocosmos antes y después de la aplicación de los abonos orgánicos.
- Determinar el perfil de las comunidades microbianas en respuesta a la aplicación de los abonos orgánicos mediante un análisis bioinformático.
- Cuantificar la eficiencia del *Brachiaria brizantha* mediante la concentración de N foliar y la biomasa producida en respuesta de la aplicación de los abonos orgánicos.

## 4. METODOLOGÍA

El proyecto se dividió en dos partes, una fase preliminar donde se realizó la recolección de suelo inicial, el establecimiento de los mesocosmos y la siembra del pasto seleccionado. Una vez cumplido un mes de haber sembrado el pasto se inició la segunda fase que correspondió al período de experimentación segmentado en tres puntos en el tiempo. Estos fueron el mes 0 indicando el inicio, un punto medio a los cuatro meses y en el octavo mes donde se finalizó el experimento. El lapso entre la siembra del pasto y el inicio del período experimental se dio siguiendo la recomendación de Moreno y Molina (2007), que indican que para el correcto establecimiento y germinado en campos forrajeros debe haber transcurrido mínimo un mes después de la siembra de la semilla.

### 4.1 Material experimental

**Suelos.** El suelo utilizado para el experimento se tomó de un bosque primario aldeaño a finca ganadera El Liral, ubicada en Cascajal de Coronado, San José. Primeramente, se limpió el área de muestreo de residuos vegetales, para luego cavar un hueco de 1 metro de largo x 1 metro de ancho. El suelo fue tomado de los 10 a 30 cm de profundidad del punto llenando tres sacos. Se tomó suelo de bosque debido a que el objetivo de este proyecto fue aislar el efecto de la aplicación de los abonos orgánicos; por lo tanto, un suelo con alguna transformación agrícola podría tener un impacto en este efecto.

Con el suelo recolectado, se establecieron en el invernadero del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), seis mesocosmos en cajas de plástico de 0,25 m de ancho, 0,38 m de largo y 0,15 m de alto, a los que se le hicieron 6 agujeros en el fondo para permitir el drenaje del agua de riego. Se uniformizó previamente todo el suelo colectado extendiéndolo en un plástico sobre el suelo y homogenizándolo con ayuda de una pala. En cada mesocosmo se colocó aproximadamente  $1.425 \times 10^{-9} \text{ m}^3$  de suelo. Los mesocosmos se dividieron en tres tratamientos con dos réplicas cada uno que se mantuvieron en el mismo invernadero donde se establecieron. Además, en este espacio, se instaló un equipo para el registro de los valores de temperatura y humedad relativa (ver Anexo 4); sin embargo, este equipo falló, por lo tanto, no se obtuvieron estos. Los tratamientos correspondieron a suelo control (SC), en donde no hubo ningún tipo de aplicación de abonos orgánicos, suelo

fertilizado con aguas verdes (SAV) y suelo fertilizado con vermicompost (SVC), tal como se muestra en la Tabla 1.

**Forraje.** El pasto utilizado para el experimento fue de la especie *Brachiaria brizantha*, cv. Pasto Toledo, ya que es el pasto que se utiliza como alimento para las vacas en la finca el Liral. En la Figura 4, se muestra cómo se realizó la siembra del forraje, en una distribución de seis agujeros a lo largo de los mesocosmos por cuatro agujeros a lo ancho. En cada uno de estos fueron colocadas dos semillas a una profundidad aproximada de 2 a 3 cm.

**Abonos orgánicos.** Los abonos orgánicos utilizados para la fertilización del forraje fueron aguas verdes y vermicompost, ambos utilizados en la finca El Liral como parte de su sistema de fertilización. En esta finca la recolección de las aguas verdes se da mediante un sistema de tuberías de dos etapas. Primeramente, se colectan las aguas de lavado junto a las excretas de los animales (orina y boñiga), y se filtran los líquidos que continúan a la segunda etapa, y los sólidos se utilizan como sustrato para el vermicompostaje con lombrices del género *Eisenia*. La fracción líquida que corresponde a las aguas verdes se llevan a un tanque de almacenamiento con capacidad de 3 m<sup>3</sup> donde se conecta al sistema de bombeo y es aplicado mediante fertirriego. Las aguas verdes aplicadas a los mesocosmos se tomaron del tanque de almacenamiento, primero con ayuda de una barra de PVC se removió con el fin de homogenizar y posteriormente, se tomaba con un recipiente las aguas verdes vertiéndolas en una botella plástica de un litro.

En cuanto al proceso de vermicompostaje, las excretas sólidas son colectadas en un espacio abierto donde permanecen durante dos semanas para el proceso de pérdida de humedad y de sustancias tóxicas para las lombrices. Después, esta materia seca se incorpora en el área de vermicompostaje donde permanece en contacto con las lombrices durante 30 días, hasta su utilización. Este proceso está en constante rotación para su adecuada aireación. Para la recolección, se tomó material del área donde el vermicompost ya estaba listo y con ayuda de una pala se vertió en una bolsa plástica. Las muestras de vermicompost fueron de aproximadamente un kilogramo.

Para ambos casos, una vez recolectado los abonos orgánicos se trasladaron a las instalaciones del CIBCM donde se realizó la aplicación inmediatamente y el sobrante se mantuvo a 2 °C, para su análisis químico y microbiano.

**Fertilización de mesocosmos con abonos orgánicos.** Para efectos del experimento, se utilizó material fresco de la finca cada vez que era necesario realizar la aplicación, las aguas verdes cada 35 días mientras que el vermicompost se recolectó cada cuatro meses. Las aplicaciones de los abonos orgánicos en el forraje durante el experimento se basaron en el programa de aplicación de estos mismos abonos de la finca. Las dosificaciones utilizadas son las siguientes: a. Para aguas verdes es de 1.2 l/m<sup>2</sup>, por lo que para cada mesocosmo con un área de 0.095 m<sup>2</sup> se aplicó 114 ml. b. Para el vermicompost, la dosis es de 5 t/ha en campo, por lo tanto, se aplicó 47.5 g en cada unidad experimental. Los mesocosmos utilizados como control no fueron fertilizados con abonos orgánicos, pero el manejo de riego y siembra de pasto si fue igual a los otros tratamientos.

**Riego.** A cada mesocosmo se le aplicó una lámina de agua de 6.65 mm (basado en la frecuencia de riego de la finca) cada semana, pero esta variable no se tomó como factor para equilibrar la cantidad de agua en los tratamientos fertilizados con aguas verdes en donde se dispuso cierta cantidad de agua como componente de este abono.

**Colecta de muestras.** Las muestras que se utilizaron para el análisis químico y para la extracción de ADN del suelo se recolectaron en los meses 0, cuatro y ocho del período experimental, seleccionando seis puntos aleatorios de donde se tomó el suelo. Se utilizaron tubos cónicos estériles de 50 ml y 20 ml para las muestras dirigidas a los análisis químicos y extracción de ADN, respectivamente.

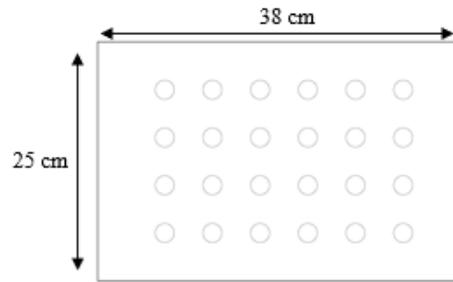
Para realizar estos análisis en los abonos orgánicos se utilizaron las porciones almacenadas de cada una. En el caso de las aguas verdes, se realizó un pool de las tres aplicaciones de cada período (mes 0 al mes cuatro y al mes ocho), al finalizar cada uno, y se tomaron 500 ml para el análisis químico y 50 ml para la extracción de ADN. En cuanto al vermicompost, se realizó el mismo proceso que las aguas verdes variando únicamente en la cantidad utilizada en el análisis químico, ya que se utilizó 250 gramos, y para la extracción de ADN se utilizó la cantidad colectada en un tubo cónico de 50 ml.

#### 4.2 Caracterización química de los suelos de los mesocosmos y abonos orgánicos

Los análisis químicos de las muestras de suelos y abonos se realizaron en el Laboratorio de Suelos y Forrajes del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA), utilizando los procedimientos estandarizados del mismo para cada muestra, estos se realizaron al inicio del experimento, a los cuatro y a los ocho meses. Para determinar el pH, la acidez, el Ca, el Mg, el K y el valor CICE (capacidad de intercambio catiónico) se realizó mediante los niveles críticos generales para la solución extractora KCL-Olsen Modificado y estos valores están dados por centimoles entre litro (cmol(+)/l). También con esta solución extractora se determinó la concentración en miligramos entre litros (mg/l) del P, el Zn, el Cu, el F y el Mn. Con respecto al porcentaje de C y N totales se determinaron con el Autoanalizador de C / N por combustión seca. Y la CE (mS/cm) fue determinada en una proporción de 10 g de material: 20 ml de agua, hasta alcanzar el punto de saturación de la pasta. Las lecturas se hicieron del extracto filtrado con succión. En cuanto a la obtención del valor de N foliar se determinó mediante el Autonalizador de N, y es expresado en base seca en relación masa/masa.

**Tabla 1.** Distribución de los seis mesocosmos establecidos por tratamiento

<b>Número de mesocosmos</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Abreviatura</b>
Muestra 1	Suelo control	SC-1
Muestra 2	Suelo control	SC-2
Muestra 3	Suelo + aguas verdes	SAV-3
Muestra 4	Suelo + aguas verdes	SAV-4
Muestra 5	Suelo + vermicompost	SVC-5
Muestra 6	Suelo + vermicompost	SVC-6

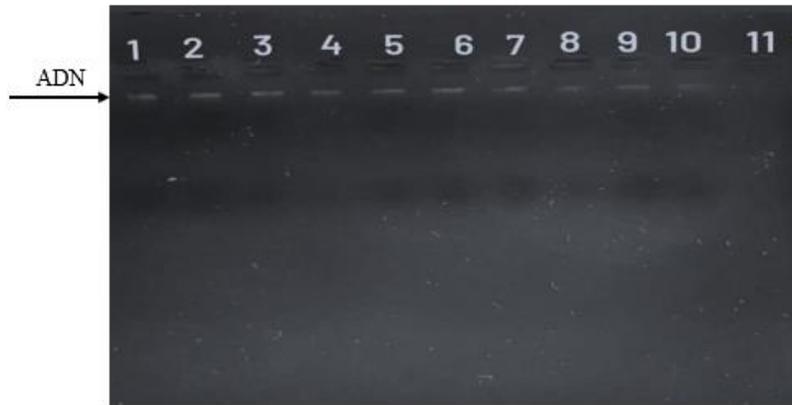


**Figura 4.** Configuración de siembra del forraje *Brachiaria brizantha* en cada mesocosmo (elaboración propia)

#### 4.3 Determinación de la estructura de las comunidades bacterianas

Las extracciones de ADN de las muestras de suelo fueron realizadas al inicio (tiempo 0), a los cuatro meses y a los ocho meses del período experimental. Con el fin de obtener la mejor calidad de ADN para la secuenciación masiva, se utilizaron tres metodologías de extracción, incluyendo dos kits comerciales específicos para suelos, uno de Mo Bio Laboratories y el otro de la marca Machery-Nagel<sup>TM</sup> (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. El tercer procedimiento aplicado fue la extracción de ADN utilizando Fenol-Cloroformo basado en el protocolo de métodos de extracción de ADN por solventes orgánicos de la Red BiöBancos (2011). Este consiste, en extraer el ADN a partir de la reacción de los componentes de las muestras de suelo y abonos orgánicos con los solventes fenol y cloroformo, separando el ADN en la fase acuosa y los restos celulares en la fase intermedia y orgánica. Posteriormente, el ADN es precipitado con etanol absoluto y finalmente es resuspendido en una solución amortiguadora (buffer TE).

Para seleccionar las muestras de ADN de mejor calidad para la secuenciación, se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %, y además se cuantificaron utilizando el espectrofotómetro Nanodrop 2000C de la marca Thermo Scientific, donde se obtuvo la concentración (ng/μl) y las relaciones 260/280 y 260/230, que permiten evaluar la presencia de contaminación con proteínas y fenolato y tiocianato de guanidina, respectivamente. Se seleccionaron las muestras de ADN que presentaron una alta concentración y los niveles de pureza adecuados para el envío a secuenciación.



**Figura 5.** Electroforesis de agarosa con muestras de ADN extraído por el protocolo de fenolcloroformo de muestras de suelos (SC, SAV y SVC) y abonos utilizados (VC y AV). 1. Escalera, 2. SC #1, 3. SC #2, 4. SC #3, 5. SAV #1, 6. SAV #2, 7. SVC #1, 8. SVC #2, 9. VC #1, 10. AV #1 y 11. AV #2

Las muestras de ADN seleccionadas se enviaron a la empresa Novogene, California donde se amplificó el marcador ARNr 16s ribosomal en las regiones V3-V4 mediante la plataforma Illumina Miseq (Illumina, Inc). Se utilizaron dos primers que corresponde a: 3´TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG´5 (forward) y 5´GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG´3 8 (reverse).

Las secuencias obtenidas se sometieron a una edición mediante el uso software de acceso libre Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME2) (Bolyen et al., 2019). Para el acceso a este software se utilizó el clúster del Centro Nacional de Alta Tecnología (CENAT). Durante el proceso de edición, primeramente, se removieron las secuencias únicas o “singletons”, las quimeras y las secuencias de cloroplasto y mitocondria, para luego ensamblar las secuencias. Una vez ensambladas, se realizó la asignación taxonómica con la base de datos SILVA v.138. De esta asignación, se tuvo como resultados la clasificación taxonómica y su correspondiente matriz de abundancia de los ASV (Amplicon Sequence Variant) presentes. Por último, se comparó la clasificación de los ASV más abundantes con la base de datos de EzBioCloud (Yoon et al., 2017) que almacena secuencias curadas de genes 16s de ARN ribosomal.

#### 4.4 Determinación de la producción de masa seca del forraje

Para cada cosecha de forraje se determinó el rendimiento de masa seca ( $R_{MS}$ ) en kilogramos por metro cuadrado producida por mesocosmo utilizando la fórmula [1]. Se realizó una primera cosecha a los 120 días. Tras esto, el forraje se cosechó consecutivamente cada 35 días, debido a que en el primer corte el período debe considerar mayor tiempo para asegurar el correcto establecimiento y espigado del pasto (Moreno y Molina, 2007). Posteriormente, una vez cosechado el forraje es colocado en bolsas de papel y se pesó para determinar el peso inicial (base húmeda) después se colocaron en una estufa a 80 °C durante 24 horas, terminado este período se procedió a pesar en base seca.

$$R_{MS} = \frac{M_{seca} [kg]}{A_{mesocosmo} [m^2]} \quad [1]$$

#### 4.5 Análisis estadísticos

Primeramente, se realizó un promedio de las dos repeticiones de cada tratamiento de las muestras del cuarto y octavo mes para los resultados químicos, de producción de biomasa seca y comunidades bacterianas. Para los resultados del análisis químico, foliares y biomasa seca producida se realizó un análisis de la prueba Kruskal Wallis mediante el programa InfoStat, estableciendo un valor de significancia de  $p = 0.05$  para analizar la existencia de diferencias significativas según los factores de los tipos de tratamiento y el tiempo de muestreo en relación. Además, para el análisis químico de suelo se calculó el cambio porcentual de ellos indicadores evaluados del mes 0 al mes 8.

Para los datos biológicos se utilizaron rutinas de estadística multivariada utilizando el programa Plymouth Routines In Multivariate Ecological Research (PRIMER7) (Clarke & Goyle 2015). En cuanto a la evaluación de las comunidades bacterianas, se realizó un escalamiento multidimensional no métrico (NMDS en sus siglas en inglés) basado en la matriz de la similitud de Bray-Curtis, transformada con raíz cuadrada y estandarizada. Además, se visualizaron los datos mediante diagramas de matriz de sombras (Shadeplot), que utiliza el Índice de Whittaker para las especies y la matriz de similitud de Bray Curtis para las muestras, donde se observan solo los taxones más importantes que contribuyen a la disimilitud de las muestras (25 en el caso de la tabla general, y 36 en el caso de las bacterias

relacionadas al ciclo del N). Tanto las muestras como las especies se agruparon jerárquicamente de forma independiente, y la intensidad de sombreado dentro de la matriz es indicativo de la abundancia relativa transformada de cada una.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Análisis químicos

Con base a los resultados de la prueba de Kruskal Wallis se obtuvo que no hay diferencias significativas de los análisis químicos del suelo con respecto al tratamiento; sin embargo, para el caso del tiempo de muestreo solamente se observó diferencias significativas en el pH, CICE, Mg, Ca, Zn y Mn. Diversos estudios han reportado que la disponibilidad y los cambios de los parámetros químicos del suelo cuando existe fertilización orgánica se ve reflejado en los respectivos ciclos cuando se analiza en largos plazos debido a que, cuando se utilizan abonos orgánicos el ciclaje de nutrientes aportados son más lentos (Ahmed et al., 2019, Hernández et al., 2010, Jiang et al., 2018). El suelo inicial que se utilizó para el establecimiento de los mesocosmos se caracterizó con textura franco arenosa ya que su composición física corresponde a un 82 % de arena, 16 % limo y un 2 % de arcilla, con un pH de 5,60. Este valor de pH se encuentra en los rangos adecuados para la fertilidad del suelo según la solución extractora utilizada en los análisis químicos realizados, este parámetro está muy cerca del pH mínimo recomendable (5,5), ya que por debajo de este se considera que pueden presentar problemas de acidez específicamente con el ion de aluminio (Garro, 2016).

Sin embargo, al establecerse el forraje en los mesocosmos se observó que existió un aumento de este indicador en el tiempo, principalmente en los sistemas fertilizados con vermicompost. Esto puede deberse a que el sistema, al tener una incorporación directa de materia orgánica amortigua la acidez del suelo y provee una estabilidad en la actividad iónica de los nutrientes incorporados. En un estudio donde se evaluó el efecto de abonos orgánicos contra fertilización NPK, se concluyó que los abonos orgánicos disminuyen la acidez manteniendo el pH entre 6 a 7 mientras que, la fertilización química aumenta este indicador caracterizándose que los pH de estos suelos se encuentran entre 4 y 5 (Wang et al., 2019).

Por otra parte, la disminución de la acidez se ve involucrada con el aumento de la capacidad de intercambio catiónico efectiva (CICE) en los mesocosmos al octavo mes, principalmente en el tratamiento fertilizado con vermicompost. Se ha observado que un más alto valor de CICE se asocia con mayor fertilidad en los suelos y menor acidez, debido a que existe una

regulación entre la actividad iónica favoreciendo el potencial de almacenar y suministrar nutrientes (Aranda y Vásquez, 2022).

**Tabla 2.** Resultados de los análisis químicos de suelos realizados a los 0, 4 y 8 meses del proyecto (SC\_0: suelo inicial, SC\_4: suelo control a los cuatro meses, SAV\_4: suelos + aguas verdes a los cuatro meses, SVC\_4: suelos + vermicompost a los cuatro meses, SC\_8: suelo control a los ocho meses, SAV\_8: suelos + aguas verdes a los ocho meses y SVC\_8: suelos + vermicompost a los ocho meses)

Tratamiento / Análisis	Muestreo						
	0 meses	4 meses			8 meses		
	SC_0	SC_4	SAV_4	SVC_4	SC_8	SAV_8	SVC_8
pH (cmol (+)/l)	5,60	6,00	6,10	6,10	6,30	6,10	6,70
Acidez (cmol (+)/l)	0,14	0,17	0,16	0,14	0,11	0,13	0,10
Ca (cmol (+)/l)	5,64	5,72	5,40	5,64	6,93	6,48	9,41
Mg (cmol (+)/l)	1,72	1,65	1,55	1,72	1,62	1,74	1,79
K (cmol (+)/l)	0,20	0,08	0,07	0,20	0,06	0,06	0,07
CICE (cmol (+)/l)	7,70	7,62	7,18	7,70	8,72	8,41	11,36
SA (%)	2,00	2,00	2,00	2,00	1,00	1,50	0,85
P (mg/l)	3,00	3,00	4,00	3,00	2,00	2,00	17,50
Zn (mg/l)	3,30	4,20	3,40	3,30	9,60	8,15	14,35
Cu (mg/l)	14,00	8,00	9,00	14,00	8,00	9,50	7,50
Fe (mg/l)	144,00	92,00	94,00	144,00	96,50	101,50	78,50
Mn (mg/l)	13,00	9,00	6,00	13,00	4,00	3,50	2,50
CE (mS/cm)	0,40	0,20	0,20	0,40	0,15	0,35	0,40
C (%)	4,30	4,81	3,70	4,30	3,99	4,27	5,96
N (%)	0,37	0,37	0,32	0,37	0,33	0,35	0,45
C:N (%)	11,60	13,00	11,60	11,60	12,25	12,40	13,15
MO (%)	6,15	6,88	5,29	6,15	5,71	6,10	8,52

En la Tabla 3, se muestra el cambio porcentual de los parámetros del suelo analizados entre el tiempo 0 y el octavo mes cuando se finalizó el experimento, debido a que mayor plazo se podría evidenciar un mayor efecto de los tratamientos aplicados ya que al utilizar suelos de origen boscosos muchos de los nutrientes biodisponibles a corto plazo podrían dar respuesta a la reserva de elementos de este tipo de suelos (FAO, 2015<sup>2</sup>). Se observó una disminución

general en el K, Cu, Fe y Mn, y en el caso del suelo control y el fertilizado con AV, también C, N y materia orgánica, que podría atribuirse a la absorción de macro y micronutrientes por parte del pasto, entre ellos K, N y Mg. En el caso del suelo fertilizado con vermicompost, se ve una mayor proporción de Ca, C, N y materia orgánica, además existe un notable aumento del Zn y de la disponibilidad de P. Cabe destacar que el Ca y el Zn también aumentaron en los otros tratamientos en menor medida que el vermicompost. Es importante destacar que solamente en el suelo fertilizado con vermicompost se observó aumento en el contenido de P. Se ha reportado que el proceso de vermicompostaje aumenta hasta 25 veces más este elemento, en comparación a otros abonos como el estiércol sin procesar (InfoAgro, 2017; Romero et al., 2013).

**Tabla 3.** Cambios porcentuales de los nutrientes presentes en los diferentes tratamientos analizados durante el período de análisis

Tratamiento/ Análisis	Δ% 8 meses		
	SC_8	SAV_8	SVC_8
pH	5,00	0,82	6,35
Acidez	-35,29	-31,25	-9,09
Ca	21,15	27,50	45,03
Mg	-1,82	12,90	8,18
K	-31,25	-21,43	0,00
P	-33,33	-50,00	75,00
Zn	128,57	132,35	181,37
Cu	0,00	-5,56	-16,67
Fe	4,89	3,19	-16,93
Mn	-55,56	-58,33	-54,55
C	-17,05	8,78	59,15
N	-12,16	3,12	38,46
C/N	-5,77	5,17	14,35
MO	-17,05	8,78	59,15

El aumento del P en el tratamiento fertilizado con vermicompost al octavo mes puede estar asociado a la disponibilidad de ese elemento en la fuente de fertilización durante el periodo experimental ya que el vermicompost presentó valores más altos de este elemento que las aguas verdes, como se observa en la Tabla 4. Esto podría responder a que este vermicompost se obtiene a partir de los sólidos de los desechos de la ganadería (heces principalmente) donde se concentra la mayoría de los nutrientes además de los aportados por el metabolismo de las

lombrices involucradas en el proceso (Henríquez, 2007). Por otro lado, las aguas verdes poseen una menor cantidad de nutrientes ya que gran parte de su fracción corresponde a agua. Con respecto al aumento de C, N y % MO en los tratamientos fertilizados, además de la incorporación de materia orgánica por las excretas del ganado, se puede atribuir a la presencia de residuos vegetales provenientes del forraje, que durante el período experimental se degrada, reincorporando nutrientes al sistema edáfico y a la naturaleza de los abonos utilizados (Doll et al, 2018).

**Tabla 4.** Análisis químicos de los abonos orgánicos utilizados en los tratamientos fertilizados de los períodos de 0 a los 4 meses y de los 4 a 8 meses (N/D: no determinado)

Indicador	Aguas verdes		Vermicompost	
	0 - 4 meses	4 - 8 meses	0 - 4 meses	4 - 8 meses
pH (cmol (+)/l)	7,30	5,80	6,50	6,50
Ca (%)	0,01	0,02	17,82	5,92
Mg (%)	0	0,01	0,52	0,56
K (%)	0,02	0,03	0,3	0,39
P (%)	0	0,01	0,76	0,76
Cu (mg/kg)	0,10	1,00	120,00	122,00
Zn (mg/kg)	1,00	3,00	296	370
Fe (mg/kg)	3,00	18,00	8472,00	18379,00
Mn (mg/kg)	1,00	3,00	296,00	370,00
C (%)	N/D	N/D	15,14	15,46
N (%)	0,010	0,03	1,05	1,49
C:N	N/D	N/D	14,4	10,4

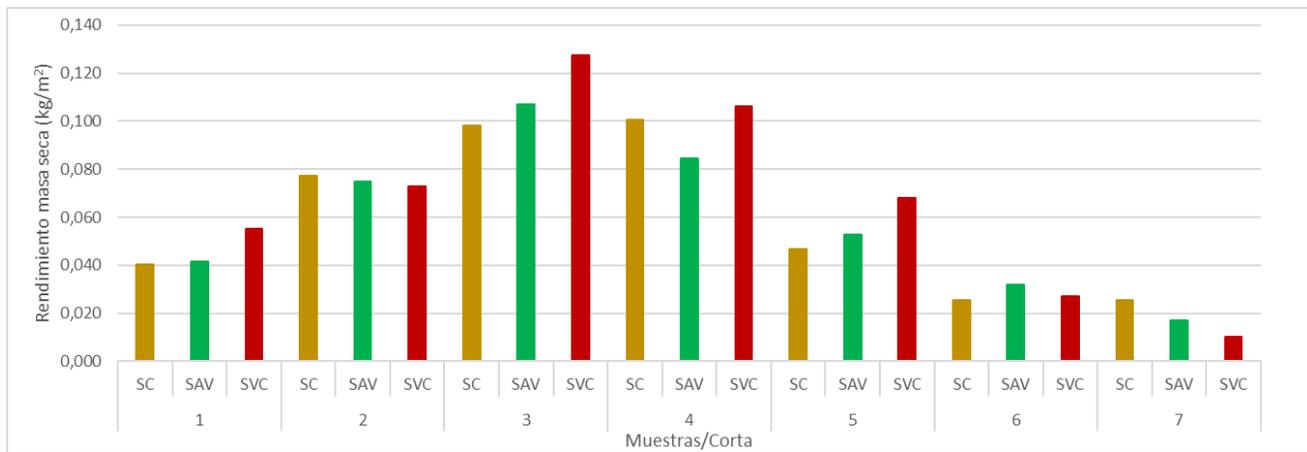
Según Cerón y Aritzabal (2012) la disponibilidad de los nutrientes como el N está asociado directamente con los procesos de mineralización resultante de la de aminación y degradación de materia orgánica, por lo tanto, una mayor disponibilidad de carbono puede llevar a aumentar la biodisponibilidad del N, esto por influencia directa entre estos nutrientes (relación C:N). Con base en lo anterior, se refleja esta relación con los indicadores analizados en el comportamiento decreciente del tratamiento de vermicompost, aguas verdes y, por último, el suelo control sin fertilización; ya que el vermicompost es la enmienda que más aporte de MO y C tienen al suelo, mientras que, el suelo control tiene el aporte únicamente del follaje.

Con relación al Zn, su aumento en todos los tratamientos puede estar relacionado a la forma en que está presente en el suelo, debido a que cuando se tienen niveles de pH bajos, este pasa a ser soluble y se libera; mientras que a pH cercanos a 7 (neutros) como es el caso de todos los tratamientos a partir del mes cuatro, este micronutriente se mantiene en su forma no soluble, acumulándose en la fracción orgánica (Durán y Hernández, 2007).

## 5.2 Análisis foliares

En la Figura 6, se muestran los resultados de la biomasa producida del forraje *B. brizantha* dada en el  $R_{ms}$  en los diferentes tratamientos de suelo durante el período experimental. Según los resultados de la prueba de Kruskal Wallis, no hay diferencias significativas con respecto al tratamiento y tiempo de corta. En la corta número tres (que corresponde al cuarto mes del experimento), se observó el punto con la mayor cantidad de biomasa seca. El tratamiento fertilizado con vermicompost tuvo el mayor rendimiento seguido del suelo con aguas verdes y por último el suelo sin ninguna aplicación. A partir de punto, la producción es decreciente hasta la corta número siete bajando los rendimientos de todos los tratamientos. A pesar de que en la corta tres se obtuvo el mayor rendimiento de materia seca, este estuvo por debajo del rendimiento esperado del pasto *Brachiaria*, ya que en promedio se estima que sea de 0.17 kg/m<sup>2</sup> (Merlo et al., 2017) y el valor más alto obtenido del experimento (muestra de suelo con vermicompost) fue de 0.13 kg/m<sup>2</sup> aproximadamente.

Los rendimientos de biomasa seca coinciden con los cambios que reflejan los análisis de suelo correspondientes tanto para el mes cuatro y mes ocho. La presencia de K, Ca, Mn y Fe en el suelo disminuyó en todos los tratamientos a partir del mes cuatro, donde ya el sistema de forraje se ha establecido en comparación al suelo inicial. La disminución del N y P se reflejó únicamente en los tratamientos de suelo control y fertilizado con aguas verdes. Mientras que para el vermicompost si existió un aumento. Según Salas y Cabalceta (sf); el pasto *B. brizantha* tiene una mayor absorción de K, N, Mg, P, Mn, Zn, Cu y B en los puntos con mayor producción vegetativo; por lo tanto, el establecimiento del sistema productivo forrajero en los mesocosmos está asociado a la disponibilidad de nutrientes en el suelo.



**Figura 6.** Comportamiento del rendimiento de materia seca producida ( $\text{kg/m}^2$ ) durante el período experimental de los mesocosmos. Muestras SC: suelo control (color amarillo); SAV: suelo + aguas verdes (color verde) y SVC: suelo + vermicompost (color rojo)

El rendimiento de la materia seca de la corta número tres y la corta número seis coinciden con los puntos de muestreo correspondientes al cuarto y octavo mes respectivamente. Como se describió anteriormente, entre los dos tipos de abonos orgánicos y el tratamiento sin aplicaciones no hubo diferencias significativas en la disponibilidad de macro y micronutrientes a nivel de suelo; por lo tanto, en los diferentes tratamientos el nutrimento del sistema productivo no difiere ya que tienen un perfil similar en cuanto a la composición nutricional que presenta el suelo. En cuanto al tiempo de muestreo, los forrajes durante su período productivo tienen un punto máximo del rendimiento y a partir de este, a través del tiempo su productividad disminuye como el caso de pasturas del género *Brachiaria* (Lemus, 2008).

Blouin et al. (2019), en un metaanálisis del uso del vermicompost como parte de la fertilización en sistemas productivos, concluyó que este abono aumenta la cantidad de biomasa producida, y que el mayor efecto en la productividad de biomasa se da cuando se utiliza la proporción del 30 al 50 % de vermicompost en el volumen total del suelo, concluyendo además que la familia *Poaceae* se encuentra dentro de la que mejor rendimiento tuvo con este abono orgánico. En las condiciones experimentales de este estudio, el tratamiento de vermicompost estuvo asociado con el mayor rendimiento de biomasa seca producida, aunque no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tipos de fertilización utilizados. Sin embargo, es importante tener en cuenta que, aunque el

vermicompost puede proporcionar nutrientes al sistema, a partir del cuarto mes de cultivo, las dosificaciones utilizadas ya no son suficientes para mantener la misma productividad del follaje. Por lo tanto, se sugiere aumentar las dosis o combinar el uso de vermicompost con otras fuentes de nutrientes, como se maneja en la finca en la cual se basó el proyecto.

En la Tabla 5, se muestra el porcentaje N foliar presente en el forraje durante el período del muestreo donde se obtuvo que este indicador tampoco tiene diferencias significativas con el tiempo y tratamiento. Como se observa, los valores de las muestras del cuarto mes son mayores comparados con los tratamientos del octavo mes, coincidiendo con la mayor producción de materia seca del forraje. Palacios, (2019) reporta que porcentajes de N foliar mayores a 1,5 ya se considera una pastura de calidad nutricional para alimentar al ganado; con base a esto se reflejó que únicamente los valores del cuarto mes estuvieron por encima, mientras que los del octavo mes demostraron una baja eficiencia de este elemento.

**Tabla 5.** Resultados del porcentaje en masa de N foliar presente en el forraje de los diferentes tratamientos al cuarto y octavo mes de muestreo

Tratamiento	% N foliar
SC_4	1,83
SAV_4	2,15
SVC_4	1,74
SC_8	1,30
SAV_8	1,25
SVC_8	1,43

Castillo y Ligarreto, (2010), Castro et al., (2018) y Palacios (2019), indican que el N foliar es uno de los indicadores más importantes para la productividad de los forrajes ya que se asocia a componentes indispensables en la nutrición del ganado como la proteína cruda. Sin embargo, existe correlación de este elemento con otros factores como lo son el contenido de clorofila en las hojas, hojas seleccionadas para el análisis, edad del forraje y tipo de pastura analizada. Además, hay influencia de agentes externos como lo son la temperatura y humedad. Al no evaluar el efecto de estos parámetros en este experimento, no se pueden relacionar a los cambios observados en los resultados.

En los sistemas forrajeros bajo fertilización orgánica como método para la reintegración de nutrientes al suelo como lo son las excretas de ganado, solo una pequeña parte de la fracción del N que es depositada corresponde a la fracción soluble, limitando la biodisponibilidad para las plantas (Hernández et al., 2007). Los abonos orgánicos como los residuos vegetales y animales son las principales materias primas que aportan MO disponible en el sistema edáfico; y esta necesita ser descompuesta por las comunidades de microorganismos, como bacterias y hongos, presentes en el suelo para liberar nutrientes, como el nitrógeno (N), que luego pueden ser utilizados por las plantas. Estos microorganismos desempeñan un papel crucial en el proceso de descomposición de la MO y en la disponibilidad de nutrientes para las plantas.

Sin embargo, existen factores que afectan directamente las estructuras de las comunidades microbianas en las actividades agrícolas, como, por ejemplo, el uso de desparasitantes en el ganado cuyos residuos son depositados en el suelo a través de sus excretas, alterando los ecosistemas bacterianos. Un caso de lo anterior son los residuos de antibióticos que podrían estar presentes en las aguas verdes (Boschini y Elizondo, 2005; Botero, 2021; Celaya y Castellano, 2011; Francioli et al., 2016; Muñoz, 2017; Pezo y García, 2018). En este estudio, se utilizaron abonos orgánicos obtenidos a partir de las excretas del ganado de la finca para fertilizar los suelos; sin embargo, no se incluyó la evaluación de este tipo de sustancias en la calidad de los abonos orgánicos utilizados. Además, se mantuvo el forraje senescente en los mesocosmos, por lo que el nivel de nitrógeno foliar del forraje puede verse afectado por varios factores, como los antes mencionados, incluyendo el tiempo de experimento, que en este caso fue de ocho meses. Es importante destacar que, al evaluarse únicamente ocho meses, los efectos observados pueden estar limitados a un corto plazo, ya que los dos abonos podrían requerir más tiempo para la mineralización de los nutrientes y la biodisponibilidad. Por lo tanto, el sistema vegetativo establecido probablemente utiliza únicamente la reserva del suelo inicial.

### 5.3 Análisis de las comunidades bacterianas

El análisis bioinformático dio como resultado un total de 10 924 ASV's distribuidos en las 11 muestras analizadas. En la Tabla 6, se muestran los resultados del análisis de la diversidad calculado mediante el índice de Shannon en logaritmo en base 10 de las muestras. Como se

observa, el suelo inicial (S\_0), con un índice de 3,004, fue superior en cuanto a la abundancia de ASV's identificados en comparación a los demás tratamientos. Esto puede relacionarse a que las poblaciones de los suelos de los tres tratamientos a los cuatro y ocho meses fueron modificadas en el tiempo debido a las condiciones de invernadero y por la siembra del pasto.

Los suelos con alguna aplicación de abonos orgánicos se podrían ver influenciados por la carga bacteriana que se incorpora en el suelo debido al uso de vermicompost y aguas verdes, que por su caracterización química podrían favorecer a grupos específicos disminuyendo diversidad (Feng et al. 2015; Zhang et al. 2020).

En ambos períodos evaluados, la menor diversidad se observó en el tratamiento de suelos control, lo que podría responder a que estos no tienen alguna fuente de incorporación de bacterias, como las aguas verdes y el vermicompost. Además, en comparación al suelo inicial, la diferencia puede estar dada al establecimiento de un sistema vegetativo que va a favorecer a ciertos grupos bacterianos y afectar negativamente a otros por las relaciones simbióticas a nivel radicular como indica Ward et al. (2019).

**Tabla 6.** Resultados del índice de Shannon para la diversidad de las comunidades bacterianas presentes en los diferentes tratamientos durante el período de muestreo

Muestra	Total de especies (ASV's)	Número de secuencias	Índice de Shannon Log (10)
S_0	3308	47999	3,004
SC_4	1183	81800	2,406
SAV_4	1811	69640	2,704
SVC_4	1402	91673	2,776
SC_8	1827	54650	2,747
SAV_8	2055	59921	2,852
SVC_8	2114	58463	2,860
AV_0-4	2529	59454	2,837
AV_4-8	371	45747	1,218
VC_0-4	1561	51099	2,823
VC_4-8	1244	50574	2,761

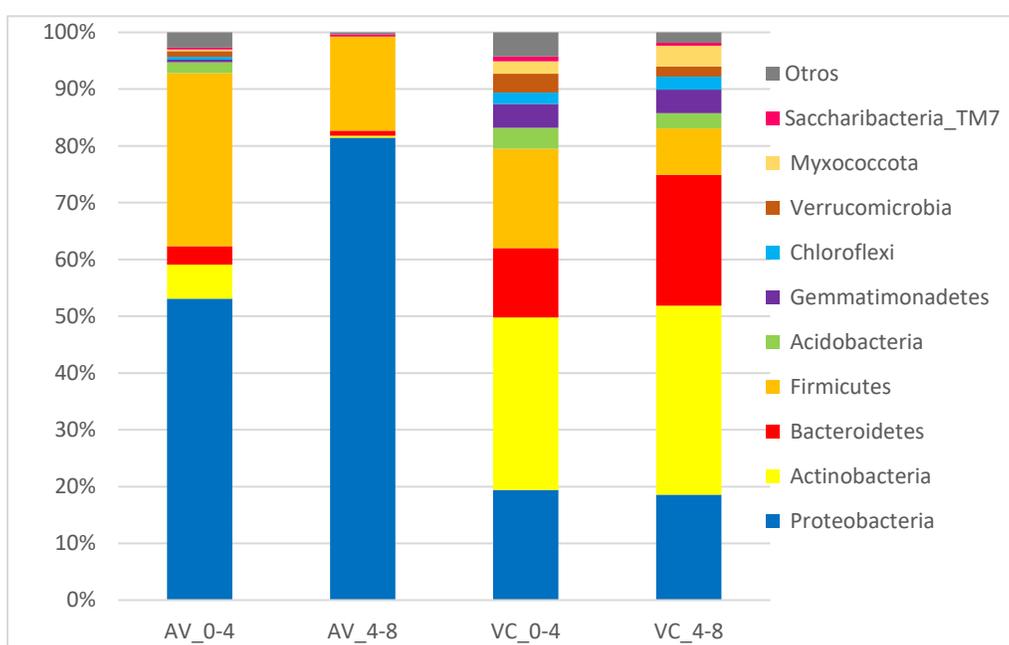
### 5.3.1 Comunidades bacterianas en los abonos orgánicos

En la Figura 7 se presentan los filos bacterianos con más del 1 % de la abundancia relativa total en los dos abonos orgánicos utilizados durante los diferentes períodos de muestreo. Como se observa, las muestras de aguas verdes utilizadas en ambos periodos de aplicación presentaron mayor proporción del filo Proteobacterias. En las aplicaciones cuyo efecto abarca del inicio del experimento hasta los cuatro meses, este filo correspondió con el 50 % de la abundancia total; mientras que las aplicadas en el período de cuatro a los ocho meses aumentaron a un 80 %. Las Proteobacterias son bacterias que se encuentran en diversos ambientes como en mantos marinos, aguas dulces, en el microbiota intestinal de mamíferos y aves; además, hay géneros específicos como las *Pseudomonas*, *Pseudolabrys Afipia* y *Rhizobium* asociados a ambientes nitrogenados, desempeñando un papel en el ciclo de N (Yu et al. 2022; Maçik, Gryta y Fraç, 2020; Taylor, Sichel y Salama, 2019).

El siguiente filo más abundante en este abono corresponde a los Firmicutes, donde hay una mayor abundancia en el primer periodo de aplicación en comparación al segundo, con 30 % y cerca del 20 %, respectivamente. En diversos estudios que utilizan secuenciación de nueva generación con base al gen 16s ribosomal, han descrito que existe una comunidad central o “core” de bacterias ruminales compuesto por siete grupos de bacterias calificadas a diversos niveles taxonómicos, destacándose, entre otros, los géneros *Prevotella*, *Butirivibrio*, *Ruminococcus* y otras bacterias no clasificadas de las familias y órdenes donde incluyen la Ruminococcaceae, Lachnospiraceae, Clostridiales y Bacteroidales, todas menos la última pertenecientes al filo Firmicutes (Henderson et al., 2015; Jain y Proctor, 2014). Estos grupos dominan en las excretas de ganado, sin embargo, en este caso, al ser una mezcla de desechos líquidos de lechería, sometidos a almacenamiento durante un período de tiempo fuera del animal, podría permitir la colonización de bacterias ambientales pertenecientes a otros filos bacterianos (Wong et al., 2016).

En cuanto a los filos presentes en el vermicompost utilizado en la fertilización, se observa una composición similar entre ambas muestras. Las Actinobacterias son el filo predominante, con cerca del 30 % tanto para el vermicompost utilizado en el intervalo de los 0 a los cuatro meses como al de los cuatro a ocho meses, seguido de las Proteobacterias con una abundancia de 20 % en cada una. El filo Bacteroidetes es el tercero más abundante con una diferencia

cerca del 10 % entre los dos períodos de tiempo. Estos resultados son consistentes con otros estudios que encontraron que en el vermicompost hay un aumento en la diversidad de bacterias pertenecientes a los filos de Bacteroidetes y Actinobacteria. Estos grupos son favorecidos por el ambiente anóxico y el enriquecimiento de nutrientes en el intestino de las lombrices las cuales se encargan de la descomposición de la materia orgánica. Además, el proceso para la obtención del vermicompost modificó la comunidad bacteriana original de los desechos que se utilizan de una manera diversa explicando así la diferenciación entre las comunidades bacterianas con las presentes en las aguas verdes (Yasir et al., 2009; Murillo et al., 2022; Sun et al., 2015).



**Figura 7.** Abundancia relativa de los distintos filos con una presencia mayor al 1 % de la abundancia total de los abonos orgánicos utilizados en los tratamientos de suelo con fertilización. AV: Aguas verdes, VC: Vermicompost. 0-4: Abonos utilizados en el período del inicio del experimento a los 4 meses. 4-8: Abonos utilizados de los 4 a los 8 meses

### 5.3.2 Comunidades bacterianas en los suelos

En la Figura 8 se observa que los filos de bacterias predominantes para el suelo inicial son Actinobacteria y Acidobacteria, con un 36 % y 25 % de abundancia relativa respectivamente. Los filos de Bacteroidetes, Proteobacteria, Firmicutes y Chloroflexi tienen una fracción similar dentro de la abundancia de la muestra. En el caso del tratamiento control (SC), al que

no se le aplicó ningún abono, se observó un aumento significativo del filo Bacteroidetes en el mes cuatro y que disminuye a los ocho meses. Los filos de Proteobacteria y Gemmatimonadetes aumentan durante el tiempo, siendo mayor el efecto en las Proteobacterias. El efecto contrario se observa en las Actinobacterias y Acidobacterias. Los Firmicutes tienen una disminución muy notoria a los cuatro meses, sin embargo, al mes ocho incrementa su abundancia. A pesar de que el suelo control no se le aplicó algún tipo de fertilización su variabilidad en las comunidades bacterianas pueden ser respuesta al establecerse un sistema vegetativo o a los cambios del entorno donde se encuentran los mesocosmos.

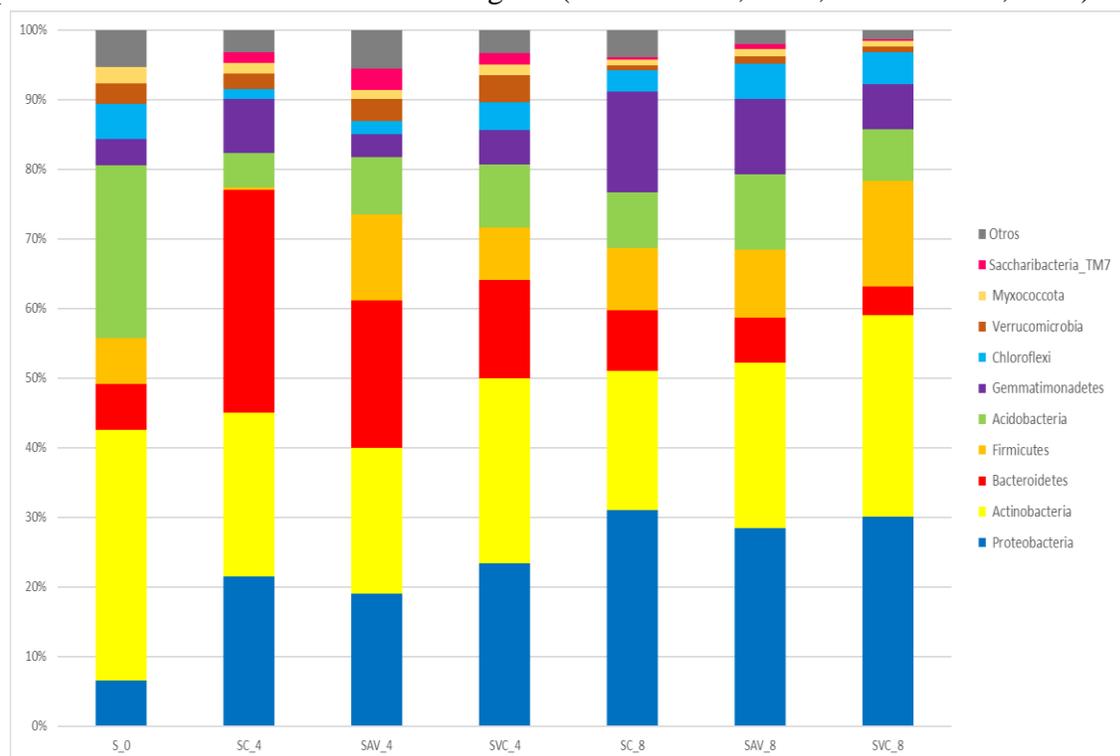
Por otra parte, en los tratamientos de suelo fertilizado con aguas verdes (SAV) se observó un comportamiento similar al suelo sin fertilización. Al final de los ocho meses de estudio las comunidades bacterianas del suelo con aplicaciones de AV tuvieron alta similitud con el suelo sin aplicaciones en el mismo muestreo, a pesar de las diferencias observadas a los cuatro meses. Ejemplo de esto son los Bacteroidetes que incrementaron al mes cuatro, y disminuyeron en el muestreo de los ocho meses. En cuanto al aumento de las Proteobacterias, puede dar respuesta a la aplicación de las aguas verdes ya que dentro de su composición es el filo más abundante en las dos muestras aplicadas durante el período de fertilización muestreado.

Por último, se tiene a los suelos fertilizados con vermicompost, donde también se ve un aumento en las Proteobacterias y Firmicutes, un comportamiento estable a través del tiempo de las Actinobacterias, y una disminución de la abundancia de las Acidobacterias con comparación al suelo inicial del muestreo. En cuanto a las Bacteroidetes, tiene el mismo comportamiento que los suelos control y con aguas verdes.

Los filos de Proteobacterias y Firmicutes, se consideran los filos impulsores en la variabilidad temporal de los grupos de bacterias cuando se trata de evaluaciones en el suelo debido a la fertilización por abonos de origen animal, en este caso con las aguas verdes y vermicompost. En general, existe una tendencia en la que estos tipos de abonos orgánicos promueve la biomasa bacteriana, la abundancia y la diversidad de la mayoría de los grupos bacterianos del suelo. Sin embargo, el aporte de carbono derivado del estiércol no favorece a todas las bacterias por igual (Feng et al. 2015; Zhang et al. 2020). Un ejemplo de variabilidad en estos

filos se observa cuando al aumenta la abundancia de las Proteobacterias, el filo Acidobacteria disminuye; y de igual forma con la relación de los Bacteroidetes con el filo Firmicutes tendiendo un comportamiento inverso en cuanto al aumento o disminución de la abundancia presente (Francoli et al., 2016; Zhang, Tomas y Hao, 2018).

Estos comportamientos coinciden con el cambio de las comunidades bacterianas con respecto al tiempo y los tratamientos de los abonos orgánicos en comparación al suelo inicial. En cuanto al suelo control se tiene una dinámica similar, dando probablemente respuesta al establecimiento de un sistema vegetativo o a los cambios del entorno donde se encuentran los mesocosmos. Los mesocosmos son una herramienta utilizada en la ecología para una amplia gama de estudios como el análisis de comunidades bacterianas de diversos ambientes, ya que como ventaja permite dilucidar las condiciones naturales de los sistemas que se quieren replicar a nivel de una experimentación controlada escalable a diferentes tamaños; sin embargo, puede haber limitaciones con relación al no evaluar ciertas relaciones biológicas que se desencadenan en el ambiente original (Stewart et al., 2013; Cañedo et al., 2012).

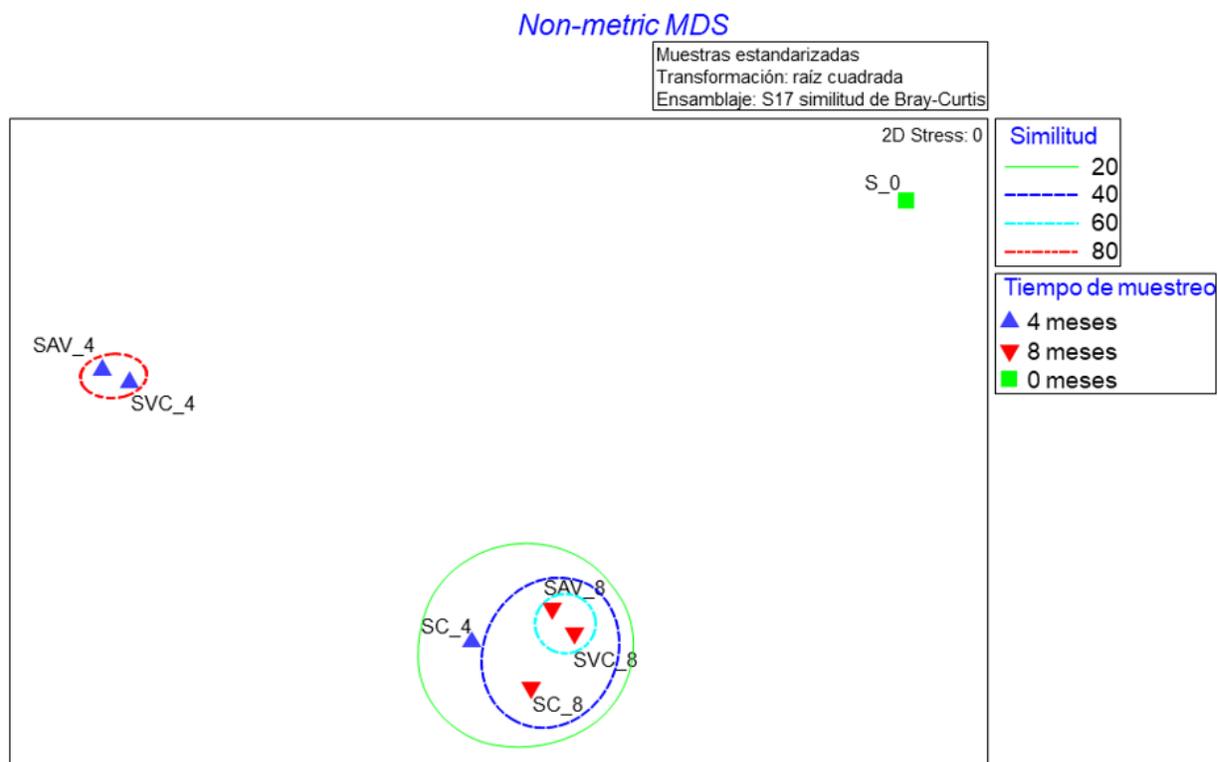


**Figura 8.** Abundancia relativa de los distintos filos con una presencia mayor al 1 % de la abundancia total de los diferentes tratamientos de fertilización y según el tiempo de muestreo

En la Figura 10 se muestra el agrupamiento basado en la matriz de similitud de Bray-Curtis de la tabla de abundancias de las comunidades bacterianas de los suelos de este estudio (Escalamiento multidimensional no métrico o nMDS por sus siglas en inglés). Primeramente, se observa una separación del suelo inicial (S\_0) de las demás muestras del experimento, incluyendo los suelos control que no tienen ninguna aplicación de abonos orgánicos. Esta diferenciación se puede atribuir a que este suelo se analizó antes del establecimiento del pasto, y las muestras control de los tratamientos si fueron analizadas con el pasto. La presencia de este cultivo permite que se desarrolle un microecosistema a nivel de la raíz de este, favoreciendo las relaciones simbióticas entre grupos bacterianos específicos tales como las Proteobacterias, debido a su capacidad para responder a fuentes lábiles de C, mostrando un rápido crecimiento y adaptación a las diversas rizosferas vegetales, y a las Acidobacterias, a las que se les atribuye un papel importante en el ciclo del C en los suelos debido a su capacidad para degradar carbohidratos complejos como la celulosa y la lignina (Ward et al. 2009). Bacterias del filo Actinobacteria se han asociado con la capacidad para aumentar la nodulación de las raíces y promover el crecimiento de las plantas (Bulgarelli et al., 2013; Chaparro et al., 2014; Mendes et al., 2011; Peiffer et al., 2013; Tokala et al., 2002; Ward et al. 2009).

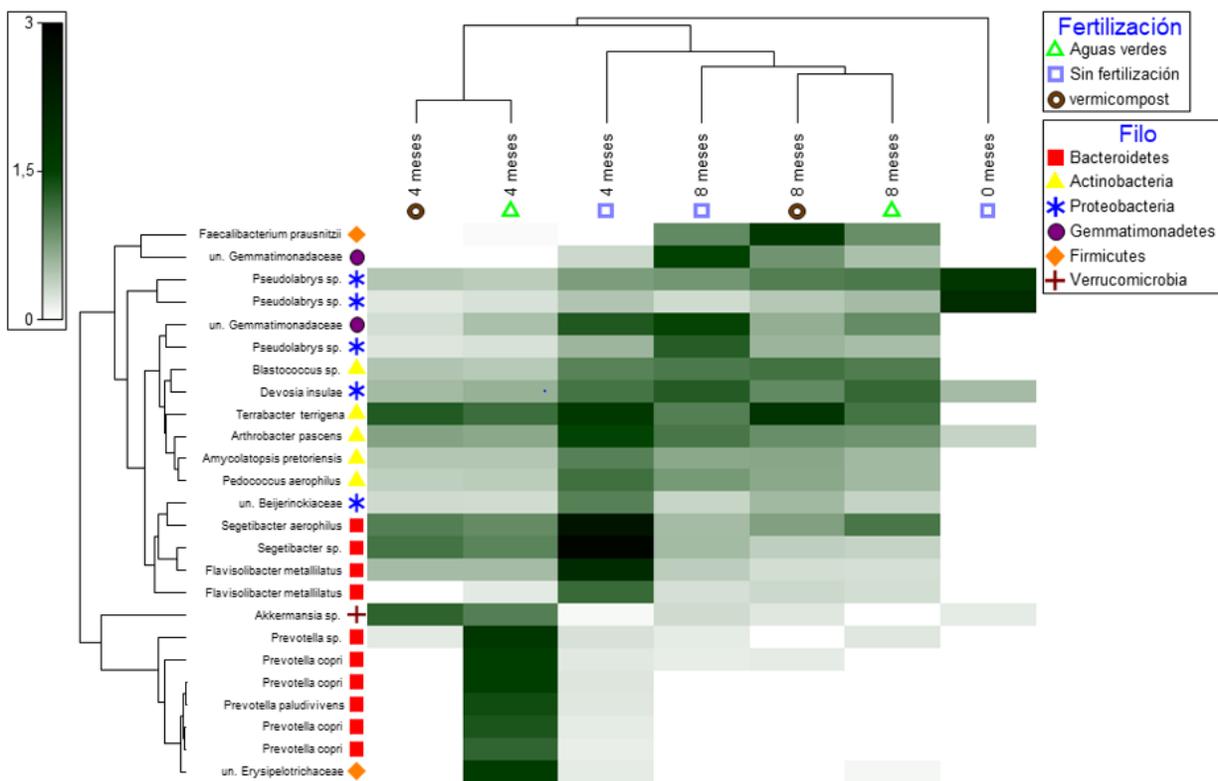
Además, se observó que al cuarto mes hubo una separación entre los tratamientos ya que los suelos con fertilización orgánica tienen una similitud del 80 % entre sí, mientras que el suelo control correspondiente (SC\_4), no tiene relación con estas, y se agrupa con un 20 % de similitud con todas las muestras tomadas al octavo mes. Esto puede indicar una respuesta durante los primeros cuatro meses del estudio de las comunidades bacterianas debido a la aplicación de los abonos orgánicos. Al existir un régimen de aplicación, parte de las diferencias entre las comunidades del suelo control y los abonados podría adjudicarse a la incorporación de nuevos grupos bacterianos existentes en las aguas verde y vermicompost. Entre el cuarto mes y el octavo, la similitud entre los tratamientos fertilizados disminuyó de 80 % al 60 % entre ellos, aunque estas muestras si mantienen un 50 % de similitud con el suelo control (SC\_8). Estos resultados indican que el factor del tiempo de muestreo tiene un impacto significativo en las variaciones de las comunidades bacterianas del suelo, mientras que la aplicación de los abonos orgánicos no resultó significativa en sí misma, pero contribuyó a la variación de estas comunidades entre los diferentes tratamientos.

En el estudio realizado por Francioli et al. (2016), se señala que en los sistemas de fertilización orgánica en plazo de dos a cuatro años se observan diferencias significativas en los cambios de las comunidades bacterianas. Sin embargo, en el corto plazo, estos cambios no son significativos y resulta difícil observar diferencias. Estos hallazgos resaltan la importancia del régimen de fertilización y la estabilización de las bacterias en función del período de estudio.



**Figura 9.** Escalamiento multidimensional no métrico obtenido de la matriz de similitud de Bray-Curtis de las comunidades bacterianas a nivel de ASV's de las muestras de suelo de los diferentes tratamientos

En la Figura 10 se muestra el gráfico de sombras con los 25 ASV's clasificados a nivel de especie que tienen el mayor efecto en la variabilidad de las comunidades bacterianas según el índice de Whittaker (Clarke & Goyle 2015). Dentro de esta selección, se encuentran tres ASVs clasificados como *Pseudolabrys sp.*, dos de ellos se caracterizaron por estar en mayor abundancia en el suelo inicial, desapareciendo en el tiempo, y el tercero se encuentra en mayor abundancia en el SC\_8. Esta especie es nitrificadora y ha sido aislada en diversos tipos de suelos alrededor del mundo, desde suelos de tundra hasta de bosques (Kim et al., 2014; Kämpfer, 2006).



**Figura 10.** Gráfico de sombra de la distribución de los 25 ASV's identificados a nivel de especie que tienen mayor significancia en la disimilitud entre las muestras analizadas. Una tonalidad de color más oscura indica mayor abundancia relativa de las especies en las muestras

Diferentes especies del género *Prevotella* en cambio, hacen la diferenciación en las comunidades presentes en el suelo fertilizado con aguas verdes al mes cuatro. Este género ha sido descrito ampliamente como uno de los principales en el microbioma del rumen del ganado (Delgado et al., 2022), asimismo como las bacterias pertenecientes a la familia *Erysipelotrichaceae*, identificada como parásitos intestinales en mamíferos incluido el ganado (Khalil, Batool y Arif, 2022), por lo que no extraña que se encuentre en mayor abundancia en el abono a base de excretas de ganado sin procesar. No obstante, la abundancia de estas bacterias disminuyó en la muestra SAV\_8, lo que puede indicar que las condiciones afectaron su persistencia en el suelo. Característico de las muestras tomadas en el mes ocho, el ASV clasificado como *Faecalibacterium prausnitzii*, tiene representantes parásitos que se encuentra en el intestino del ganado vacuno (Savin et al., 2019) y en este caso marca la disimilitud con respecto a las muestras del mes cuatro. Las especies como *Devoisia insulae*, *Terrabacter terrigena* y *Arthrobacter pascens* se encuentran en las muestras de suelo a partir

de establecimiento del pasto y se asocian a suelos de uso agrícola donde existen cultivos, ya que se involucran en diferentes procesos de ciclaje de nutrientes y control biológico (Roy y Kumar, 2020; Wang et al., 2019; Hassan, Lepp y Zhou, 2015; Lee et al., 2014; Weon et al., 2010; Yoon et al., 2009).

Las bacterias desempeñan un papel crucial en los ciclos de nutrientes, como el ciclo del nitrógeno. Entre ellas, las bacterias fijadoras de nitrógeno y las nitrificantes desempeñan un papel fundamental en el establecimiento de los cultivos. Estas bacterias tienen la capacidad de convertir el nitrógeno en formas absorbibles por las plantas, lo que resulta esencial para su crecimiento y desarrollo (Benimeli, et al., 2019; Celaya y Castellano, 2011).

En la Figura 12 se observa la distribución de ASVs identificados dentro de las principales especies bacterianas con funciones dentro del ciclo de N, ya sea fijación, nitrificación o denitrificación, presentes en las muestras analizadas. En las muestras de suelos abonados durante los primeros cuatro meses, se observó una mayor diversidad de estas bacterias, la mayoría de las cuales no fueron observadas en las muestras posteriores. Esto sugiere que el metabolismo de estas bacterias contribuyó a una mayor biodisponibilidad de nitrógeno, lo cual se puede relacionarse con la mayor producción de forraje durante estos primeros meses. Posteriormente, las dosis utilizadas no fueron suficientes para mantener la misma productividad. Cabe recalcar que en la mayoría de los casos estos abonos orgánicos son aplicados como complementarios a otros sistemas de fertilización inorgánica, y que, en el caso del vermicompost, su mayor efectividad se da cuando se utiliza en proporciones significativamente mayores que las utilizadas en este estudio (Blouin et al. 2019)

Las especies que pueden fijar, nitrificar o desnitrificar el N identificadas en este estudio pertenecen a las familias Nitrobacteraceae, Nitrospiraceae, Paenibacillaceae, Rhizobiaceae y Streptomycetaceae. Los géneros *Rhizobium* y *Mesorhizobium* pertenecientes a la familia Rhizobiaceae, son de los grupos de bacterias más conocidas en la fijación de nitrógeno, interactuando en asociaciones mutualistas en las raíces de las plantas, induciendo la formación de estructuras especiales en sus raíces, llamadas nódulos, en las que se produce el proceso de fijación (Maçik, Gryta y Fraç, 2020).

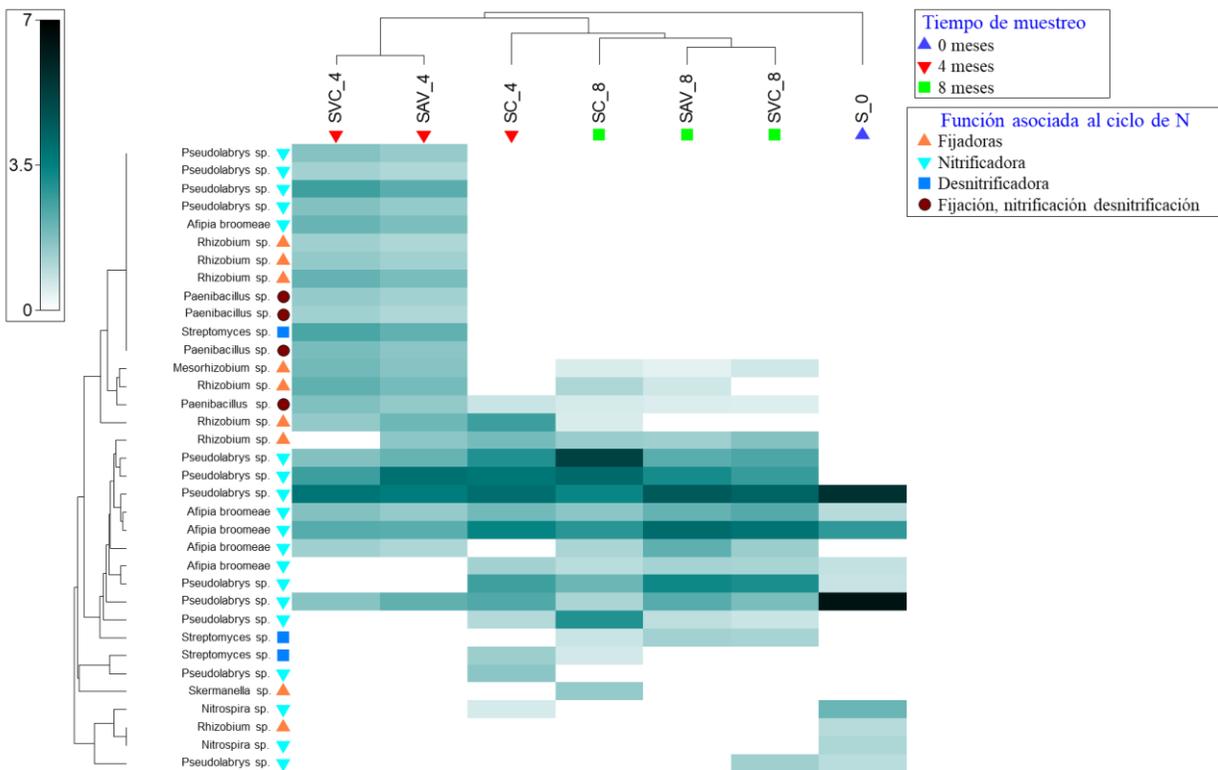
La especie *Nitrospira sp.* (fam. *Nitrospiraceae*) desempeña un papel fundamental en el ciclo de N debido a que oxida los nitritos a nitratos, biodisponiendo estos compuestos a la planta

ya que es de la forma que absorbe el N del suelo. Los ASVs clasificados como *Nitrospira* se encuentra mayoritariamente en el suelo inicial. La familia Streptomycetaceae realiza el proceso contrario, donde a partir de compuestos nitrificados dispone al suelo  $N_2$  como reserva para que posteriormente sea metabolizado por otros grupos de bacterias, y así continuar con el ciclo del N; además, se han evidenciado metabolitos bioactivos con características insecticidas, acaricidas, pesticidas entre otros, siendo una familia benéfica para la agricultura (Singh y Mazumdar, 2022; Dains y Wagner, 2018). El género *Paenibacillus* es ubicado en suelos a nivel mundial y se encuentra entre las bacterias promotoras de crecimiento. Se han identificado especies en este género con propiedades de fijación, nitrificación y desnitrificación (Karuriya & Choudhary, 2022; Liu et al., 2019).

Los ASVs identificados como *Pseudolabrys* y *Afipia*, ambos géneros de bacterias nitrificadoras pertenecientes a la familia Nitrobacteraceae, fueron los más abundantes de las bacterias del nitrógeno en estas muestras. Estas bacterias son conocidas por su capacidad para llevar a cabo la oxidación del nitrito a nitrato como parte del proceso de nitrificación, y han sido reportadas en suelos (Yu et al. 2022). Ambas especies fueron observadas en todas las muestras analizadas, sin embargo, se encontraron subpoblaciones exclusivas de cada tiempo de muestreo, lo que sugiere que las funciones relacionadas con el ciclo del nitrógeno se llevan a cabo en todas las muestras, pero a los cuatro meses hay una mayor diversidad de ASV's asociados a este ciclo. Esto podría permitir un mayor aprovechamiento de los nutrientes por parte de las plantas y podría haber influido en los resultados observados en términos de producción de biomasa; ya que no se evidenció diferencias significativas entre la nutrición de los suelos en los tres tratamientos con respecto a la aplicación de abonos orgánicos.

Al aplicar abonos orgánicos derivados de excretas de ganado, como las aguas verdes y el vermicompost como fuentes de nutrientes, se introducen simultáneamente ciertos grupos de bacterias presentes en estos abonos al suelo. Esto aumenta la disponibilidad de macro y micronutrientes, así como la actividad bacteriana en el suelo. A partir de esto, se desencadena una serie de transformaciones debido al metabolismo de las bacterias en el suelo, lo que permite que los nutrientes inicialmente no disponibles para las plantas se conviertan en

formas absorbibles, potenciando así el desarrollo de sistemas vegetativos como los pastos forrajeros (Roychowdhury, Mondal y Banerjee, 2016).



**Figura 11.** Gráfico de sombra de la distribución de los 36 ASV's identificados a nivel de especies relacionadas al ciclo de nitrógeno que tienen mayor significancia en la disimilitud entre las muestras analizadas, donde entre mayor concentración de color mayor abundancia relativa en las muestras

## 6. CONCLUSIONES

- Estadísticamente el tipo de tratamiento no presentó diferencias significativas entre los parámetros químicos del suelo evaluados, mientras que la variable del tiempo experimental tuvo diferencias significativas en el pH, la acidez y micronutrientes como el CA, Mg, K, ZN y Mn.
- La muestra de suelo aplicada con aguas verdes presento el menor porcentaje de nitrógeno en el suelo al cuarto mes con 0,32 %, mientras que en el suelo aplicado con vermicompost al octavo mes se observó el mayor con 0,45 %.
- En la corta número tres se obtuvo el mayor rendimiento de materia seca del forraje. El mayor rendimiento se observó en el suelo con vermicompost con 0,128 kg/m<sup>2</sup>, seguido del suelo aplicado con aguas verdes con 0.107 kg/m<sup>2</sup> y por último el suelo control con 0,098 kg/m<sup>2</sup>.
- Al cuarto mes se obtuvieron los mayores valores de N foliar, siendo el suelo con aguas verdes el más alto con 2,15 %, seguido del suelo control con 1,83 % y el suelo con vermicompost con 1,72 %.
- El suelo proveniente del bosque fue el más diverso según la cantidad de ASV's identificados con un índice de Shannon de 3,004. Los suelos control fueron los menos diversos en el mes cuatro y en el mes ocho con un índice de Shannon de 2,406 y 2,747 respectivamente.
- En las aguas verdes las Proteobacterias fueron las más abundantes con más del 50 %, mientras que las Actinobacterias predominaron en el vermicompost con un 30 %
- Las Actinobacterias, los Bacteroidetes y Proteobacterias fueron los filos con mayor abundancia en las muestras de suelos evaluadas y las que más varió su presencia entre tratamientos.
- Los suelos con aplicación de abonos orgánicos del cuarto mes presentaron la mayor diversidad de especies asociadas al ciclo del nitrógeno, entre ellas *Pseudolabrys* sp., y *Afipia broomeae* que cumplen un rol en la nitrificación de N orgánico.

## 7. RECOMENDACIONES

- Utilizar como suelo inicial también suelos agrícolas de lecherías para comparar la respuesta de las comunidades microbianas a la aplicación de abonos orgánicos y la disponibilidad de los nutrientes aportados por estas fuentes.
- Para próximas investigaciones con el mismo abordaje se debe agrandar el tamaño de muestra y repeticiones para aumentar la variabilidad de los datos. Además, de monitorear otras variables como la temperatura, la humedad y la lámina de riego durante el experimento.
- Evaluar diferentes dosificaciones en la aplicación de los abonos orgánicos, además de combinar con fertilización química en diferentes proporciones utilizando como base este estudio, con el fin de encontrar el punto óptimo de la utilización de este tipo de abono orgánico, que favorezca a la producción del forraje e impacte en los costos de producción.
- Considerar la secuenciación de las comunidades fúngicas presentes, ya que también tienen un papel dentro del ciclaje de nutrientes respondiendo a cambios en la biodisponibilidad de los nutrientes.
- Es importante estudiar más a fondo las bacterias relacionadas al ciclo del nitrógeno por medio de técnicas dependientes de cultivo, con el fin de analizar su influencia en la biodisponibilidad de este nutriente para los sistemas forrajeros, para un mayor aprovechamiento de las fuentes utilizadas.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Aczel, M. (2019). What is the nitrogen cycle and why is it key to life? *Frontiers from young mind*, vol. 7 (41).
- Ahamed, W., Jing, H., Kaillou, L., Qaswar, M., Numan, M., Jin, C., Geng, S., Qinghai, H., Yiren, L., Guangrong, L., Mei, S., Chao, L., Dongchu, L., Ali, S., Normatov, Y., Mehmood, S. y Zhang, H. (2019). Changes in phosphorus fractions associated with soil chemical properties under long-term organic and inorganic fertilization in paddy soils of southern China. *PLoS ONE*, vol. 14, no.5. Disponible en <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216881>
- Anahtar, M., Brouman, B., y Kwon D. (2006). Efficient Nucleic Acid Extraction and 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Community Characterization. *J. Vis* (110). doi:10.3791/53939
- Aranda S. y Vásconez G. (2022). Cationes de intercambio en un transecto de suelo derivado de materiales volcánicos y su relación con la acidez. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador. 81.
- Assefa, S. y Tadesse, S. (2019). The principal role of organic fertilizer on soil properties and agricultural productivity -a review. *Agricultural Research & Technology*, vol. 22, Issue 2. ISSN: 2471-6774.
- Beare, M., Reddy, M., Tian, G. y Srivastava, S. (1997). Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function in the tropics: the role of decomposer biota. *Applied Soil Ecology*, 6: 87-108.
- Becker, F., MacLaren, C., Brink, C., Jacobs, K., Remarque le Roux, M. y Swanepoel, P. (2020). High nitrogen rates do not increase canola yield and may affect soil bacteria function. *Agronomy Journal*, vol. 112, Issue 1. Disponible en <https://doi.org/10.1002/agj2.20066>
- Benimeli, M., Plasencia, A., Corbella, R., Guevara, D., Sanzano, A., Sosa, F. y De Ullivari, J. (2019). *El nitrógeno del suelo*. Cátedra de Edafología, Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Técnica Nacional de Tucumán.

- Bernhard, A. (2010). The nitrogen cycle: processes, players and human impact. *Nature Education knowledge* 3(10):5. Disponible en <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/the-nitrogen-cycle-processes-players-and-human-15644632/>
- Blouin, M., Barrere, J., Meyer, N., Lartigue, S., Barot, S. y Mathieu, J. (2019). Vermicompost significantly affects plant growth. A meta-analysis. *Agronomy for Sustainable Development*, vol. 39. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1007/s13593-019-0579-x>
- Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R. *et al.* (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol* 37, 852–857. Disponible en <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Boschini, C. y Elizondo, J. (2005). Determinación de la calidad y la producción de sorgo negro forrajero (*Sorghum almun*) en edades para ensilaje. *Agronomía Mesoamericana* 16(1): 29-36. <http://hdl.handle.net/10669/17773>
- Botero, R. (2021). Agricultura de precisión: su aplicación para la fertilización durante la siembra, establecimiento, mantenimiento, utilización y renovación de pasturas en suelos ácidos de América tropical. *Ergomix*. Disponible en <https://www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/agricultura-precision-aplicacion-fertilizacion-t47530.htm>
- Bukin, Y., Galachyants, Y., Morozov, I., Bukin, S., Zakharenko, A. y Zemskaya, T. (2019). The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Sci Data* 6, 190007. Disponible en <https://doi.org/10.1038/sdata.2019.7>
- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., van Themaat, E. y Schulze–Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol.64.
- Cai, L., Ye, L., Tong, A., Lok, S., y Zhang, T. (2013). Biased diversity metrics revealed by bacterial 16S pyrotags derived from different primer sets. *PLOS ONE* 8, e53649. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0053649>

- Cañedo M., Gramthan, T., Perreé, I., Rieradevall, M., Prat, N., Céspedes, R. y Martín, A. (2012). El mesocosmos sonda: recreación de un sistema fluvial bajo condiciones experimentales controladas. *Tecnología del Agua* 344.345. Barcelona, España.
- Cartes, G. (2013). *Degradación de suelos agrícolas y el SIRSD-S*. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias, Gobierno de Chile. Disponible en <https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2013/10/SueloAgricola201310.pdf>
- Castillo, A. y Ligarreto, G. (2010). Relación entre nitrógeno foliar y el contenido de clorofila, en maíz asociado con pastos en el Piedemonte Llanero colombiano. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, vol.11, no. 2. doi:10.21930/rcta.vol11\_num2\_art:202.
- Castro, E., Mojica, J., Carulla, J. y Lascano, E. (2018). Abonos verdes de leguminosas: integración en sistemas agrícolas y ganaderas del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, vol. 29, no. 3. Disponible en <https://doi.org/10.15517/ma.v29i3.31612>
- Chaparro, J., Sheflin, A., Manter, D. y Vivanco, J.M. (2012). Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. *Biol. Fert. Soils*, vol.48.
- Celaya, H. y Castellano, A. (2011). Mineralización de nitrógeno en el suelo de zonas áridas y semiáridas. *TERRA Latinoamericana* Vol. 29, no. 3. Disponible en <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57321283013>
- Cerón, L. y Aristizábal, F. (2012). Dinámica del ciclo de nitrógeno y fósforo en el suelo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. XIV, no. 1.
- Cerrato, M., Leblanc, H. y Kaneko, C. (2007). Potencial de mineralización de nitrógeno de bokashi, compost y lombricompost producido en la Universidad Earth. *Tierra Tropical*, 3 (2): 183-197. Disponible en <https://www.researchgate.net/publication/242088221>
- Chaoui, H. y Zibilske, L. (2003). Effects of earthworm casts and compost on soil microbial activity and plant nutrient availability. *Soil Biology and Biochemistry*, 35. Disponible en [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00279-1](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00279-1)

- Cheng, H., Yuan, M., Duan., Q., Sun, R., Shen, Y., Yo, Q. y Li, S. (2018). Influence of phosphorus patterns on the bacterial community in upland farmland. *Industrial crops and products*, vol. 155 (1). Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112761>
- Córdova, S., Cárdenas, R., Peña, J., Salgado, S., Castelán, M., Lobbit, C. y Vera, J. (2013). Fijación biológica de nitrógeno por cuatro fabáceas en suelos ácidos de Tabasco, México. *Rev. FCA UNCUYO* 45(1): 01-09. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=382837652001>
- Costa, K., Pereira, I., Faquín, V., Pereira, B., Rodrigues, C. y Menezes, F. (2007). Intervalo de cor intervalo de corte na produção de massa seca e composição... te na produção de massa seca e composição1197 químico-bromatológica da *Brachiaria brizantha* cv. mg-51. *Ciênc. agrotec., Lavras*, vol. 31, No. 4. Disponible en <https://www.scielo.br/pdf/cagro/v31n4/37.pdf>
- Costas, G. (2022). Microbiota y microbioma: concepto y diferencias. Disponible en <https://cienciaybiologia.com/microbiota-y-microbioma-concepto-y-diferencias/>
- Cuadrado, H., Torregrosa, L. y Garcés, H. (2005). Producción de carne con machos de ceba en pastoreo de pasto híbrido y mulato y *Brachiaria decumbens* en el Valle del Sinú. *MVZ-Córdoba*; 10:(1). Disponible en <https://www.researchgate.net/publication/26469498>
- Daims, H. y Wagner, M. (2018). Nitrospira. *Trends in Microbiology*, vol. 26 (5). Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.02.001>
- Del Rosario, M. y Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, vol. 22, no. 4.
- Doll, U., Araya, P., Soto-Cerda, L., Aedo, D. y Vizcarra, G. (2018). Litter production and composition in a young pre-Andean *Nothofagus glauca* forest of Maule Region. *Bosque* 39 (1). DOI: 10.4067/S0717-92002018000100151
- Durán, L. y Henríquez, C. (2007). Caracterización química, física y microbiológica de vermicompost producidos a partir de cinco sustratos orgánicos. *Agronomía Costarricense* 31(1): 41-51. ISSN:0377-9424.

- Elizondo, J. (2007). Producción y calidad de la biomasa de morera (*morís alba*) fertilizada con diferentes abonos. *Agronomía Mesoamericana*, 18(2): 255-261, ISSN: 1021-744.
- Espinosa, M., Limas, E., Rivera, P. y Romero, A. (2011). Degradación de suelos por actividades antrópicas en el norte de Tamaulipas, México. *Papeles de Geografía*, 53-54. Disponible en <https://www.redalyc.org/pdf/407/40721572006.pdf>
- Espinoza, Y., Gil, J., Obispo, N., Malpica, L. y Mujica, M. (2012). Capacidad suplidora de nitrógeno del suelo y la producción de biomasa de *Urochloa humidicola* fertilizada con estiércoles bovino y gallinaza. *Rev. Fac. Agron.* 38(3): 98-105. Disponible en <https://www.researchgate.net/publication/264613348>
- EZBioCloud (2019). 16S RRNA And 16S RRNA Gene. Disponible en <https://help.ezbiocloud.net/16s-rrna-and-16s-rrna-gene/>
- Feng, Y., Chen, R., Hu, L., Zhao, F., Wang, J., Chu, Y., Zhang, J., Dolfing, J. y Lin, X. (2015). *Bacillus asahii* comes to the fore in organic manure fertilized alkaline soils. *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 81, no. 2. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.11.021>
- Francioli, D., Schulz, E., Lentendu, G., Wubet, T., Buscot, F. y Reitz, T. (2016). Mineral vs. organic amendments: microbial community structure, activity and abundance of agriculturally relevant microbes are driven by long-term fertilization strategies. *Frontiers in Microbiology* 7:1446. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01446>
- Garro, J. (2016). *El suelo y los abonos orgánicos*. Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria, San José, Costa Rica. Disponible en <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/f04-10872.pdf>
- Gómez, F., Silva, H. y Pérez, P. (2010). *Bioinformática: aplicaciones a la genómica y proteómica*. Colegio de Postgraduados, México.
- Guamán, O. (2020). *Evaluación productiva de Dactylis Glomerata (pasto azul) mediante la utilización de tres fuentes orgánicas en un sistema silvopastoril*. (Trabajo experimental presentado como requisito para optar el grado académico de ingeniero zootecnista en la

Escuela Superior Politécnica de Chimborazo). Repositorio D Space ESPOCH, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador.

Gulzar, M., Mubashar, M., Yasmin, H., Shahzad, A., Malik, H., Lorenz, N., Abdullah, A., Dick, R. y Ali, N. (2021). Variation in archaeal and bacterial community profiles and their functional metabolic predictions under the influence of pure and mixed fertilizers in paddy soil. *Saudi J Biol Sci*, 28(11). Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8568845/>

Gutiérrez, E. (2021). Desarrollo de un clasificador bayesiano para análisis masivo de secuencias ribosomales 16S (Trabajo de tesis presentado para obtener el grado académico de maestro en ciencias de biotecnología en la Universidad Politécnica de Jiutepec). Universidad Politécnica de Jiutepec, México.

Guzmán, R., Beltrán, J., Montes, C. y Anaya, M. (2020). Efecto del abono orgánico líquido mineralizado en la producción y composición de forrajes para pastoreo. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, vol. 11, no. 2. ISSN 2145-6453.

Hassan, Y., Lepp, D. y Zhou, T. (2015). Genome Assemblies of Three Soil-Associated Devosia species: *D. insulae*, *D. limi*, and *D. soli*. *Genome Announc.* Vol 21 (3). Doi: 10.1128/genomeA.00514-15.

Henríquez, C. (2009). Crecimiento y reproducción de la lombriz roja (*Eisenia foetida*) en cinco sustratos orgánicos. *Agronomía Costarricense* 33(2): 275-281. ISSN:0377-9424. <https://www.researchgate.net/publication/43692905>

Hernández, A., Ojeda, D., López, J. y Arras, A. (2010). Abonos orgánicos y su efecto en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. *Tecnociencia Chihuahua* Vol. IV, no.1.

Hernández, T., Salcedo, E., Arévalo, G. y Galvis, A. (2007). Evaluación de la concentración de lignina como indicador de la capacidad de aporte de nitrógeno de residuos orgánicos. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 13(1): 5-13. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rcscfa/v13n1/2007-4018-rcscfa-13-01-5.pdf>

- Hernández, I., Saéñz, J., Luevanos, M. y Balagurusamy, N. (2014). *Metagenómica: concepto y aplicaciones en el mundo microbiano*. Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Coahuila, México. ISBN: 978-607-506-204-4.
- Huang, C. y Chen, Z. (2010). Carbon and nitrogen mineralization of sewage sludge compost in soils with a different initial pH. *Soil Science and Plant Nutrition*, 55:5. Disponible en <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2009.00410.x>
- Huse, S., Dethlefsen, L., Huber, J., Welch, D., Relman, D. y Sogin M. (2008). Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable Tag sequencing. *PLOS Genet.* e1000255. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1000255>
- InfoAgro (2017). Lombricompost, vermicompost o humus de lombriz. Disponible en <https://mexico.infoagro.com/lombricomposto-vermicompost-o-humus-de-lombriz/>
- Jakelaitis, A., Da Silva, A. y Ferreira, L. (2005). Efeitos do nitrogênio sobre o milho cultivado em consórcio com *Brachiaria brizantha*. *Acta Scientiarum, Biological Sciences*, 27(1). Disponible en <https://www.redalyc.org/comocitar.oa?id=187117080006>
- Jiang, G., Zhang, W., Xu, M., Kuzyakov, Y., Zhang, X., Wang, J., Di, J. y Murphy, D. (2018). Manure and mineral fertilizer effects on crop yield and soil carbon sequestration: A meta-analysis and modeling across China. *Global Biogeochemical Cycles*, vol. 32. <https://doi.org/10.1029/2018GB005960>
- Labrador M., J. 2001. *La materia orgánica en los agrosistemas*. Mundi-Prensa. Madrid, España. ISBN: 9788449102486.
- Kämpfer, P., Young, C., Arun, A., Jäckel, U., Rosselló, R., Lai, W: y Rekha, P. (2006). *Pseudolabrys taiwanensis* gen. nov., sp. nov., an alphaproteobacterium isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. vol. 56. (10). <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64124-0>
- Karuriya, S., & Choudhary, S. (2022). Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification potential of *Paenibacillus* sp. strain GLM-08 isolated from lignite mine waste and its role ammonia removal from mine waste water. *Water Science & Technology*, 86(12).

- Kim, H., Young, J., Yergeau, E., Yeon, C., Hizman, L., Nam, S., Gyu, S., Kim, O., Chun, J. y Lee, Y. (2014). Bacterial community structure and soil properties of a subarctic tundra soil in Council, Alaska. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 89. (2). <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12362>
- Khalil, A., Batool, A. y Arif, S. (2022). Healthy cattle microbiome and dysbiosis in diseased phenotypes. *Ruminants* 2(1). <https://doi.org/10.3390/ruminants2010009>
- Kwak, J., y An, Y. (2016). The current state of the art in research on engineered nanomaterials and terrestrial environments: different-scale approaches. *Environmental research*, vol. 151.
- Laiton, J. (2019). *Evaluación de tres especies de Brachiaria spp, bajo métodos de pastoreo rotacional, en Sabanas del Piedemonte del Municipio de Tame-Arauca*. (Tesis presentada como requisito parcial para la obtención del título de Magister en Sistemas Sostenibles de Salud Producción Animal Tropical, Universidad de los Llanos, Colombia). Repositorio Unillanos, disponible en <https://repositorio.unillanos.edu.co/bitstream/001/1426/2/EVALUACION%20DE%20TRES%20ESPECIES%20DE%20BRACHIARIA....pdf>
- Lascano, C., Pérez, R., Plazas, C., Medrano, J., Pérez, O., y Argel, P. (2002). Pasto Toledo (*Brachiaria brizantha* CIAT 26110), Gramínea de crecimiento vigoroso para intensificar la ganadería colombiana. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia. Disponible en <https://doi.org/10.13140/2.1.3614.5927>
- Lee, L., Zainal, N., Azman, A., Eng, S., Gog, B., Yin, W., Mutalib, N. y Chan, K. (2014). Diversity and Antimicrobial Activities of Actinobacteria Isolated from Tropical Mangrove Sediments in Malaysia. *The Scientific World Journal*, vol 2014. Disponible en <https://doi.org/10.1155/2014/698178>
- Lemus, G. (2008). *Análisis de productividad de pasturas en sistemas silvopastoriles en fincas ganaderas de doble propósito en Esparza, Costa Rica* (Tesis presentada ante el Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza como requisito para optar por el grado de Magíster Scientiae en Agroforestería Tropical del Centro Agronómico Tropical de Investigación y

- enseñanza). Repositorio CATIE, Costa Rica. Disponible en <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/4498>
- Lennon, J. y Jones, S. (2011). Microbial seed banks: the ecological and evolutionary implications of dormancy. Macmillan Publishers Limited, vol. 9. Doi:10.1038/nrmicro2504
- Liu, D., Huang, Y., Yan, H., Jiang, Y., Zhao, T. y An, S. (2018). Dynamics of soil nitrogen fractions and their relationship with soil microbial communities in two forest species for northern China. *PLOS ONE*, 13(5), e0196567. Disponible en <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196567>
- Liu, Z., DeSantis, T., Andersen, G. y Knight, R. (2008). Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers. *Nucleic Acids Res.* 36, e120–e120. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkn491>
- Liu, X., Li, Q., Li, Y., Guan, G., y Chen, S. (2019). Paenibacillus strains with nitrogen fixation and multiple beneficial properties for promoting plant growth. *PeerJ*, vol. 7.
- López, I. (2018). Microbioma humano: un universo en nuestro interior. *Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular*, Universidad de Navarra, España. Disponible en <https://revista.sebbm.es/articulo.php?id=500&url=microbioma-humano-un-universo-en-nuestro-interior>
- Maçik, M. Gryta A. y Fraç, M. (2020). Biofertilizers in agriculture: An overview on concepts, strategies and effects on soil microorganisms. *Advances in Agronomy*, vol. 163. Disponible en <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2020.02.001>
- Mendes, R., Kruijt, M., de Bruijn, I., Dekkers, E., van der Voort, M., Schneider, J., Piceno, Y., DeSantis, T., Andersen, G., Bakker, P. y Raaijmakers, J. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome. *Science*, vol.1097.
- Merlo, F., Ramírez, L., Ayala, A., Ku-Vera, J. (2017). Efecto de la edad de corte y la época del año sobre el rendimiento y calidad de *Brachiaria brizantha* (A. Rich.) Staff en Yucatán, México. *J. Selva Andina Anim Sci*, 4(2):116-127. Disponible en [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S231125812017000200004&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S231125812017000200004&lng=es&tlng=es).

- Miller, C., Handley, K., Wrighton, K., Frischkorn, K., Thomas, B. y Banfield, J. (2013). Short-read assembly of full-length 16S amplicons reveals bacterial diversity in subsurface sediments. *PLOS ONE* 8, e56018. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0056018>
- Monsalve, O., Gutiérrez, J. y Cardona, W. (2017). Factores que intervienen en el proceso de mineralización de nitrógeno cuando son aplicadas enmiendas orgánicas al suelo. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, vol. 11, No.1. Disponible en <http://dx.doi.org/10.17584/rcch.2017v11i1.5663>
- Moreno, F. y Molina, D. (2007). Manual Técnico de Buenas Prácticas Agropecuarias (BPA) en la producción de ganado de doble propósito bajo confinamiento con caña panelera como parte de la dieta. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, ISBN: 978-92-5-305921-8 .
- Moreno, A., García, V., Reyes, J., Vásquez, J. y Cano, P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. XX, núm. 1. Disponible en <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707>
- Moreno, M., Valladares, J. y Halabe, J. (2018). Microbioma humano. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, vol. 61, No. 6. Disponible en <http://dx.doi.org/10.22201.fm.24484865e.2018.61.6.02>
- Morgan, X. y Huttenhower, C. (2012). Human microbiome analysis. *PLoS Comput Biol* 8(12): e1002808. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002808>
- Mubarak, A., Gali, E., Mohamed, A., Steffens, D. y Awadelkarim, A. (2010). Nitrogen mineralization from five manures as influenced by chemical composition and soil types. *Communication in soil science and plant analysis*, 41 (16). Disponible en <http://dx.doi.org/10.1080/00103624.2010.495802>
- Muñoz, A. (2017). *Antibióticos en el suelo* (Trabajo de grado para optar el grado académico de farmacia en la Universidad Complutense). Biblioteca Complutense, Universidad Complutense, España.

- Nayfach, S. et al. (2020). A genomic catalog of Earth's microbiome. *Nature biotechnology*. Disponible en <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0718-6>
- Nieto, A., Murillo, B., Troyo, E. y Larrinaga, J. (2002). El uso de compostas como alternativa ecológica para la producción sostenible de chile (*Capsicum annuum L.*) en zonas áridas. *Interciencia* 27(8):417-421. [https://www.researchgate.net/publication/262751021\\_](https://www.researchgate.net/publication/262751021_)
- Ochoa, R. (2017). Consecuencias de las deposiciones de nitrógeno sobre la biodiversidad y el funcionamiento de los ecosistemas terrestres: una aproximación general de la ecología de ecosistemas. *Revista Científica de Ecología y Medio Ambiente*, 26(1). Disponible en Doi:10.7818/ECOS.2017.26-1.05
- Odum, E. (1984). The mesocosm. *BioScience*, 34(9).
- Olivera, Y., Manchado, R. y Pozo, P. (2006). Características botánicas y agronómicas de especies forrajeras importantes del género *Brachiaria*. *Pastos y Forrajes*, vol. 29, No. 1. Disponible en <http://www.pasturasdeamerica.com/articulos-interes/notas-tecnicas/caracteristicas-brachiaria/brachiaria.pdf>
- Onywera, H. y Meiring, T. (2020). Comparative analyses of Ion Torrent V4 and Illumina V3-V4 16S rRNA gene metabarcoding methods for characterization of cervical microbiota: taxonomic and functional profiling. *Scientific African*, vol. 7, e00278. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00278>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2015). *El suelo es un recurso no renovable*. Roma, Italia.<sup>1</sup>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2015). *Suelos Sanos para una vida sana*. Roma, Italia.<sup>2</sup>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2016). *Estado mundial del recurso del suelo*. Roma, Italia.
- Pacasa-Quisbert, F., Loza-Murguía, M., Bonafacio-Flores, B, Vino-Nina, L. y Serrano-Canaviri, T. (2017). Comunidad de hongos filamentosos en suelos del Agroecosistema de K'iphak'iphani, Comunidad Choquenaira-Viacha. *Journal of the Selva Andina Research Society*; 8(1):2-25.

- Pace, N., Stahl, D., Lane, D. y Olsen, G. (1986). *The analysis of natural microbial population by ribosomal RNA sequences*. Department of Biology and Institute for Molecular and Cellular Biology, Indiana University, Bloomington, Indiana 47405.
- Palacios, J. (2019). *Niveles críticos foliares en el pasto Brachiaria decumbens para la zona de Santo Domingo durante la época seca* (Trabajo previo para la obtención del título de ingeniero agropecuario de la Universidad UTE). Repositorio Sistema de Documentación de la Universidad UTE, Ecuador. Disponible en <http://repositorio.ute.edu.ec/handle/123456789/20350>
- Peiffer, J., Spor, A., Koren, O., Jin, Z., Tringe, S., Dangl, J., Buckler, E. y Ley, R. (2013). Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol.110.
- Penn, C. y Camberato, J. (2019). A Critical Review on Soil Chemical Processes that Control How Soil pH Affects Phosphorus Availability to Plants. *Agriculture*, 9, 120; doi:10.3390/agriculture9060120
- Petersen, J. y Englund, G. (2005). Dimensional approaches to design better experimental ecosystems. A practitioner's guide with examples. *Oecologia*, 145: 216–224. Disponible en <https://doi.org/10.1007/s00442-005-0062-z>
- Pezo, D. y García, F. (2018). Uso eficiente de fertilizantes en pasturas. Boletín Técnico no. 98, Repositorio CATIE, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Costa Rica. ISBN 978-9977-57-696-1
- Pizarro, H. (2015). Fertilización Orgánica. Disponible en <https://agriculturers.com/fertilizacion-organica/>
- Prasad, R. y Chakraborty, D. (2019). Phosphorus basic: Understanding phosphorus forms and their cycling in the soil. Alabama Cooperative System. Disponible en <https://www.aces.edu/blog/topics/crop-production/understanding-phosphorus-forms-and-their-cycling-in-the-soil/>

- Ramírez, K., Lauber, C., Knight, R., Bradford, M. y Fierer, N (2010). Consistent effect of nitrogen fertilization on soil bacterial communities in contrasting systems. *Ecology*, 91(12). Disponible en <https://doi.org/10.1890/10-0426.1>
- Ramos, D. y Terry, E. (2014). Generalidades de los abonos orgánicos: importancia del bocashi como alternativa nutricional para suelos y plantas. *Cultivos Tropicales*, 2014, vol. 35, no. 4. Disponible en <https://www.researchgate.net/publication/317519925>
- Red BioBancos (2011). PNT: extracción de ácidos nucleicos. Instituto de Salud Carlos III, España. Disponible en <https://redbiobancos.es/wp-content/uploads/pnt-extraccion-acidos-nucleicos.pdf>
- Regier, Y., Komma, K., Weigel, M., Kraiczy, P., Laisi, A., Pulliainen, A., Hain, T., Kempf, V. (2019). Combination of microbiome analysis and serodiagnostics to assess the risk of pathogen transmission by ticks to humans and animals in central Germany. *Parasites and vectors*, 12:11. Disponible en . <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3240-7>
- Rodríguez G., Patiño P.R., Altahona L., Gil J. 2011. Dinámica de crecimiento de pasturas con manejo rotacional en diferente topografía en un sistema de producción de carne vacuna en Córdoba, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*. 3: 47-61.
- Romero, J., Rodríguez, M., Gutiérrez, M. y Sánchez, J. (2013). Vermicompost como sustrato en la producción de menta (*Mentha piperita L.*). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, no. 5. ISSN: 2007-0934.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van der Mark, P., Ayres, D., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M., y Huelsenbeck, J. (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology*, Vol. 61, Issue 3. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Roy, P. y Kumar, A. (2020). *Beneficial Microbes in Agroecology*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00001-0>
- Roychowdhury D., Mondal S. y Banerjee, S. (2017). The Effect of Biofertilizers and the Effect of Vermicompost on the Cultivation and Productivity of Maize - A Review. *Adv Crop Sci Tech* 5: 261. Doi: 10.4172/2329-8863.1000261

- Salas, D. (2017). Manejo de suelos y enmiendas como base para la producción eficiente de forrajes. (Presentación con diapositivas). In Congreso Nacional Lechero (XXII, 2016). San José, Costa Rica.
- Sarma, P. y Das, D. (2015). Application of Shannon's Index to Study Diversity with Reference to Census Data of Assam. *Asian Journal of Management Research*, vol. 635.
- Salas, R. y Cabalceta, G. (sf). Manejo del Sistema Suelo – Pasto: partida para la producción de forrajes. Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
- Savin. K., Zawadzki. J., Auld. M., Wang. J., Ram. D., Rochfort, S. y Cocks, B. (2019). Faecalibacterium diversity in dairy cow milk. *PLoS One*, vol.14 (8). doi: 10.1371/journal.pone.0221055. PMID: 31419254; PMCID: PMC6697359.
- Singh, P. y Mazundar, P. (2022). *Microbial pesticides: trends, scope and adoption for plant and soil improvement*. *Advances in Bio-Inoculants*, vol. 2. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823355-9.00023-7>
- Stewart, R., Dossena, R., Bohan, D., Jeppesen, E., Kordas, R., Ledger, M., Meerhoff, M., Moss, B., Mulder, C., Shurin, J., Suttle, B., Thompson, R., Trimmer, M. y Woodward, G. (2013). *Advances in Ecological Research*, vol. 48. Disponible en <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417199-2.00002-1>
- Sylvia, D., Fuhrmann, J., Hartel, P. y Zuberer, D. (2005). Principles and applications of soil microbiology, 2nd edition. Prentice Hall, New Jersey, Estados Unidos.
- Tanabe, A. y Toju, H. (2016). Two new computational methods for universal DNA barcoding: a benchmark using barcode sequences of bacteria, archaea, animal, fungi and land plants. *PLOS ONE*, 11(3), e0152242. Disponible en <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152242>
- Tao, C., Li, R., Xiong, W., Shen, Z., Liu, S., Wang, B., Ruan, Y., Geisen, S., Shen, Q. y Kowalchuk, G. (2022). Bio-organic fertilizers stimulate indigenous soil *Pseudomonas* populations to enhance plant disease suppression. *Microbiome*, vol. 137. Disponible en <https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-020-00892-z>

- Taylor, J., Sichel, S. y Salama, N. (2019). Bent Bacteria: A Comparison of Cell Shape Mechanisms in *Proteobacteria*. *Annue Rev Microbial*, vol. 8 (73). DOI: 10.1146/annurev-micro-020518-115919.
- Tokala, R., Strap, J., Jung, C., Crawford, D., Salove, M. y Deobald, L. (2002). Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisumsativum*). *Appl. Environ. Microbiol*, vol. 68.
- Torres, E., Cortes, J., Mejía, E., Exebio, A., Santos, A. y Delgadillo, M. (2003). Evaluación de la degradación de suelos en la cuenca “El Josefino” Jesús María, Jalisco. *TERRA Latinoamericana* Vol. 21, no. 1. Disponible en <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57321114>
- Trejo, H., Salazar, E., López, J. y Vázquez, C. (2013). Impacto del estiércol bovino en el suelo y producción de forraje de maíz. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* Vol. 4, no.5. <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v4n5/v4n5a6.pdf>
- Valenzuela, F., Casilla, R., Villalpando, E. y Vargas, F. (2015). *Ciencias Marinas*, 41(4): 297-313. Disponible en <http://dx.doi.org/10.7773/cm.v41i4.2492>
- Verhagen, F., Duyts, H. y Laanbroek, H. (1992). Competition for ammonium between nitrifying and heterotrophic bacteria in continuously percolated soil columns. *Applied and environmental microbiology* V. 58 (10). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC183095/pdf/aem00051-0103.pdf>
- Wang, G., Wang, Y., Ji, F., Xu, L., Yu, M., Shi, J. y Xu, J. (2019). Biodegradation of deoxynivalenol and its derivatives by *Devosia insulae* A16. *Food Chemistry*, vol. 276 (15). Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.011>
- Wang, H., Xu, J., Liu, X., Zhang, D., Li, L., Li, W. y Sheng, L. (2019). Effects of long-term application of organic fertilizer on improving organic matter content and retarding acidity in red soil from China. *Soil and Tillage Research*, vol. 195. ISSN 0167-1987.
- Wang, J., Song, Y., Ma, T., Raza, W., Howland, J. G., Huang, Q. y Shen, Q. (2017). Impact of organic and inorganic fertilization treatments on bacterial and fungal communities in a paddy soil. *Soil Ecology*, vol. 112.

- Wang, Q., Wang, C., Yu, W., Turak, A., Chen, D., Huang, Y., Ao, J., Jiang, Y. y Huang, Z. (2018). Effects of Nitrogen and Phosphorus Inputs on Soil Bacterial Abundance, Diversity, and Community Composition in Chinese Fir Plantations. *Sec Terrestrial Microbiology*, vol. 9. Disponible en <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01543>
- Ward, N., Challacombe, J., Janssen, P., Henrissat, B., Coutinho, P. y Wu, M. (2009). Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol.75.
- Wei, X., Zhu, Z., Liu, Y., Luo, Y., Deng, Y., Xu, X., Liu, S., Richter, A., Shibistova, O., Guggenberger, G., Wu, J. y Ge, T. (2020). C: N: P stoichiometry regulates soil organic carbon mineralization and concomitant shifts in microbial community composition in paddy soil. *Biol Fertil Soils* 56. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01468-7>
- Wilson, M. y Piel, J. (2013). Metagenomic Approaches for Exploiting Uncultivated Bacteria as a Resource for Novel Biosynthetic Enzymology. *Chemistry and Biology* 20. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.04.011>
- WingChing, R., Rojas, A. y Quan, A. (2005). Nitrógeno orgánico y químico en sorgo negro con cobertura permanente de maní forrajero. Características nutritivas y de producción. *Agronomía Costarricense*, 29(1): 29-39, ISSN:0377-9424.
- WingChing, R., y Uribe, L. (2016). Biomasa y actividad microbiana en suelos de uso ganadero y en regeneración de bosque. *Cuadernos de Investigación UNED*, 8(1), 106-114.
- Weon, H., Kwon, S., Son, J., Kim, S., Kim, Y., Kim, J. y Ka, J. (2010). *Adhaeribacter aerophilus* sp. Nov., *Adhaeribacter aerolatus* sp. Nov. And *Segetibacter aerophilus* sp. Nov., isolated from air samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 60. Disponible en <https://doi.org/10.1099/ijs.0.018374-0>
- Wong, K., Shaw, T., Oladeinde, A., Glenn, T., Oakley, B. y Molina, M. (2016) Rapid microbiome changes in freshly deposited cow feces under field conditions. *Front in Microbiol.*, vol. 7:500. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00500>
- Yan, H., Zhou, X., Zheng, K., Gu, S., Yu, H., Ma, K., Zhao, Y., Wang., Y., Zheng, H., Liu, H., Shi, D., Lu, G. y Deng, Y. (2023). Response of organic fertilizer application to soil

microorganisms and forage biomass in grass–legume mixtures. *Agronomy* 13(2). Disponible en <https://doi.org/10.3390/agronomy13020481>

Yoon, J., Park, S., Kang, S., Jung, Y. y Kim, W. (2009). *Terrabacter terrigena* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 59. DOI: 10.1099/ijms.0.010553-0

Yoon, S., Ha, S., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., y Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(5), 1613–1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>

Yu, F., Jayawardena, R., Thongklang, N., Lu, M., Zhu, X, y Zhao, Q. (2022). Morel production associated with soil nitrogen-fixing and nitrifying microorganisms. *Journal of Fungi*, vol. 8(3).

Zhang, L., Loh, K., Wei, J., Zhang, J. (2019). Bioinformatics analysis of metagenomics data of biogas-producing microbial communities in anaerobic digesters: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 100, ISSN 1364-0321.

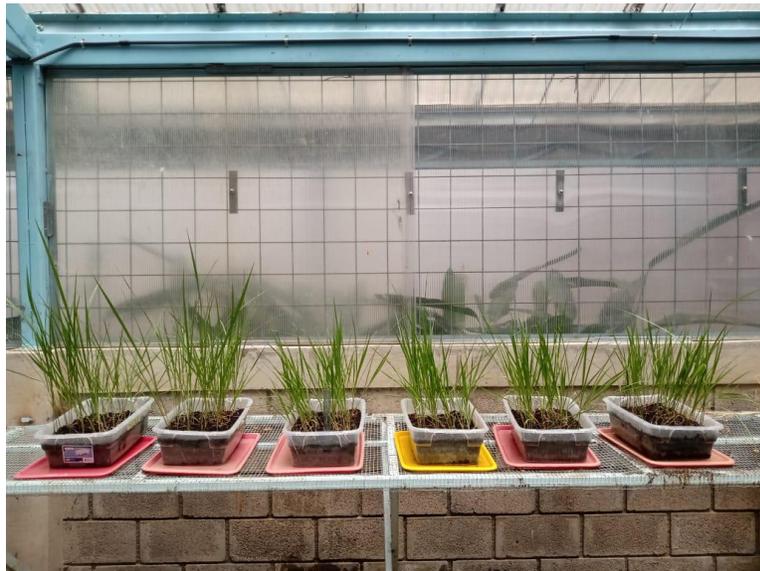
Zhang, S., Sun, L., Wang, Y., Fan, K., Xu, Q., Li, Y., Ma, Q., Wang, J., Ren, W. y Ding, Z. (2020). Cow manure application effectively regulates the soil bacterial community in tea plantation. *BMC Microbiol* 20, 190. Disponible en <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01871-y>

Zhang, Y., Thomas, B. y Hao, X. (2018). Long-term and legacy effects of manure application on soil microbial community composition. *Biology and fertility soil*, vol. 54, no. 2. DOI:10.1007/s00374-017-1257-2

## 9. ANEXOS



**Anexo 1.** Recolección de las aguas verdes del tanque en la Finca Los Lirales, la cual se utilizó como abono orgánico para los tratamientos SAV durante el proyecto



**Anexo 2.** Establecimiento de los mesocosmos con el forraje de *Brachiaria brizantha* en el invernadero donde se mantuvo durante el período de experimentación

**Anexo3.** Rangos recomendados para cada una de las variables analizadas en el análisis de suelo con solución extractora (para los elementos y determinación de acidez intercambiable) KCl-Olsen Modificado (CIA; UCR)

Análisis	Nivel	
	Mínimo	Máximo
pH (cmol (+)/l)	5,5	7
Acidez (cmol (+)/l)	0	0,5
Ca (cmol (+)/l)	4	
Mg (cmol (+)/l)	1	40
K (cmol (+)/l)	0,2	1,5
CICE (cmol (+)/l)	5	40
SA (%)	0	10
P (mg/L)	10	100
Zn (mg/L)	3	10
Cu (mg/L)	2	50
Fe (mg/L)	10	500
Mn (mg/L)	5	100
CE (mS/cm)	0,5	2
C (%)	1	3
N (%)	0,1	0,4
C:N (%)	10	15

**Anexo 4.** Parámetros temperatura y humedad registrados en el período de funcionamiento del equipo

Parámetro	Valor
Cantidad de tomas	4526
Intervalo de tomas	30 minutos
Fecha inicial	13/10/2021
Fecha final	15/12/2021
T <sub>máx</sub> (°C)	16,3
T <sub>min</sub> (°C)	29,9
T <sub>prom</sub> (°C)	26,4
HR <sub>máx</sub> (%)	74,9
HR <sub>min</sub> (%)	22,1
HR <sub>prom</sub> (%)	41,7