

eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

## **Tesis Doctoral**

# BIODESINFECCIÓN EN CULTIVOS HORTÍCOLAS MEDIANTE EL EMPLEO DE SUBPRODUCTOS AGROINDUSTRIALES: UN ENFOQUE DE ECONOMÍA CIRCULAR PARA LA MEJORA DE SUELOS

**Maite Gandariasbeitia López**

Directores:

Santiago Larregla del Palacio

José Antonio López Pérez

2023



## RESUMEN

La agricultura convencional, basada en el monocultivo y la aplicación de agroquímicos para el aumento del rendimiento, es el sistema productivo más extendido y practicado durante las últimas décadas. Sin embargo, esta forma de manejo queda muy alejada de la visión del suelo como un sistema vivo. En consecuencia, actualmente, la producción agrícola se está viendo amenazada por el incremento de enfermedades en los cultivos, especialmente por patógenos de suelo. Esto, unido a la progresiva prohibición de muchos fumigantes sintéticos por su peligrosidad para el medio ambiente y la salud humana, obligan a la búsqueda de alternativas más sostenibles y comprometidas con la salud. La biodesinfección del suelo, que consiste en la aplicación de materia orgánica y el posterior acolchado plástico habiendo humedecido antes el suelo, se presenta como una práctica sostenible y respetuosa con el medio ambiente que considera el suelo como un sistema vivo.

En este trabajo se evaluó el efecto de la biodesinfección para el control del nematodo fitopatógeno *M. incognita* y el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (FOLac), principalmente, en explotaciones comerciales de lechuga afectadas en la Comunidad Autónoma del País Vasco, una región climática templada. Esta práctica suele aplicarse con éxito en regiones cálidas debido al efecto probado de las altas temperaturas en el control de patógenos. En el caso de las regiones climáticas con baja radiación solar, se intenta mejorar el efecto de la biodesinfección mediante la generación de condiciones anaerobias por saturación y por la aplicación de materia orgánica fácilmente degradable. En este trabajo se probaron diferentes subproductos de la industria agroalimentaria (torta de colza, bagazo de cerveza, salvado de trigo y cáscara de pipa de girasol) como enmiendas orgánicas en combinación con estiércol fresco o compost. Los tratamientos de biodesinfección evaluados en este trabajo mostraron resultados positivos tanto en el control de los patógenos como en la mejora del rendimiento del cultivo siguiente. La biodesinfección, además de contribuir a incrementar la disponibilidad de nutrientes en el suelo, provocó cambios en la microbiota edáfica favoreciendo a poblaciones asociadas a suelos sanos y supresores o reconocidas como beneficiosas para el cultivo. Además, el empleo de subproductos agroindustriales de proximidad en este tipo de tratamientos reduce la acumulación de residuos y el gasto de recursos promoviendo una economía circular necesaria en un sistema de consumo tan intenso como el actual.

A través de este trabajo se pudo concluir que los subproductos agroindustriales tienen potencial para aplicarse con éxito como enmiendas orgánicas en los tratamientos de biodesinfección. Además, su incorporación en la mezcla ayuda en la disminución de la dosis de aplicación de estiércol. También se pudo comprobar que estos tratamientos pueden aplicarse con éxito en áreas geográficas donde la radiación solar puede ser limitante. Por todo ello, la biodesinfección incluyendo subproductos de la industria agro-alimentaria como enmiendas orgánicas puede ser una alternativa rentable y sostenible que ayude a contribuir en la mejora de los suelos agrícolas en diferentes áreas geográficas con diferentes condiciones climáticas y disponibilidad de subproductos.

## ABSTRACT

Conventional agriculture, based on monoculture and the application of agrochemicals to increase yield, is the most widespread and practiced production system for the last decades. However, this management does not consider soil as a living system and, currently, the increase in crop diseases, especially by soil pathogens, threatens agricultural production. Moreover, several synthetic pesticides have been banned or restricted because many of them represent a risk for the environment and the human health. This scenario leads to the search for more sustainable and health-friendly alternatives. Soil biodisinfestation, which consists of the incorporation of organic matter and subsequent plastic mulch, having previously moistened the soil, is presented as a sustainable and environmentally friendly practice that considers the soil as a living system.

In this work, the effect of biodisinfestation was assessed for the control of the phytopathogenic nematode *M. incognita* and the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (FOLac), mainly, in affected commercial lettuce farms in the Basque Country, a temperate climatic region. This practice is successfully applied in warm regions because of the proven effect of high temperatures against pathogens. In climatic regions with low solar radiation, anaerobic conditions may compensate the lack of high temperatures in biodisinfestation treatments. Anaerobic conditions can be achieved through soil saturation and the addition of easily degradable organic matter. In this work, different agricultural by-products (rapeseed cake, beer bagasse, wheat bran and sunflower seed husk) were assessed as organic amendments combined with fresh cow manure or compost. The biodisinfestation treatments evaluated in this work showed positive results in both pathogens control and yield improvement. Biodisinfestations contributed increasing soil nutrients availability and restructured soil microbiota promoting some organisms associated with healthy and suppressive soils or recognized as biostimulants. In addition, the use of agro-industrial by-products of proximity in biodisinfestation treatments reduces the generation of waste and the expense of resources, promoting a circular economy necessary in a consumption system as intense as the current one.

The results of this work enabled to conclude that agro-industrial by-products have the potential to be successfully applied as organic amendments in biodisinfestation treatments. Furthermore, the incorporation of these amendments helps to reduce the dose of manure. It was also found that these treatments can be successfully applied in geographical areas in which solar radiation may be a limiting factor. For all these reasons, biodisinfestation treatments with agricultural by-products as organic amendments can be a profitable and sustainable alternative that helps to improve agricultural soils in different geographical areas with different climatic conditions and availability of by-products.



## LABURPENA

Monolaborantza eta errendimendua handitzeko agrokimikoen erabileran oinarritutako nekazaritza konbentzionala, azken hamarkadetan gehien hedatu eta praktikatu den ekoizpen-sistema dugu. Hala ere, lurra maneiatzeko eredu hau lurzorua sistema bizitzat hartzetik urruti dago. Praktika honek eragindako labore-gaixotasunen gorakadak, batez ere lurzoru patogenoei lotutako gaitzek, gaur egungo nekazaritza-ekoizpena arriskuan jartzen ari dira. Honetaz gain, ingurumen zein giza-osasunerako arrisku bat suposatzen duten fumigatzaile sintetiko askoren erabilera mugatzen ari da, eta honek osasunarekin konprometitutako alternatiba garbiak bilatzera behartzen gaitu. Lurzoruaren desinfekzioa, nekazal-lurra humeldu ondoren materia organikoa gehitu eta hau plastiko bidez estaltzean datzan praktika, lurzorua sistema bizi gisa tratatzen duen irtenbide jasangarritzat aurkezten da.

Lan honetan, biodesinfekzioak *M. incognita* nematodo fitopatogenoa eta *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lactucae* (FOLac) onddoa kontrolatzeko orduan duen eragina aztertu zen, batik bat eskualde klimatiko epela den Euskal Autonomia Erkidegoan kaltetutako letxuga-ustiategi komertzialetan. Praktika hau arrakastaz ematen da eskualde beroetan, tenperatura altuek patogenoen kontrolean duten eragin frogatua dela eta. Hala ere, eguzki-erradiazio txikia duten eskualde klimatikoen kasuan, biodesinfekzioaren eragina hobetzen saiatu beharra dago prozesuan zehar baldintza anaerobioak faboratuz, zein erraz degradatu daitekeen materia organikoa gehituz. Ikerketa honetan, nekazal-industriako hainbat azpiproduktu probatu ziren (koltza-opila, garagardo-patsa, gari-salbatzea eta ekilore-pipa oskola), simaur freskoarekin edo konpostarekin konbinatuta materia organiko gehigarri gisa. Ikerketan ebaluatutako biodesinfekzio-tratamenduek emaitza positiboak izan zituzten, bai patogenoak kontrolatu, zein ondorengo laborearen errendimendua hobetzeari dagokionez. Biodesinfekzioak, lurzoru mantengaiaren eskuragarritasuna handitzeaz gain, mikrobiota edafikoan aldaketak eragin zituen, lurzoru osasuntsu eta ezabatzaileei edo laborantzarako onuragarritzat jotzen diren mikroorganismoek mesede eginez. Gainera, aztertutako tratamenduetan hurbileko nekazal sektoreko azpiproduktuak erabiltzeak hondakinen metaketa eta baliabideen gastua murriztea baimentzen du, gaur egungo kontsumo-sistema bizian ezinbestekoa den ekonomia zirkularra sustatuz.

Lortutako emaitzetatik, nekazal-industriako azpiproduktuek biodesinfekzio tratamenduetan zuzenketa organiko gisa arrakastaz jarduteko ahalmena dutela ondorioztatzen da. Gainera, hondakin hauetaz baliatzeak simaurra aplikatzeko dosia gutxitzen ere lagundu dezake. Halaber, azpiproduktu bitarteko tratamenduek eguzki-erradiazio mugatzailea izan dezaketen eremu geografikoetan ere frogatu dute haien eraginkortasuna. Honegatik guztiagatik, nekazal sektoreko azpiproduktuak gehigarri organiko gisa erabiltzen dituen biodesinfekzioa, alternatiba errentagarri bezain jasangarria dela esan daiteke, baldintza klimatiko eta gertuko azpiproduktu desberdinak dituzten hainbat eremu geografikotako nekazal-lurrak hobetzen laguntzeko orduan.



## ABREVIATURAS

<b>AGV</b>	Ácidos grasos volátiles
<b>AEMET</b>	Agencia Española de Meteorología
<b>ANOVA</b>	<i>Analysis of variance</i> / Análisis de la varianza
<b>ANOSIM</b>	<i>Analysis of similarity</i> / Análisis de similitud
<b>ARYL</b>	Arilsulfatasa
<b>ASD</b>	<i>Anaerobic soil disinfection</i> / Desinfección anaerobia del suelo
<b>ASV</b>	<i>Amplicon sequence variant</i> / Variantes de secuencia del amplicón
<b>AWCD</b>	<i>Average well color development</i> / Desarrollo medio del color del pocillo
<b>Ba</b>	Bacteriófagos
<b>BC</b>	Bagazo de cerveza
<b>BF</b>	Biofence®
<b>CAPV</b>	Comunidad Autónoma del País Vasco
<b>CBM</b>	Carbono de la biomasa microbiana
<b>CE</b>	Conductividad eléctrica
<b>CLPP</b>	<i>Community-level physiological profiles</i> / Perfiles fisiológicos a nivel de comunidad
<b>COM</b>	Compost
<b>COP</b>	Compuesto orgánico persistente
<b>COS</b>	Carbono orgánico soluble
<b>cp</b>	Colonizador-persistente
<b>CPG</b>	Cáscara de pipa de girasol
<b>DDT</b>	Dicloro difenil tricloroetano
<b>EE</b>	Error estándar
<b>EFV</b>	Estiércol fresco vacuno
<b>FAO</b>	<i>Food and Agriculture Organization</i> / Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
<b>FOL</b>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
<b>FOLac</b>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i>
<b>Fu</b>	Fungívoros
<b>GAL</b>	Galactosidasa
<b>GLU</b>	Glucosidasa
<b>He</b>	Herbívoros
<b>ISO</b>	<i>International Organization for Standardization</i> / Organización Internacional de Estandarización

<b>ITC</b>	Isotiocianato
<b>J (1, 2, 3, 4)</b>	Juveniles (1, 2, 3, 4)
<b>MAPA</b>	Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación
<b>MBTOC</b>	<i>Methyl Bromide Technical Options Committee</i> / Comité de Opciones Técnicas sobre el Bromuro de Metilo
<b>NINJA</b>	<i>Nematode indicator joint analysis</i> / Análisis conjunto de indicadores de nematodos
<b>NMDS</b>	<i>Non-metric multidimensional scaling</i> / Análisis de escalamiento multidimensional no métrico
<b>NPM</b>	Nitrógeno potencialmente mineralizable
<b>NUS</b>	<i>Number of substrates used</i> / Número de sustratos usados
<b>Om</b>	Omnívoros
<b>OTU</b>	<i>Operational taxonomic unit</i> / Unidad taxonómica operativa
<b>PAC</b>	Fosfatasa ácida
<b>PAK</b>	Fosfatasa alcalina
<b>PCA</b>	<i>Principal component analysis</i> / Análisis de componentes principales
<b>PERMANOVA</b>	<i>Permutational multivariate analysis of variance</i> / Análisis de la varianza multivariado con permutaciones
<b>PCR - qPCR</b>	<i>Polymerase chain reaction - quantitative PCR</i> / Reacción en cadena de la polimerasa - PCR cuantitativa
<b>PGPF</b>	<i>Plant growth promoting fungi</i> / Hongos promotores del crecimiento de la planta
<b>PGPM</b>	<i>Plant growth promoting microorganisms</i> / Microorganismos promotores del crecimiento de la planta
<b>PGPR</b>	<i>Plant growth promoting rhizobacteria</i> / Rizobacterias promotoras del crecimiento de la planta
<b>PNP</b>	Para-nitrofenol
<b>Pr</b>	Predadores
<b>Q (1, 2, 3)</b>	Cuartil (1, 2, 3)
<b>RDA</b>	<i>Redundancy analysis</i> / Análisis de redundancia
<b>RSD</b>	<i>Reductive soil disinfestation</i> / Desinfección reductora del suelo
<b>ST</b>	Salvado de trigo
<b>TC</b>	Torta de colza
<b>TIF</b>	<i>Total impermeable film</i> / Lámina totalmente impermeable
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>URE</b>	Ureasa
<b>USEPA</b>	<i>United States Environmental Protection Agency</i> / Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos

# ÍNDICE

<b>1. Antecedentes</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Introducción</b> .....	<b>7</b>
2.1. Cultivo de lechuga en el contexto global .....	9
2.1.1. Formas de cultivo.....	11
2.1.1.1. Cultivo extensivo al aire libre.....	11
2.1.1.2. Cultivo intensivo en invernadero .....	11
2.1.2. Sistemas de producción.....	12
2.1.2.1. Producción convencional.....	12
2.1.2.2. Producción integrada .....	12
2.1.2.3. Producción ecológica .....	13
2.2. Cultivo de lechuga en la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV) .....	13
2.3. Principales enfermedades de suelo en cultivo de lechuga de la CAPV .....	15
2.3.1. Nematodo <i>Meloidogyne incognita</i> .....	15
2.3.2. Hongo <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i> .....	18
2.4. Tratamientos de desinfección del suelo .....	20
2.4.1. Fumigantes sintéticos.....	21
2.4.2. Esterilización por vapor.....	21
2.4.3. Control biológico .....	22
2.4.4. Biodesinfección .....	23
2.4.4.1. Biosolarización.....	24
2.4.4.2. Biofumigación.....	25
2.4.4.3. Desinfección anaerobia .....	26
2.5. Subproductos agroindustriales como enmiendas para biodesinfección .....	27
2.6. El suelo .....	29
2.6.1. Salud del suelo y supresividad .....	31
2.6.2. Indicadores físicos.....	32
2.6.3. Indicadores químicos.....	33
2.6.4. Indicadores biológicos .....	34
2.6.4.1. Biomasa microbiana.....	35
2.6.4.2. Actividad microbiana.....	36
2.6.4.3. Comunidades microbianas .....	38

<b>3.</b>	<b>Hipótesis y Objetivos</b> .....	<b>45</b>
3.1.	Hipótesis.....	47
3.2.	Objetivo Principal.....	47
3.3.	Objetivos Específicos.....	47
<b>4.</b>	<b>Procedimientos Generales</b> .....	<b>49</b>
4.1.	Ubicación de los ensayos y condiciones climáticas.....	51
4.1.1.	Explotación 1.....	53
4.1.2.	Explotación 2.....	53
4.1.3.	Instalaciones NEIKER-BRTA.....	55
4.2.	Patógenos de suelo evaluados.....	55
4.2.1.	<i>Meloidogyne incognita</i> .....	55
4.2.1.1.	Identificación y cuantificación.....	55
4.2.1.2.	Evaluación de enfermedad.....	59
4.2.2.	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i> .....	61
4.2.2.1.	Identificación y cuantificación.....	61
4.2.2.2.	Origen y producción de inóculo.....	62
4.2.2.3.	Evaluación de enfermedad.....	63
4.3.	Enmiendas y subproductos empleados.....	64
4.3.1.	Estiércol fresco.....	64
4.3.2.	Compost.....	64
4.3.3.	Bagazo de cerveza.....	65
4.3.4.	Torta de colza.....	65
4.3.5.	Cáscara de pipa de girasol.....	66
4.3.6.	Salvado de trigo.....	68
4.3.7.	Pellets de semilla de <i>Brassica carinata</i> (Biofence).....	68
4.4.	Procedimiento de biodesinfección.....	69
4.5.	Muestreo y procesado de muestras.....	70
4.6.	Caracterización fisicoquímica de suelos y enmiendas.....	72
4.7.	Parámetros medidos durante la biodesinfección.....	73
4.7.1.	Temperatura.....	73
4.7.2.	Redox y pH.....	73
4.8.	Variables productivas.....	74
4.8.1.	Producción.....	74

4.8.2.	Variables nutricionales en hoja .....	74
4.9.	Variables biológicas.....	75
4.9.1.	Respiración del suelo.....	75
4.9.2.	Carbono de la biomasa microbiana (CBM).....	76
4.9.3.	Carbono orgánico soluble (COS) .....	77
4.9.4.	Nitrógeno potencialmente mineralizable (NPM).....	77
4.9.5.	Actividades enzimáticas .....	78
4.9.6.	Perfiles fisiológicos a nivel de comunidad bacteriana (Biolog EcoPlates™).....	80
4.9.7.	Nematofauna.....	82
4.9.8.	Comunidades de bacterias y hongos .....	84
4.10.	Tratamiento de datos .....	85
4.10.1.	Análisis de datos de temperatura y redox.....	85
4.10.2.	Análisis de datos univariantes .....	86
4.10.3.	Análisis de datos multivariantes.....	86
<b>5.</b>	<b>Evaluación de supresividad contra <i>M. incognita</i> tras biodesinfección de suelo con subproductos en cultivo de lechuga bajo invernadero .....</b>	<b>89</b>
5.1.	Introducción.....	91
5.2.	Materiales y métodos.....	93
5.3.	Resultados y discusión .....	100
<b>6.</b>	<b>Aplicación de diferentes mezclas de subproductos agroindustriales para biodesinfección de suelos contra <i>M. incognita</i> en cultivo de lechuga bajo invernadero .....</b>	<b>117</b>
6.1.	Introducción.....	119
6.2.	Materiales y métodos.....	122
6.3.	Resultados y discusión .....	130
<b>7.</b>	<b>Evaluación en condiciones controladas de diferentes estrategias de biodesinfección contra <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i>.....</b>	<b>161</b>
7.1.	Introducción.....	163
7.2.	Materiales y métodos.....	165
7.3.	Resultados y discusión .....	172
<b>8.</b>	<b>Incorporación de compost tras biodesinfección de suelo con subproductos agroindustriales contra <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i> y <i>M. incognita</i> en explotación de lechuga bajo invernadero .....</b>	<b>191</b>
8.1.	Introducción.....	193
8.2.	Materiales y métodos.....	195

8.3. Resultados y discusión .....	202
<b>9. Discusión General.....</b>	<b>243</b>
<b>10. Conclusiones y Tesis .....</b>	<b>265</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>271</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>296</b>
Anexo 1.1. Abundancia relativa de nematodos.....	296
Anexo 1.2. Abundancia relativa de bacterias.....	298
Anexo 1.3. Abundancia relativa de hongos .....	317







# CAPÍTULO 1



## Antecedentes



Primavera en Barbizon (1868-1873). Jean-François Millet





# 1. Antecedentes

---

Se estima que la agricultura lleva ligada al ser humano, al menos, 10.000 años y hace unos 5.000 que, junto con la ganadería, predominaría como estilo de vida a nivel global (Diamond, 2002). Desde los comienzos de la agricultura, el ser humano se ha visto obligado a proteger sus cultivos de plagas y enfermedades. Los primeros indicios del uso de pesticidas se dan en Sumeria y China, entre el 2.500–1.500 A.C., donde se empleaban compuestos botánicos y otros derivados del azufre (Oerke, 2006). También, griegos y romanos dejaron registro hace más de 2.000 años de las técnicas empleadas para el control de plagas, entre las que se encontraban los acolchados, la aplicación de extractos vegetales y el control biológico (Dayan et al., 2009). Además, otras prácticas realizadas en aquellos tiempos, como la rotación de cultivos y el aporte periódico de materia orgánica, contribuyeron al mantenimiento de la productividad durante milenios (Bailey y Lazarovits, 2003).

El comienzo de la industrialización, a principios del siglo XIX, supuso un cambio radical en todas las actividades socioeconómicas, incluida la agricultura, por la mecanización de muchos procesos con el objetivo de producir más en menos tiempo. En 1892, John Froelich puso en marcha el primer tractor a gasolina que marcaría el gran cambio en el sector agrícola. A partir de entonces un solo agricultor podía trabajar más superficie en menos tiempo (Ruiz-Altisent y Gil Sierra, 2000). A comienzos del siglo XX, existía una amplia variedad de maquinaria agrícola que propició la intensificación del sector. Esto llevó al abandono de las prácticas ancestrales que acabó derivando en un aumento de plagas y enfermedades. Por ello, para aquel entonces ya se comercializaban diferentes pesticidas, uno de los primeros fue el "Jabón de Piretro", con base de crisantemo, patentado por Johann Zacherl en 1884. A mediados del siglo XX, tras la Segunda Guerra Mundial (1939-1945), llegó la Revolución Verde que cambió radicalmente la industria agroquímica ofreciendo gran variedad de compuestos sintéticos para la fertilización y el control de plagas (Gupta et al., 2022). Entre estos últimos compuestos destacó el DDT (dicloro difenil tricloroetano), un insecticida descubierto por el químico Paul Hermann Müller en 1939. Este compuesto fue empleado durante la Segunda Guerra Mundial para controlar la malaria y el tifus entre los civiles y las tropas rociando, indistintamente, campos y personas. Debido a su alta eficacia fue aplicado durante varios años hasta que en 1962 la bióloga marina y zoóloga Rachel Carson describe los efectos tóxicos del DDT sobre el medio ambiente en su publicación "Primavera Silenciosa" (Figura 1.1). A partir de 1969, comienza a restringirse su uso hasta quedar totalmente prohibido en EEUU en 1972 y en el resto de países en los años consecutivos (Mahmood et al., 2016).

La prohibición del uso de estos compuestos por cuestiones de salud humana y medioambiental continuó durante las siguientes décadas. En 1989 se celebró el Protocolo de Montreal para la prohibición de sustancias dañinas para la capa de ozono que acarreó prohibiciones y restricciones de uso de algunos fumigantes de suelo, entre ellos el bromuro

de metilo (BrMe), el fumigante de suelos más empleado (Gareau, 2010). En 2001 tuvo lugar el Convenio de Estocolmo en el que 179 países firmaron la prohibición del uso de los compuestos orgánicos persistentes (COPs) como el DDT. Todas estas medidas se tomaron ante las evidencias de que estos compuestos causaban daños en la salud humana y el medioambiente. Esta tendencia aún continúa y progresivamente se siguen sumando fitosanitarios a la lista de restricciones y prohibiciones. Sin embargo, el uso abusivo de este tipo de compuestos durante décadas, sumado al intenso manejo que soportan los suelos agrícolas, ha resultado en la degeneración de los mismos a nivel global (Mahmood et al., 2016).



**Figura 1.1** | Fotografía tomada por Krueger en Alemania en 1953 a trabajadores fumigando con DDT para el control del escarabajo de la patata. Arriba a la derecha, imagen de la 1ª edición del libro *Silent Spring* (1962) junto al retrato de su autora, Rachel Carson.

El estado actual de los suelos agrícolas, altamente degradados, favorece la proliferación de patógenos edáficos (del suelo) y, con ello, las enfermedades en los cultivos. En particular, los suelos hortícolas soportan un manejo muy intensivo y mayoritariamente de monocultivo. A largo plazo, este manejo acaba favoreciendo la proliferación de patógenos que se ven beneficiados por estas prácticas (Raghu et al., 2021; Sooriyaarachchi et al., 2021). La aplicación de fitosanitarios de síntesis para la desinfección de estos suelos ha sido el método más empleado durante décadas por su alta eficacia. Sin embargo, el uso reiterado de este tipo de compuestos durante tanto tiempo ha dañado la salud de los suelos, haciéndolos más vulnerables y al mismo tiempo, promovido la generación de resistencias por parte de los patógenos a estos compuestos. Esto hace que, en los últimos años, los productores vean incrementar las pérdidas en la producción año tras año mientras tratan de buscar soluciones. De esta necesidad surge el presente trabajo, en concreto, de la demanda de soluciones por parte de los productores de lechuga (*Lactuca sativa*), cultivo mayoritario de la región objeto de estudio. Estos agricultores acusaban pérdidas de producción por patógenos de suelo

(nematodo *Meloidogyne incognita* y hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*) que iban aumentando su población año tras año ante la escasez de medidas para su control. Además, el manejo intensivo ejercido durante décadas en esta región, no hace sino agravar el problema al agotar las capacidades del suelo a largo plazo.

Ante esta situación, extendida a nivel global en diferentes cultivos, impera la búsqueda de alternativas comprometidas con la salud y el medioambiente pero eficaces y rentables al mismo tiempo. Este es uno de los mayores retos a los que se enfrenta la agricultura en el siglo XXI. Actualmente, existen varias vías de investigación en lo que concierne a las enfermedades edáficas que reúnen estas cualidades, entre ellas predominan la lucha biológica y la biodesinfección de suelos. La lucha biológica se basa en la introducción de microorganismos parásitos o predadores de patógenos y se muestra como una alternativa prometedora. Sin embargo, aun presenta diversas trabas, tanto en lo relativo a su legislación como en su complejidad al tratarse de organismos vivos (Panth et al., 2020). Por otro lado, la biodesinfección es una práctica con mayor recorrido y garantía. Esta consiste en la desinfección del suelo sin empleo de fitosanitarios sintéticos y a través de procesos bióticos y abióticos promovidos por una serie de actuaciones. En general, estos procedimientos se basan en la aplicación de materia orgánica al suelo para humedecerlo y cubrirlo, posteriormente, con plástico transparente durante un mínimo de cuatro semanas (Katan, 2017; Gamliel et al., 2000). Durante ese tiempo y en esas condiciones se pueden producir una serie de mecanismos favoreciendo a la microbiota (conjunto de microorganismos) beneficiosa del suelo en detrimento de los organismos patógenos. Al mismo tiempo, los procesos generados durante estos tratamientos pueden contribuir en la recuperación de la salud del suelo con la consecuente mejora en la productividad. Sin embargo, también presenta variabilidad en su eficacia según el patógeno, el clima, el tipo de suelo y la materia orgánica empleada (Lazarovits et al., 2001; Roskopf et al., 2020).

Dado que la inactivación térmica de patógenos (pasteurización) ya era una medida eficaz conocida, los tratamientos de biodesinfección comenzaron aplicándose durante los meses más cálidos y en regiones climáticas con elevada radiación solar para conseguir alcanzar temperaturas cercanas a la pasteurización en el suelo. Además, las altas temperaturas junto con la humedad actúan de catalizadores de los procesos de degradación, que también promueven otra serie de mecanismos con impacto positivo en el control del patógeno y en la salud del suelo. Los buenos resultados de esta técnica han dado lugar a su implantación dentro del manejo de cultivos intensivos en regiones cálidas, como las de clima Tropical o Mediterráneo (Stapleton, 2000). En áreas climáticas más templadas, en las que la radiación solar es un factor limitante, esta práctica se focaliza en generar condiciones anaerobias en el suelo. Mientras que los patógenos pueden verse afectados por la anaerobiosis, la microbiota endémica es capaz de adaptarse y recolonizar una vez se recuperan las condiciones aerobias. Para lograr esto, el suelo se riega hasta la saturación y se incorpora materia orgánica de fácil degradación para promover la actividad microbiana. Además de la saturación, este aumento de actividad por los procesos de degradación se traduce en un incremento de la respiración y, por tanto, del consumo del oxígeno presente.



La cubierta plástica contribuye a mantener estas condiciones imposibilitando la evaporación y la entrada de oxígeno (Roskopf et al., 2020).

Bajo esta premisa, la escasa radiación solar dejaría de ser un factor limitante en la eficacia de estos tratamientos, lo que propiciaría su aplicación en regiones con climas templados como es el caso del área geográfica donde se llevó a cabo el presente trabajo. La Comunidad Autónoma del País Vasco se localiza al norte de la Península Ibérica y se caracteriza por sus altas precipitaciones. Esta región presenta un clima templado y húmedo diferente al resto de la península que limita el efecto térmico en los tratamientos de biodesinfección. Sin embargo, estudios anteriores en esta región mostraron resultados positivos en la aplicación de la biodesinfección frente a patógenos de suelo (hongos *Phytophthora capsici* y *Verticillium dahliae*) presentes en el cultivo de pimiento (*Capsicum annuum*) empleando estiércol fresco o restos vegetales como única fuente de materia orgánica (Núñez-Zofío, 2012). En un principio, este trabajo fue concebido con el objetivo de evaluar determinados subproductos procedentes de la industria agroalimentaria como enmiendas orgánicas para este tipo de tratamientos. De manera que se planificó la ejecución de diferentes ensayos en las instalaciones del centro de investigación responsable, tanto en condiciones controladas de laboratorio como en campo, en los invernaderos destinados para ensayos. Sin embargo, el escenario cambió ante la realidad de los agricultores locales que demandaban soluciones ante las crecientes pérdidas y ofrecieron sus explotaciones para la realización de ensayos. Por lo tanto, este trabajo se centró en evaluar determinados subproductos agroindustriales en tratamientos de biodesinfección con el objetivo de mejorar los resultados en regiones climáticas donde la radiación solar es un factor limitante. En estos casos, los mecanismos biológicos juegan un papel relevante. En este sentido, la cantidad y naturaleza de la materia orgánica aportada junto con las condiciones abióticas generadas durante el tratamiento son determinantes.

Con este fin, se probaron diferentes mezclas de subproductos agroindustriales en tratamientos de biodesinfección llevados a cabo, en su mayoría, en explotaciones comerciales de lechuga bajo invernadero afectadas por patógenos de suelo. Para la evaluación de los resultados se tuvieron en cuenta variables fisicoquímicas y biológicas del suelo profundizando en el efecto sobre la funcionalidad y composición de las comunidades de bacterias, hongos y nematodos. De esta forma, no solo se consideró el efecto de los tratamientos sobre las poblaciones de patógenos sino que también se tuvieron en cuenta otra serie de variables que contribuyeron en la evaluación de los efectos sobre la salud del suelo. El objetivo final en todos los casos es lograr mantener suelos sanos, considerando el suelo como un sistema vivo sostenido por innumerables procesos bióticos y abióticos de los que depende su estado. Además, el empleo de subproductos agroindustriales contribuiría en el impulso a la economía circular, un modelo ancestral pero necesario en la actualidad. Con esto, no solo se reducirían costes de producción en agroquímicos, también se llevaría a cabo una práctica sostenible y comprometida con la salud humana y el medio ambiente.





# CAPÍTULO 2



---

## Introducción

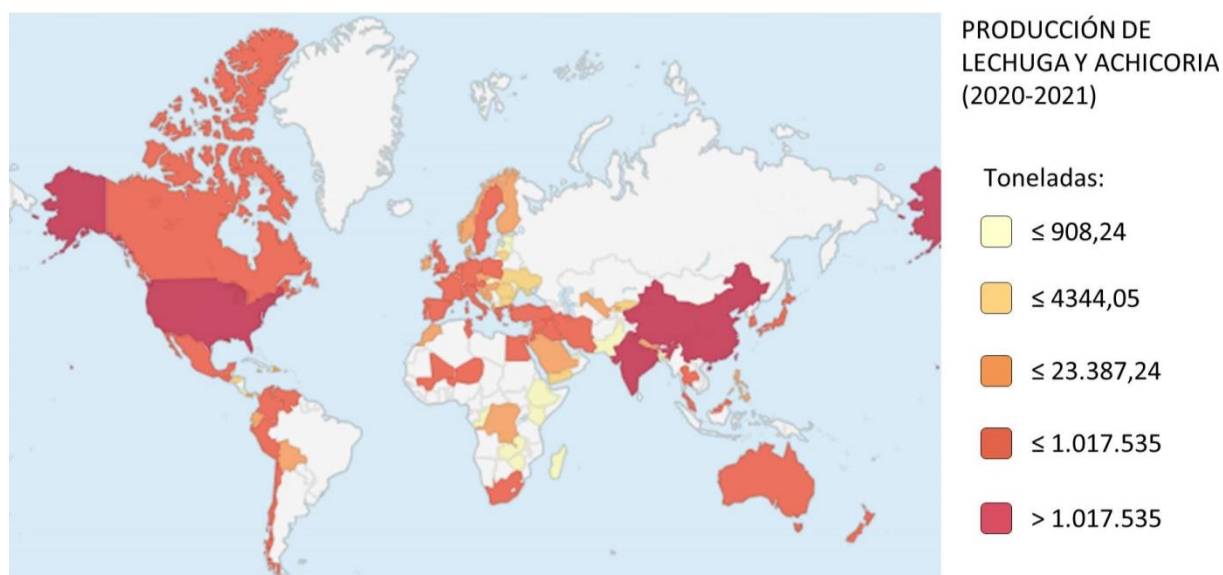




## 2. Introducción

### 2.1. Cultivo de lechuga en el contexto global

La lechuga (*Lactuca sativa*) es uno de los vegetales más consumidos a nivel global con una producción total que superó las 27 millones de toneladas en 2020, ocupando una superficie de 1.226.370ha (FAO, 2021). Asia es el mayor productor (>17Mt en 2020), seguido por América (>5Mt en 2020) y Europa (4Mt en 2020) (Figura 2.1). De acuerdo a los datos recogidos por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO: *Food and Agriculture Organization*), los principales países productores de lechuga (y achicoria) son China, EEUU, India, España e Italia. El cultivo de lechuga se realiza, principalmente, al aire libre o protegido bajo invernadero. En las últimas décadas se están desarrollando e implantando técnicas de cultivo sin suelo (hidroponía) o en interior con luz artificial (*indoor*), pero son menos representativas y no son objeto del presente trabajo. El cultivo de lechuga, tanto al aire libre como en invernadero puede darse bajo diferentes manejos o sistemas de producción (convencional, integral, ecológica) descritos en los siguientes apartados.



**Figura 2.1** | Mapa de producción (toneladas) por país de lechuga y achicoria con valores promedios de producción en 2020-2021. <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL/visualize>

La lechuga es una planta anual autógama con una raíz pivotante gruesa que puede alcanzar 60cm de longitud. A pesar de esto, es en la parte cercana a la superficie donde se desarrollan la mayoría de raíces laterales y, por tanto, la zona de intercambio de agua y nutrientes. Las hojas crecen en forma de espiral creando una roseta alrededor de un tallo grueso central y pueden presentar diferentes tonalidades (verde, amarillo, rojo). La lechuga se

produce durante todo el año y se cosecha en periodo vegetativo, antes de alcanzar la madurez (aparición de tallo floral). El tiempo de desarrollo puede variar de dos a cuatro meses en función de las condiciones ambientales, siendo la temperatura el factor más limitante. Se considera una hortaliza de clima frío con una temperatura óptima de desarrollo de 15-18°C. Por debajo de los 12°C el crecimiento cesa, mientras que por encima de 25°C la formación de la cabeza es irregular y tienden a emitir el tallo floral que impide su comercialización (Saavedra et al., 2017).

Dentro de la especie *L. sativa* se han clasificado 5 variedades, cada una con sus respectivos cultivares (Saavedra et al., 2017):

- *L. sativa* var. *longifolia*: Popularmente conocida como Romana. Se aprovechan sus hojas grandes y alargadas con nervadura prominente.
- *L. sativa* var. *capitata*: A este grupo se les denomina mantecosas por la textura de sus hojas anchas y delgadas. Estas plantas son más pequeñas y precoces que el resto.
- *L. sativa* var. *crispa* L.: En este grupo se distinguen dos subtipos, Iceberg y Batavia, y son las de mayor tamaño. Se caracterizan por la formación de una cabeza compacta a medida que aumenta el número de hojas.
- *L. sativa* var. *acephala*: Esta variedad corresponde a las llamadas hoja de roble, lechugas de corte o de hojas sueltas. Las hojas crecen sin formar cogollo y presentan mayor variedad de formas y colores.
- *L. sativa* var. *augustuanæ*: Estas son lechugas espárrago o de tallo y únicamente se cultivan en China. De estas se consume su tallo carnoso, además de las hojas que crecen libres sin formar cogollo.

Este vegetal se consume, mayoritariamente, en crudo y es rico en fibra, flavonoides, folato, fenoles, vitamina C y otros fitoquímicos promotores de la salud humana. Sin embargo, los factores ambientales y el manejo agronómico pueden inducir cambios en la biosíntesis de estos compuestos (Yang et al., 2022). Diferentes estudios demostraron la alteración de la producción de fitoquímicos en función del tipo y dosis de fertilización, el tiempo y tipo de luz, la temperatura, la disponibilidad de agua y la aplicación de fitosanitarios. En este sentido, aunque los requerimientos agronómicos de las variedades pueden diferir, por lo general, la mayor concentración de compuestos saludables se da en los cultivos al aire libre, en condiciones de baja temperatura (10-13°C), baja dosis de fertilización nitrogenada y en ausencia de fitosanitarios y estrés hídrico (Yang et al., 2022; Kim et al., 2016). También se demostró que el establecimiento de relaciones mutualistas con microorganismos promotores del crecimiento de las plantas estimulan la producción de estos fitoquímicos (Yang et al., 2022).

### 2.1.1. Formas de cultivo

#### 2.1.1.1. Cultivo extensivo al aire libre

El cultivo de lechuga al aire libre o extensivo se realiza en campo abierto (Figura 2.2) y puede partir de la siembra directa o del trasplante. El número de ciclos al aire libre viene determinado, principalmente, por la temperatura siendo el rango óptimo de crecimiento 18-25°C durante el día y 10-15°C a la noche (Saavedra et al., 2017). Es por esta razón que en muchas regiones productoras el cultivo se limita a los meses de primavera y otoño, lo que permite la rotación de cultivo o el barbecho. Sin embargo, actualmente se encuentran disponibles en el mercado variedades aptas para la producción de invierno y verano al aire libre, pero en zonas de clima templado. En este tipo de cultivos es habitual el empleo de acolchado plástico de diferentes características para prevenir la proliferación de hierbas adventicias y regular la temperatura y humedad del suelo. Los marcos de plantación puede oscilar en función de la variedad y las costumbres de manejo (Saavedra et al., 2017). Los insumos empleados tanto en cultivos al aire libre como protegidos vienen determinados por el sistema de producción, convencional, integral o ecológico.



**Figura 2.2** | Fotografías de cultivo de lechuga en exterior (izquierda) y bajo invernadero (derecha).

#### 2.1.1.2. Cultivo intensivo en invernadero

El cultivo de lechuga protegido bajo invernadero también se denomina intensivo debido a que en muchas regiones, especialmente en zonas templadas, permite el cultivo continuado durante todo el año (4-6 ciclos). También en regiones con climas algo más extremos permite proteger el cultivo del frío o en climas muy cálidos limitar la radiación solar modificando la cubierta. Los tamaños y diseños de invernadero, así como el tipo de cubierta, varía en función de las características de cada región climática. En climas más fríos, los invernaderos son de menor altura y las cubiertas plásticas más gruesas. Por el contrario, en las regiones más cálidas se emplean invernaderos con mayor altura y ventilación y, si la radiación solar es elevada, se suelen incluir cubiertas de sombreado. El manejo del cultivo bajo invernadero es similar al extensivo, realizado sobre acolchado plástico y marco de plantación de 20-25x30-



35cm. De igual manera, el manejo de la tierra, la fertilización y el control de enfermedades dependen más del sistema de producción empleado y descritos a continuación.

## **2.1.2. Sistemas de producción**

### 2.1.2.1. Producción convencional

El sistema de producción convencional trata de obtener el máximo rendimiento en el menor tiempo y se caracteriza por la mecanización agrícola y el uso de agroquímicos. Esta es la práctica más extendida desde la década de los 60 y se basa en el consumo de insumos externos como abonos químicos, herbicidas y pesticidas. Además, incluye el uso intensivo de maquinaria agrícola con sus respectivas fuentes de energía (fósil o eléctrica). De forma generalizada, los suelos se labran, con ayuda de un tractor, antes del cultivo para fragmentar el suelo y así facilitar el establecimiento y crecimiento del cultivo. Tanto las semillas como las plántulas son sometidas a diferentes tratamientos fitosanitarios para prevenir el desarrollo de enfermedades. Una vez establecido el cultivo, también se realizan diferentes aplicaciones de fitosanitarios en función del patógeno a combatir. La fertilización suele ser mineral y se realiza antes de la implantación del cultivo o por fertirrigación durante su desarrollo. Este sistema productivo es el más extendido, sin embargo, en los últimos años su productividad se está viendo reducida debido, principalmente, a la degradación de estos suelos. A esto se suman las progresivas regulaciones en el ámbito legal relacionadas con las dosis de fertilización y el uso de fitosanitarios. Además, estudios recientes ponen de manifiesto el elevado coste ambiental de este sistema y su fragilidad a largo plazo (Reeve et al., 2016).

### 2.1.2.2. Producción integrada

En las últimas décadas, en muchos países, la producción integrada surge como alternativa a la problemática ligada a la producción convencional. En 2002, se publica en España el Real Decreto 1201/2002 por el que se regula la producción integrada de productos agrícolas. Este sistema se basa en un mayor aprovechamiento de los recursos y mecanismos naturales para asegurar una producción de calidad y sostenible a largo plazo. La producción integrada pretende limitar las actuaciones de acuerdo a la demanda del cultivo, y no de forma sistemática. Para ello, se introducen métodos agronómicos (biológicos, culturales, biotecnológicos y químicos) de acuerdo a una evaluación previa que determine la idoneidad de la técnica o tratamiento. La elección debe realizarse en función de la casuística particular y compatibilizando en todo momento con la productividad agrícola, la protección medioambiental y las exigencias de la sociedad. Entre los aspectos agronómicos desarrollados en la norma de referencia, destaca la obligación del mantenimiento y mejora de la fertilidad del suelo. En este sentido, se propone minimizar las perturbaciones físicas o químicas generadas por las labores de labranza y desinfección del mismo (RD 1201/2002).

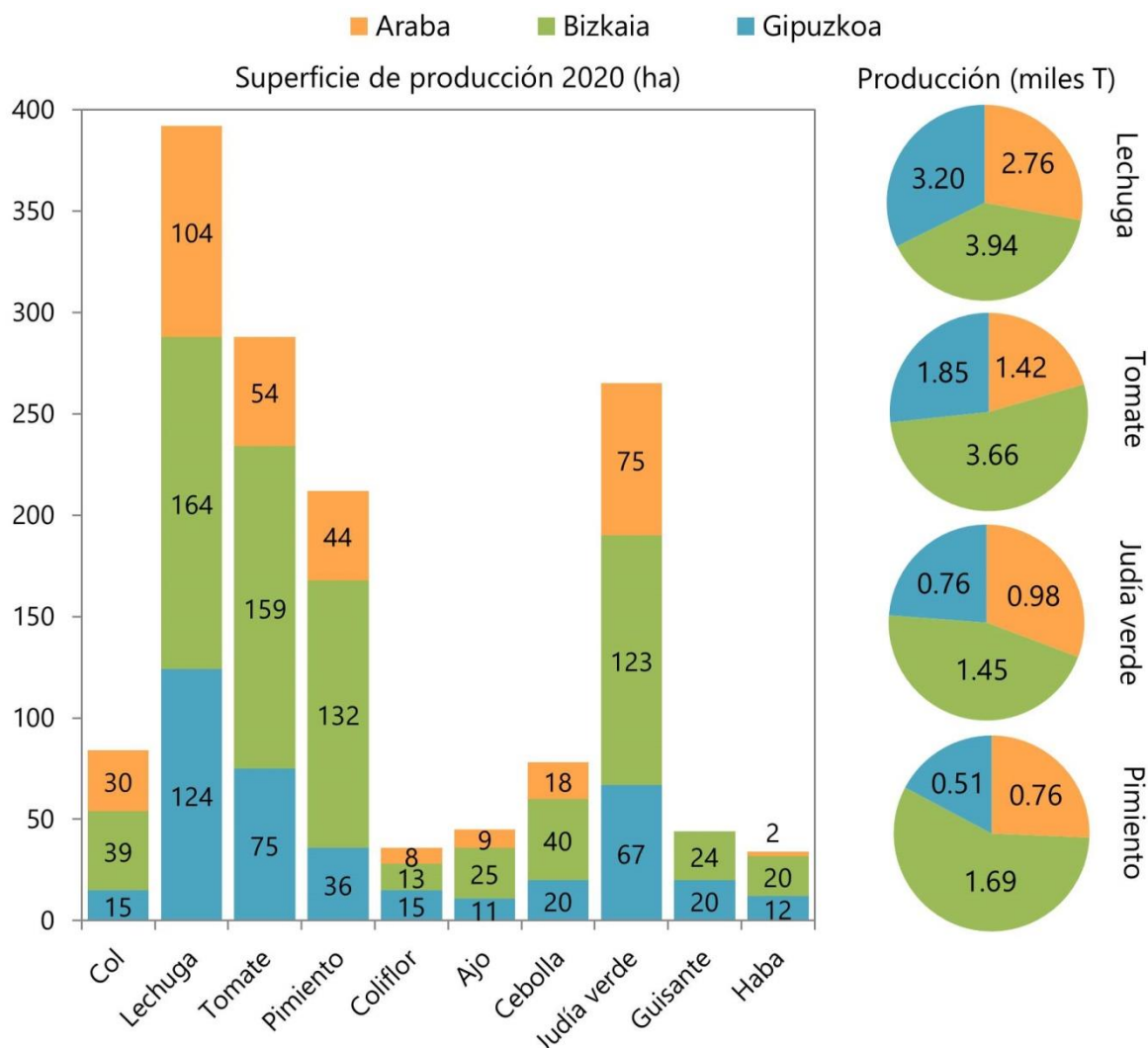
### 2.1.2.3. Producción ecológica

La producción ecológica u orgánica va más allá que la integrada y tiene como objetivo la eliminación de todas aquellas prácticas que comprometan la salud humana y medioambiental. Este enfoque nace a finales del siglo XX ante la insostenibilidad de la agricultura convencional y el aumento de conciencia social con la salud y el entorno. En 1999 la Comisión del Codex Alimentarius, formado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la FAO, incluyeron una serie de directrices para la producción, elaboración, etiquetado y comercialización de alimentos producidos orgánicamente (Alimentarias, 1999). En este documento se define la producción orgánica o ecológica como "un sistema global de gestión de la producción que fomenta y mejora la salud de los agroecosistemas, incluyendo la diversidad biológica, los ciclos biológicos y la actividad biológica del suelo. Se hace hincapié en la utilización de prácticas de manejo teniendo en cuenta que las condiciones regionales requieren sistemas adaptados localmente. Esto se consigue aplicando, siempre que sea posible, métodos agronómicos, biológicos y mecánicos, en contraposición a la utilización de materiales sintéticos, para desempeñar cualquier función específica dentro del sistema" (Alimentarias, 1999). En Europa, la primera normativa al respecto se aprobó en 1991 con el Reglamento (CEE) N° 2092/91 sobre la producción agrícola ecológica y su indicación en los productos agrarios y alimenticios. Este reglamento se fue actualizando durante los años sucesivos hasta la actualidad, que se rige por Reglamento (UE) 2018/848. Además de lo establecido en este documento, recientemente se complementó la regulación de este sistema productivo con la aprobación del Reglamento de Ejecución (UE) 2021/1165 por el que se autorizan determinados productos y sustancias para su uso en la producción ecológica y se establecen sus listas.

## **2.2. Cultivo de lechuga en la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV)**

Actualmente, en la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV), la inmensa mayoría de cultivos bajo invernadero están destinados a la producción de lechuga, tomate (*Solanum lycopersic*) y pimiento o guindilla (*Capsicum annuum*). La lechuga es el cultivo mayoritario dentro de la CAPV ocupando una superficie total cercana a 400ha y una producción de casi 10.000 toneladas en 2020 (EUSTAT, 2023) (Figura 2.3). Dentro de la CAPV, se distinguen tres provincias: Bizkaia, Gipuzkoa y Araba. Entre ellas, Bizkaia es la mayor productora de lechuga, y otras hortalizas, y donde se llevaron a cabo los ensayos de este trabajo. La mayoría de estas explotaciones de este territorio practican el monocultivo en sistema convencional con una media de 5 ciclos de lechuga anuales. El tipo varietal dominante, casi exclusivo, es Batavia y se cosecha tanto para 1° (producto fresco entero) como para 4° gama (procesado y conservado en frío). A pesar de la implantación de la agricultura convencional en este territorio, aún se conservan algunas prácticas culturales como el estercolado anual o bianual del suelo.

De forma generalizada en la CAPV, el cultivo de lechuga se produce durante todo el año de manera continuada aunque con una sola fertilización anual. Habitualmente, se aplica estiércol fresco a razón de 3-4kg/m<sup>2</sup> (peso fresco) o, en menor medida, fertilización mineral (NPK: 80-30-160) a dosis bajas. Antes del trasplante, el suelo se labra hasta los 20-25cm de profundidad con ayuda del tractor, seguido de una tabla llana o atabladera para dejar la superficie del suelo uniforme para la colocación del plástico de acolchado. Este tipo de plásticos suelen ser negros, de 200-400galgas, y con el marco de plantación incluido de 25-28x30cm (12plantas/m<sup>2</sup>, aproximadamente). El riego, generalmente, se realiza por aspersión a demanda del cultivo. El trasplante se hace de forma manual con plántulas que presentan 6-8 hojas verdaderas. Cuando el cultivo adquiere el tamaño deseado para su comercialización se corta cada planta por la base del tallo de forma manual. La raíz queda en el suelo y se incorpora en la preparación del mismo para el siguiente ciclo.



**Figura 2.3** | Gráfico de barras con la superficie total (ha) de producción dedicada a los principales cultivos hortícolas de la CAPV en 2020. Los gráficos circulares indican la producción en miles de toneladas para los cultivos dominantes (lechuga, tomate, judía verde y pimiento). En ambos gráficos se especifican los valores para cada provincia: Araba en naranja, Bizkaia en verde y Gipuzkoa en azul. Datos obtenidos de EUSTAT (Instituto Vasco de Estadística).



### 2.3. Principales enfermedades de suelo en cultivo de lechuga de la CAPV

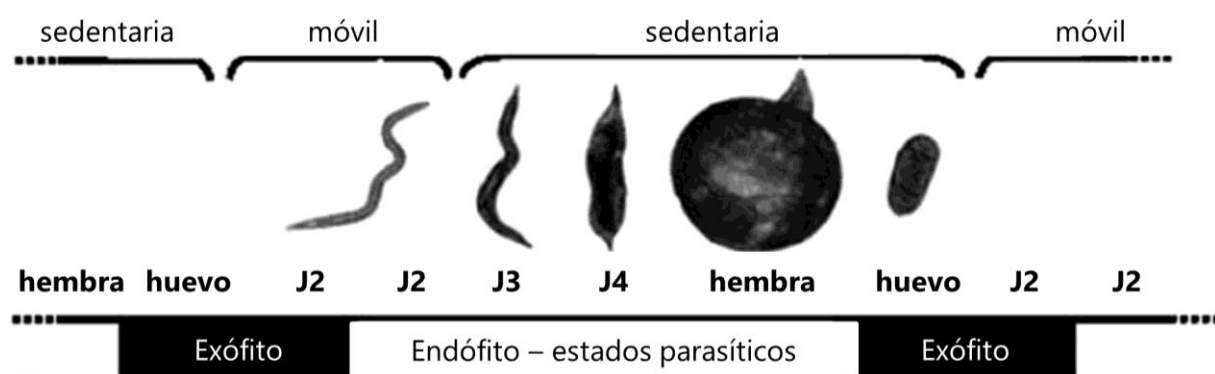
Muchas de las explotaciones comerciales de lechuga en la CAPV acumulan más de 20 años de monocultivo intensivo en los mismos suelos. Sin embargo, en los últimos años las pérdidas de producción están siendo acusadas en la mayoría de las explotaciones, sobre todo en los meses de primavera y verano. Los principales patógenos causantes de estas pérdidas son el nematodo *Meloidogyne incognita* y el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*, ambos patógenos de suelo. De hecho, es habitual detectar la presencia de ambos en la misma explotación, lo que puede agravar el problema. Diversos estudios demostraron el aumento de enfermedad por *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* en plantas infectadas por *M. incognita*. La teoría más aceptada es la entrada del hongo en el sistema radicular a través de las heridas provocadas por el nematodo. Sin embargo, algunos autores lo atribuyen a una respuesta fisiológica por el debilitamiento de la planta ante la infección (Manzanilla-López y Starr, 2009). La forma tradicional de combatir a estos organismos es el uso de fumigantes y otros fitosanitarios. Sin embargo, su uso prolongado ha provocado la aparición de nuevas poblaciones resistentes a estos productos y con su consecuente daño a otras especies no patógenas y a su acumulación en el suelo.

#### 2.3.1. Nematodo *Meloidogyne incognita*

Los nematodos son un grupo zoológico de invertebrados no segmentados capaz de ocupar la mayoría de hábitats ambientales, así como colonizar plantas y animales. Son los animales más abundantes en la tierra y entre los que habitan en el suelo algunos corresponden a especies patógenas que infectan los cultivos generando grandes pérdidas económicas (Hassan et al. 2013; Mkandawire et al. 2022; Pires et al. 2022). Los nematodos pertenecientes al género *Meloidogyne* son los principales causantes de enfermedad en plantas dentro de este grupo. Las primeras investigaciones sobre estos patógenos fueron realizadas en cafetales enfermos de Brasil, primero por Jobert en 1878 y más tarde por Göldi, en 1887, quien publicó un documento extenso sobre esta enfermedad. Sin embargo, el primer registro de observaciones se remonta a 1855 y fueron descritas por Berkeley en un cultivo de pepino en Inglaterra. Casi 100 años más tarde, Chitwood (1949) establece la clasificación actual de las cuatro especies más comunes de *Meloidogyne* causantes de enfermedad en cultivos de interés económico: *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla*. Además, con el desarrollo de las investigaciones en este área, se demostró que el ataque de estos patógenos predispone a otras enfermedades fúngicas y bacterianas (Taylor y Sasser, 1983). Todas estas especies se encuentran ampliamente distribuidas aunque *M. hapla* es más común en regiones frías mientras que el resto habita en regiones con climas más cálidos. La especie *M. incognita* es de las más problemáticas en relación a las pérdidas económicas y es la responsable de la merma de producción en muchas explotaciones de lechuga de la CAPV. La lechuga es uno de los principales cultivos hospedantes para este

patógeno pero también es habitual en otros cultivos de gran relevancia económica como el tomate y el pimiento, ambos cultivos incluidos entre los mayoritarios en esta región.

A estos nematodos se les conoce como agalladores por inducir a la formación de nódulos o agallas en la raíz de la planta hospedante. Los juveniles penetran en la raíz con la ayuda del estilete bucal y se desplazan por las células no diferenciadas hasta alcanzar la región cercana a la elongación radicular. A través del estilete inyectan secreciones, producidas en las glándulas esofágicas, que causan el agrandamiento de las células. Esto provoca la formación de agallas o nódulos en la raíz que impiden el correcto desarrollo de la planta. Estos nódulos pueden medir entre 1-2mm cuando penetra un solo juvenil o incluso más de 1cm si la densidad de individuos en el mismo punto es elevado (Taylor y Sasser, 1983). Una vez dentro de la raíz el juvenil continúa su desarrollo hasta su madurez como hembra adulta, momento en el que deja depositada la masa de huevos unida por una matriz gelatinosa y muere. Son especies muy prolíficas, llegando a encontrarse más de 1.000 huevos en una sola masa. Los huevos pueden permanecer durante tiempo prolongado en dormancia y eclosionar cuando las condiciones les son favorables. Igualmente, durante la fase larvaria pueden entrar en diapausa (cese del desarrollo) ante condiciones desfavorables. La duración del ciclo de vida puede variar según las condiciones ambientales y es frecuente que oscile en función de la época del año. Las altas temperaturas favorecen su actividad y es cuando aumentan la tasa de reproducción. Por ello, en la CAPV las pérdidas de producción se dan durante los meses de primavera y verano, pudiendo prolongarse hasta principios de otoño si las temperaturas son altas. Estos organismos presentan, principalmente, reproducción asexual, pudiendo darse la generación de machos para la reproducción sexual cuando se producen alteraciones ambientales que requieran adaptación (Curtis et al., 2009; Evans y Perry, 2009).



**Figura 2.4** | Ciclo de vida del nematodo agallador *Meloidogyne incognita*. Se presentan las fases del ciclo con los nombres y características de cada una (J: juvenil). Estas fases pueden ser móviles o sedentarias y, en cada caso, el organismo puede ser exófito o endófito (fuera o dentro de la planta, respectivamente). Imagen adaptada de Danchin y Perfus-Barbeoch (2009).

Su ciclo de vida consta de seis estadios diferenciados entre la fase de huevo, juvenil (J) y adulto. La mayoría son formas sedentarias, salvo en el momento de colonizar una nueva raíz denominada fase móvil (Figura 2.4). El ciclo comienza con un huevo que tras pocas horas de ser depositado comienza su desarrollo hasta el primer estadio larval. Aun dentro del

huevo realiza la primera muda y pasa a la fase de juvenil 2 (J2), momento en el que emerge del huevo por un agujero realizado mediante pinchazos reiterados con el estilete. Una vez fuera de la raíz, esta fase móvil se desplaza por el suelo en busca de una planta hospedadora. Estos organismos se guían por determinadas sustancias secretadas por la raíz de la planta hospedadora y les ayudan a localizar el punto de penetración. Una vez instalado J2 en la raíz del nuevo hospedador, comienza la fase sedentaria en la que acaba de desarrollarse experimentando dos mudas más, juvenil 3 (J3) y 4 (J4), y una última para convertirse en hembra madura y comenzar de nuevo el ciclo (Taylor y Sasser, 1983).

Como se ha mencionado previamente, la duración completa del ciclo puede oscilar de unos pocos días a varios meses en función de las condiciones ambientales, siendo la temperatura el principal factor limitante seguido de la humedad. Se estima que el rango de supervivencia y reproducción está, aproximadamente, entre una temperatura mínima de 0-5°C y una máxima de 35-40°C. Sin embargo, estos extremos pueden afectar a la supervivencia y reproducción y son los valores intermedios los más favorables y, por tanto, de mayor infectividad. En relación a la humedad, los huevos y larvas mueren ante la falta de agua y en condiciones de baja humedad se inhibe la eclosión del huevo y dificulta el desplazamiento de J2. Estos efectos también pueden darse en suelos anegados pero en estos casos debido a la falta de oxígeno. La textura del suelo también puede influir, siendo los suelos arenosos en los que más fácilmente se propaga la infección (Taylor y Sasser, 1983).



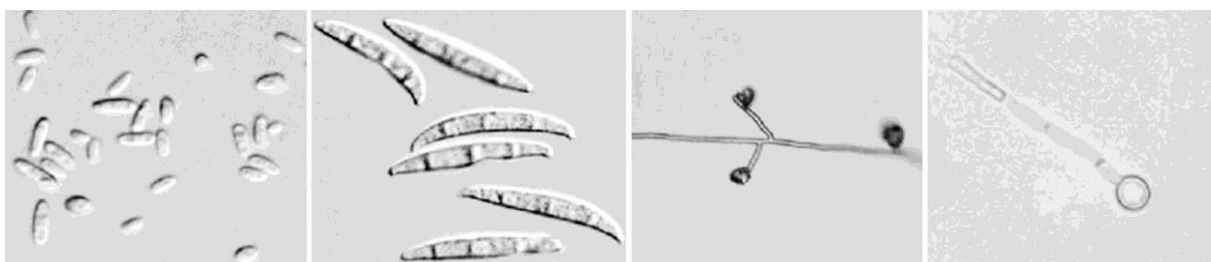
**Figura 2.5** | Fotografías de cultivo de lechuga atacado por el nematodo fitopatógeno *Meloidogyne incognita*. A la izquierda, plantas con poco desarrollo; a la derecha, detalle de raíz con nodulación.

Durante su fase móvil este patógeno se desplaza por el agua presente en el suelo y lo hace, principalmente, en el perfil vertical. En parte, debido a esto, su distribución suele ser heterogénea dentro de una misma parcela y es habitual observar los daños en forma de manchas o corros con plantas poco desarrolladas. Esta suele ser la primera señal de infección, dado que en la cosecha las raíces quedan en el suelo, y es al extraerla cuando se puede observar el agallamiento radicular (Figura 2.5). Este es el indicador más claro de la presencia de *M. incognita* y en función del grado de agallamiento, escala desarrollada por Bridge y

Page (1980), se puede determinar el nivel de infección y estimar la densidad del patógeno en el suelo.

### 2.3.2. Hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*

Los hongos del género *Fusarium* son especies filamentosas pertenecientes al filo Ascomycota y se encuentran ampliamente distribuidos en agua, suelo y plantas. Dentro de este género están descritas 20 especies con diferentes estrategias, pudiendo actuar como parásitos, endófitos (dentro de la planta) o saprófitos (descomponedores) (Ma et al., 2013; Rana et al., 2017). Entre todas ellas, las especies patógenas son las que mayor atención reciben debido a las importantes pérdidas económicas que originan en gran variedad de cultivos comerciales. La especie que más problemas genera a nivel global es *F. oxysporum*, dentro de la cual se han identificado más de 150 formas especializadas (f. sp.) o patotipos en función del cultivo hospedador. Así mismo, dentro de un mismo patotipo o forma especializada se pueden desarrollar diferentes razas que difieren en las condiciones que les son favorables para su proliferación (Rana et al., 2017). Dentro de la CAPV, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL), el patotipo que infecta el cultivo de tomate, es uno de los más extendidos y que más tiempo lleva presente en la región. Sin embargo, actualmente, los cultivos de lechuga se están viendo fuertemente afectados por *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* (FOLac) generando graves pérdidas en las explotaciones comerciales. FOLac fue descrito por primera vez en Japón por Matuo y Motohashi en 1967 y actualmente se encuentra ampliamente distribuido. A la enfermedad producida por este patógeno se le denomina marchitamiento o Fusariosis vascular de la lechuga y es considerada de gran importancia económica debido a su carácter devastador y persistente (Gordon y Koike, 2015).



**Figura 2.6** | Imágenes al microscopio de la morfología de las diferentes estructuras del hongo *Fusarium oxysporum* tomadas de Fourie et al. (2011). De izquierda a derecha: microconidias, macroconidias, monofiálicas y clamidospora terminal.

En esta especie únicamente está descrita la reproducción asexual a través de diferentes tipos de esporas denominadas clamidosporas, macroconidias y microconidias (Figura 2.6). Las microconidias son esporas uninucleadas formadas a partir de estructuras simples formadoras de esporas (conidióforos) que germinan pobremente, con una eficiencia de germinación que va del 1 al 20%. Por otro lado, las macroconidias, que se producen por agregación de conidióforos son multinucleadas y germinan rápidamente. Su alta prevalencia en el suelo se debe a las esporas resistentes que son las clamidosporas que son de pared gruesa y se forman a partir de las hifas o macroconidias. Las clamidosporas pueden

permanecer hasta más de 10 años en el suelo en ausencia de hospedador (Ma et al., 2013; Gordon, 2017; Rana et al., 2017). La distribución de semilla infectada junto con el suelo infectado desprendido de maquinaria agrícola se consideran las principales vías de dispersión de este patógeno.

La infección en el cultivo se produce por la colonización del hongo en la superficie de la raíz. Una vez colonizada, penetra en el sistema vascular de la planta hospedadora donde libera una serie de toxinas. Esta entrada puede verse facilitada por cualquier pequeña herida en raíz producida por otros organismos. Una vez penetra por la raíz, comienza a ascender por el cuello generando un daño vascular que lleva al marchitamiento de la planta (Gordon y Koike, 2015; Gordon, 2017). Uno de los síntomas más detectables es el amarillamiento y secado de las hojas basales. Cuando el grado de infección es muy elevado, los tejidos de la corona y las raíces superiores presentan una necrosis marrón rojiza seguida de la descomposición. Esto hace que la forma más sencilla de confirmar el daño por FOLac consista en realizar un corte longitudinal por la mitad del cuello de la planta y observar si existe coloración rosada o amarronada (Figura 2.7). Generalmente, las plantas infectadas apenas se desarrollan y a menudo mueren, lo que resulta en pérdidas económicas para los productores. La gran mayoría de los cultivares de las variedades de lechuga son susceptibles a la enfermedad, incluida la Batavia.



**Figura 2.7** | Imágenes de plantas de lechuga afectadas por el hongo de suelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. A la izquierda, lechugas con síntomas y sin apenas desarrollo; a la derecha, corte longitudinal del cuello de lechuga con síntomas en el que se observa la coloración típica en el sistema vascular tras la infección por este patógeno.

Como se ha mencionado al comienzo del apartado, dentro de una misma especie pueden darse diferentes razas. A fecha de publicación de este documento, en la CAPV sólo se ha detectado presencia de FOLac raza 1. Esta raza se ve favorecida en ambientes cálidos, siendo 24-28 °C su rango de temperatura óptimo en el suelo. Esto da lugar a elevadas pérdidas desde de mayo hasta septiembre, ambos incluidos, lo que implica cerca de la mitad de la producción y el periodo en el que el producto adquiere mayor valor en el mercado. Esto es debido, en gran medida, a la baja oferta derivada de la pérdida de producción

generalizada en el territorio. Por el contrario, la raza 4 tiene capacidad infectiva también en condiciones de bajas temperaturas. En 2021, en regiones cercanas (sureste peninsular) se detectó la presencia de la raza 4 (Gálvez et al., 2023), lo que hace temer la entrada de esta raza en la CAPV. Si esto sucediera, supondría la ruina para muchos de los productores de lechuga, puesto que la producción podría verse dañada durante todo el año.

En algunos países, FOLac se considera uno de los factores limitantes para la producción comercial de lechuga durante la temporada de verano, sobre todo, cuando la lechuga se cultiva en monocultivo, alcanzando pérdidas de hasta un 70%. En condiciones climáticas favorables, la infección puede conducir a la destrucción total del cultivo obligando en muchos casos a dejar de cultivar lechugas en parcelas infectadas. Actualmente, esta enfermedad presenta una distribución mundial. La primera cita documentada en España se ha encontrado en 2017 en el Noroeste de Murcia (Guerrero et al., 2020). En la CAPV, se cuenta con el primer diagnóstico (Laboratorio SV DF Bizkaia) desde el año 2017 en Gamiz (Bizkaia) en invernaderos con monocultivo de lechuga en tierra. Desde entonces las pérdidas han ido en aumento y cada vez son más las explotaciones afectadas. Se piensa que entró en la CAPV por el uso de semilla contaminada y que pudo propagarse por traslados de maquinaria entre fincas. También pudo contribuir el uso de plántula producida a partir de semilla contaminada. Una de las prácticas más generalizadas para reducir la enfermedad es el empleo de variedades resistentes. Sin embargo, la reiteración en el uso de estas variedades tiende a ejercer presión de selección en la población del patógeno que acaba conduciendo a la aparición de nuevos patotipos capaces de remontar las resistencias introducidas.

#### **2.4. Tratamientos de desinfección del suelo**

Prácticamente, de la mano de la agricultura vino la lucha contra los fitopatógenos y la intensificación agrícola en el siglo XX no hizo más que agravar y extender el problema. En la actualidad, se estima que alrededor de 80.000 enfermedades afectan a los cultivos globalmente, la mayoría producidas por patógenos de suelo (Abdelaziz et al., 2023). A esto se suma la mayor dificultad que presenta el control de las enfermedades edáficas frente a las aéreas (Matthiesen y Kirkegard, 2006). En este sentido, las producciones convencionales son las que más acusan esta clase de enfermedades y el problema persiste ante la continua degradación de estos suelos. Durante las últimas décadas se han ido incorporando nuevas técnicas para el control de patógenos edáficos y, actualmente, existen varias formas de abordar el problema. Algunas de estas surgieron con la intensificación de la agricultura como la aplicación de fitosanitarios para fumigar el suelo o el uso de vapor de agua para su esterilización. Estas prácticas mantienen la visión del sistema convencional generando importantes perturbaciones en el suelo. Sin embargo, existen otras alternativas menos agresivas como el control biológico y la biodesinfección. Todas estas prácticas tienen ventajas e inconvenientes que deben ser valorados a la hora de su aplicación según las necesidades, condiciones y recursos de cada explotación. Además, también se pueden incluir



determinadas prácticas de manejo para reducir la enfermedad, como la inclusión de cultivos para la rotación o el uso de variedades resistentes. A continuación se presentan los tratamientos aplicados directamente al suelo.

#### **2.4.1. Fumigantes sintéticos**

La aplicación de fitosanitarios, principalmente fumigantes sintéticos, era la práctica más extendida durante el pasado siglo y, actualmente, continúa siendo común a nivel global. Estos productos se suelen aplicar por inyección al suelo o por incorporación al agua de riego y su eficacia mejora si se cubre el suelo con plástico impermeables a los gases (VIF o TIF). El bromuro de metilo (BrMe) fue el fumigante más empleado por su alta eficacia y amplio espectro pero, dada su peligrosidad, a finales del siglo pasado comenzaron las restricciones de uso hasta su actual prohibición. Este fumigante estaba tan implementado en el manejo agrícola que ante esta nueva situación se creó el Comité de Opciones Técnicas para el Bromuro de Metilo (MBTOC: *Methyl Bromide Technical Options Committee*). Este comité, formado por diferentes expertos en la materia, desde el primer informe publicado en 1995 (MBTOC, 1995), realiza actualizaciones periódicas del mismo ante los nuevos escenarios surgidos desde entonces (ámbito legal y de investigación).

Inicialmente, el BrMe fue sustituido por la aplicación conjunta del 1,3-dicloropropeno (insecticida y nematicida), y la cloropicrina (fungicida y bactericida) (Matthiessen y Kirkegard, 2006). Sin embargo, en 2007 la Comisión Europea determinó la no inclusión de 1,3-dicloropropeno en el Anexo I de la Directiva 91/414/CEE relativa a la comercialización de productos fitosanitarios (derogada por Reglamento (CE) N° 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo). Así y todo, en el caso de España, se aprobaron varias prórrogas para el uso de BrMe hasta 2005, y lo mismo sucedió con los productos formulados a base de 1,3-dicloropropeno y cloropicrina amparándose en el artículo 53 del Reglamento 1107/2009. Estos últimos contaron con una autorización excepcional hasta 2021 en determinados cultivos y 2022 para el tabaco (MAPA, 2022). Ante las progresivas restricciones, estos compuestos de síntesis fueron sustituidos, fundamentalmente, por el dazomet y el metam sodio que al degradarse generan metil isotiocianato. Este compuesto está reconocido como desinfectante general con acción parcial, sin la efectividad y el amplio espectro que presentaba el BrMe. Así y todo, actualmente el uso del metam sodio también queda restringido a autorizaciones excepcionales, como es el caso de España (MAPA, 2022). Además, la aplicación reiterada de estos compuestos ha provocado el desarrollo de resistencias por parte de los patógenos y la degradación de los suelos haciéndolo más vulnerables. Todo esto hace de la fumigación química una alternativa cada vez menos viable.

#### **2.4.2. Esterilización por vapor**

El uso de vapor de agua para esterilizar el suelo y librarlo así de patógenos era el método más empleado antes de la llegada de los fumigantes químicos. Consiste en inyectar vapor de

agua a la temperatura necesaria y durante el tiempo suficiente para matar al patógeno objetivo (Panth et al., 2020). En la actualidad, se pueden encontrar diferentes aparatos en el mercado para este fin, desde inyectores a planchas de vapor. De forma general, se establecen 30 minutos de exposición a temperatura elevada que varía en función de la sensibilidad térmica del patógeno. Gran parte muere tras 30 minutos a 70°C, mientras que a 100°C se logra dañar a los patógenos más resistentes. Generalmente, tanto el tiempo como la temperatura suelen adaptarse para cada caso (Barker, 1957). Esta técnica, además de eliminar a los patógenos, libera los nutrientes contenidos en el suelo y en los microorganismos presentes dejándolos disponibles para el cultivo, ayudando a mejorar el rendimiento. Sin embargo, este efecto positivo inicial es temporal y llega a ser muy perjudicial a largo plazo al eliminar toda la vida del suelo y liberar de golpe los nutrientes contenidos en él. Este vacío biológico no hace sino facilitar la entrada de patógenos y su proliferación ante la falta de competencia en el suelo (Gamliel et al., 2000; Katan, 2000). Además de estos desequilibrios, este enfoque resulta menos rentable que la fumigación química dado el elevado coste de maquinaria y energía sumado al tiempo que requiere su aplicación (Fennimore et al., 2014).

### 2.4.3. Control biológico

La aplicación de agentes de biocontrol es una de las prácticas más recientes y sigue en desarrollo. El control biológico se basa en la introducción de otros organismos al suelo para reducir la población del patógeno por efecto antagonista. Los principales mecanismos descritos para esto son parasitismo o predación, liberación de biocidas, inducción de resistencia a la planta y competencia por nutrientes y nicho (Heydari y Pessarakli, 2010; Panth et al. 2020). Estos organismos se encuentran de forma natural en el suelo y en las plantas (endófitos), de hecho, además del control biológico, muchos de ellos también han demostrado efecto promotor del crecimiento de la planta. Los primeros descubrimientos en este sentido se dieron con las rizobacterias que son las bacterias que se encuentran en asociación con la raíz. Por esta razón comenzaron a denominarse PGPR, por las siglas en inglés para referirse a rizobacteria promotora del crecimiento de la planta (*plant growth promoting rhizobacteria*). Lo mismo sucede con algunas especies de hongos, a los que también se les conoce como promotores del crecimiento de la planta, denominados PGPF (*plant growth promoting fungi*). Dado que las funciones beneficiosas para el cultivo vienen dados por diferentes tipos de organismos, resulta más prudente ampliar el término a microorganismos promotores del crecimiento (PGPM: *plant growth promoting microorganisms*) (Avis et al., 2008). La colonización de la raíz por este tipo de organismos repercute en beneficio de la planta de diferentes formas. Por un lado, el propio establecimiento en la raíz impide la entrada de patógenos y ayuda a inducir la resistencia sistémica de la planta. Por otro lado, son capaces de transformar los nutrientes presentes en el suelo e intercambiarlos con la planta en asociación.

Actualmente, existen diferentes organismos empleados como agentes biológicos que también contribuyen en la salud del cultivo. En su gran mayoría son bacterias y hongos



presentes en los suelos. Entre los más reconocidos destacan varias especies de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Trichoderma* pero también se emplean especies de *Azotobacter*, *Serratia*, *Coniothyrium*, *Paecilomyces*, *Phlebiopsis*, *Rhizobium*, *Streptomyces*, y *Gliocladium*, (Mazzola y Freilich, 2017; Joshi et al., 2021; Suman et al., 2022; Abdelaziz et al., 2023). Aunque en menor medida, también algunas especies de nematodos se emplean para tal fin. Generalmente, estos tratamientos consisten en la inoculación de estas especies al suelo de forma artificial. Sin embargo, también a través de determinadas prácticas, como el aporte de materia orgánica o la rotación de cultivos, se puede favorecer a los que ya se encuentran presentes (endémicos) en el suelo. Esta práctica fue una de las alternativas no químicas propuestas en el primer informe del Comité para la búsqueda de alternativas al Bromuro de Metilo (*Methyl Bromide Technical Options Committee* -MBTOC-, 1995). A pesar de ser la inoculación de organismos la práctica habitual, también se puede favorecer el desarrollo de estas poblaciones endémicas a través de determinados mecanismos como se describe más adelante en este capítulo (apartado 2.6).

#### **2.4.4. Biodesinfección**

El término biodesinfección aparece por primera vez en el informe de 2010 del MBTOC como alternativa no química al BrMe aglutinando prácticas ya propuestas en informes anteriores como la biofumigación y la solarización, junto con la desinfección anaerobia incluida también en este informe (MBTOC, 2010). A pesar de los diferentes enfoques planteados en cada una de estas prácticas, el procedimiento resulta muy similar. Todas ellas incluyen la incorporación de materia orgánica (1-5% p/p) y posterior riego antes de la colocación de una cubierta plástica, preferiblemente transparente, que se mantiene durante un mínimo de cuatro semanas. La efectividad de estos tratamientos depende de que se produzcan una serie de mecanismos físicos, químicos y biológicos durante el tiempo que dura su aplicación. Los principales son el aumento de la temperatura del suelo, la liberación de compuestos biocidas durante la degradación de la materia orgánica, la anaerobiosis y los cambios en la microbiota del suelo (Stapleton, 2000; Matthiesen y Kirkegard, 2006; Katan y Gamliel, 2014). Cada proceso no es exclusivo de cada enfoque y en la mayoría de ocasiones se generan todos estos efectos en mayor o menor medida. Por esta razón, en este trabajo se emplea el término biodesinfección por ser el más inclusivo y contemplar el conjunto de procesos como ya propusieron otros autores previamente (Lamers et al., 2010; Momma et al., 2013).

La biodesinfección del suelo es una alternativa que no solo ha demostrado ser eficaz para combatir enfermedades edáficas, sino que también puede mejorar las propiedades del suelo y, como resultado, la productividad del cultivo. Entre todos los mecanismos de acción contra el patógeno generados durante la BD, el cambio en la composición de la microbiota edáfica se considera uno de los más determinantes. Algunas poblaciones beneficiosas para el cultivo, como las empleadas para el control biológico (PGPM), se ven favorecidas y aumentan sus poblaciones impidiendo la proliferación del patógeno, incluso a largo plazo. Todo esto hace de la biodesinfección una de las alternativas más sostenibles y beneficiosas para el

control de enfermedades edáficas. Sin embargo, dada la complejidad de los mecanismos ligados a esta práctica, los resultados pueden variar en función del patógeno, el clima y el tipo de suelo y la dosis y naturaleza de la materia orgánica incorporada.

#### 2.4.4.1. Biosolarización

En muchos tratamientos con fumigantes sintéticos se incluía una cubierta plástica tras su aplicación, bien por la elevada volatilidad del compuesto o con el propósito de retener durante más tiempo los compuestos activos en el suelo (Katan, 2017). En la década de 1970, ante la búsqueda de alternativas a los fumigantes de síntesis, surge la solarización (Katan et al., 1976), predecesora de la biosolarización. Esta técnica prescinde del empleo de compuestos de síntesis y se focaliza en la inactivación térmica del patógeno, hasta los 45-60cm de profundidad del suelo, habiendo humedecido el suelo previamente (Gamliel et al., 2000). Con este fin, únicamente se emplea una cubierta de plástico transparente que permite la penetración de mayor espectro de radiación solar. Los plásticos empleados suelen ser finos (200-400 galgas), de polietileno y preferiblemente impermeable a los gases, tipo VIF (*virtually impermeable film*) o TIF (*total impermeable film*). Ésta cubierta se mantiene de cuatro a seis semanas para exponer al patógeno el tiempo suficiente a temperaturas letales o subletales (Gamliel et al., 2000; Stapleton, 2000). Dada la relevancia de la radiación solar, este tratamiento se aplica en regiones de clima cálido. En estos casos, las temperaturas del suelo suelen alcanzar los 45-55°C en las capas superiores y 35-40°C en las más profundas (Gamliel y Stapleton, 2012; Katan, 2017). Estos rangos de temperatura son tolerados por muchos organismos endémicos y PGPM cuyas poblaciones se recuperan una vez finaliza el tratamiento, a diferencia de los patógenos que se ven afectados por las altas temperaturas. Las temperaturas alcanzadas en estos tratamientos pueden llegar a inactivar los propágulos y las estructuras de resistencia de los patógenos o debilitarlos (Gamliel et al., 2000).

En los tiempos en los que esta técnica era evaluada, se observó que los resultados mejoraban con la incorporación de materia orgánica al suelo antes de humedecerlo y cubrirlo con plástico. A esta adaptación se le diferenció con el término biosolarización (Katan, 2017). De hecho, se pudo comprobar que en los suelos biosolarizados la eficacia en el control del patógeno era mayor sin alcanzar temperaturas tan elevadas como en los solarizados (Gamliel et al., 2000). Esta mayor eficacia viene atribuida a una serie de procesos biológicos propiciados por la incorporación de la materia orgánica aportada. Durante la degradación biológica de la materia orgánica se liberan una serie de compuestos siendo algunos de estos tóxicos para los patógenos. En general, se trata de compuestos volátiles que se difunden fácilmente por el suelo y con mayor facilidad en presencia de agua. Entre ellos destacan los ácidos grasos volátiles (AGV) (acético, propiónico, butírico, isobutírico y ácido valérico), aldehídos, amonio (NH<sub>3</sub>) y ácido cianhídrico (HCN) (Oka et al., 2007; Dutta et al., 2019). Sin embargo, mientras que los patógenos son vulnerables a estos compuestos, la mayoría de poblaciones endémicas pueden tolerarlos sin verse perjudicadas (Bailey y Lazarovitz, 2003). El favorecimiento de ciertas poblaciones sobre otras provoca un cambio en la composición de

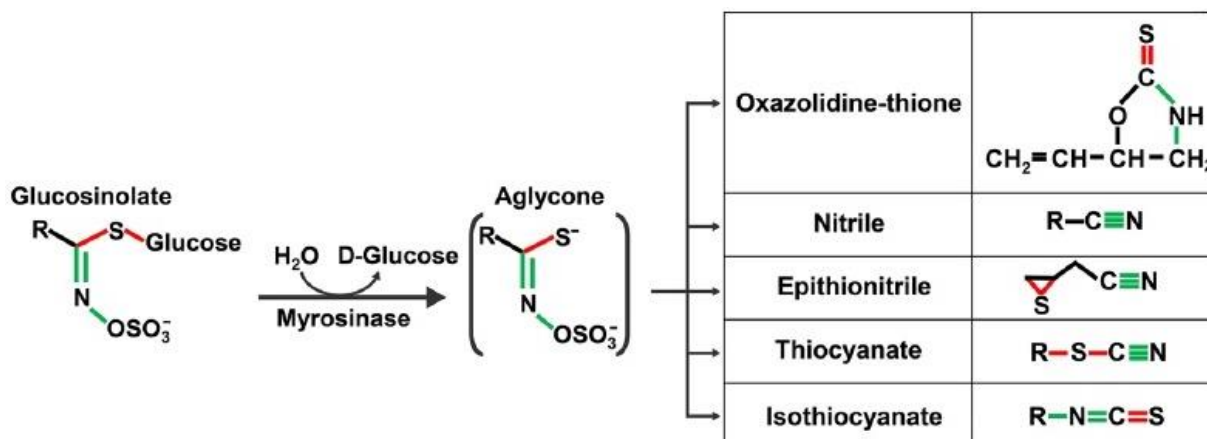
la microbiota del suelo hacia un mayor equilibrio que puede sostenerse a largo plazo. Además, con la incorporación de la materia orgánica se logra una mejora de las propiedades fisicoquímicas y biológicas del suelo que acaban favoreciendo al cultivo. La biosolarización aparece en el primer informe del MBTOC como una de las alternativas al BrMe que además de controlar las enfermedades edáficas mejora la productividad del cultivo (MBTC, 1995). De hecho, es una práctica incorporada en el manejo de muchas explotaciones comerciales en regiones tropicales y mediterráneas, como es el caso de España, Grecia y Turquía (Stapleton, 2000).

#### 2.4.4.2. Biofumigación

En el informe de 1998 del MBTOC aparece el término biofumigación como una de las alternativas no químicas al BrMe. En este informe viene definida como la incorporación de materia orgánica al suelo que al degradarse genera una serie de compuestos que dañan al patógeno. Esta técnica puede combinarse, o no, con una cubierta plástica para aumentar la temperatura y mejorar la retención de estos compuestos (MBTOC, 1998). Entre las enmiendas más empleadas destacan los restos vegetales de plantas crucíferas o *Brassicaceae* debido a su contenido en glucosinolatos. Estos compuestos se transforman en isotiocianatos (ITC) al hidrolizarse en presencia de la enzima mirosinasa, también presente en estas plantas (Figura 2.8). Varios de los subproductos obtenidos por la degradación de este tipo de enmiendas resultan tóxicos para muchos patógenos, especialmente el ITC. De hecho, la efectividad del fumigante químico metam sodio resulta de la liberación de metil isotiocianato al aplicarse en suelo húmedo (Smelt y Leistra, 1974). El término biofumigación fue acuñado por J. A. Kirkegaard en 1993 y las primeras investigaciones se centraron en el uso de restos vegetales de plantas Brassicaceas por los glucosinolatos presentes (Kirkegaard et al., 1993; Kirkegaard y Matthiessen, 2004). Entre las especies más empleadas como enmiendas para este fin están algunas mostazas (*Brassica carinata*, *B. juncea*, *B. napus* y *Sinapis alba*), la rúcula (*Eruca sativa*), los rábanos (*Raphanus sativus* y *R. napus*) y el brócoli u otras coles (*Brassica oleracea*) (Matthiesen y Kirkegaard, 2006; Hanschen y Winkelmann, 2020). El contenido en glucosinolatos puede variar en función de la especie, el momento de desarrollo (estado ontogénico) y el órgano de la planta. Por ejemplo, en el caso de la mostaza india (*B. juncea*) las semillas contienen mucha más cantidad (61  $\mu\text{mol/g}$ , peso seco) que las raíces, tallos, hojas y flores en etapa de floración (4-5,5  $\mu\text{mol/g}$ , peso seco) (Hanschen y Winkelmann, 2020). Este efecto de las Brassicaceas se basa en un mecanismo de alelopatía que ya se había descrito anteriormente y que le otorgó mala reputación como plantas acompañantes (Matthiesen y Kirkegaard, 2006).

Una práctica habitual en la biofumigación consiste en intercalar el cultivo afectado con un ciclo de una especie biofumigante cuyo restos se incorporan al suelo cuando se encuentra en estado de floración. Otra opción más ventajosa es el empleo de los subproductos provenientes del procesado de estos cultivos por ser de bajo coste y no condicionar tiempo ni espacio para su cultivo. Mayoritariamente, en estos tratamientos se

opta por la colocación de una cubierta plástica tras la incorporación de la enmienda, en cantidades similares a la biosolarización, para aumentar la eficacia del tratamiento. De esta forma se suman otros mecanismos de control aumentando su efectividad, de forma similar a la biosolarización. Entre ellos, el incremento de la temperatura del suelo, la liberación de otros compuestos tóxicos además de los ITC, la reestructuración de la microbiota y la mejora de las condiciones fisicoquímicas y biológicas del suelo.



**Figura 2.8** | Reacción de hidrólisis de glucosinolato mediada por mirosinasa (izquierda) y moléculas bioactivas resultantes (derecha). Figura extraída de Tagele et al. (2021).

#### 2.4.4.3. Desinfección anaerobia

La desinfección anaerobia del suelo o ASD (*anaerobic soil disinfestation*), también conocida como desinfección biológica o reductora, surge ante la limitación climática de la biosolarización. Esta práctica nace a principios de este siglo en Holanda y Japón como alternativa de biodesinfección para regiones con climas húmedos o con menor radiación solar (Momma et al., 2008). Este enfoque se basa en la generación de condiciones anaerobias o reductoras en el suelo mediante la incorporación de enmiendas orgánicas fácilmente degradables y posterior saturación del suelo para cubrirlo con plástico transparente durante un mínimo de cuatro semanas (Shennan et al. 2007; Momma et al., 2008; Lamers, 2010). El objetivo principal es reducir la población del patógeno mediante la exposición a condiciones de falta de oxígeno y a los compuestos tóxicos generados durante la degradación anaerobia de la materia orgánica aportada. Para esta práctica, además de la saturación del suelo, la naturaleza de la enmienda orgánica aportada toma un papel relevante. En este caso se incorpora materia orgánica lábil, de fácil degradación, para promover la actividad microbiana. Con ello, además de liberar compuestos tóxicos durante los procesos de degradación, se producen cambios en la composición microbiana por la anaerobiosis temporal que contribuyen en el control del patógeno. La anaerobiosis puede verse favorecida a dosis de enmienda cercanas a 4mgC/g de suelo (Butler et al., 2012a y 2014). Entre las enmiendas más empleadas predominan las melazas de diferentes orígenes y el etanol como enmiendas líquidas y el salvado de trigo (*Triticum* spp.) o de arroz (*Oryza sativa*) entre las sólidas (Momma et al., 2013). Este tipo de enmiendas están compuestas por estructuras de carbono

simples, como azúcares y aminoácidos, consideradas fuentes lábiles de C. Además, durante la degradación en condiciones anaerobias se liberan compuestos tóxicos para los patógenos pero que muchas poblaciones residentes pueden tolerar, al igual que la anaerobiosis transitoria. Entre estos elementos destacan la liberación de Fe y Mn, derivada de las condiciones reductoras en el suelo (Momma et al., 2011), junto con HCN, NH<sub>3</sub> y AGV resultantes de la degradación de la materia orgánica (Oka et al., 2007; Dutta et al., 2019).

La técnica del encharcamiento para el control de patógenos edáficos ya se practicaba con anterioridad. De hecho, el MBTOC cita el encharcamiento como una práctica complementaria a otras, entre las alternativas al BrMe en su primer informe (MBTOC, 1995). Sin embargo, el control de patógenos por simple saturación del suelo requiere de largos periodos en estas condiciones (4-6 meses) y no es muy efectivo debiendo combinarse con otras prácticas (Katan, 2000). A través de la ASD, que incorpora el aporte de materia orgánica y la cubierta plástica, se logra reducir considerablemente el tiempo de exposición y mejorar los resultados (Momma et al., 2013). En este enfoque, se considera que la estimulación de la microbiota indígena a través de las condiciones generadas durante la ASD en el suelo es el factor más determinante para el control de patógenos (Ueki et al., 2018). Sin dejar de lado el efecto nocivo de las condiciones anaerobias sobre el patógeno. Se consideran condiciones reductoras o facultativas cuando el valor del potencial redox (Eh) se encuentra entre 0-200mV, y altamente reductoras a valores negativos (<0mV) (Reddy y DeLaune, 2008). Además, al igual que con la temperatura, la acumulación de tiempo de exposición a estas condiciones repercute negativamente en el patógeno (Shennan et al., 2018). Por estas razones, se reconoce a esta técnica como la alternativa a la biosolarización para regiones en las que la radiación solar es limitada. Así y todo, las altas temperaturas del suelo aceleran los procesos de degradación pudiendo mejorar los resultados, por lo que en estos casos también es preferible su aplicación durante los meses más calurosos de cada región, aunque permitiría adaptar el momento del tratamiento a los ciclo de cultivo (Lamers et al., 2010; Momma et al., 2013).

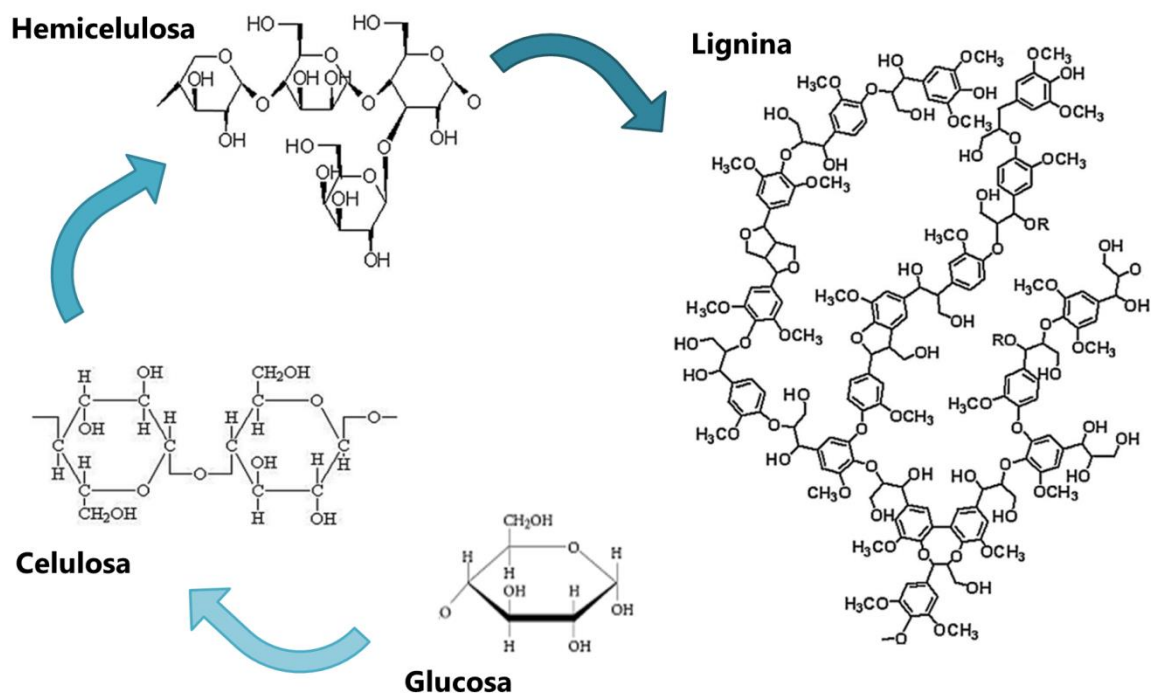
## **2.5. Subproductos agroindustriales como enmiendas para biodesinfección**

Una vez descritos los diferentes enfoques de biodesinfección, se puede concluir que las características fisicoquímicas de la materia orgánica junto con las condiciones abióticas determinan los procesos microbiológicos que se producen en el suelo durante estos tratamientos. Por lo tanto, la elección apropiada de enmiendas y dosis es uno de los mayores retos a los que se enfrenta esta técnica. Es por ello que la gran mayoría de estudios relacionados se centran en la evaluación de enmiendas y mezclas contra diferentes patógenos en diferentes tipos de suelo y zonas climáticas (Lazarovits et al. 2001; Bonanomi et al., 2010; Roskopf et al., 2020; De Corato 2021). Desde el comienzo, la atención se centró en el uso de residuos vegetales, principalmente restos de cultivo, o estiércoles y purines de origen animal. En los últimos años los subproductos procedentes de la industria

agroalimentaria han tomado especial relevancia al promover con su uso la economía circular. Con este fin, es importante tener en cuenta factores como la disponibilidad, en términos de cantidad y proximidad, además de las características fisicoquímicas de los subproductos. Para que un residuo pueda considerarse subproducto debe estar permitido su uso como tal, de lo contrario deberá gestionarse como un residuo (Ley 7/2022).

Cada uno de los enfoques de biodesinfección presentados en los apartados anteriores suele estar ligado al empleo de determinados subproductos. En general, las propiedades más valoradas en la elección de subproductos como enmiendas para estos tratamientos es la concentración de N y la naturaleza de la fuente de C, junto con el resultante ratio C/N (Bonanomi et al., 2018). Estos parámetros son esenciales y determinantes en los procesos biológicos. Los microorganismos emplean el N para degradar los sustratos de C y así proliferar aumentando sus poblaciones. En este sentido, los valores C/N por encima de 30 limitan el desarrollo microbiano y gran parte del C queda inmovilizado con el consecuente riesgo de secuestro de N por los microorganismos, impidiendo ser tomado por el cultivo (Scotti et al., 2015). Además, el nivel de degradabilidad de la fuente de C y su naturaleza influyen fuertemente en estos procesos, tanto en el grado de actividad y funcionalidad como en la composición de las comunidades microbianas (Zhao et al., 2020). Se aplica el término lábil a los sustratos fácilmente degradables que suelen ser estructuras simples, fáciles de descomponer. Por otro lado, las moléculas de estructuras más complejas y más difíciles de degradar son consideradas recalcitrantes y, generalmente, también requieren de comunidades microbianas especializadas en su degradación. En los residuos vegetales se pueden encontrar compuestos lábiles como azúcares y celulosa o más recalcitrantes como la lignina, que requiere de enzimas específicas para su degradación (Figura 2.9). En función del material vegetal pueden predominar unas formas sobre otras.

Entre los subproductos más empleados con alto contenido en N destacan los estiércoles y purines de diferentes orígenes, que son las enmiendas más empleadas desde los inicios de estos tratamientos. Recientemente, se incluyen otros subproductos como las harinas de sangre, hueso o pluma, emulsión de pescado y restos de leguminosas como la soja (Lazarovits et al., 2001; Gamliel y Stapleton, 2012; Rosskopf et al. 2020). En lo concerniente a las fuentes de C el abanico de opciones es muy amplio y, como se ha mencionado previamente, suele estar relacionado con su degradabilidad. En los tratamientos con un enfoque de ASD, que busca un fuerte incremento en la actividad microbiana, predomina el uso de subproductos lábiles. Entre la multitud de opciones destacan las melazas y vinazas de diferentes orígenes, el salvado de trigo o de arroz y el bagazo de uva y de cerveza (Rosskopf et al. 2020). El enfoque de la biosolarización es menos restrictivo, por lo que presenta mayor abanico en la aplicación de subproductos. En estos casos toman mayor relevancia otros subproductos como las tortas resultantes de la extracción de aceites, compost de diferentes orígenes, cáscaras de semilla, desechos alimentarios de la industria pesquera, e incluso lodos de depuradora (De Corato, 2021).



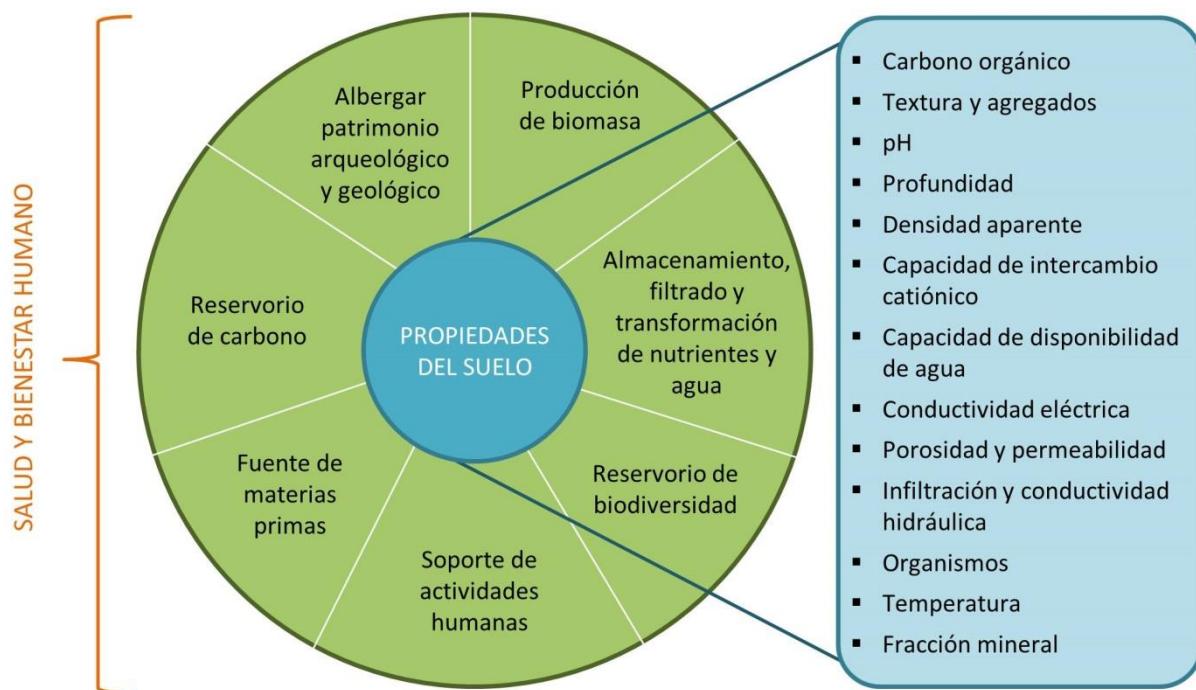
**Figura 2.9** | Estructura molecular de polisacáridos presentes en los restos vegetales, de menor a mayor complejidad estructural.

Ante el vasto abanico de subproductos aplicables en estos tratamientos, los esfuerzos se centran en la determinación de la dosis y el valor C/N de la mezcla de enmiendas. Sin dejar de lado la naturaleza del subproducto que puede modular la composición de la microbiota y favorecer la proliferación de determinadas poblaciones, pudiendo hacer la BD más o menos efectiva. Este es el caso de los degradadores de lignina o quitina, que al tratarse de estructuras más complejas requieren de poblaciones específicas con capacidad degradadora para este tipo de compuestos. En cuanto al valor C/N, muchas investigaciones coinciden en que las mezclas con valores altos (>30) son menos efectivas, al igual que aquellas con valores muy bajos (<10). Sin embargo, dentro del rango recomendado de C/N los resultados varían según el patógeno, tipo de suelo y naturaleza de la enmienda (Bonanomi et al., 2018). La dosis de aplicación es otro de los factores relevantes pero es muy variable, pudiendo oscilar entre el 0,1-10% (peso/peso) (Roskopf et al., 2020). La variabilidad en los resultados de estos tratamientos está directamente relacionada con la complejidad intrínseca de los procesos biológicos del suelo de los que depende la salud del mismo.

## 2.6. El suelo

El suelo se considera un sistema vivo complejo con multitud de interacciones y un recurso no renovable indispensable para la vida (Yang et al., 2020b). Éste soporta la mayor parte de las actividades humanas al mismo tiempo es proveedor de otros recursos esenciales como alimento y materias primas. A todas estas funciones se les denominan servicios ecosistémicos y muchos de ellos dependen directamente del estado del suelo, determinado por sus

propiedades físicas, químicas y biológicas (Baveye et al., 2016; Jahiruddin, 2020) (Figura 2.10). Es bien sabido que una mala gestión de este recurso puede llevar a la pobreza, malnutrición y otros problemas socioeconómicos. Por tanto, resulta evidente que la salud del suelo está estrechamente ligada a la salud y al bienestar humano (Pepper, 2013; Bünemann et al., 2018). Por esta razón, la correcta gestión de los suelos resulta imperante y en particular los agrícolas, que siendo los proveedores de alimento están sujetos a constantes e importantes perturbaciones que alteran la salud de los mismos. El uso abusivo de estos suelos a través de prácticas agresivas continuadas durante décadas ha provocado su degradación a nivel global (baja fertilidad, salinidad, acidez, erosión, compactación, acumulación de contaminantes, pérdida de biodiversidad, etc.), limitando o anulando su capacidad para llevar a cabo sus funciones (Jahiruddin, 2020; Yang et al., 2020b; Guo, 2021). Por todo ello, resulta fundamental entender los procesos y mecanismos que se dan en los suelos para dirigir las actuaciones en pos de su salud.



**Figura 2.10** | Esquema de los servicios ecosistémicos de los que depende la salud y el bienestar humano y que vienen condicionados por las propiedades del suelo. Adaptación de Adhikari y Hartemink (2016).

Un suelo natural está constituido por minerales, materia orgánica, organismos vivos, agua y aire, estando todos estos elementos interrelacionados a través de procesos físicos, químicos y biológicos (Guo et al., 2021). La capacidad de un suelo para realizar correctamente sus funciones está directamente ligada a los elementos y procesos mencionados. Todo esto lo convierte en un sistema altamente complejo que en condiciones adecuadas es capaz de mantener su fertilidad y garantizar la producción de alimento en ausencia de enfermedad, además de mejorar la calidad de agua y del aire (Bünemann et al., 2018; Raghu et al., 2021). Por esta razón, resulta indispensable dirigir los esfuerzos hacia la recuperación de la salud de los suelos, y en particular de los suelos agrícolas.



### 2.6.1. Salud del suelo y supresividad

Hasta hace unos pocos años se diferenciaban los términos calidad y salud del suelo. La calidad hacía referencia a la capacidad del suelo para cumplir una determinada función definida por la necesidad humana. Por otro lado, el término salud del suelo englobaba toda una serie de funciones físicas, químicas y biológicas implicadas en el correcto funcionamiento del sistema. La salud del suelo contempla atributos ecológicos como la biodiversidad, la red trófica y la capacidad de realizar determinadas funciones (Lehmann et al., 2020). Por esta razón, en los últimos años se ha adoptado el término salud del suelo de forma generalizada siendo éste es el objetivo primordial en todos los casos. Aunque existen varias definiciones, una de las más empleadas es la del Servicio de Conservación de Recursos Naturales del Departamento de Agricultura de EEUU que se define salud del suelo como la "capacidad continua del suelo para funcionar como un ecosistema vivo vital que sustenta plantas, animales y humanos" (NRCS-USDA, 2019). De esta forma se enfatiza que un suelo sano es aquel que produce beneficios tanto ecológicos como agronómicos. Entre estos últimos destaca la mejora de la fertilidad, la supresión de enfermedades y malezas y la resiliencia al estrés ambiental (Hodson y Lewis, 2016).

Un suelo sano, especialmente los agrícolas, incluye encontrarse libre de patógenos que puedan afectar al cultivo. Para ello, debe evaluarse el suelo en perspectiva contemplando un periodo de tiempo prolongado en ausencia de enfermedad. Sin embargo, un suelo sano también puede albergar al patógeno pero sin dejar que prolifere ni genere enfermedad en el cultivo susceptible. Este fenómeno se conoce como supresividad o suelo supresor, cualidad que puede considerarse como parte de la capacidad de homeostasis de un ecosistemas estable. En oposición, los suelos conducentes son aquellos en los que la enfermedad se desarrolla fácilmente. Los primeros estudios de suelos supresivos determinaron que la supresividad del patógeno puede darse de diferentes formas: (i) el patógeno no se establece, (ii) el patógeno se establece pero no genera enfermedad en el cultivo, o (iii) el patógeno se establece e incluso persiste generando daños leves por un tiempo (Baker y Cook, 1974). Aunque esta cualidad también incluye propiedades físicas y químicas del suelo ventajosas que mejoran la protección de los cultivos, el componente biológico está considerado el principal responsable de este atributo (Jayaraman et al., 2021). Esta afirmación viene consolidada por varios estudios que demostraron la adquisición de esta cualidad en suelos conducentes mediante la transferencia de pequeñas cantidades de suelo supresor. De la misma forma, se observó la pérdida de supresividad tras la esterilización o pasteurización del suelo (Siegel-Hertz et al., 2018). Por tanto, aunque no se puede descartar el valor de las propiedades fisicoquímicas, es conveniente focalizar la atención en la composición y estructura de la población microbiana. La supresividad mediada por la microbiota involucra diferentes mecanismos antagónicos como son: (i) competencia, (ii) antibiosis, (iii) parasitismo y (iv) depredación. Además, en los suelos supresivos también se dan mecanismos no antagónicos como la resistencia sistémica inducida en la plantas (Hoitink y Boehm, 1999; Jayaraman et al., 2021; Sooriyaarachchi et al., 2021).

Se considera que existen dos tipos de supresividad, la general, que incluye el efecto del conjunto de la población microbiana, y la específica en la que intervienen poblaciones concretas (Garbeva et al., 2011). En ambos casos, la aplicación de materia orgánica tiene capacidad reguladora de las poblaciones siendo el grado de degradabilidad uno de los factores más influyentes. Además, el aporte de materia orgánica también mejora las propiedades físicas y químicas del suelo (estructura, drenaje, retención de humedad, etc.) y aumenta la concentración de nutrientes. De la misma forma, otras prácticas de manejo como el laboreo, la aplicación de pesticidas y el monocultivo influyen negativamente en el equilibrio de la microbiota edáfica (Akhtar y Malik, 2000; Bailey y Lazarovits, 2003). La salud del suelo y la supresividad son conceptos complejos y difícilmente cuantificables. Por ello, su análisis requiere de la evaluación conjunta de indicadores suficientemente diversos como para representar las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo y los procesos que en él ocurren (Guo, 2021). Un indicador puede definirse como una variable que proporciona información sobre otras que son difíciles de conocer y se puede utilizar como punto de referencia para la toma de decisiones. Los criterios de selección para indicadores de salud del suelo deben incluir la capacidad de indicar cambios en la función del suelo, facilidad de muestreo y medición, sensibilidad a las variaciones climáticas y de manejo y accesibilidad e interpretabilidad para usuarios generales (Bünemann et al., 2018; Guo, 2021).

### 2.6.2. Indicadores físicos

Las propiedades físicas del suelo son difíciles de mejorar y los cambios requieren periodos prolongados. Se consideran características físicas del suelo a aquellas propiedades relacionadas con la difusión de agua y oxígeno junto con la capacidad de permitir el crecimiento de las raíces de las plantas y el asentamiento de microorganismos. Entre los indicadores físicos más empleados para la evaluación de la salud de suelos destacan (Cardoso et al., 2013; Moebius-Clune et al., 2016; Maurya et al., 2020):

- Textura física: Abundancia relativa de las diferentes fracciones sólidas definidas por el tamaño de partícula (arena>limo>arcilla). Influye en la retención y movilización del agua y otros compuestos. A menor tamaño de partícula, mayor capacidad de retención.
- Estructura y porosidad: Formación de agregados y poros de diferente tamaño. Afecta a la aireación y a la infiltración de agua (conductividad hidráulica).
- Capacidad de campo: Cantidad de agua que puede retener el suelo. Su valor tiene relación con la textura y la estructura del suelo.
- Densidad aparente: Cantidad de peso en un volumen de suelo sin compactar, considerando los poros presentes. Influye en la retención y movilización de agua y otros compuestos.

- Profundidad de suelo o zona de enraizamiento: Capa superficial del suelo hasta donde se desarrollan las raíces de las plantas. Zona de mayor actividad física, química y biológica. Fuertemente influenciada por las variables anteriores.

La mayoría de estas variables se ven afectadas por otras químicas y biológicas, todas ellas fuertemente influenciadas por el manejo del suelo. En cuanto a las características físicas, un suelo sano es aquel bien estructurado y aireado que permite la difusión de agua y nutrientes, así como el correcto asentamiento de plantas y microorganismos. Aunque las prácticas de manejo son las que más impacto tienen sobre estas variables, la textura viene determinada por la naturaleza del suelo e influye fuertemente en el resto de variables. Los suelos arcillosos retienen mejor el agua y otros compuestos pero son más vulnerables a la compactación y al desarrollo de enfermedades (Cardoso et al., 2013).

### **2.6.3. Indicadores químicos**

Las características químicas de un suelo hacen referencia a las condiciones que afectan a su capacidad para almacenar y proveer de nutrientes a las plantas. A pesar de que la fertilidad de un suelo viene determinada, al igual que su salud, por un conjunto de variables físicas, químicas y biológicas, los indicadores químicos son los más empleados tradicionalmente en su evaluación. Los indicadores químicos más empleados son los siguientes (Cardoso et al., 2013; Moebius-Clune et al., 2016; Maurya et al., 2020):

- pH: Concentración de iones de hidrógeno en la solución del suelo. Condiciona la liberación de nutrientes y la actividad biológica.
- Capacidad de intercambio catiónico: Capacidad de retención de nutrientes y otros compuestos en el suelo.
- Conductividad eléctrica: Concentración de sales solubles que siendo elevada provoca la salinidad del suelo, lo que conlleva su desestructuración y la pérdida de fertilidad.
- Macronutrientes y micronutrientes: Concentración de macro (C, H, O, N, P, K, Ca, Mg, S) y micronutrientes (Fe, Zn, Cu, Mn, Mo, Cl, B). Son limitantes en el desarrollo de las plantas y pueden encontrarse retenidos o libres (disponibles para las plantas).
- Materia orgánica: Restos de origen vegetal o animal, descompuestos o no. La concentración y naturaleza de la materia orgánica afectan a la mayoría de variables físicas, químicas y biológicas.
- Contaminantes: Se consideran sustancias contaminantes a todas aquellas que pongan en riesgo la salud humana y el medio ambiente. Entre estos elementos, los metales pesados son los más medidos en la evaluación de suelos por su frecuente presencia.

Al igual que las variables físicas, las químicas también están fuertemente influenciadas por el manejo del suelo y, de la misma forma, también están vinculadas a otras variables físicas y biológicas. Por esta razón, la evaluación conjunta de indicadores de

diferente naturaleza resulta lo más apropiado en la evaluación de la salud del suelo. Tradicionalmente, la evaluación del suelo agrícola, focalizada en el grado de fertilidad, centraba su atención en los análisis fisicoquímicos. Sin embargo, en los últimos años el componente biológico está adquiriendo mayor relevancia al destacar como elemento clave en los procesos del suelo aportando información más completa (Guo, 2021).

#### **2.6.4. Indicadores biológicos**

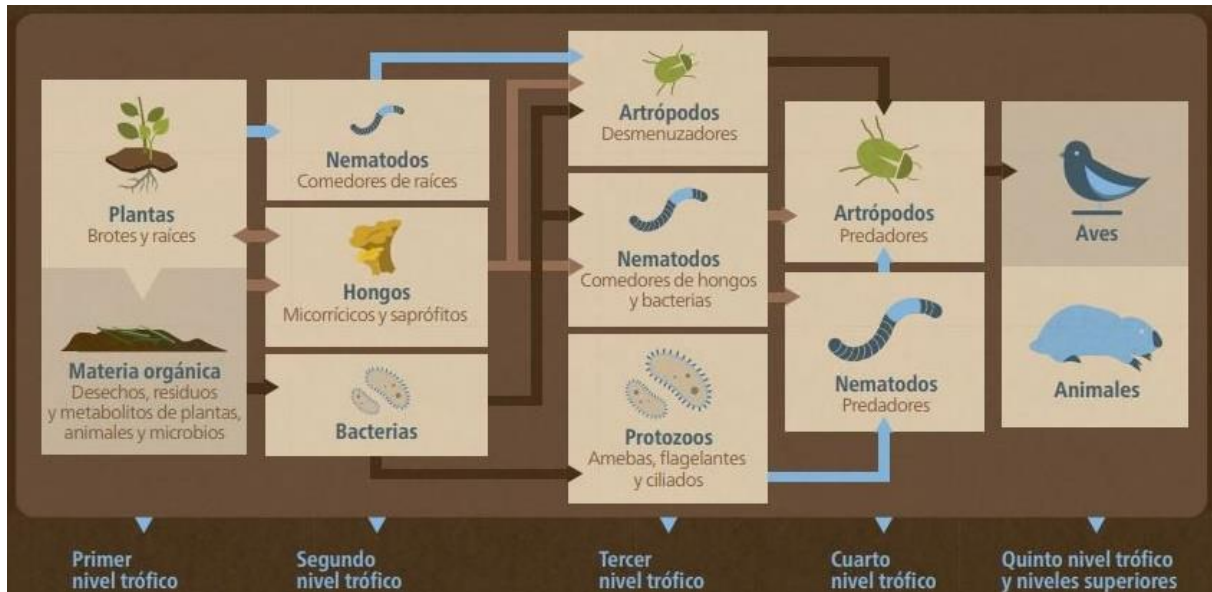
Los indicadores biológicos permiten la evaluación del componente biológico del suelo, cuya actividad se concentra en los primeros 30cm de profundidad (Pankhurst et al., 1997). Junto con las plantas, la biota del suelo está conformada por (Gupta y Yeast, 1997; Cortet et al., 1999; Martin y Sprunger, 2022):

- Microflora: bacterias, cianobacterias, actinomicetos, hongos, arqueas y algas.
- Microfauna (<0,02mm): protozoos y nematodos.
- Mesofauna (0,02-4mm): oligoquetos menores, colémbolos y ácaros.
- Macrofauna (>4mm): oligoquetos mayores, artrópodos, gasterópodos y pequeños mamíferos.
- Otros: virus y viroides.

La biota edáfica juega un papel fundamental en la salud y fertilidad del suelo, al actuar sobre la descomposición de la materia orgánica, ciclo de nutrientes, control de patógenos e influir en las propiedades químicas y físicas. Además, es un componente dinámico que se ve rápidamente afectado por el uso y manejo del suelo o cualquier otra perturbación. Por tanto, los indicadores relacionados con el componente biológico ofrecen una visión integradora en la evaluación del suelo que las variables físicas y químicas no pueden proporcionar por sí solas (Cardoso et al., 2013; Maurya et al., 2020). La estructura y composición de todos los organismos que conforman la biota edáfica junto con sus dinámicas conforman la red trófica del suelo, desglosada en diferentes niveles interconectados (Figura 2.11). El primer nivel está representado por los organismos fotosintetizadores y la materia orgánica. El segundo lo forman todos los organismos descomponedores, mutualistas y parásitos. En el tercer nivel se encuentran los trituradores, predadores y herbívoros. El cuarto y quinto son los niveles superiores formados, en su mayoría, por predadores superiores. En todos los casos, los organismos de cada nivel dependen directamente de los presentes en los niveles inferiores (Melakeberhan et al., 2021).

Los indicadores biológicos o bioindicadores más empleados son aquellos relacionados con los organismos presentes en los niveles inferiores (bacterias, hongos y nematodos, principalmente). Esto se debe a su alta sensibilidad y rápida respuesta a los cambios, además sustentan la red trófica siendo la base de la que dependen los organismos de niveles superiores. La actividad y diversidad microbiana juegan un papel fundamental en el mantenimiento de las funciones esenciales en la salud del suelo, siendo muy susceptibles a las perturbaciones. A menor grado de perturbación por las prácticas de manejo del suelo (laboreo, fertilización, cultivo, etc.), mayor actividad y diversidad microbiana. Es por todo esto

que la evaluación del suelo a través de un conjunto de bioindicadores facilita el pronóstico temprano del estado del suelo (Cardoso et al., 2013). La principal limitación de estos indicadores es el alto grado de variabilidad en función del clima, la estación, la ubicación geográfica y los factores pedogenéticos (formadores del suelo). Esto da lugar a conclusiones contradictorias en diferentes estudios al describir los efectos de un contaminante o un manejo determinado en la salud del suelo (Gil-Sotres et al., 2005). En conclusión, para una correcta evaluación del estado del suelo se requiere el análisis conjunto de indicadores físicos, químicos y biológicos, con especial atención a las variables biológicas.



**Figura 2.11** | Esquema de la red trófica del suelo. (FAO, 2015) <https://www.fao.org/3/i4551s/i4551s.pdf>

#### 2.6.4.1. Biomasa microbiana

La biomasa microbiana del suelo se puede definir como el conjunto de organismos que componen la microflora y microfauna. Entre ellos, las poblaciones de bacterias y hongos son generalmente las dominantes y las más relevantes en cuanto al flujo de energía y la transferencia de nutrientes en los ecosistemas terrestres. Sin embargo, la mayoría de estimaciones de la biomasa no excluyen de forma fiable los protozoos y nematodos, también relevantes en las funciones mencionadas (Schloter et al., 2003). La biomasa microbiana del suelo se ve afectada no solo por las prácticas de manejo, sino también por la composición de las especies de plantas presentes y la naturaleza de la materia orgánica. Entre las prácticas agrícolas, el laboreo, la fertilización mineral y la aplicación de pesticidas son las que generan mayor impacto negativo en la biomasa microbiana (Gil-Torres et al., 2005; Cardoso et al., 2013). Las variables más empleadas para su evaluación son el C de biomasa microbiana (CBM), el análisis del perfil de los ácidos grasos fosfolípidicos (PLFA: *phospholipidic fatty acid analysis*) y la tasa de respiración del suelo. El CBM indica la fracción del C orgánico contenida exclusivamente en los microorganismos vivos y, junto con la respiración del suelo son las variables más empleadas como bioindicadores. La tasa de respiración del suelo, que indica la

cantidad de CO<sub>2</sub> que emiten los organismos vivos, también permite obtener información del nivel de actividad microbiana en el suelo. Por otro lado, los fosfolípidos se encuentran en las membranas de todas las células vivas y su análisis también permite obtener información sobre la diversidad de las comunidades microbianas (Schloter et al., 2003; Cardoso et al., 2013).

#### 2.6.4.2. Actividad microbiana

La actividad microbiana es un indicador clave en la determinación de la salud del suelo puesto que determina el nivel de actividad de sus funciones, entre las que destacan la regulación del ciclo de nutrientes, la descontaminación y la purificación del agua (Zhao et al., 2020; Guo, 2021). El ciclo de nutrientes, esencial para el desarrollo del cultivo, incluye una serie de reacciones químicas, bioquímicas, y fisicoquímicas. Las reacciones bioquímicas están catalizadas por diferentes enzimas, lo que hace que puedan considerarse buenos bioindicadores. Las principales fuentes de enzimas en el suelo son las plantas, animales y microorganismos, siendo estos últimos los mayores contribuyentes. Estas enzimas se encuentran en diferentes formas, en las células de los organismos vivos, en los restos de estos al morir, en la solución del suelo o unidos a las arcillas o coloides orgánicos. La liberación de enzimas al suelo se produce durante la descomposición del tejido muerto de los organismos, dinamizando el ciclo de nutrientes (Cardoso et al., 2013; Chettri et al., 2021). Los ciclos del nitrógeno (N), carbono (C), fósforo (P) y azufre (S) son esenciales en todos los suelos, especialmente en los agrícolas, y vienen mediados por sus respectivas enzimas. Algunas de las más empleadas son (Adetunji et al., 2017; Chettri et al. 2021):

- Ureasa: Interviene en el ciclo del N actuando en la hidrólisis de la urea a dióxido de C (CO<sub>2</sub>) y amoníaco (NH<sub>3</sub>). En los suelos cultivables, la urea suele emplearse como fertilizante nitrogenado que hace aumentar la actividad de la ureasa, lo que en exceso puede conducir a toxicidad por NH<sub>3</sub> y nitrito (NO<sub>2</sub>). Estos compuestos son dañinos para las plántulas jóvenes, aunque el NH<sub>3</sub> generado a menudo se pierde por volatilización. Esta enzima se libera del metabolismo vegetal y microbiano, así como de sus células muertas.
- β-glucosidasa (celobiasa): Interviene en el ciclo del C al catalizar la hidrólisis y biodegradación de varios β-glucósidos (maltosa y celobiosa) presentes en los desechos vegetales. La β-glucosidasa se encuentra predominantemente en las plantas, animales, hongos y bacterias. Esta enzima actúa en la última fase del proceso de degradación de la celulosa hidrolizando el residuo de celobiosa. Estas reacciones producen glucosa como producto final, una importante fuente de energía de C para el crecimiento y actividad de los microorganismos del suelo.
- β-galactosidasa: Junto con la β-glucosidasa, la β-galactosidasa forma parte de las enzimas catalizadoras de la hidrólisis de carbohidratos. Esto provoca la liberación de azúcares de bajo peso molecular que son importantes fuentes de energía para los microorganismos.

- Fosfatasa ácida y alcalina: Intervienen en el ciclo del P catalizando la hidrólisis de ésteres y anhídridos de ácido fosfórico. Dado que las plantas utilizan solo el P inorgánico y una gran cantidad de P del suelo se encuentra en forma orgánica, la conversión a formas disponibles (mineralización) de la porción orgánica resulta vital en la nutrición vegetal. Ante la carencia de P asimilable, las raíces de las plantas y los microorganismos aumentan la secreción de fosfatasa para intensificar la solubilización y movilización del P, tanto en medio ácido como alcalino. Por tanto, la actividad de las fosfatasas se puede utilizar como indicador de la disponibilidad de P inorgánico.
- Arilsulfatasa: Forma parte del ciclo del S actuando en la hidrólisis de los ésteres aromáticos de S (ésteres fenólicos de ácido sulfúrico), liberando fenoles y sulfatos. El S es uno de los macronutrientes esenciales para el crecimiento de plantas y organismos en el suelo. La mayor parte del S existe en forma orgánica en el suelo como ésteres de sulfato que representan entre el 30-75% de este azufre orgánico. Los microorganismos son los principales productores de esta enzima pero el conocimiento con respecto a los géneros y especies involucrados en su síntesis y en la mineralización del S es limitado. Estas enzimas podrían indicar la presencia de hongos, ya que solo los hongos contienen ésteres sulfatos. Su presencia en el suelo a menudo está directamente relacionada con biomasa microbiana y la tasa de inmovilización de S.

La variación en la producción de estas encimas deriva de diversos factores como la materia orgánica, temperatura, humedad, pH y alteraciones derivadas de las prácticas de manejo. Siendo variables muy sensibles y fundamentales en las dinámicas bioquímicas del suelo destacan como bioindicador en la evaluación de la actividad microbiana edáfica. Esto convierte a estas variables en unas de las más fiables y empleadas para la evaluación del estado del suelo (Adetunji et al., 2017; Chettri et al., 2021). Además de las actividades enzimáticas, la evaluación de otras variables de actividad biológica puede contribuir en la evaluación de la salud del suelo. Otras variables sensibles al manejo e importantes para los suelos agrícolas son las relacionadas con los ciclos del C y el N, elementos esenciales en las dinámicas bioquímicas del suelo. Entre estas variables destacan el C orgánico soluble (COS) y el N potencialmente mineralizable (NPM) como indicadores de actividad biológica sensibles a las alteraciones del suelo. La biodisponibilidad del N en el suelo es un factor fundamental para el crecimiento la planta y el NPM es una variable combinada de la actividad biológica del suelo y del sustrato disponible para mineralizar el N. Esta medida permite conocer la capacidad de la microbiota del suelo para mineralizar el N retenido en los residuos orgánicos a formas disponibles para la planta como el amonio ( $\text{NH}_4$ ) (Moebius-Clune et al., 2016). De igual manera, el COS hace referencia a la capacidad de la microbiota edáfica de transformar el C orgánico a formas disponibles. Al mismo tiempo, también hace referencia a parte de la fracción de C orgánico presente en el suelo que está directamente relacionado con la materia orgánica y la microbiota edáfica al ser parte de su composición.

### 2.6.4.3. Comunidades microbianas

La estructura y composición de la microbiota edáfica es uno de los pilares en la determinación de la salud y supresividad del suelo. Un suelo con alta diversidad microbiana tiene más posibilidades de mantener los procesos ecológicos después de una perturbación, capacidad denominada resiliencia. La composición de la comunidad vegetal puede favorecer la prevalencia de ciertos grupos funcionales microbianos o causar su supresión, al igual que la composición y cantidad de la materia orgánica presente en el suelo (Van Bruggen y Semenov 2000; Cardoso et al., 2013). La comunidad microbiana edáfica se ve altamente afectada por las prácticas agrícolas, ligadas a fuertes y continuas perturbaciones. Actualmente, se reconoce que el laboreo, la fertilización mineral, la aplicación de pesticidas y el monocultivo actúan en detrimento de una microbiota estable y equilibrada. Además de estas prácticas, otros factores abióticos como la temperatura, la humedad y el pH, entre otros, también influyen fuertemente en la microbiota edáfica (Gupta et al., 2022). Entre las comunidades microbianas más estudiadas destacan las de bacterias y hongos debido a su abundancia en el suelo y por las funciones esenciales que realizan. Estos microorganismos son los principales degradadores, lo que les convierte en agentes fundamentales de los procesos biogeoquímicos. Además, algunos de estos grupos de microorganismos habitan las plantas formando parte de su microbiota (endófitos) contribuyendo en los procesos vitales, tanto de nutrición como de protección frente a enfermedades (resistencia inducida) (Mukherjee et al., 2021). La comunidad de nematodos (nematofauna) también resulta de gran interés en la evaluación del estado del suelo al operar a través de diferentes niveles tróficos. Su estructura y composición dependen de los niveles inferiores, lo que convierte a esta comunidad en un buen indicador de la estructura de la microbiota edáfica y, por tanto, del estado del suelo (Melakeberhan et al., 2021).

- Comunidad de bacterias

Muchos de los grupos de bacterias considerados PGPM son especies endófitas que viven en asociación a la raíz de la planta. Estos organismos se encuentran generalmente de forma libre en el suelo y son atraídas hacia la raíz por los exudados radiculares. La mayoría de especies endófitas pertenecen a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Rhizobium* y *Fusarium*. Cuando están presentes en un gran número mejora el crecimiento de las plantas por sus acciones directas e indirectas. Las acciones directas incluyen importantes cambios bioquímicos y fisiológicos como la liberación y asimilación de nutrientes (solubilización de K, P, Ca, Mg, Mn, Cu, Zn, Fe y Zn), mejora de la textura del suelo, secreción de fitohormonas, liberación de metabolitos secundarios y fijación de N. Las acciones indirectas incluyen tendencias antagónicas hacia patógenos de plantas como la producción de antibióticos, HCN y varias sustancias químicas de señalización extracelular para la inducción de resistencia sistémica en



la planta (Boroujeni et al., 2021; Joshi et al., 2021; Mukherjee et al., 2021; Sooriyaarachchi et al., 2021).

A continuación se describen algunas de estas relaciones beneficiosas mediadas por determinados grupos de bacterias. Una de las más conocidas es la asociación entre *Rhizobium* y las plantas leguminosas que adquieren el N a través de estas bacterias que fijan el N atmosférico y lo transforman en formas asimilables. En el caso de las plantas no leguminosas, la fijación del N viene dado por otras bacterias. Entre las más estudiadas destacan las especies de *Azotobacter*, heterótrofos (obtención de nutrientes a partir de diversas fuentes de carbono orgánico) de vida libre que dependen de un suministro adecuado de compuestos de C como fuente de energía. Por otro lado, la clase Clostridia son heterótrofos anaerobios obligatorios y solo son capaces de fijar N en ausencia total de oxígeno y su actividad depende de la relación C/N en el suelo. La solubilización de otros nutrientes esenciales como el P viene mediada por grupos como *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Rhizobium*. Estas bacterias tienen la capacidad de solubilizar fosfato orgánico e inorgánico insoluble, que son las formas predominantes en los suelos. En este grupo, destacan los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* como potentes solubilizadores de P. Su actividad de solubilización se atribuye a la liberación de ácidos orgánicos producidos por estas bacterias, limitada por las fuentes de C y la relación C/N del suelo. La producción de sideróforos, compuestos solubilizadores de Fe, es otra de las funciones que pueden ejercer estos organismos, como *Pseudomonas*, y que favorecen el desarrollo del cultivo. Además de todas estas funciones, las bacterias asociadas a la raíz generan una capa protectora alrededor de esta denominada biofilm que la protege de ataques de patógenos y, junto a otros mecanismos antagonistas, ayuda a prevenir enfermedades (Hayat et al., 2010; Boroujeni et al., 2021). Entre las bacterias con reconocido efecto antagonista destacan las pertenecientes a los géneros *Streptomyces*, *Bacillus* y *Pseudomonas*, y su presencia se asocia a suelos supresores. Dado el beneficio que supone para el cultivo la presencia de este tipo de bacterias, muchas de estas son inoculadas en los suelos agrícolas. Sin embargo, a través de determinadas prácticas (aporte de materia orgánica, rotación de cultivos, mínimo laboreo, etc.) se puede promover la proliferación de las mismas, ya presentes en los suelos, y con mayor garantía de establecimiento de las poblaciones.

Dada la variedad de procesos en los que intervienen estos microorganismos, estas bacterias se pueden clasificar en grupos funcionales según el proceso biológico que desempeñan en un ecosistema. Por ejemplo, todas las que actúan en el ciclo de elementos esenciales (C, N, P, etc.) son ejemplos de grupos funcionales. En este enfoque, la especie individual no es el objetivo, sino la función que desempeñan colectivamente en un entorno. Las pruebas de utilización de sustratos como las proporcionadas por Biolog™ suelen emplearse para monitorear cambios en actividades metabólicas microbianas. La diversidad metabólica es consecuencia de la diversidad genética, los efectos ambientales en la expresión génica y la interacción ecológica entre diferentes poblaciones (Garlan y Mills, 1991). En consecuencia, conocer el perfil metabólico puede ayudar a comprender los cambios en la

actividad biológica del suelo causados por actividades antropogénicas u otras interferencias en el medio ambiente (Van Bruggen y Semenov, 2000; Cardoso et al., 2013). En cuanto a la composición taxonómica, en los últimos años, gracias a los avances en biotecnología, la secuenciación masiva es una de las técnicas más empleadas. Partiendo de una muestra de ADN del suelo, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR: *polymerase chain reaction*), se amplifican fragmentos concretos de genes estructurales diana para determinada comunidad. Los datos obtenidos con este proceso de secuenciación permiten el estudio de la diversidad, estructura y composición taxonómica de los microorganismos del suelo. Además, esta técnica también permite la evaluación de genes estructurales para una determinada función.

- Comunidad de hongos

Los hongos, junto con las bacterias, son los principales descomponedores de la materia orgánica del suelo, pudiendo darse especialización en el sustrato a degradar. De igual manera, pueden vivir de forma libre, asociados a la raíz (micorrícicos) o como endófitos en otras partes de la planta y dependen de fuentes de energía externas. Los hongos endófitos identificados pertenecen a los géneros *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Berkleasmium*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Cryptococcus*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Geomyces*, *Glomus*, *Leptospora*, *Microdochium*, *Neotyphodium*, *Ophiognomonina*, *Paecilomyces*, *Phaeomoniella*, *Phyllosticta*, *Penicillium*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus*, *Rhodotorula*, *Trichoderma*, *Wallemia*, y *Xylaria*. Junto con las especies endófitas, otros grupos de hongos también están reconocidos como PGPF, la mayoría dentro de los filos Ascomycota, Basidiomycota, y Zygomycota. Entre estos filos destaca Ascomycota, que recoge las especies más estudiadas como son las pertenecientes a los géneros *Trichoderma*, *Penicillium*, *Chaetomium* y *Gliocladium*. Los mecanismos llevados a cabo por los PGPF son similares a los de las bacterias, estableciéndose relaciones mutualistas o simbióticas. Entre estos mecanismos se incluye la mineralización de nutrientes como P, Ca, Zn, S, N, con especies pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Además, los géneros *Acremonium*, *Chryseolinea*, *Mortierella* y *Mycothermus* están negativamente correlacionados con la incidencia de la enfermedad y la abundancia de patógenos, convirtiéndolos en posibles agentes supresores de enfermedad. Está comprobado que el establecimiento de relaciones de estos hongos con las plantas alivia el estrés biótico (patógenos) y abiótico (sequía, salinidad, contaminación, etc.) del cultivo mejorando la productividad, especialmente ante condiciones de estrés (Akthar y Malik 2000; Emami-Karvani y Chitsaz-Esfahani, 2021; Liu et al., 2021; Salimi y Hamed, 2021).

Los efectos positivos de estos hongos en los cultivos también han propiciado su aplicación en la agricultura con diferentes preparados comerciales para su inoculación en el suelo. Entre los organismos más empleados destacan algunas cepas de *Trichoderma* spp. y *Glomus* spp. comercializadas para su uso como PGPF. Sin embargo, en ocasiones su aplicación no resulta efectiva y es que su inoculación no implica su asentamiento. Al

encontrarse de forma natural en los suelos su proliferación puede verse favorecida por las condiciones del suelo, al igual que las bacterias. La estructura y composición de la comunidad fúngica de los suelos agrícolas está influenciada en gran medida por la naturaleza del suelo y el clima pero también por el tipo de cultivo, las prácticas de manejo y el contenido y naturaleza de la materia orgánica (Liu et al., 2021; Salimi y Hamedi, 2021). La evaluación de la población fúngica del suelo suele realizarse mayoritariamente mediante secuenciación masiva. A pesar de que este tipo de análisis aporta información relevante respecto a la estructura y composición poblacional, es importante destacar que tan solo una pequeña fracción de la población total presente en el suelo es detectable por esta metodología. Lo mismo sucede con las bacterias y el resto de microorganismos del suelo. La librería de referencia genética queda limitada a la poca proporción de microorganismos identificados hasta la actualidad (Urra Ibáñez de Sendadiano, 2020).

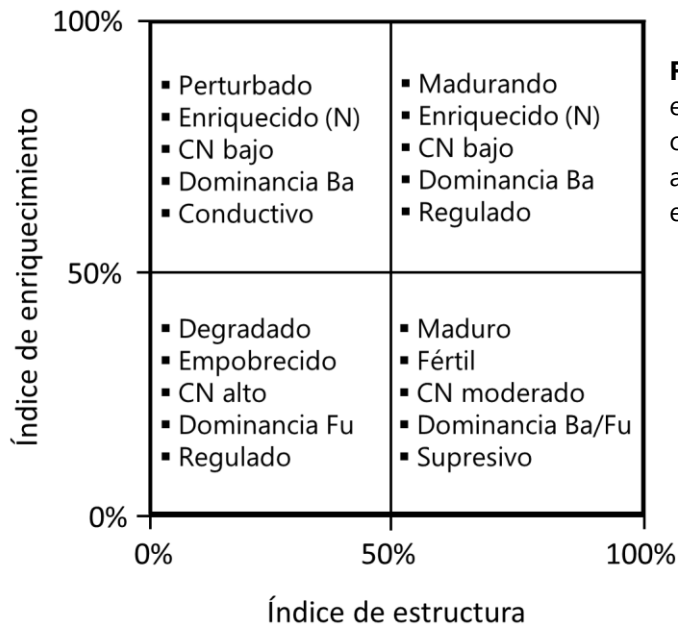
- Nematofauna

La nematofauna hace referencia a la comunidad de nematodos, un tipo de gusanos microscópicos que, en el caso del medio terrestre, habitan en la lámina de agua del suelo. Los nematodos del suelo son microorganismos sensibles y complejos que ocupan varios niveles en la red trófica (Figura 2.11). Esto implica que el estudio de la composición de su comunidad puede aportar información relevante del estado del suelo (Bongers y Ferris, 1999; Cesarz et al., 2015). Autores como T. Bongers, H. Ferris y G. W. Yeates, desarrollaron diferentes categorías para su clasificación facilitando el estudio de la nematofauna y aportando claves para su interpretación (Bongers, 1990 y 1999; Ferris et al., 2001; Ferris, 2010; Yeast et al., 1993). Por un lado, los nematodos se pueden clasificar por el grupo trófico al que pertenecen: bacteriófagos, fungívoros, herbívoros, predadores y omnívoros. Por otro lado, también presentan diferentes estrategias reproductivas pudiendo ser colonizadores o persistentes (r o k estrategias, respectivamente). Esta categorización está definida por cinco niveles o valores cp (*colonizer-persisten*), de más colonizador a más persistente. Para la evaluación de la nematofauna es imprescindible considerar los grupos tróficos junto con los valores cp para su correcta interpretación.

Los valores cp más bajos se otorgan a aquellas familias de nematodos de menor tamaño, con ciclo de vida corto y alta tasa de reproducción. Las familias Rhabditidae, Panagrolaimidae y Diplogasteridae son las más representativas de los bacteriófagos cp-1, siendo las más oportunistas y con mayor tolerancia a perturbaciones, como la eutrofización y las condiciones anaerobias (Bongers y Bongers, 1998; Ferris et al., 2001). En ambientes con menores perturbaciones Cephalobidae y Monhysteridae suelen ocupar este nicho y presentan valores cp-2. Algunos fungívoros tienen cierto carácter oportunista como Aphelenchidae, Aphelenchoididae y Anguinidae con un valor cp-2, siendo los primeros de este grupo trófico en colonizar tras una perturbación. Cuando las condiciones se reestablecen y mantienen durante suficiente tiempo tras una perturbación, el grado de estructura de la comunidad aumenta y predominan familias con valores cp más altos. Dentro

de este grupo, se pueden encontrar familias con carácter más persistente como Pristomatolaimidae y Diphterophoridae (bacteriófagos y fungívoros, respectivamente) ambos con valores cp-3. A partir de este nivel, comienzan a aparecer nuevos grupos tróficos, como Tripylidae que son predadores con valor cp-3. A medida que las condiciones se mantienen estables en el largo plazo, aumenta la presencia de las familias más persistentes (cp-4 y cp-5) de los diferentes grupos tróficos. Es el caso de Leptonchidae dentro de los fungívoros, Mononchidae de predadores y Dorylaimidae de omnívoros, todos con cp-4. Las familias indicadoras de alto estado de conservación (cp-5), y más susceptibles, son Discolaimidae entre los predadores y Thorneinematidae y Qudsianematidae entre omnívoros (Ferris et al., 2001). Dentro de los herbívoros o fitófagos solo unos pocos son parásitos capaces de producir enfermedad en los cultivos. La gran mayoría no generan daños en las plantas, incluso algunos actúan como limpiadores del tejido epidérmico de la raíz, favoreciendo así su crecimiento y toma de nutrientes. Entre estos últimos, la familia Tylenchidae (cp-2) es la más prolífica y, además, cuenta con capacidad de reproducirse en presencia de hongos. Esta familia presenta perfil de colonizador por ser tolerante a contaminantes debido a su cutícula impermeable pero, valorando su tasa de reproducción y ciclo de vida, es algo más persistente al igual que el resto de herbívoros que en su mayoría presentan valores cp-3 (Bongers, 1999).

Considerando la doble clasificación se pueden calcular una serie de índices que contribuyen en la interpretación del estado del suelo (Figura 2.12). Estos valores son sencillos de calcular (Bongers 1990; Bongers et al., 1991, Bongers et al. 1997; Ferris et al., 2001), aunque desde 2014 existe la herramienta web "NINJA" (*Nematode Indicator Joint Analysis*) que permite cargar bases de datos y calcular estos índices y otros valores de interés (Sieriebriennikov et al., 2014). Sin embargo, es importante considerar que en el caso de los suelos agrícolas de manejo convencional, sometidos a perturbaciones periódicas (laboreo, fertilización, etc.), los estados estructurados o maduros quedan descartados predominando el estado degradado o perturbado según el momento. Por ello, para estos casos los índices desarrollados pueden no ser tan útiles pero sí lo es el estudio de la composición y estructura de la nematofauna. A pesar de esto, son pocos los estudios sobre biodesinfección del suelo en los que tienen en cuenta la evaluación de esta comunidad de microorganismos que también puede contribuir en la determinación de la supresividad del suelo (Carrascosa et al., 2014; Fernandez-Bayo, 2020).



**Figura 2.12** | Esquema para la evaluación del estado del suelo en función de la composición de la comunidad de nematodos a través de los índices de enriquecimiento y estructura (Ferris et al., 2001).



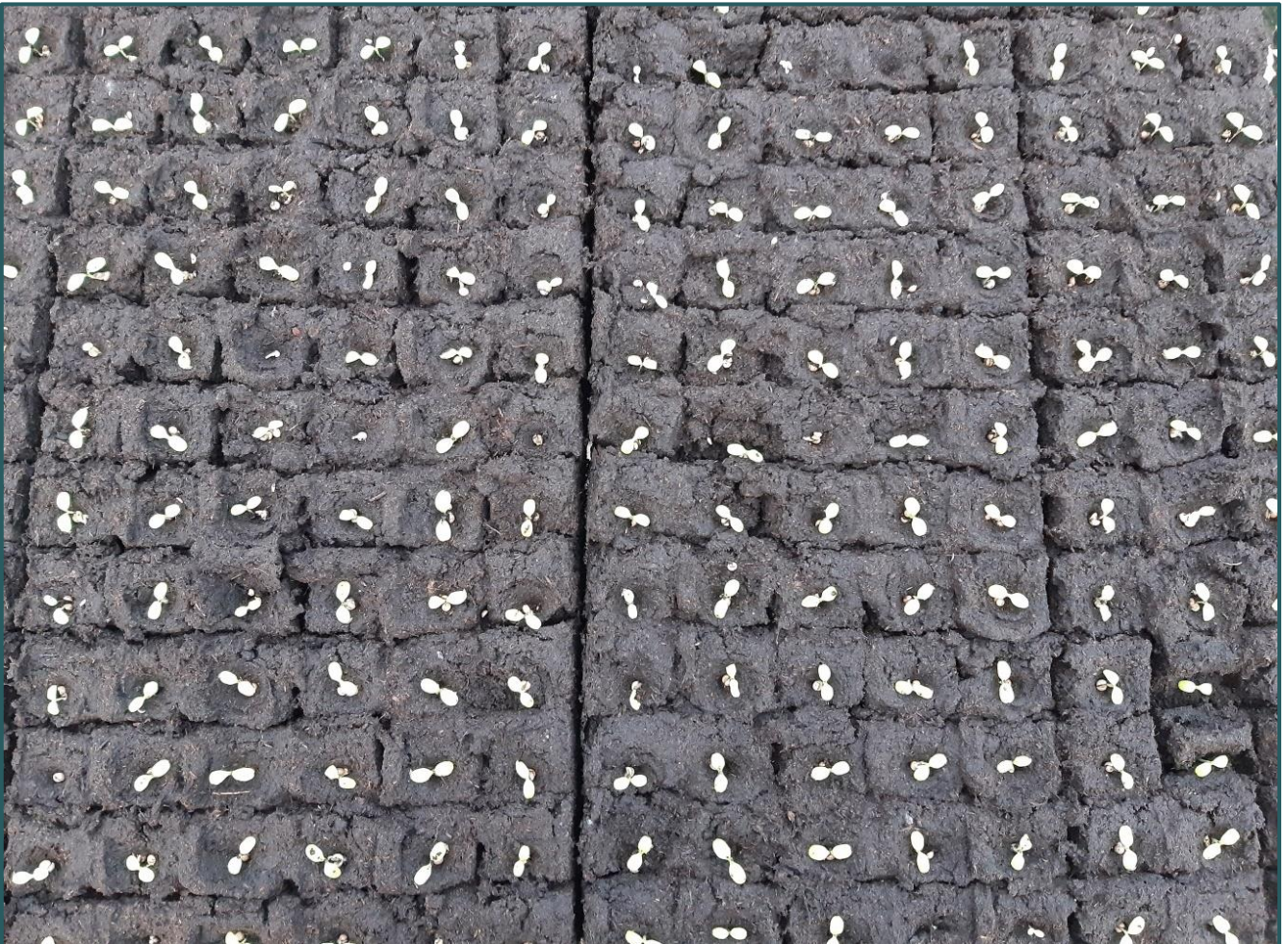


# CAPÍTULO 3



---

## Hipótesis y Objetivos







## 3. Hipótesis y Objetivos

---

### 3.1. Hipótesis

La selección de subproductos adecuados para las mezclas de enmiendas en tratamientos de biodesinfección de suelos hortícolas puede mejorar los resultados del tratamiento en condiciones de escasa radiación solar al promover una serie de mecanismos biológicos como los efectos antagonistas o la supresividad, además de mejorar las condiciones generales de salud del suelo, lo que permitiría incluir este tipo de tratamientos en el manejo de cultivos en zonas de clima templado.

### 3.2. Objetivo Principal

Seleccionar y evaluar subproductos de la industria agroalimentaria con uso potencial como enmiendas para la biodesinfección de suelos hortícolas para establecer mezclas y dosis adecuadas que tengan mayor efecto contra el patógeno y mejoren la salud del suelo en regiones de clima templado húmedo.

### 3.3. Objetivos Específicos

- 1) Conocer la problemática relacionada con enfermedades de suelo en el territorio donde se desarrolla este trabajo (Comunidad Autónoma del País Vasco, CAPV).
- 2) Identificar los posibles mecanismos implicados en el control de patógenos en la biodesinfección de suelos.
- 3) Seleccionar y evaluar subproductos de la industria agroalimentaria como enmiendas susceptibles de ser incorporadas en la biodesinfección del suelo.
- 4) Establecer mezclas de enmiendas con subproductos agroalimentarios y dosis efectivas para la biodesinfección del suelo.
- 5) Evaluar el estado de los suelos una vez realizado el tratamiento de biodesinfección con subproductos de la industria agroalimentaria y después de la cosecha del primer cultivo tras el tratamiento.





# CAPÍTULO 4



## Procedimientos Generales

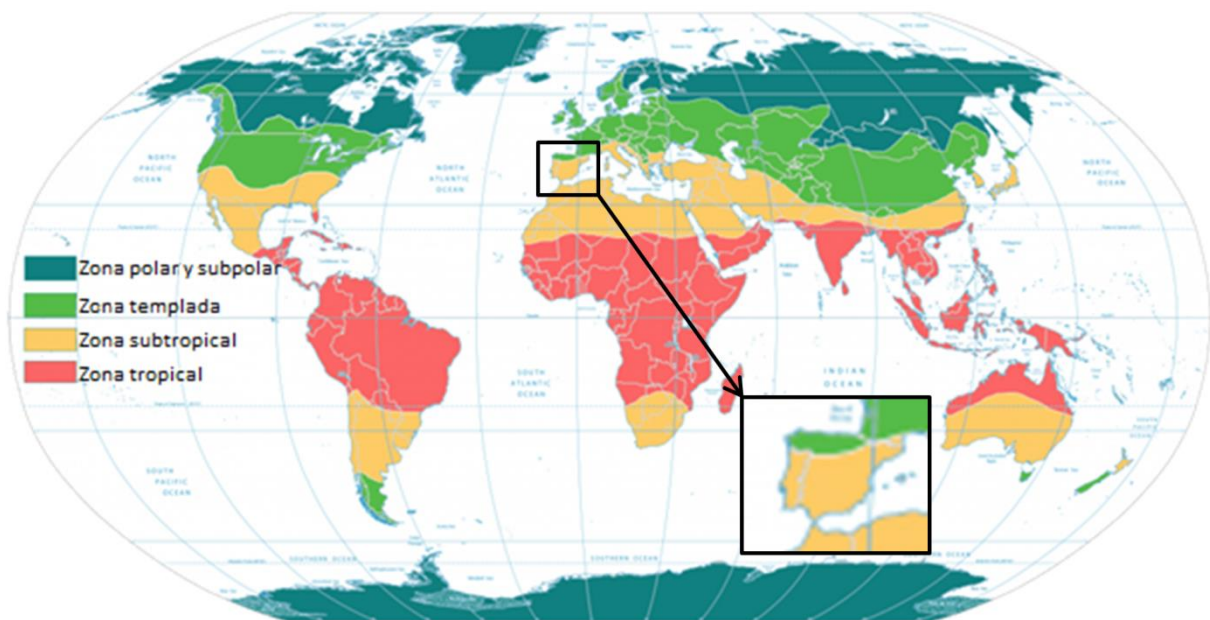




## 4. Procedimientos Generales

### 4.1. Ubicación de los ensayos y condiciones climáticas

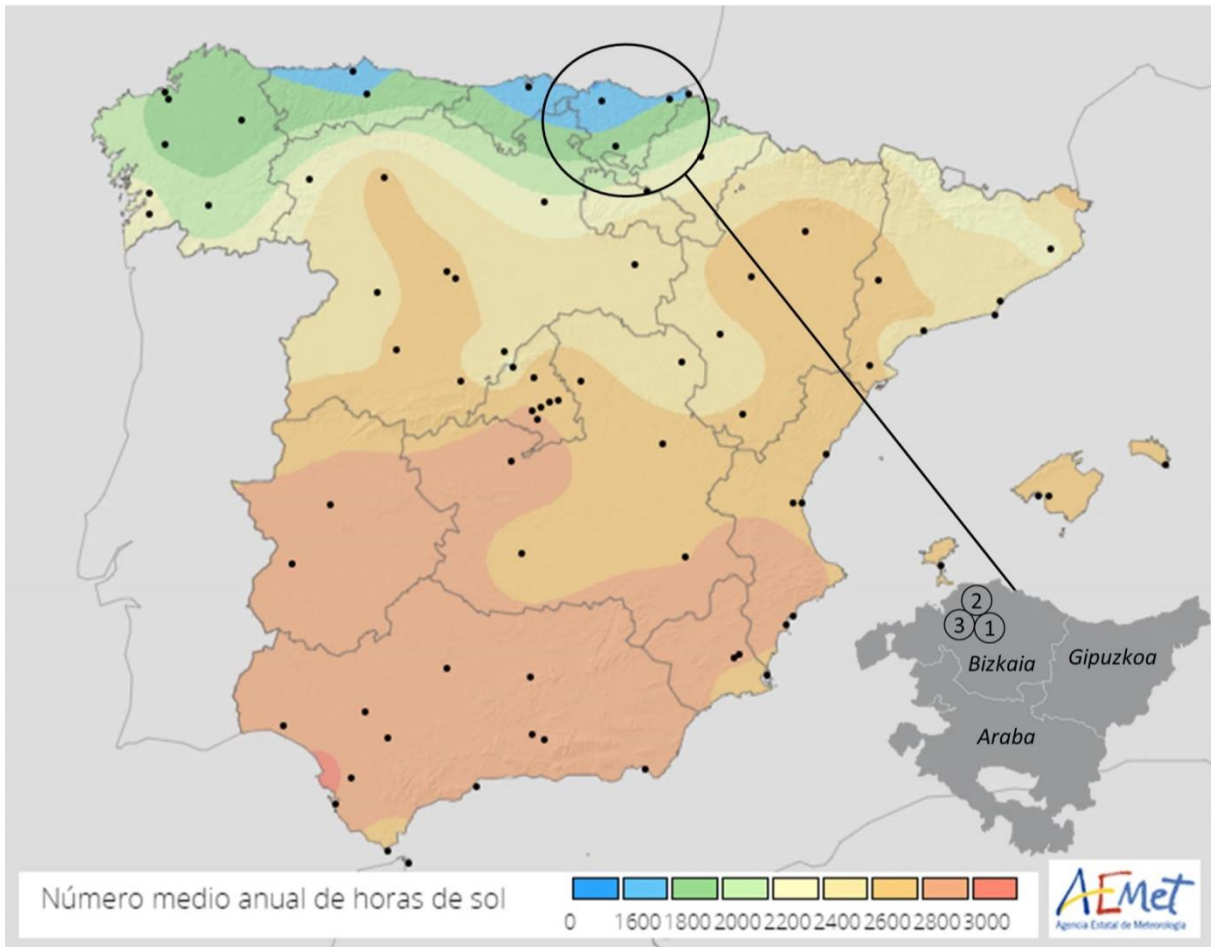
Este trabajo se enmarca en la problemática de enfermedades de suelo hortícola presentes en la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV), ubicada al norte de la Península Ibérica. Toda la franja norte presenta un clima templado húmedo que difiere al del resto del territorio peninsular que es más cálido y con mayor radiación solar. Siendo la temperatura un factor limitante en la biodesinfección, esta suele llevarse a cabo durante los meses cálidos con el fin de alcanzar altas temperaturas en el suelo durante el tiempo del tratamiento.



**Figura 4.1** | Principales zonas climáticas y detalle de los tipos de clima presentes en la Península Ibérica (zona templada en la franja norte y el resto zona subtropical). Imagen adaptada de <https://content.meteoblue.com/es/meteoscool/zonas-climaticas-generales>

Las altas temperaturas generadas en los tratamientos de biodesinfección se deben, principalmente, al aumento de la radiación solar. La zona climática en la que se localizan los ensayos de este trabajo está clasificada como templada húmeda sin estación seca, o clima atlántico. Esto indica que es una región con precipitaciones elevadas y temperaturas suaves con oscilaciones térmicas poco acusadas entre invierno y verano. La cercanía al océano y la orografía son las responsables de las frecuentes precipitaciones en esta área geográfica, entre 1.200-2.000mm de media anual pudiendo superarse los 2.000mm. Esto se traduce en mayor número de días nublados, incluso en verano, por lo tanto, menor cantidad de radiación solar que el resto de la Península (Figura 4.1). De acuerdo a los datos analizados por la Agencia Española de Meteorología (AEMET, 2023), mientras que en la mitad sur

peninsular se registran una media anual de 2.600-3.000 horas de insolación, la franja norte presenta un promedio de 1.600-1.800 horas (Figura 4.2).



**Figura 4.2** | Mapa de España con el promedio del número de horas de insolación anuales en un período de 30 años (1981-2010). Imagen obtenida de AEMET (Agencia Estatal de Meteorología) en la que se representan con puntos las estaciones meteorológicas. La región donde se realizaron los ensayos (CAPV: Comunidad Autónoma del País Vasco) se señala dentro de un círculo y, abajo a la derecha, se detalla la ubicación de las diferentes localizaciones (1: explotación 1; 2: explotación 2; 3: NEIKER-BRTA). <https://www.aemet.es/es/serviciosclimaticos/datosclimatologicos/valoresclimatologicos>

Este trabajo está conformado por una serie de ensayos realizados en explotaciones comerciales de la CAPV con suelos naturalmente infectados que estaban generando graves pérdidas en el cultivo de lechuga. Estos fueron complementados con un ensayo en macetas en condiciones controladas dentro de una cámara de cultivo dentro de las instalaciones del Instituto de Investigación NEIKER-BRTA. Tanto las explotaciones comerciales destinadas para los ensayos (explotación 1 y 2) como las instalaciones de NEIKER-BRTA (3) se encontraban en la provincia de Bizkaia y muy próximas entre ellas como se refleja en la Figura 4.2. La CAPV la conforman tres provincias, Bizkaia al noroeste, Gipuzkoa al noreste y Araba al sur. Bizkaia es la que presenta menor número de horas de insolación promedio anual (1.600h), factor que podría ser limitante en la obtención de resultados positivos de los tratamientos de biodesinfección.



#### 4.1.1. Explotación 1

La explotación 1 se localizaba en el municipio de Morga (X: 519240, Y: 4794098), dentro de la provincia de Bizkaia (País Vasco). Se trataba de una pequeña explotación comercial, y familiar, de lechuga bajo invernadero (3.000m<sup>2</sup>). Desde 1995, momento en que se puso en marcha la producción, se cultivó lechuga de manera continuada incorporando alguna rotación con tomate en los últimos años. El manejo era convencional e incluía estercolado anual en cada túnel de invernadero. El cultivo de lechuga se realizaba sobre plástico negro con marco de plantación 25x30cm (12plantas/m<sup>2</sup>) y el riego mediante aspersión con agua procedente de un sondeo. La producción era continua con un promedio de cinco ciclos anuales.

El cultivo de lechuga en esta explotación sufría de graves pérdidas causadas por el nematodo agallador *Meloidogyne incognita*, que desde 2013 comenzó a generar enfermedad en el cultivo con sus consecuentes pérdidas. Tras probar diferentes fumigantes químicos con los que no se obtuvieron los resultados deseados, en 2018 y 2019 uno de los invernaderos afectados de la explotación fue cedido para la ejecución de dos ensayos de biodesinfección empleando subproductos agroindustriales. El invernadero era de tipo multicapilla conformado por seis cuerpos de 8x50m (400m<sup>2</sup>) cada uno (Figura 4.3). La textura del suelo era franco-limoso (40% arena, 37% limo, 23% arcilla) con pH de 7,5 y con 5,8% de materia orgánica. Estas y otras características fisicoquímicas del suelo se incluyen en la Tabla 4.1.



**Figura 4.3** | Imágenes de satélite de las dos explotaciones comerciales en las que se ejecutaron los ensayos de biodesinfección en campo A la izquierda la explotación 1 (Capítulos 5 y 6) y a la derecha la explotación 2 (Capítulo 8).

#### 4.1.2. Explotación 2

La explotación 2 estaba ubicada en el municipio de Gamiz-Fika (X: 514740, Y: 4797133), Bizkaia, muy próxima a la explotación 1. Esta finca contaba con mayor superficie de producción dedicada al monocultivo de lechuga en invernadero (8.000m<sup>2</sup>). También con más de 20 años de cultivo continuado y manejo similar al de la explotación 1. En este caso, el patógeno causante de las pérdidas en el cultivo fue el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp.

*lactucae*. En 2016 comenzaron los primeros síntomas de Fusariosis en esta explotación y para 2020 ya se daban pérdidas de producción superiores al 60%.

Aunque la Fusariosis era la enfermedad principal en esta explotación, también se detectó desarrollo de nodulación en las raíces del cultivo provocado por *M. incognita*. El invernadero en el que se aplicó la biodesinfección era un multitunel de cuatro cuerpos de 30x6m (180m<sup>2</sup>), salvo uno algo más corto que el resto de 25x6m (150m<sup>2</sup>) (Figura 4.3). Los cultivos de lechuga de todos los invernaderos de esta explotación presentaban Fusariosis en mayor o menor grado, siendo el que se cedió para el ensayo uno de los más afectados. El suelo del invernadero era franco-arcilloso (30% arena, 35% limo, 35% arcilla) con pH de 7,5 y un contenido de materia orgánica del 5,5% (Tabla 4.1). En este ensayo el efecto de la biodesinfección fue evaluado en ambos patógenos.

**Tabla 4.1** | Caracterización fisicoquímica de los suelos empleados en este trabajo (CE: conductividad eléctrica). Valores sobre peso seco. Algunas variables se expresan en complejo cambio (meq/100g) y extracto soluble (meq/L).

Variable	Explotación 1	Explotación 2	NEIKER-BRTA
Arena - Limo - Arcilla (%)	40 - 37 - 23	29 - 36 - 35	52 - 38 - 10
Materia seca (%)	76.7	79.5	81.1
pH	7.5	7.5	7.3
CE (dS/m)	0.74	0.86	0.83
Materia orgánica (%)	5.8	5.5	2.9
N total kjeldahl (%)	0.32	0.29	0.18
NO <sub>3</sub> (mg/kg)		64.62	65.41
NO <sub>3</sub> (meq/L)	0.07	0.05	2.80
C orgánico (%)	3.38	3.46	1.71
C/N	10.6	11.9	9.4
K (meq/100g)	0.85	0.28	<0.1
K (meq/L)	0.44	0.09	0.07
Ca (meq/100g)	25.50	24.38	13.85
Ca (meq/L)	6.29	7.66	6.40
Mg (meq/100g)	3.14	2.16	0.65
Mg (meq/L)	1.70	1.05	0.46
Na (meq/100g)	0.16	0.36	0.16
Na (meq/L)	0.66	1.40	0.92
SO <sub>3</sub> (meq/L)	5.29	4.20	0.81
P (ppm)	228.8	267.7	16
Fe (ppm)	62.66	51.43	39.89
Mn (ppm)	11.56	13.07	18.33
Cu (ppm)	8.76	2.76	5.63
Zn (ppm)	15.12	8.20	12.22
B (ppm)	1.22	1.91	0.45
Cd (ppm)	<0.2	<0.2	<0.2
Pb (ppm)	20.2	24.6	30.9
Hg (ppm)	<0.4	<0.4	<0.4
Cr (ppm)	17.4	25.1	14.2
Ni (ppm)	14.3	20.8	12.3



### 4.1.3. Instalaciones NEIKER-BRTA

Durante este trabajo se llevaron a cabo varios ensayos en condiciones controladas en las instalaciones del Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario NEIKER-BRTA ubicadas en el municipio de Derio (X: 510114, Y: 4793165), Bizkaia. Para llevar a cabo estos ensayos se empleó una cámara de cultivo o fitotrón en el que se fijaron las condiciones ambientales deseadas para cada ensayo. En este documento solo se presenta el ensayo más relevante considerando el carácter general que fue tomando el trabajo. El suelo empleado para este ensayo se recogió de una parcela ubicada dentro de las instalaciones de NEIKER-BRTA en una zona de vega. El suelo era franco (52% arena, 38% limo y 10% arcilla) con pH de 7,3 y 2,9% de materia orgánica (Tabla 4.1). Este suelo apenas se había trabajado en los últimos años y se encontraba libre de patógenos.

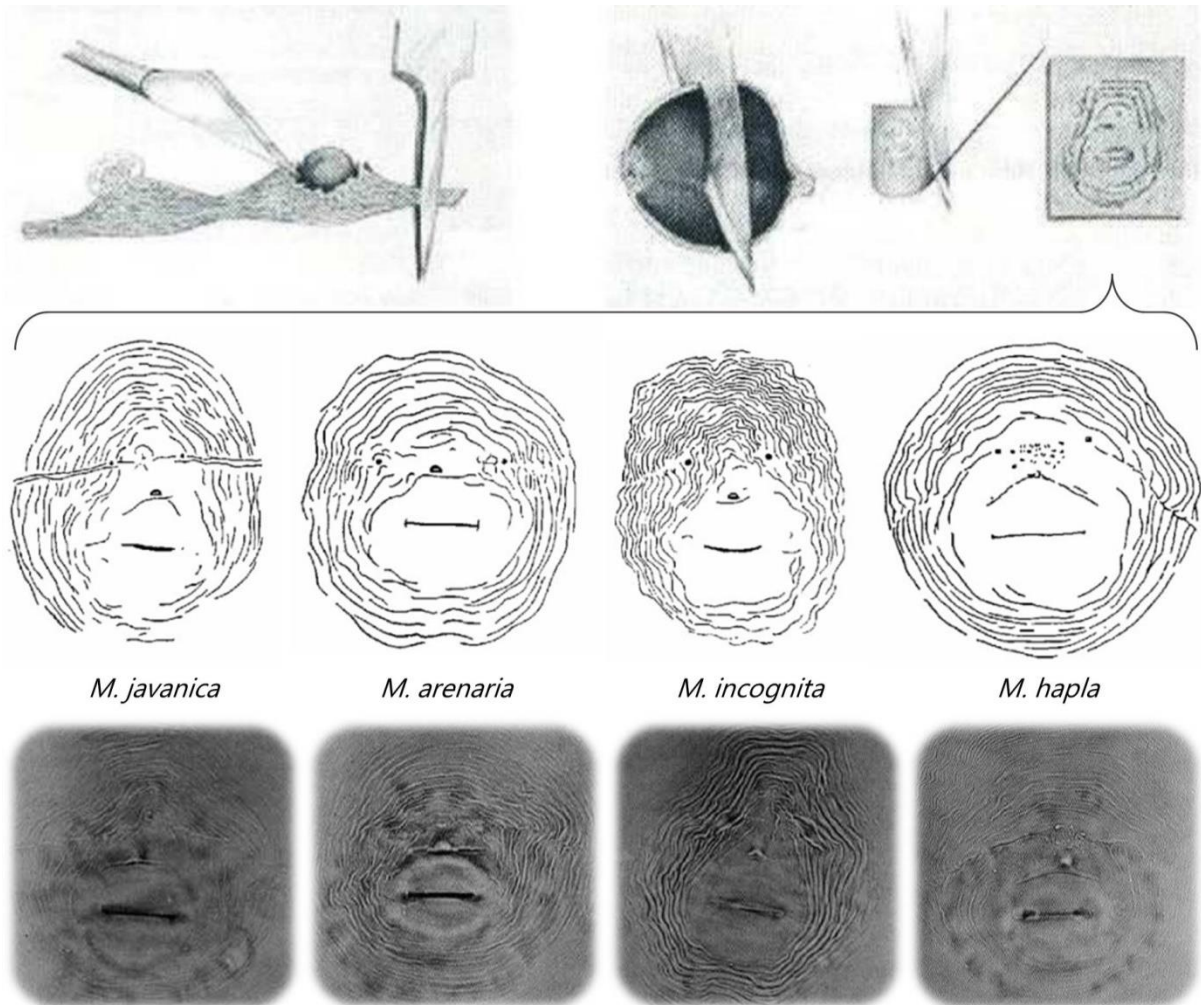
## 4.2. Patógenos de suelo evaluados

En este estudio se evaluó el efecto de la biodesinfección sobre los patógenos más problemáticos del cultivo de lechuga y presentes en la CAPV, el nematodo agallador *Meloidogyne incognita* y el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*, ambos descritos en el Capítulo 2 de Introducción. Este capítulo se centra en la descripción de la metodología empleada para la identificación y cuantificación de ambos patógenos.

### 4.2.1. *Meloidogyne incognita*

#### 4.2.1.1. Identificación y cuantificación

La identificación de *M. incognita* se llevó a cabo a través de la caracterización del patrón perineal (Hartman y Sasser, 1985), zona que rodea la vulva y el ano. Para este procedimiento, se lavaron bajo el grifo unas muestras de raíces con agallas de las que se tomaron tres nódulos individuales de cada muestra para extraer la hembra del interior. Bajo una lupa (NIKON SMZ800) a 6.3X y con la ayuda de pinzas y aguja se rasgó cuidadosamente la parte externa del nódulo hasta llegar a la hembra. Una vez localizada la hembra, se extrajo del nódulo y se mantuvo inmersa en lactofenol durante 2h. Pasado ese tiempo, se colocó la hembra en un portaobjetos para diseccionar con un bisturí, de nuevo bajo la lupa, la parte posterior del cuerpo, donde se encuentra la vulva. Con mucho cuidado se tomó la parte trasera seccionada y se colocó en otro portaobjetos con una gota de glicerina y se observó al microscopio a 400X para la identificación por el patrón perineal (Figura 4.4). El de *M. incognita* se caracteriza y diferencia del resto por presentar una forma ovalada con un arco dorsal alto en forma de pera o V invertida. También la zona perineal se encuentra rodeada de estrías en forma de zigzag y muy próximas entre ellas (Jepson, 1987) (Figura 4.4).



**Figura 4.4** | Arriba, procedimiento de disección y corte perineal para la caracterización del patrón perineal (Shurtleff y Averre, 2000). Debajo, dibujo del patrón perineal de las especies más dañinas del género *Meloidogyne* (Stirling et al., 1999) y sus respectivas imágenes al microscopio (Eisenback et al., 1980).

La cuantificación de este patógeno se realizó considerando el número de juveniles (J2) presentes en el suelo por identificación morfológica en el microscopio. Las características principales del género *Meloidogyne* son el aparato bucal, que consta de un estilete con dos nódulos en la base, y una cola cónica (Figura 4.5). También presentan piel rugosa y movimientos angulosos, no serpenteantes. Para la cuantificación, se extrajeron todos los nematodos presentes en el suelo mediante la técnica de embudo de Baermann (Barker, 1985). Para ello, se tomaron 600g por muestra de suelo natural, deshaciendo manualmente los agregados de mayor tamaño, para generar tres réplicas homogéneas por muestra de 200g cada una. El suelo se pasó a una jarra de 3L y se añadió agua hasta los 2L, aproximadamente. El contenido de la jarra se traspasó de una a otra del mismo volumen con movimientos suaves, unas 25 veces, hasta disgregar completamente la muestra. Primero, se filtró el contenido de la jarra por 2mm, a otra jarra, para retirar los restos más grandes. Después, se removió la parte filtrada suavemente con movimientos circulares y se dejó reposar hasta el cese del movimiento para filtrarlo poco a poco por un tamiz de 45 $\mu$ m. La parte retenida se recogió con agua y se mantuvo durante 24h en un recipiente (300ml)

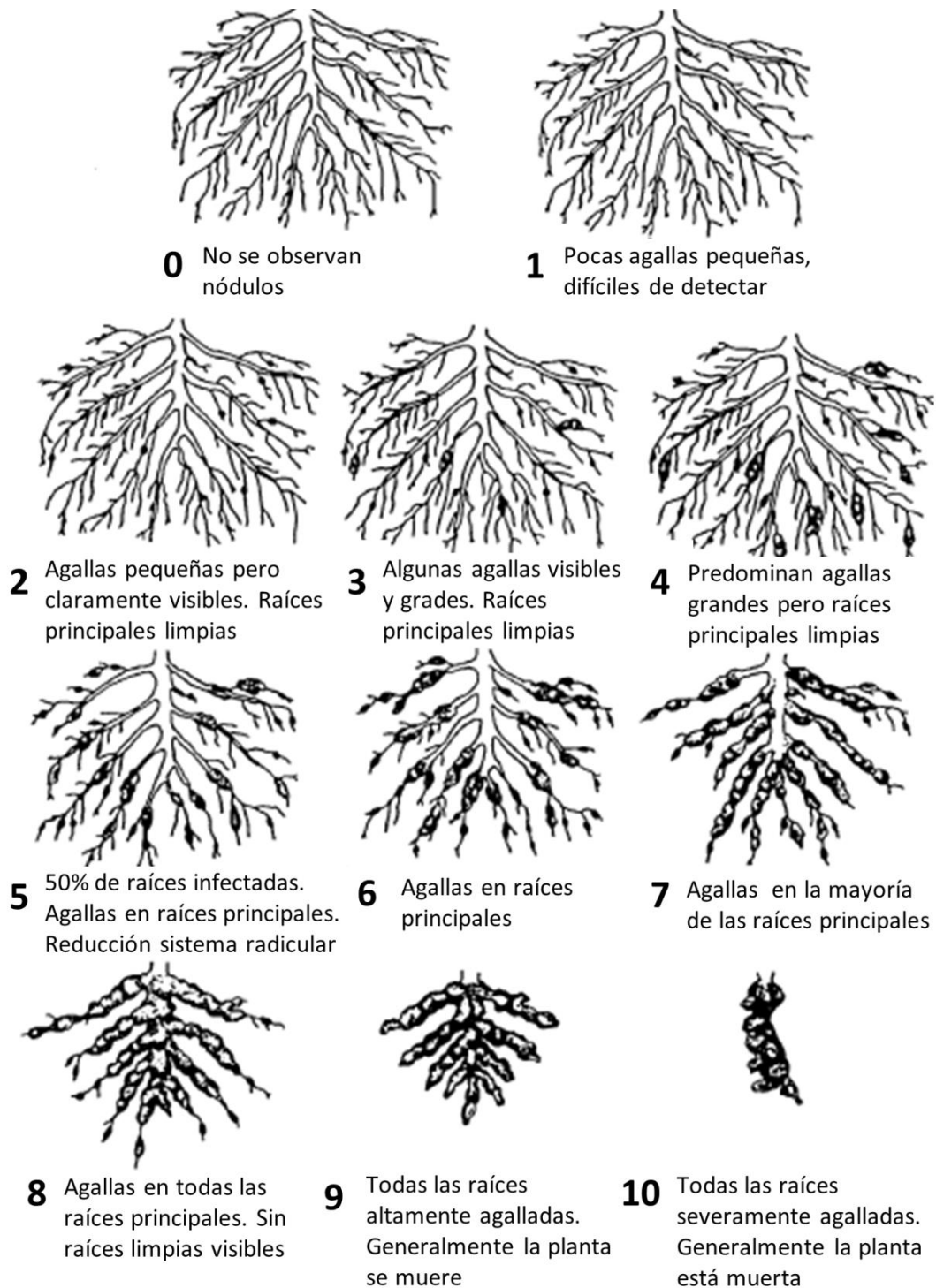
tapado con un paño "Kleenex" fijado con goma elástica, de manera invertida, y colocado sobre un embudo Baermann (Figura 4.5). Este embudo acaba en un tubo de goma cerrado con pinza en la parte final y todo el volumen debe contener agua para que los nematodos presentes en la muestra migren del sedimento al embudo en el transcurso de 24h. Pasado ese tiempo, se abrió cada pinza para recoger 50ml de la muestra en una copa de ese volumen y se dejaron en reposo durante 3h a temperatura ambiente.



**Figura 4.5** | Arriba, fotografías del procedimiento para la extracción de nematodos de muestras de suelo según la técnica de embudo Baermann. Debajo, imagen de juvenil (J2) de *M. incognita* identificado al microscopio en muestras de suelo del presente trabajo junto con detalle del aparato bucal, extraído de Jaraba et al., (2003).

En ese tiempo los nematodos se precipitan al fondo de la copa. Para recoger la parte de interés, se descartaron los primeros 40ml de agua de la muestra con una pipeta tomando el agua suavemente desde la parte superior. Los 10ml restantes se resuspendieron con suavidad y se pasaron a un tubo tipo Falcon de 15ml para su centrifugación a 1.500rpm durante 3 minutos. Las muestras se conservaron de esta forma a 4°C hasta la cuantificación en el día o por un máximo de 24h. Para este procedimiento se descartaron 9ml de cada muestra con una pipeta tomando el agua suavemente desde la parte superior del tubo con la punta apoyada en la pared. Finalmente, se resuspendió la muestra para tomar 200µl que se visualizaron al microscopio 200X (LEIKA DM6000B). La identificación morfológica de los nematodos extraídos se realizó a nivel de familia y se cuantificaron todos los nematodos presentes en los 200µl tomados de cada muestra. Conocido el peso seco de cada muestra de suelo, se realizaron los cálculos pertinentes para trabajar con el valor del número de nematodos en 100g de suelo en peso seco. Mediante este procedimiento se obtuvo la densidad de población del patógeno *M. incognita*, así como los datos necesarios para la

evaluación de la nematofauna, a través de la identificación y cuantificación del resto de individuos presentes. Este procedimiento se llevó a cabo en los ensayos presentados en los Capítulos 5, 6 y 8 para evaluar el efecto de la biodesinfección en el patógeno *M. incognita* y en la composición de la nematofauna.



**Figura 4.6** | Esquema traducido de Bridge y Page (1980) para la determinación del índice de nodulación según la escala desarrollada por los mismos.

#### 4.2.1.2. Evaluación de enfermedad

La evaluación de la enfermedad por *M. incognita* se realizó, principalmente, a través del desarrollo de agallas (Capítulos 5, 6 y 8) y en algunos muestreos se incorporó la determinación del número de huevos en las raíces (Capítulos 6 y 8). Además, en uno de los ensayos de campo (Capítulo 5) también se pudieron incluir datos de producción en función del número de plantas cosechadas para su comercialización.

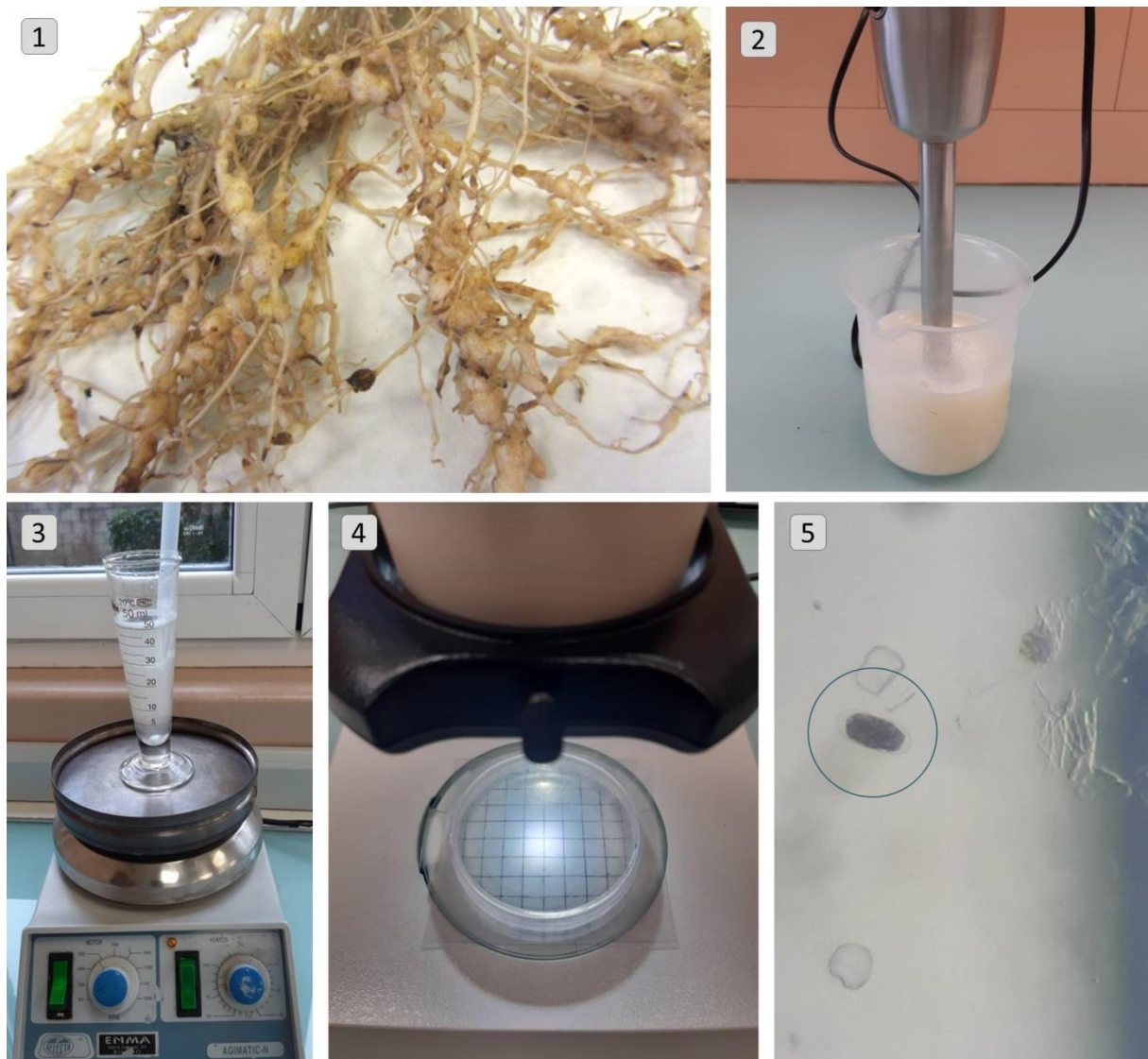
#### **Índice de nodulación**

El grado de agallamiento de las raíces de lechuga provocado por *M. incognita* se determinó de acuerdo a la escala desarrollada por Bridge y Page (1980). Esta escala fue desarrollada como una metodología sencilla para conocer el grado de enfermedad generado por las especies de *Meloidogyne* a través del índice de nodulación de la raíz y que no requiere elevada cualificación. En esta escala del 0 al 10, el 0 representaría una raíz sana sin nódulos, mientras que el 10 indicaría el máximo grado de nodulación (Figura 4.6). A partir del índice 4 los daños en el cultivo comienzan a hacerse evidentes, con sus consecuentes pérdidas de producción. Por encima de 8 las raíces dejan de realizar sus funciones y las plantas apenas se desarrollan y muchas mueren.

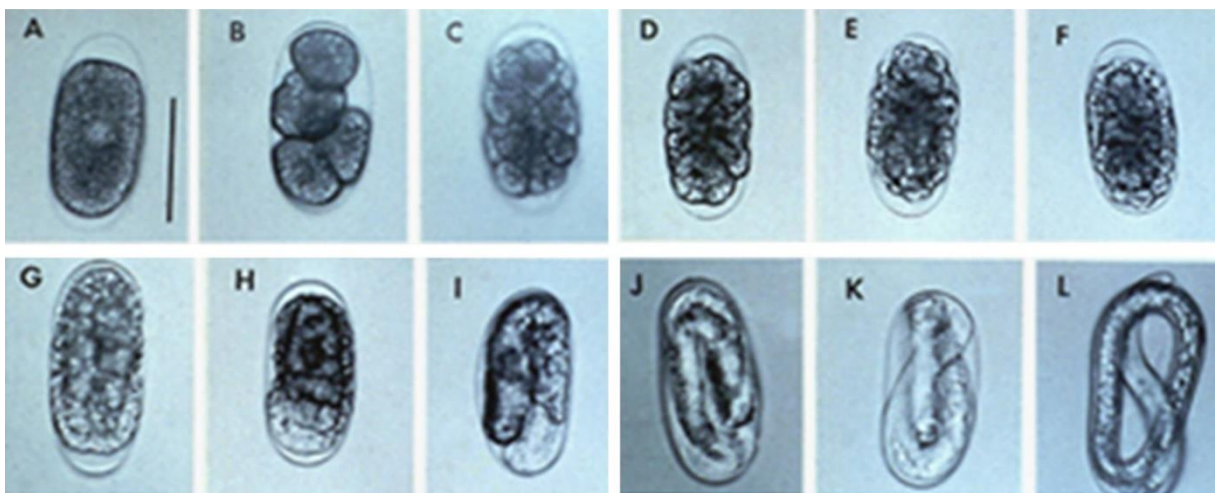
#### **Número de huevos**

La cuantificación del número de huevos en las raíces de lechuga se realizó siguiendo el procedimiento de Cortada et al. (2009). Para ello, cada raíz se lavó cuidadosamente bajo el grifo para eliminar los restos de tierra y se secaron con papel absorbente para registrar el peso de la raíz (descartando el cuello). Cada raíz se batió en una solución de hipoclorito sódico (0,5%) hasta la homogenización, a pequeños pulsos para no sobrecalentar la muestra. El batido se filtró por un tamiz de 2mm seguido de otro de 75 $\mu$ m para descartar las partes gruesas y, finalmente, por uno de 30 $\mu$ m donde quedaron retenidos los huevos. Esta fracción se aclaró con agua varias veces, sobre el tamiz, para eliminar el hipoclorito sódico (NaClO) y se recogió y enrasó a un volumen final de 50ml (Figura 4.7). Con la muestra en agitación se tomaron 2ml que fueron visualizados en lupa a 40X (LEICA XXXXX) en una placa Petri de 50mm $\varnothing$ . Para facilitar la cuantificación, se colocó una plantilla graduada bajo la placa. La identificación de los huevos resulta sencilla al diferenciarse claramente la envoltura ovalada de la pared del interior del huevo. Es importante tener en cuenta que los huevos pueden presentar diferente fases de desarrollo pero todos presentan la envoltura ovalada como elemento diferenciador del resto de estructuras (Figura 4.8). Tras los respectivos cálculos, el valor obtenido fue el número de huevos por gramo de raíz en peso fresco.





**Figura 4.7** | Fotografías en orden cronológico (1-5) del procedimiento para la extracción y cuantificación del número de huevos de *M. incognita* en raíces de lechuga.



**Figura 4.8** | Imágenes de huevos de *M. incognita* en función del estado de desarrollo (A-L) (Mitkowski, y Abawi, 2003).

#### 4.2.2. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*

##### 4.2.2.1. Identificación y cuantificación

El hongo de suelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (FOLac) raza 1 fue identificado por un laboratorio externo (MICROGAIA BIOTEC. Universidad de Murcia, España). Para ello, se enviaron colonias desarrolladas en medio específico del inóculo proveniente de lechugas con síntomas de Fusariosis muestreadas en explotaciones afectadas por la enfermedad. Para la obtención de colonias de FOLac, se descartó toda la parte de la planta excepto el cuello que se desinfectó por inmersión en NaClO (0,5%) durante 3 minutos. Transcurrido ese tiempo, la muestra se aclaró con agua destilada y se dejó secar sobre papel secante 24h a temperatura ambiente. En cámara de flujo laminar se realizó un corte longitudinal a la muestra para tomar parte del tejido interno infectado, que presenta tonalidad marrón-rosácea, y sembrarlo en placas Petri con medio selectivo Komada (Komada et al., 1975) (Figura 4.9). Las placas se incubaron a 25°C en oscuridad durante dos semanas, hasta que gran parte de la placa quedó tapizada. Las placas libres de contaminación fueron enviadas al laboratorio especializado para su identificación mediante PCR. Parte de cada colonia destinada para la identificación fue conservada en el laboratorio para su multiplicación y conservación en la micoteca (14°C) del centro NEIKER-BRTA.



**Figura 4.9** | Fotografías del procedimiento para la obtención del inóculo y confirmación del patógeno FOLac raza 1 mediante qPCR. Arriba, imágenes de la toma de muestras de un cultivo de lechuga con síntomas de Fusariosis y, debajo de los procedimientos llevados a cabo en el laboratorio.

Una vez confirmado el patógeno, se procedió a la optimización de la qPCR para su cuantificación en las muestras de suelos procedentes de los ensayos presentados en los Capítulos 7 y 8, de acuerdo a los procedimientos descritos por Pascuali et al. (2007) y Cabral

et al. (2018). En primer lugar, se probaron diferentes kits para la extracción de ADN del suelo para acabar empleando Invisorb Spin Soil DNA Kit- QIAGEN (QIAGEN N.V., Venlo, Holanda) por los mejores resultados obtenidos. El ADN extraído de 0,35g de suelo fresco tamizado se cuantificó en un espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific, Wilmington, EEUU) y se realizó la dilución necesaria para tener 25ng ADN/ $\mu$ l. La qPCR se realizó empleando los cebadores Hani (5'-GAACCCTCCAACATTCAACA-3') y Hanilatt3rev (5'-ATTCAGTGTACACCAACCTTTT-3') descritos por Pascuali et al. (2007). El volumen total de reacción para la qPCR fueron 20 $\mu$ l compuestos por 2,5 $\mu$ l de la dilución de ADN (25ng/ $\mu$ l), 0,8 $\mu$ l de solución de cada cebador (10 $\mu$ M) y 0,2 $\mu$ l de la de la sonda, 0,1 $\mu$ l de albúmina de suero bovino (BSA: *bovine serum albumin*) (50mg/ml), 10 $\mu$ l del Master Mix 2X con la sonda TaqMan y 5,58 $\mu$ l de agua estéril tipo I (Milli-Q). Las muestras se amplificaron en un termociclador (SureCycler 8800, Agilent Technologies; California, EEUU) con las siguientes condiciones de PCR: una primera fase UNG (*Uracyl N-Glycosylase*) de descontaminación a 50°C durante 2 minutos, seguida de la desnaturalización a 95°C por 2 minutos, para finalizar con 45 ciclos de amplificación y desnaturalización a 95°C durante 10 segundos y anillamiento y extensión a 58°C durante un minuto. Los resultados obtenidos fueron el número de ciclos necesarios de cada muestra hasta alcanzar el ciclo umbral (Ct) que es el ciclo a partir del cual la fluorescencia aumenta significativamente con respecto a la fluorescencia basal. Habiendo analizado previamente muestras de una recta patrón a concentraciones conocidas ( $10^2 \geq 10^5$  UFC/g de suelo, peso seco), se calcularon las unidades formadoras de colonias (UFC) de cada muestra de suelo.

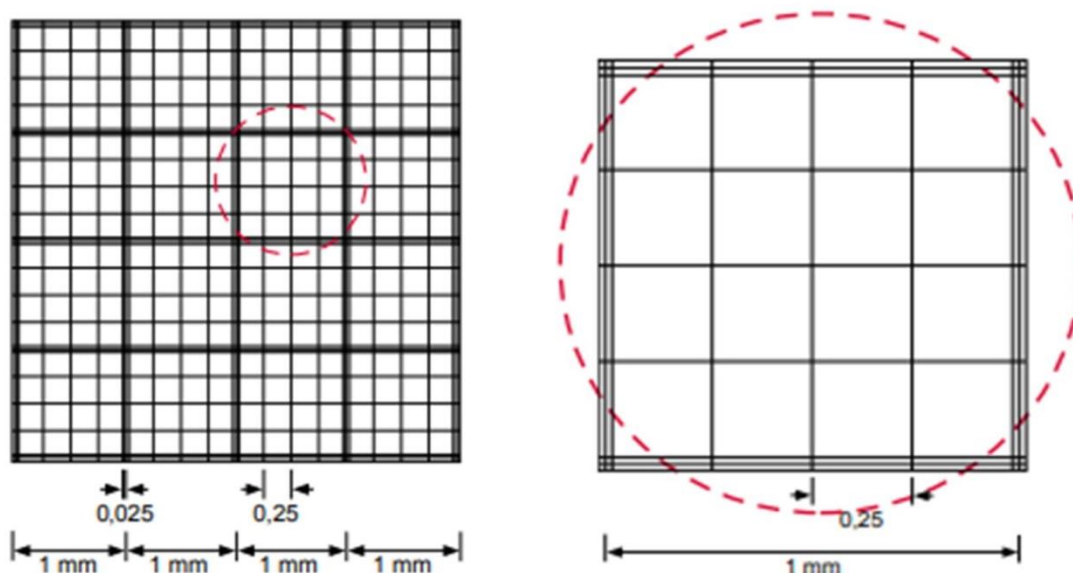
#### 4.2.2.2. Origen y producción de inóculo

Uno de los ensayos con este patógeno se realizó en condiciones controladas y requirió la producción de inóculo de FOLac que se llevó a cabo adaptando el procedimiento de Cabral et al. (2018). Para ello, se sembró en medio genérico PDA (*potato dextrose agar* - agar de dextrosa de patata) un disco de 5mm $\varnothing$  de una colonia limpia desarrollada en medio selectivo Komada a fin de generar colonias libres de los antibióticos que pudieran influir en los resultados del ensayo. A partir de una colonia nueva desarrollada en PDA, esta se repicó en 70 placas nuevas con PDA que se incubaron en oscuridad a 25°C hasta que todas quedaron tapizadas. El contenido de 50 placas libres de contaminación se batió en agua destilada esterilizada, con intervalos cortos para evitar calentamiento, hasta crear un batido uniforme que fue filtrado por 75 $\mu$ m con ayuda de un embudo y bomba de vacío. De esta forma, la mayor parte del micelio y otros restos quedaron retenidos obteniendo como resultado una solución de microconidias o UFC. El producto filtrado se diluyó 10 veces para facilitar la cuantificación en una cámara de recuento Fuchs-Rosenthal (Figura 4.10).





Profundidad = 0,2 mm	□	mm x mm / 1 □	mm <sup>2</sup> / 1 □	mm <sup>2</sup> = μl
Rejilla completa	1	4 x 4	16	3,2
Cuadrados grandes por rejilla	16	1 x 1	1	0,2
Cuadrados pequeños por cuadrado grande	16	0,25 x 0,25	0,0625	0,0125



**Figura 4.10** | Arriba, fotografías del procedimiento para la producción de inóculo de FOLac. De izquierda a derecha: colonia de FOLac en placa con PDA, filtrado del batido con bomba de aire e imagen al microscopio de la muestra dispensada en la cámara de recuento antes de su dilución x10. Debajo, instrucciones facilitadas por el fabricante para la cuantificación de UFC en cámara de recuento Fuchs-Rosenthal.

#### 4.2.2.3. Evaluación de enfermedad

El desarrollo de Fusariosis se evaluó de dos formas en función del ensayo. En condiciones controladas en cámara de cultivo, se diseñó una escala de 0-3 adaptada de otros autores (Scott et al., 2010b; Gordon y Koike, 2015; Pastrana et al. 2022) para evaluar el desarrollo de enfermedad. De acuerdo a esta escala, se adjudicó 0 a plantas sanas sin síntomas, 1 a plantas con primeros síntomas como marchitamiento de hojas basales, 2 a aquellas con importante amarillamiento o marchitez en la mitad de las hojas y 3 para plantas completamente marchitas o muertas.

### 4.3. Enmiendas y subproductos empleados

#### 4.3.1. Estiércol fresco

El estiércol fresco es la enmienda orgánica empleada tradicionalmente en los tratamientos de biodesinfección. Además, la aplicación de estiércol fresco en suelos agrícolas es una práctica agrícola en muchas regiones por sus conocidas virtudes como enmienda para mejorar la salud de los suelos y del cultivo (Gamliel et al., 2000). En este caso, en todos los ensayos se empleó estiércol fresco vacuno (EFV) aunque de diferentes orígenes pero todos con un 20% de contenido en paja y de explotaciones ganadera próximas a cada explotación, sin coste más que el del transporte. Las características fisicoquímicas de cada EFV aplicado se reflejan en la Tabla 4.2. En esta tabla se incluyen los datos para el EFV empleado en cada ensayo, siendo EFV1a y EFV1a del mismo origen pero aplicado en dos momentos diferentes (Capítulo 5 y Capítulo 6, respectivamente), y EFV2 de diferente origen y empleado en los ensayos presentados en los Capítulos 7 y 8.

#### 4.3.2. Compost

El compost (COM) es el residuo obtenido de la descomposición de la materia orgánica por determinados procesos biológicos. El COM puede ser de origen animal o vegetal y, aunque cualquier materia orgánica es susceptible de ser compostada, principalmente, se emplean estiércoles y los restos de poda en cada caso. El de origen vegetal también es conocido como compost verde o estructurante (Bonanomi et al., 2010). Este último término alude a la necesidad de emplear un determinado porcentaje de este tipo de compost (70-80%) para poder compostar los restos orgánicos domésticos procedentes de aquellos municipios con una gestión más integral de residuos. El COM es una de las principales fuentes de materia orgánica aplicada en suelos agrícolas, especialmente en producción ecológica. Su elevado contenido en materia orgánica y macro y micro nutrientes le confieren las características indicadas como fertilizante orgánico. Además, el correcto proceso de compostaje incluye alcanzar temperaturas elevadas (65-70°C) para su pasteurización. Esto garantiza que el producto final se encuentre libre de patógenos y además, elimina la capacidad germinativa de la mayoría de semillas presentes en el material de inicio (Reglamento CE 208/2006; Sayara et al., 2020).

El COM empleado en este trabajo se obtuvo de la planta de gestión pública Bizkaiko Konpostegia, en Artigas (Bizkaia), a 27€/t. El producto de origen de este COM es vegetal e incluye restos de jardinería en el porcentaje antes mencionado, completado con bioresiduos de grandes almacenes de alimentos (distribuidoras y comercializadoras de verdura) y la fracción orgánica de los residuos urbanos recogidos de forma selectiva. Sus características fisicoquímicas se presentan en la Tabla 4.2. Este subproducto se empleó en los ensayos presentados en los Capítulos 7 y 8 como enmienda de biodesinfección y tratamiento post-biodesinfección, respectivamente.

### **4.3.3. Bagazo de cerveza**

El bagazo de cerveza (BC) es el resultado del filtrado y prensado de la cebada (*Hordeum vulgare*) una vez cocida, antes de la fermentación. Este subproducto representa cerca del 85% de todo el residuo derivado de la producción de cerveza y se estima que por cada 100L se generan, aproximadamente, 20kg de BC (Mussato et al., 2006). Para la elaboración de la cerveza, la cebada malteada (por germinación inducida y secado) se muele y se mezcla con agua para la maceración aumentando la temperatura progresivamente (de 37 a 78°C). Durante este proceso el almidón se convierte en azúcares fermentables (maltosa y maltotriosa principalmente) y no fermentables (dextrinas) y las proteínas se degradan parcialmente a polipéptidos y aminoácidos. Finalizado el proceso, se descarta la fracción sólida (BC) y el líquido filtrado se emplea para la fermentación y producción de la cerveza (Mussato et al., 2006). El BC está compuesto principalmente de lignocelulosa (celulosa, hemicelulosas y lignina), proteína y fibra pero también se pueden encontrar minerales, vitaminas y aminoácidos. Por tanto, este subproducto puede estimular la actividad microbiana del suelo en condiciones adecuadas, lo que le convierte en una enmienda apropiada para tratamientos de biodesinfección. De hecho, en algunos estudios previos se obtuvieron resultados positivos de biodesinfección incorporando BC como parte de la mezcla de enmiendas tratamientos (Guerrero-Díaz et al., 2014; Guerrero et al., 2019; Lacasa et al., 2022). Así y todo, existen muy pocas referencias al respecto y su principal uso es como pienso para el ganado (Mussato et al., 2006). En este trabajo, el BC se empleó en los ensayos de campo presentados en los Capítulos 5 y 6 y fue facilitado por una fábrica de cerveza local (BOGA Basque Craft Beer. Mungía, Bizkaia) que semanalmente lo gestiona como residuo, aunque se estima un breve periodo de tiempo tomará valor en el mercado como pienso. En la Tabla 4.2 se presentan las características fisicoquímicas del BC empleado en este trabajo.

### **4.3.4. Torta de colza**

La colza (*Brassica napus*) es una de las especies más empleadas en la producción de aceite vegetal, alcanzando una producción mundial en 2021 superior a 70 millones de toneladas (FAO, 2021). El aceite extraído de las semillas se emplea en la industria alimentaria pero también se destina gran parte a la producción de biodiesel (Özçimen y Karaosmanoğlu, 2004). En la obtención de este aceite, mediante presando, se obtiene gran cantidad de residuo que pasa a denominarse torta, aproximadamente el 65% de la materia prima (Briones et al., 2011). Este subproducto está compuesto en su mayoría de lignocelulosa pero también es una fuente interesante de proteínas y aminoácidos y, por eso, su principal uso es para piensos (Özçimen y Karaosmanoğlu, 2004). Los tipos varietales "Canola" o "00", en referencia a sus bajos niveles de ácido erúxico y glucosinolatos, son los más empleados en alimentación animal por su bajo contenido en glucosinolatos. Estos compuestos están presentes en la mayoría de especies pertenecientes a la familia Brassicaceae pero son de mala digestibilidad pudiendo producir toxicidad en los no-rumiantes (Shi et al., 2015).

La torta de colza (TC) resulta un subproducto interesante para la BIODESINFECCIÓN con el que se obtuvieron resultados positivos en estudios previos, a pesar de su bajo contenido en glucosinolatos ( $<15\mu\text{mol/g}$ ) (Dutta et al., 2019; Mazzola et al., 2001). Estos autores atribuyen su eficacia al contenido en nitrógeno (formando parte de las proteínas) que promueve la actividad microbiana al aplicarse al suelo y, con ello, la liberación de compuestos biocidas (i.e.  $\text{NH}_3$ , VFAs). Sin embargo, la microbiota responsable de esa actividad requiere de fuentes de carbono, por lo que su elevado contenido en lignocelulosa garantiza la correcta actividad y la mantienen en el largo plazo debido al carácter recalcitrante de la lignina. La TC empleada en los ensayos de este trabajo fue facilitada por una de las granjas experimentales de NEIKER-BRTA ubicada en Arkaute (Araba), pero se estima un coste de unos 320€/t (en 2019, IVA incluido). La enmienda se aplicó en forma de pellets (Figura 4.11) en dos de los ensayos en campo (Capítulos 5 y 6) y sus características fisicoquímicas se describen en la Tabla 4.2.



**Figura 4.11** | Imágenes de los diferentes subproductos empleados como enmiendas orgánicas en los tratamientos de biodesinfección.

#### 4.3.5. Cáscara de pipa de girasol

El girasol (*Helianthus annuus*) es uno de los mayores cultivos herbáceos industriales con amplia distribución geográfica. Actualmente, la producción anual de girasol se estima en 50 millones de toneladas distribuidas en seis continentes, aunque la mitad se produce en países Europeos (FAO, 2021). El girasol se cultiva, en su gran mayoría, para la producción del aceite extraído de la semilla descartando la cáscara. La cáscara de la pipa del girasol (CPG) constituye entre un 30-50% de la semilla, por tanto, anualmente se generan millones de toneladas de este subproducto. Su principal uso es como pienso para el ganado aunque se están probando nuevas aplicaciones debido a su alto contenido energético (Perea-Moreno et al., 2018; Shaukat et al., 2021). La CPG puede contener cerca de un 48% de celulosa y 17% de lignina (Shaukat et al., 2021), lo que hacen de este un subproducto muy interesante para

aplicar en tratamientos de biodesinfección. Algunos microorganismos degradadores de lignina pueden inducir efectos antagonistas y ejercer presión en la población de diferentes patógenos (Simmons et al., 2016; Fernández-Bayo et al., 2019; Shea et al., 2022). A pesar de las propiedades de este subproducto, no se encontraron referencias en esta área de estudio. La CPG se aplicó en forma de pellets en los capítulos 6, 7 y 8 y, en todos los casos, se obtuvo de una cooperativa de piensos próxima (MIBA Coop., Mungía, Bizkaia) a 208€/t (en 2020, IVA incluido). Sus características fisicoquímicas se describen en la Tabla 4.2.

**Tabla 4.2 |** Caracterización físicoquímica de las enmiendas aplicadas: estiércol fresco vacuno (EFV; 1-2: origen; a-b: tiempo), compost (COM), torta de colza (TC), bagazo de cerveza (BC), salvado de trigo (ST), cáscara de pipa de girasol (CPG) y Biofence® (BF) (\*datos facilitados por el fabricante). Valores expresados sobre el peso seco. También se incluyen los precios de venta de cada enmienda en 2019-2020.

ENMIENDA	EFV-1a	EFV-1b	EFV-2	COM	TC	BC	ST	CPG	BF*
Precio (€/kg)	-	-	-	0.03	0.32	-	0.52	0.21	10.8
Materia seca (%)	14.75	15.21	37.97	78.3	93.8	25.81	90.08	91.06	100
pH	8.89	8.05	8.5	7.8	5.35	3.85	6.48	5.99	
CE (mS/cm)	8.19	5.2	6.9	4	3.13	2.12	2.48	2.34	
Materia orgánica (%)	65.36	75.47	78.02	68.15	93.94	96.32	95.41	90.78	90.2
C orgánico (%)	37.91	43.78	45.26	39.53	54.49	55.87	55.47	52.76	
N total Kjeldahl (%)	1.48	1.55	1.54	2.46	3.77	3.1	2.37	0.87	6.2
C/N	26	28	29.31	16.09	14	18	23	61	
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (%)	0.73	0.73	0.96	1.03	1.99	1.13	0.92	0.19	3
K <sub>2</sub> O (%)	3.62	1.76	2.2	1.9	1.25	0.1	1.35	1.06	1.6
SO <sub>3</sub> (%)	4.62	0.49	0.53	0.52	0.36	<0.01	0.13	0.17	
CaO (%)	3.05	1.79	1.75	6.05	1.59	0.46	0.21	0.54	
MgO (%)	0.38	0.35	0.39	0.41	0.49	0.32	0.54	0.32	
Na (%)	0.23	0.11	0.28	0.24	0.02	<0.01	0.01	<0.01	
Fe (mg/kg)	0.11	0.04	0.12	0.68	0.04	0.02	0.01	0.01	
Mn (mg/kg)	126.26	120.88	173.8	203.4	43.99	27.71	91.31	13.41	
Cu (mg/kg)	14.7	15.31	19.92	39.48	11.37	7.92	11.91	9.93	
Zn (mg/kg)	75.85	72.85	102.1	120.94	46.96	65.8	67.98	11.92	
B (mg/kg)	17.42	15.8	13.21	34.3	28.91	1.12	2.87	16.72	
Cd (mg/kg)	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	
Pb (mg/kg)	7.09	1.14	1.81	11.55	<0.49	<1	<1	<1	
Hg (mg/kg)	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4	
Cr (mg/kg)	5.06	6.68	4.34	16.99	0.45	2	0.3	2.13	
Ni (mg/kg)	2.98	3.89	3.31	7.7	0.38	0.94	0.72	1.79	

#### 4.3.6. Salvado de trigo

El trigo (*Triticum* spp) es uno de los cereales más cultivados, tanto para consumo humano o como pienso, con una producción anual en 2021 que superó los 770 millones de toneladas (FAO, 2021). Mayoritariamente, este grano se procesa para la producción de harinas y durante la molienda se descarta el salvado, la capa externa de la semilla, que suele representar el 13-19% del peso seco de la semilla completa (Onipe et al., 2015). El salvado de trigo (ST) es rico en polisacáridos no almidonados (38%), como celulosa y hemicelulosas, almidón (19%) y proteínas (18%), además de lignina (6%) y fitoquímicos como compuestos fenólicos y vitaminas (Papageorgiou y Skendi, 2018). Las grandes cantidades generadas de este subproducto junto con las propiedades que presenta, lo convierten en una enmienda interesante en tratamientos de biodesinfección. De hecho, en el enfoque de ASD es una de las enmiendas más empleadas junto con las melazas. La naturaleza lábil del C presente en el ST estimula la actividad microbiana favoreciendo de esta forma la generación de condiciones anaerobias en los procesos de biodesinfección (Roskopf et al., 2020). Este subproducto se compró, al igual que la CPG, a una cooperativa de piensos cercana (MIBA Coop., Mungía, Bizkaia) a 208€/t (en 2020, IVA incluido) y se aplicó en forma de harinilla como parte de las mezclas de biodesinfección en los Capítulos 5, 6 y 7. En la Tabla 4.2 se presentan las características fisicoquímicas del subproducto empleado en estos ensayos.

#### 4.3.7. Pellets de semilla de *Brassica carinata* (Biofence)

Dentro de los diferentes enfoques de biodesinfección, la biofumigación fue uno de los primeros en demostrar su eficacia. Esta práctica se centra en la incorporación de material vegetal de especies de la familia *Brassicaceae* para desinfectar el suelo de patógenos gracias a su alto contenido en glucosinolatos. Estos compuestos se transforman en isotiocianatos al hidrolizarse, sustancias con actividad biocida. Por esta razón, ya existen en el mercado productos basados en estas especies vegetales, entre ellos está Biofence® (Triumph, Italia) (BF) que ofrece semilla de *Brassica carinata* (colza etíope, mostaza etíope o mostaza abisinia) en forma de pellets o harina. Se estima que la semilla de esta especie puede contener cantidades importantes de glucosinolatos. Dada la eficacia demostrada en biofumigación y en ensayos similares (Núñez-Zofío, 2012; Gilardi et al., 2016 y 2020; Molina, 2017), en este trabajo se quiso evaluar su aplicación frente al resto de subproductos. Esta enmienda se aplicó en forma de pellets en el ensayo de condiciones controladas presentado en el Capítulo 7. En este caso, no se realizó caracterización fisicoquímica de la enmienda, pero se presentan los datos aportados por el fabricante (Tabla 4.2). Esta información resultó suficiente para el diseño de las mezclas y al no aplicarse en ningún ensayo de campo no se realizó la caracterización completa como en los demás casos.

#### 4.4. Procedimiento de biodesinfección

Exceptuando un ensayo realizado en condiciones controladas, el resto de los ensayos presentados se llevaron a cabo en invernaderos de explotaciones comerciales con problemas de enfermedades de suelo en el cultivo de lechuga. Las tres biodesinfección aplicadas en campo (Capítulos 5, 6 y 8) se ejecutaron en los meses de verano, entre julio y agosto. El procedimiento de los tratamientos de biodesinfección llevado a cabo en los invernaderos se describe de forma general, y detallados en los correspondientes capítulos, en los siguientes pasos e imágenes (Figura 4.12):

1. Aporte de enmiendas orgánicas.
2. Laboreo del suelo a unos 25cm de profundidad para la incorporación de enmiendas y posterior alisado con tractor.
3. Colocación de sondas de temperatura y/o redox para registrar los datos durante la biodesinfección.
4. Riego abundante por aspersión.
5. Colocación de plástico transparente.
6. Sellado de la cubierta plástica enterrando todos los bordes.

Una vez ejecutados todos los pasos descritos, las condiciones se mantuvieron de cuatro a seis semanas según del ensayo. Además, una vez retirado el plástico, al finalizar el tiempo de la biodesinfección, los suelos se dejaron descubiertos durante una semana antes de ser trabajados con tractor para el siguiente cultivo. En cada capítulo correspondiente se amplía la información de los pasos seguidos. En general, se aplicaron entre 3kg/m<sup>2</sup> (peso seco) de EFV complementado con cerca de 1kg/m<sup>2</sup> (peso seco) de uno o más subproductos. En estos tratamientos es indispensable que el plástico sea transparente y aún mejor si, además, es totalmente impermeable a gases, conocido como TIF (*Total Impermeable Film*). Generalmente, estos plásticos son de pocas galgas (alrededor de 200) y fácil de romper o agujerear, cuestiones a evitar, por lo que es recomendable un manejo cuidadoso, especialmente al extenderlo. En los ensayos del presente trabajo se empleó plástico transparente de polietileno de 200 galgas (0,24€/m<sup>2</sup> en 2020, IVA incluido) de y TIF trasparente de 120 galgas (0,09€/m<sup>2</sup> en 2020, IVA incluido) comprados a Raisa Film y Riviera Blumen, respectivamente. Un detalle importante a añadir que facilitó la colocación del plástico fue dejar enterrado y recogido en un lateral uno de los lados del plástico antes del riego. De esta forma resultó más fácil extender el plástico y se evitó pisar el suelo ya saturado. A la hora del riego, mejor si se realiza en varios tiempos cortos para dejar que el agua se infiltre llenando la máxima cantidad de poros, el objetivo es llegar casi a la saturación para facilitar las condiciones de anaerobiosis. En todos los ensayos, siendo los suelos de tipo franco, para el diseño de las dosis de enmiendas a incorporar se consideró una densidad aparente de 1,45g/cm<sup>3</sup> y una profundidad de 20cm.





**Figura 4.12** | Imágenes de la secuencia temporal del procedimiento de biodesinfección del suelo en invernadero. 1) Aporte de enmiendas. 2) Laboreo del suelo y alisado. 3) Incorporación de enmiendas. 4) Riego. 5) Colocación del plástico transparente. 6) Sellado de los bordes del plástico.

#### 4.5. Muestreo y procesado de muestras

En todos los ensayos se tomaron muestras de suelo antes (T1) y después de la biodesinfección (T2), y en la mayoría de casos, también al finalizar el cultivo siguiente a la biodesinfección (T3). Tan solo en uno de los ensayos se pudieron evaluar los efectos pasado un año de la biodesinfección (T4) (Capítulo 5). En los muestreos precedidos por un cultivo (T1, T3 y T4) se incluyó la toma de muestras de plantas de lechuga para la evaluación de síntomas y desarrollo de enfermedad.



Las muestras de suelo se tomaron con un muestreador de núcleo (25mm de diámetro) en 10 puntos aleatorios de cada parcela, formando así una mezcla compuesta de los primeros 20-25cm de suelo. Cada muestra, de 1,8-2kg de suelo fresco, se removió manualmente a fin de homogeneizarla y se conservó a 4°C hasta su procesado o análisis. En función de la analítica, las muestras fueron procesadas de manera diferente. Para el análisis de las variables biológicas, las muestras de suelo se tamizaron por 2mm para su homogenización pero procurando mantener la humedad natural de la muestra. Estas muestras se mantuvieron a 4°C, excepto la parte destinada a las extracciones de ADN que se mantuvieron a -20°C hasta su análisis. Por el contrario, los análisis fisicoquímicos requieren el secado y molido de la muestra. La parte de suelo destinada para la extracción de nematodos se mantuvo de forma natural, sin procesar, hasta su análisis. Estos son organismos muy sensibles y las muestras deben ser analizadas antes de las dos semanas siguientes a la toma de las muestras, y siempre manteniéndolas a 4°C hasta la extracción. Los suelos fueron analizados en todos los ensayos antes y después de la biodesinfección y, en la mayoría, se incluyó un muestreo al finalizar el cultivo siguiente a la biodesinfección. Tan solo en uno de los ensayos de campo se analizaron muestras del mismo suelo pasado un año de la biodesinfección (Capítulo 5).



**Figura 4.13** | Muestreador de suelo de núcleo de 25mmØ y uña metálica para retirar la muestra.

Las plantas de lechuga se muestrearon enteras con ayuda de una azada para garantizar la extracción de la raíz completa y se recogieron entre 30 y 40 muestras por tratamiento en todos los ensayos (8-20 unidades/parcela). Estas muestras se mantuvieron sin procesar a 4°C hasta su análisis durante un máximo de una semana. En uno de los ensayos de este trabajo (Capítulo 8) también se muestrearon plantas de lechuga del cultivo siguiente a la

biodesinfección con el objetivo de medir algunas variables nutricionales en la hoja (nitratos y aminoácidos). Para ello, se tomó una hoja de cada planta muestreada para conformar una muestra heterogénea. Aun en fresco, la mitad de cada hoja se dividió para destinarlas a diferentes analíticas. Una de las partes se troceó y batió en metanol, mientras que la otra se conservó sin procesar en una bolsa hermética, ambas partes de la muestra se mantuvieron a -80°C hasta su procesado y análisis.

#### 4.6. Caracterización fisicoquímica de suelos y enmiendas

Los análisis fisicoquímicos para la caracterización de los suelos y las enmiendas se llevó a cabo, en la mayoría de los casos, por un laboratorio externo (MOPRILAB S.L., Abarán, Murcia). Las muestras de suelo (1kg/muestra, peso fresco) se secaron y molieron para ser analizadas de acuerdo a los métodos estandarizados propuestos por el Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA, 1994) y otras normas de referencia (ISO-7251:2005; ISO 6579-1:2017).

**Tabla 4.3** | Variables fisicoquímicas analizadas en suelos y enmiendas con la unidad de medida y el procedimiento analítico.

VARIABLES	UNIDAD	PROCEDIMIENTO
Arena - Limo - Arcilla	%	Densímetro Bouyoucos
Materia seca	%	ISO 6579-1:2017
pH		Potenciometría (dilución 1:5)
Conductividad eléctrica (CE)	dS/m	Conductimetría
Materia orgánica	%	Cálculo con C orgánico oxidable
Nitrógeno total (N total)	%	Kjeldahl
Nitratos (NO <sub>3</sub> )	mg/kg - meq/l	Espectrofotometría UV
Carbono orgánico (C orgánico)	%	C orgánico oxidable
Ratio carbono/nitrógeno (C/N)		Cálculo
Potasio (K - KO)	meq/100g - meq/l - %	ICP-OES
Calcio (Ca - CaO)	meq/100g - meq/l - %	ICP-OES
Magnesio (Mg - MgO)	meq/100g - meq/l - %	ICP-OES
Sodio (Na)	meq/100g - meq/l - %	ICP-OES
Sulfatos (SO <sub>3</sub> )	meq/l - %	ICP-OES
Fósforo (P)	ppm	Olsen
Hierro (Fe)	ppm	ICP-OES (extracción con DTPA)
Manganeso (Mn)	ppm	ICP-OES (extracción con DTPA)
Cobre (Cu)	ppm	ICP-OES (extracción con DTPA)
Zinc (Zn)	ppm	ICP-OES (extracción con DTPA)
Boro (B)	ppm	Espectrofotometría (extracción con agua + reacción con azometina)
Cadmio (Cd)	ppm	ICP- OES (digestión ácida)
Plomo (Pb)	ppm	ICP- OES (digestión ácida)
Mercurio (Hg)	ppm	ICP- OES (digestión ácida)
Cromo (Cr)	ppm	ICP- OES (digestión ácida)
Niquel (Ni)	ppm	ICP- OES (digestión ácida)
<i>Escherichia coli</i>	UFC/g	ISO-7251:2005
<i>Salmonella spp</i>	UFC/g	ISO 6579-1:2017

## **4.7. Parámetros medidos durante la biodesinfección**

### **4.7.1. Temperatura**

La temperatura es uno de los factores más relevantes en este tipo de estudios, por lo que sus valores fueron registrados en el suelo durante la biodesinfección en todos los ensayos (Capítulos 5, 6, 7 y 8) del presente trabajo. Además, se incluyó la temperatura ambiental dentro del invernadero en todos los ejecutados en campo (Capítulos 5, 6 y 8). En dos de estos ensayos, se incluyeron sondas de temperatura a diferentes profundidades (15, 30, 45cm) para observar las diferencias entre capas de suelo. En los casos en los que solo se incluyó una sonda, esta se colocó a 15cm en condiciones de campo y en el centro de la maceta en condiciones controladas. Para las mediciones de temperatura se utilizaron dos registradores de datos diferentes, según el ensayo. Uno de ellos fue un HOBO (Weather Station, OCC, US, H8-4 32K) programado para tomar los datos cada 15 minutos, también por el dato promedio medido cada 3 minutos. El otro, un registrador Campbell (CR1000x) que se configuró para medir cada tres minutos pero registrar la media para cada 15 minutos. Con los datos recogidos se calculó la temperatura media para cada hora y el número de horas acumuladas a cada temperatura.

### **4.7.2. Redox y pH**

La generación de condiciones anaerobias en los suelos durante la biodesinfección es otro de los factores determinantes que contribuyen debilitando o mermando la población del patógeno en el suelo. Estas condiciones se consideran reductoras por la falta de oxígeno, se miden en mV y su valor va ligado al del pH del suelo. Por este motivo, las sondas redox empleadas llevaban incluidas sondas para medir el pH al mismo tiempo. Exceptuando el primer ensayo de este trabajo (Capítulo 5), en el resto se midió el redox durante la biodesinfección, sin embargo, por una serie de errores con las sondas tan solo se obtuvieron datos en el último ensayo (Capítulo 8). En este caso, se colocaron las sondas de redox-pH junto con las de temperatura a la misma profundidad de suelo pero conectadas a un registrador de datos HOBO RX3004. El aparato se programó para la adquisición de datos cada 15 minutos, con los que se calculó el valor medio para cada hora y el redox acumulado. Se consideran suelos aerobios a aquellos con valores  $>300\text{mV}$ , reductivos o anaerobios con  $0\text{-}200\text{mV}$  y altamente reductivos a valores negativos ( $<0\text{mV}$ ) (Reddy y DeLaune, 2008). Por otro lado, la acumulación de  $>50.000\text{mVh}$  en condiciones reductoras se considera el mínimo requerido para generar daños en la población del patógeno (Shennan et al., 2018). El cálculo realizado para la obtención de este valor se incluye en el apartado 10.1 de este capítulo.

## 4.8. Variables productivas

### 4.8.1. Producción

En dos ensayos realizados en campo (Capítulo 5 y 8) se pudieron recoger datos de producción. En el primer ensayo estos datos fueron facilitados por el agricultor y se calculó el porcentaje de producción en función del número de unidades de lechuga comercial cosechada para su venta. En el último ensayo, por razones ajenas a este trabajo, no se cosechó el cultivo siguiente a la biodesinfección, lo que obligó a tomar el dato mediante estimación visual del número de plantas comerciales o dañadas por parcela y considerando un máximo productivo de 12 plantas/m<sup>2</sup>.

### 4.8.2. Variables nutricionales en hoja

En el último ensayo del presente trabajo (Capítulo 8) se determinó la concentración de nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y aminoácidos en hojas de lechuga del cultivo siguiente a la biodesinfección (T3). Por un lado, los aminoácidos son esenciales para el desarrollo de la planta y parte fundamental en la síntesis de proteínas. De igual manera, también resultan fundamentales para la salud humana y parte de ellos únicamente se pueden obtener a través de los alimentos. Por otro lado, una ingesta elevada de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> puede generar toxicidad y no porque el NO<sub>3</sub> sea en sí tóxico, sino porque parte puede transformarse en metabolitos perjudiciales (nitritos o nitrosaminas) por reducción bacteriana durante el procesado y el almacenamiento de los alimentos. De hecho, de acuerdo al Reglamento (CE) 1881/2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios y sus posteriores modificaciones, se establecen niveles máximos permitidos de 5mg/g en hoja de lechuga cultivada en invernadero. Dado el elevado aporte de N en los tratamientos de biodesinfección, resulta relevante conocer la concentración de aminoácidos y NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en las hojas de lechuga de los suelos biodesinfectados.

La concentración de aminoácidos totales en hoja de lechuga se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Chen et al. (2009). Para ello, se pesaron 15g de hoja fresca tomados de una muestra compuesta de la que se empleó parte para determinar el peso seco. La muestra para la cuantificación de aminoácidos se batió en 30ml de metanol al 80% (relación 1/3 p/v) y este puré se pudo conservar a -80°C hasta su análisis (Figura 4.14). Para la determinación se descongelaron las muestras y se pesaron 1,5ml de cada una a las que se les añadió 4,5ml de agua destilada para, previa agitación, incubar en una estufa a 100°C durante una hora. Transcurrido ese tiempo, las muestras se filtraron por un 0,1µm con filtros CHROMAFIL Xtra GF-100/13 para emplear 1ml de la solución filtrada a la que se añadieron 5ml de etil acetato para eliminar impurezas. Para ello, las muestras se agitaron por vaivén a 200rpm durante un minuto y se dejaron reposar 10 minutos para descartar la fase superior cuidadosamente con pipeta. Una vez retiradas las impurezas, se añadió 1ml de NaHCO<sub>3</sub> (0,2M) y 1ml de DNFB (1%) a cada muestra antes de colocarlas en un calentador de



bloque para su incubación a 60°C durante 40 minutos. Finalizado el tiempo de incubación, se detuvo la reacción añadiendo 0,5ml de HCl (1M) a cada muestra y se tomaron 750µl a los que se les añadió 2,5ml de etil acetato para una última limpieza por agitación en vaivén durante 1 minuto a 200rpm y reposo de 10 minutos. Finalmente, la fase superior se midió en espectrofotómetro (Shimadzu UV-1800, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón) a 420nm. Para los patrones se emplearon disoluciones de ácido glutámico al 99% (10<sup>3</sup> ppm) que siguieron el mismo procedimiento que las muestras problema.



**Figura 4.14** | Fotografías del procedimiento para la determinación del contenido de aminoácidos totales en hojas de lechuga.

Para la determinación de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> se adaptaron los procedimientos propuestos por Muro et al. (1998) y Valdés (2015). Para ello, se partió de la muestra compuesta sin procesar que se mantuvo conservada en una bolsa hermética a -80°C hasta el análisis. Cada muestra se troceó en la propia bolsa, a base de golpes, para introducirlas en tarros herméticos registrado el peso de cada muestra. A cada tarro se añadió agua destilada en una relación 5/30 (p/v) y se introdujeron en un autoclave a 121°C durante 20 minutos. Una vez atemperados, se volvió a registrar el peso de cada muestra antes de batir el contenido hasta su homogenización. La mezcla resultante se filtró hasta obtener 1ml de extracto, con ayuda de una jeringa y filtros de fibra de vidrio de 1µm, al que se añadieron 24ml de agua destilada y 0,5ml de una disolución de (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> (0,26g/ml), de igual modo que a las muestras patrón con KNO<sub>3</sub> (0,01M). Con las muestras patrón se calibró el equipo y se midió la concentración de NO<sub>3</sub> con una sonda específica (LZW9662.97.0002 SENSION+ Electrodo ISE de Nitrato. HACH S.L.U, Colorado, EEUU) y manteniendo la muestra en agitación.

## 4.9. Variables biológicas

### 4.9.1. Respiración del suelo

La respiración del suelo (RS) es una de las variables más empleadas como indicador del estado del suelo para medir la actividad metabólica de la población microbiana. Esta técnica se basa en la medición del CO<sub>2</sub> emitido por los organismos en condiciones adecuadas de temperatura y humedad. El procedimiento se realizó mediante una adaptación de ISO

16072:2002 y consiste en la cuantificación de la tasa de emisión de CO<sub>2</sub>. Para ello, se pesaron 20g de suelo fresco tamizado, por duplicado (2 réplicas analíticas), que se humedeció con agua destilada hasta su capacidad de campo. En el bote con suelo húmedo, se introdujo un frasco de menor tamaño sin tapa y con 10ml de NaOH (0,2N), colocado sobre una plataforma para no cubrir la muestra de suelo. Las muestras se incubaron cerradas herméticamente a 30°C en oscuridad durante 72h. Junto con las muestras se incluyeron 2 blancos que solo contenían el agua empleada para humedecer. Pasado el tiempo de incubación, se realizó la cuantificación de CO<sub>2</sub> por colorimetría mediante valoración con HCl (0,1N). Para ello, se añadieron 2ml de cloruro de bario (BaCl<sub>2</sub>) y dos gotas de fenolftaleína (C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>) como indicador y se añadió HCl progresivamente y con la muestra en agitación hasta el viraje de color. Esta técnica tiene la ventaja de proporcionar una medición integral, rápida y de bajo costo, del nivel general de la actividad microbiana (Bünemann et al., 2018; Guo, 2021). Por todo ello, esta variable fue analizada en todos los ensayos del presente trabajo (Capítulos 5, 6, 7 y 8).

#### **4.9.2. Carbono de la biomasa microbiana (CBM)**

La cantidad de carbono de la biomasa microbiana (CBM) indica la fracción de C del suelo contenida en los microorganismos que, a su vez, refleja la cantidad de biomasa presente en el suelo. Este análisis se basa en los procedimientos descritos por Vance et al. (1987) para el que se emplearon 10g de suelo fresco tamizado para generar 2 réplicas analíticas por duplicado (2,5g/réplica). Dos de las réplicas fueron fumigadas añadiendo 0,5ml de cloroformo estabilizado con amilenos y manteniéndolas en una cámara de vacío en oscuridad durante 24h, incluyendo un recipiente abierto con 10ml de cloroformo dentro de la cámara. Pasado este tiempo, se extrajo el cloroformo mediante un vacío corto de 30 segundos dentro de la cámara seguido de un mínimo de 5 rondas de vacío de 4 minutos cada una. A las réplicas fumigadas y no fumigadas, al igual que a las muestras patrón (con ftalato ácido de potasio) para la recta de calibración, se les añadió K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5M) como extractante y se mantuvieron 30 minutos en un agitador volteador. Después, las muestras se centrifugaron a 3.500rpm durante 5 minutos para tomar 2ml del extracto de cada réplica. Finalmente, se añadieron 3,5ml de reactivo crómico (0,18% ácido crómico (p/v) y 65% sulfúrico (v/v)) y, tras su agitación, se incubaron en bloque termostático a 150°C durante 90 minutos. Transcurrida la incubación, y una vez atemperadas las muestras, se procedió a la medición de la absorbancia a 445nm en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1800, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón) (Figura 4.15). Esta fracción del C del suelo es un indicador sensible de la dinámica del C y otros nutrientes que aporta información para evaluar cambios en la salud del suelo generalmente provocados por el manejo (Scaglia y Adani, 2009; Guo, 2021; Li et al., 2021). Tanto el CBM como el C orgánico soluble, presentado a continuación, se analizaron en tres de los cuatro ensayos presentados en este trabajo (Capítulos 6, 7 y 8).

#### 4.9.3. Carbono orgánico soluble (COS)

Salvo en el primer ensayo presentado en este trabajo (Capítulo 5), en el resto (Capítulos 6, 7 y 8), además del CBM, también se incluyó la determinación del C orgánico soluble (COS). Esta medida hace referencia a fracción del C del suelo que queda disponible como resultado de la actividad microbiana (Scaglia y Adani, 2009; Li et al., 2021). Este procedimiento se realizó de acuerdo a Wei et al. (2008), de manera muy similar al CBM pero sin fumigación y empleando agua como extractante. Para ello, se pesó 1g de suelo fresco tamizado por duplicado (2 réplicas/muestras) al que se añadieron 5ml de agua destilada y se mantuvo en agitación por volteo durante 30 minutos. A continuación, se centrifugaron las muestras a 3.500rpm durante 5 minutos y se traspasaron 2ml del sobrenadante para añadirles 3,5ml de reactivo crómico. Una vez agitadas, se incubaron en un bloque termostático a 150°C durante 90 minutos. Finalizada la incubación y atemperadas las muestras, se procedió a la medición de la absorbancia a 445nm en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1800, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón).



**Figura 4.15** | Fotografías del procedimiento analítico para la determinación del C de la biomasa microbiana (CBM), muy similar al procedimiento para medir el C orgánico soluble (COS).

#### 4.9.4. Nitrógeno potencialmente mineralizable (NPM)

En los dos últimos ensayos de este trabajo (Capítulos 7 y 8) también se incluyó la determinación del N potencialmente mineralizable (NPM) como variable biológica ligada a la dinámica del N. Esta variable representa la fracción más fácilmente degradable por los microorganismos, por lo que está considerada como una medida indirecta del N disponible. Para su determinación se siguió el procedimiento descrito por Canali y Benedetti (2006) que mide el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) del suelo. Para este análisis, primero se pesaron 1,5g de suelo fresco tamizado por duplicado (2 réplicas/muestra) a los que se añadió 2,8ml de agua destilada para mantenerlos en incubación en tubos cerrados y sumergidos en un baño a 40°C durante

7 días. Durante la incubación, se produce la mineralización anaeróbica del N generando  $\text{NH}_4$ . Pasado este tiempo, se incluyeron 2 réplicas más por muestra, como referencia de suelo sin digestión anaeróbica, a las que también se les añadió 2,8ml de agua destilada. A todas las réplicas se les añadieron 4,8ml de KCl (3,2M) y se mantuvieron en agitación por volteo durante 15 minutos. Acabada la agitación, las muestras se centrifugaron para tomar 2ml del extracto y diluirlos en 2ml de agua destilada para añadir 2ml del reactivo denominado A (salicilato sódico + nitroprusiano + NaOH) y 1ml de dicloroisocianurato (DCIC al 50%). Estos reactivos también se añadieron a las muestras de la recta patrón con diluciones seriadas de  $\text{NH}_4^+$  (10mg/l) (Figura 4.16). Las muestras se agitaron y se mantuvieron en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos para, finalmente, proceder con la medición de la absorbancia a 670nm en espectrofotómetro (Shimadzu UV-1800, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón).



**Figura 4.16** | Fotografías del procedimiento analítico para la determinación del nitrógeno potencialmente mineralizable (NPM).

#### 4.9.5. Actividades enzimáticas

El ciclo de nutrientes del suelo incluye reacciones químicas, bioquímicas, y fisicoquímicas. Las reacciones bioquímicas están catalizadas por enzimas provenientes de exudados de plantas pero sobre todo de microorganismos. Estas enzimas juegan un papel fundamental en la degradación de la materia orgánica y su mineralización, lo que las convierte en buenos bioindicadores del estado del suelo (Burns, 1978 tomado de la ISO). En este trabajo se analizaron las siguientes actividades enzimáticas del suelo: glucosidasa (GLU), galactosidasa (GAL), fosfatasa ácida (PAC), fosfatasa alcalina (PAK) y arilsulfatasa (ARYL). Aunque la mayor parte de ellas fueron medidas en la mayoría de los ensayos del presente trabajo (Capítulos 6, 7 y 8), solo en el último ensayo (Capítulo 8) se obtuvieron los resultados de todas ellas.

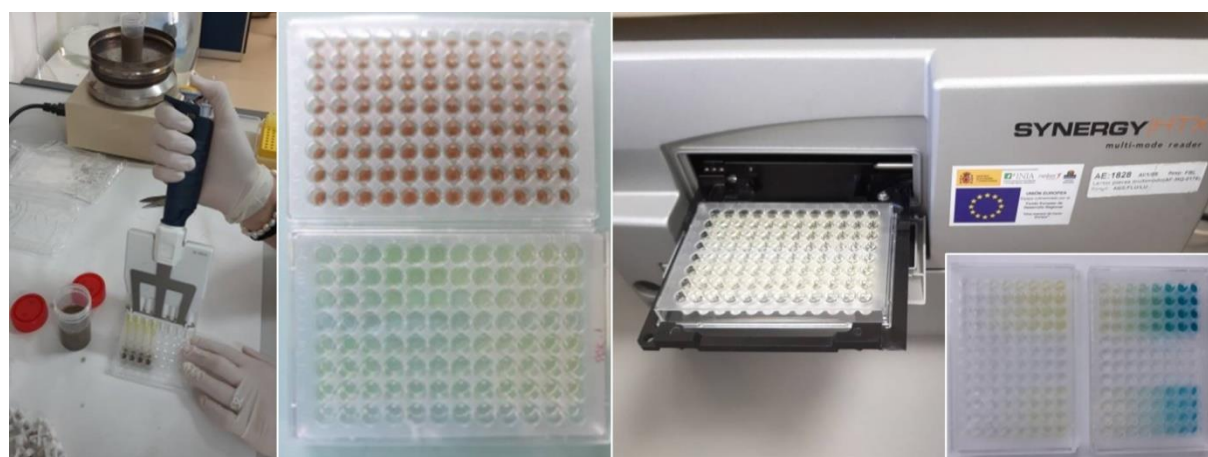
La determinación de estas variables se realizó siguiendo el procedimiento del método estándar ISO 20130:2018 que se lleva a cabo en microplacas de 96 pocillos, lo que agiliza el método. Para todas las actividades enzimáticas medidas se emplearon derivados del p-nitrofenol (PNP) como sustrato específico, salvo para la URE que se empleó urea al 98%, y todas siguieron un procedimiento similar (Tabla 4.4). Para ello, se pesaron 4g de suelo fresco



por triplicado (3réplicas/muestra) a los que se añadió 25ml de agua o solución amortiguadora específica. Con la muestra en agitación se pipetearon 125µl por cuadruplicado con una pipeta multicanal, de forma que cada placa de 96 pocillos contenía 8 muestras en 12 pocillos tomando 3 como controles (Figura 4.17). Una vez realizadas las respectivas incubaciones, se midió la absorbancia a 405nm, excepto en el caso de la URE que se midió a 650nm, en un espectrofotómetro (Synergy HTX Multimode Reader, Agilent Technologies, California, EEUU). Junto con las muestras de suelo, también se prepararon las rectas de calibración, siguiendo un procedimiento similar pero empleando cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl 62mM) para la URE y PNP (3,6mM) para el resto de actividades enzimáticas.

**Tabla 4.4 |** Resumen del procedimiento para la determinación de las actividades enzimáticas medidas (ARYL: arilsulfatasa; GAL: β-galactosidasa; GLU: β-glucosidasa; PAC: fosfatasa ácida; PAK: fosfatasa alcalina; URE: ureasa) con las diferencias detalladas para cada caso.

PROCEDIMIENTO	ARYL	GAL	GLU	PAC	PAK	URE
Muestra de suelo	4g (x3 réplicas)					
Añadir solución amortiguadora	H <sub>2</sub> O estéril (25ml)			Trizma HCl 50mM pH5,5 (25ml)	Trizma Base 50mM pH11 (25ml)	H <sub>2</sub> O estéril (25ml)
Agitación en vaivén	10 minutos a 250rpm					
Transferir suspensión de suelo en agitación	125 µl					50µl
Añadir sustrato específico (excepto en controles)	Potassium 4-nitrophenyl sulfate 0,025mol/l (25µl)	P-nitrophenyl β-D-galactopyranoside 0,02mol/l (25µl)	4-nitrophenyl β-D-glucopyranoside 0,05mol/l (25µl)	4-nitrophenylphosphate disodium salt hexahydrate 0,05mol/l (25µl)		Urea 0,4mol/l (40µl)
Añadir H <sub>2</sub> O desionizada						150µl
Incubación 1	37°C					25°C
	4 horas	3 horas	1 hora	30 minutos		3 horas
Detener reacción	Cl <sub>2</sub> Ca 0,5M (25µl)					Salicilato (40µl)
	Trizma 100mM pH12 (100µl)					Cianurato (40µl)
Añadir sustrato específico (solo en controles)	Potassium 4-nitrophenyl sulfate 0,025mol/l (25µl)	P-nitrophenyl β-D-galactopyranoside 0,02mol/l (25µl)	4-nitrophenyl β-D-glucopyranoside 0,05mol/l (25µl)	4-nitrophenylphosphate disodium salt hexahydrate 0,05mol/l (25µl)		Urea 0,4mol/l (40µl)
Incubación 2						30 minutos 20-25°C
Centrifugación	5 minutos a 2500 rpm					
Transferir sobrenadante	200 µl					
Lectura	λ = 405nm					λ = 650nm



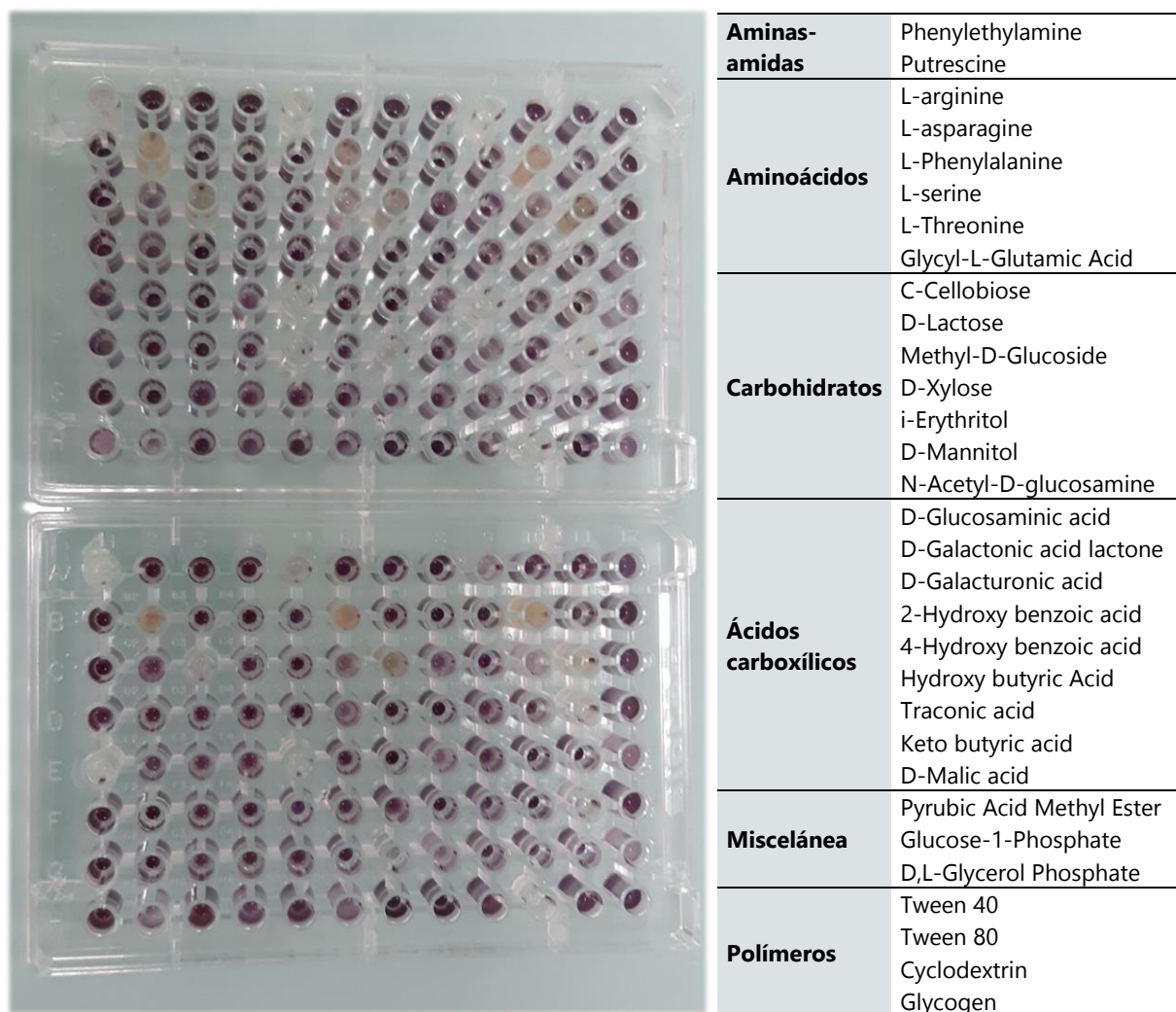
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1a	S1b	S1c	S2a	S2b	S2c	S3a	S3b	S3c	S4a	S4b	S4c
B	S1a	S1b	S1c	S2a	S2b	S2c	S3a	S3b	S3c	S4a	S4b	S4c
C	S1a	S1b	S1c	S2a	S2b	S2c	S3a	S3b	S3c	S4a	S4b	S4c
D	S1aT	S1bT	S1cT	S2aT	S2bT	S2cT	S3aT	S3bT	S3cT	S4aT	S4bT	S4cT
E	S5a	S5b	S5c	S6a	S6b	S6c	S7a	S7b	S7c	S8a	S8b	S8c
F	S5a	S5b	S5c	S6a	S6b	S6c	S7a	S7b	S7c	S8a	S8b	S8c
G	S5a	S5b	S5c	S6a	S6b	S6c	S7a	S7b	S7c	S8a	S8b	S8c
H	S5aT	S5bT	S5cT	S6aT	S6bT	S6cT	S7aT	S7bT	S7cT	S8aT	S8bT	S8cT

**Figura 4.17** | Arriba, fotografías del procedimiento del método estándar ISO 20130:2018 para la determinación de actividades enzimáticas. Debajo, esquema de la distribución de muestras en la placa de 96 pocillos (S1-S8 = número de muestra; a, b, c = réplicas, T = pocillos control).

#### 4.9.6. Perfiles fisiológicos a nivel de comunidad bacteriana (Biolog EcoPlates™)

A fin de evaluar los posibles cambios en la comunidad bacteriana del suelo por la biodesinfección, se empleó la metodología desarrollada por Biolog Inc. que analiza el perfil fisiológico a nivel de comunidad (CLPP: *community-level physiological profile*) de las bacterias heterótrofas presentes. Con este fin, la empresa Biolog Inc. diseñó microplacas de 96 pocillos, denominadas Biolog EcoPlates™, con 31 sustratos de C diferentes por triplicado y los respectivos blancos. Los sustratos se pueden agrupar en seis categorías: aminos-amidas, aminoácidos, carbohidratos, ácidos carboxílicos, miscelánea y polímeros (Figura 4.18). La distribución de cada uno de los sustratos en la placa se encuentra en los anexos. A diferencia de las técnicas moleculares de identificación taxonómica que hacen referencia a la abundancia de los microorganismos identificados, este método permite estimar la diversidad metabólico-funcional de las comunidades bacterianas heterótrofas y cultivables (Garlan y Mills, 1991; Garlan, 1997). Las bacterias heterótrofas son aquellas que emplean la materia orgánica como fuente de alimento por lo que el estudio de su comunidad puede resultar interesante en la interpretación de los procesos ligados a la biodesinfección. Este

procedimiento se llevó a cabo en todos los ensayos de campo de este trabajo (Capítulos 4, 5 y 8).



**Figura 4.18** | A la izquierda, fotografía de placas Biolog EcoPlates™ al finalizar la incubación. A la derecha, tabla con los 31 sustratos presentes en las placas y el grupo genérico en el que se incluyen.

El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo a Epelde et al. (2008) que adaptó el propuesto por Garlan (1997). Para ello se pesaron 1,2g de suelo fresco tamizado por duplicado y se añadieron 11ml de agua destilada estéril. Las muestras se agitaron en un volteador durante 30 minutos. Finalizada la agitación, se volvió a agitar cada tubo individualmente en vórtex y se dejaron reposar 3 minutos antes de comenzar a pipetear 100µl del extracto en el orden de la agitación en vórtex. Los 100µl de cada extracto se mezclaron con 10ml de agua destilada estéril y tras su agitación se dispensaron, con una pipeta multicanal, 120µl en cada pocillo de la placa a 3 filas por muestra. Una vez dispensadas todas las muestras en las microplacas, se tomaron las primeras medidas de absorbancia a 590nm en un espectrofotómetro (Synergy HTX Multimode Reader, Agilent Technologies, California, EEUU). A partir de ese momento, las placas se mantuvieron en incubación a 30°C en oscuridad una semana, hasta que la mayoría de sustratos se agotaron

(absorbancia >2). Durante la semana de incubación se tomaron mediadas de absorbancia, al menos, cada 12h.

Con las absorbancias registradas durante la semana de incubación, se realizaron los cálculos pertinentes para la determinación del desarrollo medio de color del pocillo (AWCD: *average well color development*) y del número de sustratos empleados (NUS: *number of utilized substrates*). El valor AWCD hace referencia a la absorbancia media de los 31 sustratos al finalizar la incubación (168h). El NUS indica el número de sustratos degradados por las bacterias, aquellos con un valor de absorbancia >0,25. Con los datos registrados, también se evaluó el desarrollo de actividad del conjunto de sustratos a lo largo del periodo de incubación, así como los valores máximos de absorbancia de cada grupo de sustratos (aminas-amidas, aminoácidos, carbohidratos, ácidos carboxílicos, miscelánea y polímeros).

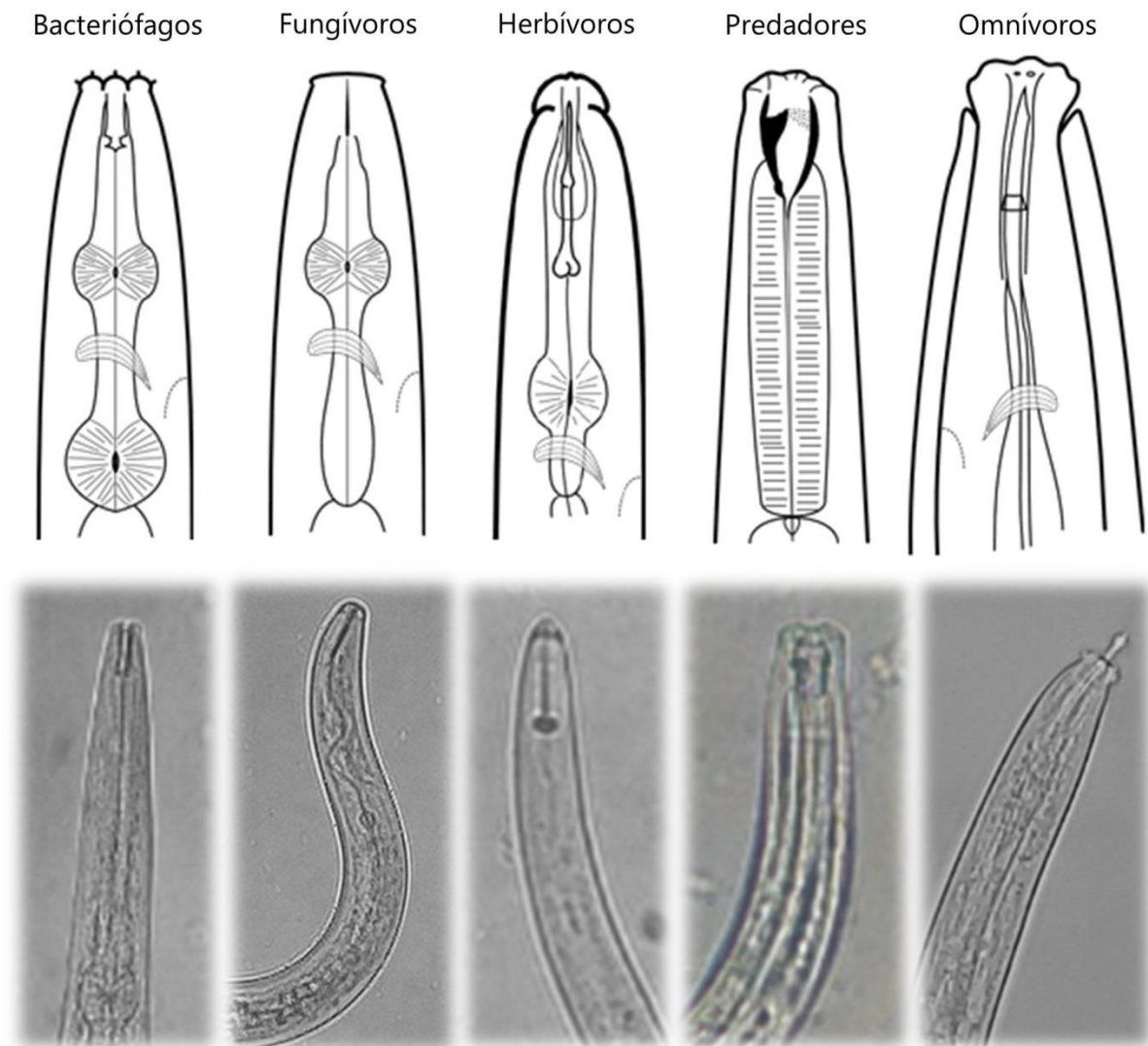
#### 4.9.7. Nematofauna

Siendo los nematodos organismos muy sensibles a las perturbaciones y dependientes de otros organismos del suelo, la evaluación de la estructura de la población puede aportar información muy relevante del estado de salud del suelo (Bongers y Ferris, 1999; Stockdale y Watson, 2009; Cesarz et al., 2015; Lu et al., 2020). Por tanto, en este trabajo se analizó la estructura de la nematofauna en todos los ensayos de campo (Capítulos 4, 5 y 8) para obtener una visión más amplia del efecto de la biodesinfección en la red trófica del suelo. Los nematodos se pueden clasificar en función del grupo trófico al que pertenecen: bacteriófagos (Ba), fungívoros (Fu), herbívoros (He), predadores o carnívoros (Pr) y omnívoros (Om). Cada grupo trófico presenta un aparato bucal especializado de forma que, en la mayoría de los casos, resulta fácil determinar su fuente de alimento y, por tanto, el grupo trófico al que pertenecen (Figura 4.19). Además, los grupos de predadores y omnívoros están, a su vez, subdivididos en aquellos que ingieren (i) o perforan (p). Lo mismo sucede con los herbívoros que, en este caso, se diferencian seis subgrupos: endoparásitos sedentarios (a), endoparásitos migrantes (b), endoparásito facultativo (c), ectoparásito (d), asociados a la raíz alimentándose de tejido radicular (e) y aquellos que se alimentan de algas, líquenes y musgos (g) (Yeates et al., 1993).

La clasificación en función del grupo trófico suele ir acompañada de la clasificación según la estrategia reproductiva r o K o, en este caso, colonizadores y persistentes (cp). Esta clasificación presenta cinco categorías, de más colonizador a más persistente, en una escala del 1 al 5. Esta categorización está definida por oportunistas (cp-1), fauna basal (cp-2), primeros oportunistas sucesionales (cp-3), sucesionales intermedios y altamente sensibles a las perturbaciones (cp-4), y especies intolerantes de vida larga (cp-5) (Bongers, 1990). No todos los grupos tróficos tienen representación en toda esta escala (Tabla 4.5). Los predadores y omnívoros son los más sensibles, dándose más frecuentemente en suelos preservados, poco alterados. Los valores cp más bajos (cp1-2) se otorgan a aquellas familias de nematodos de menor tamaño, con ciclos de vida corto y alta tasa de reproducción. Los grupos más susceptibles a las perturbaciones (cp4-5) con requerimientos de estabilidad en el



largo plazo son, en su mayoría, predadores y omnívoros. Los herbívoros son muy variados y más especializados, como se cita en el párrafo anterior, lo que amplía el rango cp de este grupo (cp2-5).



**Figura 4.19** | Imágenes de los diferentes grupos tróficos de nematodos. Arriba, imagen gráfica de los aparatos bucales y de la primera sección del cuerpo creados por Ed Zaborski de la Universidad de Illinois. Debajo, fotografías de los grupos tróficos correspondientes tomadas de muestras de suelo analizadas en este trabajo.

La extracción de nematodos para el estudio de la nematofauna se llevó a cabo al igual que para la determinación de la población de *M. incognita*, como queda descrito en el apartado 1.2.1. de este capítulo, mediante la técnica de embudo Baerman (Barker, 1985). La identificación se realizó a nivel de familia a través de determinados rasgos morfológicos como el aparato bucal, la cola y la posición de la vulva. En algunos casos, la piel (lisa o rugosa), el tamaño y los movimientos también facilitaron su identificación. Con los valores obtenidos tras la cuantificación se calculó el número de individuos de cada familia en 100g se suelo (peso seco) y, con ello, la abundancia relativa de las familias identificadas.

**Tabla 4.5** | Tabla adaptada de Bongers y Bongers (1998) con las posibles combinaciones de grupos tróficos y características del ciclo de vida.

	<b>cp-1</b>	<b>cp-2</b>	<b>cp-3</b>	<b>cp-4</b>	<b>cp-5</b>
Bacteriófagos (Ba)	Ba-1	Ba-2	Ba-3	Ba-4	-
Fungívoros (Fu)	-	Fu-2	Fu-3	Fu-4	-
Herbívoros (He) <sup>1</sup>	-	He-2	He-3	He-4	He-5
Predadores (Pr) <sup>2</sup>	-	-	Pr-3	Pr-4	Pr-5
Omnívoros (Om) <sup>2</sup>	-	-	-	Om-4	Om-5

<sup>1</sup> incluye subcategoría: endoparásitos sedentarios (a), endoparásitos migrantes (b), endoparásito facultativo (c), ectoparásito (d), asociados a la raíz que se alimentan de tejido radicular (e) y los que se alimentan de algas, líquenes y musgos (g)

<sup>2</sup> incluye subcategoría: ingieren (i) o perforan (p)

#### 4.9.8. Comunidades de bacterias y hongos

Dada la contribución esencial de los microorganismos en los procesos de biodesinfección, en tres de los cuatro ensayos presentados en este trabajo se incluyó el análisis de las comunidades bacterianas y fúngicas (Capítulos 6, 7 y 8). Para ello, se realizó la extracción de ADN en 0,3 g de suelo con el kit DNeasy PowerSoil Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania). El ADN extraído se cuantificó con un espectrofotómetro ND-2000 Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, USA). En el caso de la comunidad de bacterias se amplificaron mediante PCR las regiones V4-V5 (400-500pb) del gen ribosomal 16S empleando los cebadores 515FB (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') y 926R (5'-CCGYCAATYMTTTRAGTTT-3') (Walters et al., 2016). Para la comunidad de hongos se amplificó la región ITS2, con los cebadores ITS86F (5'-GTGAATCATCGAATCTTTGAA-3'), e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Sommermann et al., 2018). Los fragmentos de ADN fueron secuenciados en una plataforma Illumina MiSeq v3 (2x300 pb), como se describe en Comeau et al. (2017). Para verificar que no hubiera contaminación durante la extracción y procesamiento del ADN, se realizó un control con una muestra en blanco en uno de los tubos del kit. A su vez, también se analizaron controles negativos de secuenciación (uno por cada placa de 96 pocillos = 4 por ejecución de MiSeq), para comprobar que no hay lecturas sustanciales. Las secuencias se procesaron con Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2 (QIIME2 versión 19.10) (Bolyen et al., 2018). Las secuencias en bruto se depuraron eliminando cebadores y filtrando contaminantes, empleando la herramienta Deblur, para generar las variantes de secuencias de amplicones (ASV). Finalmente, se asignaron los ASV a las OTUs correspondientes empleando el complemento clasificador de características QIIME2 (método Sklearn) contra las bases de datos SILVA 132 (bacterias) y UNITE 7 (hongos). Estas tareas fueron realizadas por Dr. Raúl Ortega Pérez, responsable del Laboratorio de Microbiología de Suelos de la Universidad de Almería. Para cada muestra de suelo se calcularon las abundancias relativas de las OTUs identificadas para cada nivel taxonómico hasta el máximo nivel de clasificación (género o

especie) o en su defecto, del siguiente nivel identificado y descartando las OTUs con representación < 0,1% del conjunto de la población.

#### **4.10. Tratamiento de datos**

Todos los análisis de datos de este trabajo se realizaron con el software RStudio 4.2.1. En el caso de los datos de temperatura y redox, no se hicieron análisis estadísticos pero los cálculos necesarios para su interpretación fueron realizados con Microsoft Excel 2010. Ambas herramientas fueron empleadas para la generación de las gráficas presentadas en este trabajo. En las tablas y gráficas de este trabajo la puntuación decimal viene representada mediante puntos, a diferencia del texto (comas).

##### **4.10.1. Análisis de datos de temperatura y redox**

En los ensayos en los que se colocó más de una sonda para tomar una misma medición, se calculó el promedio para tener un solo valor por tratamiento y profundidad antes de realizar los siguientes cálculos. Tanto para la variable de temperatura como para la del potencial redox, no solo se consideraron los valores registrados, sino que también se calcularon los valores acumulados como se detalla a continuación.

Con los datos de temperatura medidos cada 15 minutos, tanto en el suelo como dentro del invernadero (temperatura ambiental), se realizó el promedio por hora de temperatura registrada. De esta forma, se pudo evaluar la evolución de la temperatura durante la biodesinfección y calcular el número de horas acumuladas a cada temperatura. Para ello, se sumaron todas las horas con el mismo valor de temperatura media para determinar el número de horas a las que el suelo estuvo expuesto a determinados grados centígrados. También se graficó la evolución de la temperatura durante el periodo de biodesinfección. Las variaciones en el potencial redox en el suelo también se midió a lo largo de la biodesinfección en el último ensayo de campo presentado en este trabajo (Capítulo 8). Con los datos registrados cada 15 minutos se procedió de la misma forma que con la temperatura a fin de determinar los valores medios a cada hora en cada tratamiento. En este caso, el número de horas acumuladas se realizó considerando el valor crítico del potencial redox (CEh), por debajo del cual se darían condiciones reductoras en un suelo, y que viene determinado por su valor pH. Este valor fue calculado aplicando la fórmula propuesta por Rabenhorst y Castenson (2005):

$$CEh = 595mV - 60mV * pH$$

Una vez obtenido el CEh para el suelo objeto de estudio, se calculó el potencial redox acumulado (mVh) durante el tiempo de biodesinfección. Para que el efecto anaerobio resulte efectivo contra el patógeno, este valor debería estar por encima de 50.000mVh (Shennan et al., 2018). Para este cálculo se aplicó el procedimiento propuesto por Butler et al. (2012b), que suma el valor absoluto de la diferencia entre un potencial redox dado y el CEh

obtenido. Para ello, una vez conocido el valor CEh y tomando 201mV como el valor a partir del cual se darían condiciones aerobias se procedió de la siguiente forma:

- $AmV + 201 > CEh = 0mVh$        $A$ : valor redox (mV) medido a cada hora
- $AmV + 201 \leq CEh = BmVh$        $B$ : valor a sumar para el cálculo del mVh total

#### 4.10.2. Análisis de datos univariantes

Los análisis estadísticos fueron aplicados a todas las variables medidas que presentaron un mínimo de 3 réplicas por tratamiento. Es por ello que tan solo en uno de los ensayos (Capítulo 6) se pudieron analizar estadísticamente los datos fisicoquímicos del suelo, dado que en el resto de ensayos solo se dispuso de 1 o 2 réplicas. Para el análisis de los datos univariantes, primeramente, se evaluó la normalidad en la distribución de los residuos por el test Shapiro-Wilk. Para las variables con distribución no paramétrica se realizó un análisis de la varianza con el test Kruskal-Wallis y el posterior de Mann-Whitney para las comparaciones por pares. A las variables que presentaron distribución paramétrica, que fueron la gran mayoría, se les aplicó un análisis de la varianza (ANOVA) acompañado del test Tukey-HSD. En todos los casos se ajustó el P-valor frente a una tasa general de error de tipo I ( $\alpha=0,05$ ) tomando como único factor el tiempo, el tratamiento y su combinación.

Salvo para las variables fisicoquímicas en el Capítulo 8, estos resultados se representan con gráficas de cajas y bigotes (*boxplot*) (librería *ggplot2*). Estas gráficas permiten la visualización gráfica de la distribución de los datos mediante cuartiles. La caja queda delimitada por debajo por el primer cuartil (Q1), que indica el valor mayor al 25% de los datos, y el tercer cuartil (Q3), valor que sobrepasa al 75%. Además se incluye la línea del segundo cuartil (Q2) o mediana de los datos entre Q1 y Q3. Los bigotes superior e inferior representan los valores máximos y mínimos establecidos para el Q3 y Q1, respectivamente. Los valores que quedan fuera de estos rangos aparecen como un punto por encima o por debajo de estos bigotes. Las diferencias estadísticas obtenidas en estos análisis se reflejan en estas gráficas con letras mayúsculas para las diferencias entre tiempos y minúsculas para la combinación de tiempo-tratamiento. Las diferencias entre tratamientos a cada tiempo se indican con asteriscos en función del grado de significación ("\*"  $P \leq 0.05$ , "\*\*\*"  $P \leq 0.01$  y "\*\*\*\*"  $P \leq 0.001$ ).

#### 4.10.3. Análisis de datos multivariantes

Los análisis multivariantes se aplicaron a los datos de abundancias relativas de las poblaciones de nematodos, bacterias y hongos. En estos casos, se realizó un análisis de la varianza multivariante con permutaciones (PERMANOVA) empleando la función Adonis (librería *Vegan*) para comparar las comunidades a cada tiempo y en entre tratamientos, así como su combinación. Este análisis no paramétrico emplea matrices de distancia y disimilitudes para probar la hipótesis de igualdad de medias multivariada entre grupos evaluando su significación con permutaciones (999) (Oksanen et al., 2013). Estos resultados



vienen representados en gráficos de barras y las diferencias estadísticas se indican de la misma forma que en las variables univariantes, con letras y asteriscos. Además de esto, se incluyó un análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS: *non-metric multidimensional scaling*), basado en la matriz de distancia de Bray-Curtis, que presenta la distribución de los datos en función de la similitud o disimilitud de la composición de las comunidades de cada punto o muestra. Esto significa que a mayor cercanía, mayor similitud entre comunidades y viceversa. La validez de este análisis viene dada por el valor de estrés obtenido (Kruskal y Wish, 1978) que debe ser  $<0,1$  para darse por válido, sin riesgo de inferencia, siendo óptimo si se encuentra por debajo de  $0,05$ . Por el contrario, si este valor sobrepasa  $0,3$  debe descartarse el análisis y por encima de  $0,2$  debería tomarse con cierta cautela (Clarke, 1993). Además, el NMDS se completó con un análisis de similitud (ANOSIM), también en función de la matriz de distancia de Bray-Curtis, con 999 permutaciones.

En el caso del análisis del perfil fisiológico (CLPP) de bacterias heterótrofas, se incluyó un análisis de componentes principales (PCA: *principal component analysis*) con los datos de absorbancia máxima de los 31 sustratos presentes en las placas. Este análisis resume en un espacio de baja dimensión la varianza en una dispersión multivariada de puntos. Básicamente, calcula nuevas variables o componentes principales (PC) que son combinaciones lineales de las variables originales y que proporciona una descripción general de las relaciones lineales entre sus objetos y variables. Puede actuar como un buen punto de partida al permitirle observar, agrupaciones, tendencias, variables clave y posibles valores atípicos (Ramette, 2007) y, además, es el recomendado por los ideadores de esta técnica. También, en algunos ensayos se analizó el conjunto de variables biológicas, previa transformación logarítmica de los datos. En el caso de la evaluación conjunta de las variables fisicoquímicas, se optó por un análisis de redundancia (RDA: *redundancy analysis*) que genera una ordenación en el espacio definida por la matriz de variables de respuesta y otra por la de variables explicativas. El RDA puede considerarse una versión restringida del análisis del PCA, en el que los ejes canónicos construidos a partir de combinaciones lineales de variables de respuesta, también deben ser combinaciones lineales de las variables explicativas (Legendre y Legendre, 1998).

Además de estos análisis multivariantes, también se calcularon los índices de diversidad de Shannon y riqueza de Chao de los datos de comunidad (nematodos, bacterias, hongos y CLPP). Con los valores obtenidos para cada caso se procedió de la misma forma que los análisis univariantes para el análisis estadístico. En este caso, los resultados se presentan en tablas con los valores medios y errores estándar (EE) de estos índices y con las diferencias estadísticas reflejadas como en el resto de análisis.





# CAPÍTULO 5



Evaluación de supresividad contra  
*M. incognita* tras biodesinfección de suelo con  
subproductos en cultivo de lechuga bajo  
invernadero





## 5. Evaluación de supresividad contra *M. incognita* tras biodesinfección de suelo con subproductos en cultivo de lechuga bajo invernadero

---

Estudio publicado en la revista *FRONTIERS In Sustainable Food Systems* en 2021:

Gandariasbeitia, M., López-Pérez, J. A., Juaristi, B., Abaunza, L., and Larregla, S. (2021). "Biodisinfestation with agricultural by-products developed long-term suppressive soils against *Meloidogyne incognita* in lettuce crop". *Front. Sust. Food Syst.* 5:663248. doi: 10.3389/fsufs.2021.663248.

En este capítulo se amplía la información aportada en dicho artículo al presentarse datos y análisis no incluidos en la publicación.

### 5.1. Introducción

En el manejo convencional de cultivos hortícolas, la práctica más habitual para el control de patógenos de suelo es la aplicación de fitosanitarios. Sin embargo, algunos de estos compuestos han demostrado efectos negativos para la salud humana y el medio ambiente, por lo que muchos han quedado prohibidos o tienen un uso restringido en la actualidad (Gareau, 2010). Esto ha provocado la necesidad de alternativas eficaces y más comprometidas con la salud y el medioambiente (Klein et al., 2012; Mocali et al., 2015;). Entre éstas, la técnica que más atención recoge es la biodesinfección de suelos por su demostrada efectividad y por los beneficios que aporta al suelo (Roskopf et al., 2020). El término biodesinfección se emplea de forma generalizada, como se explica en el apartado 1.2.4 de la Introducción, e incluye todos los enfoques relacionados con esta práctica como son la biosolarización (efecto térmico por radiación solar elevada), la biofumigación (liberación de compuestos biocidas) y la desinfección anaerobia (generación de condiciones anaerobias o reductoras). Todas tienen en común la aportación de enmiendas orgánicas y la cubierta plástica durante un periodo de tiempo mínimo de cuatro semanas.

Estas prácticas han mostrado efectos positivos en el control de diferentes patógenos de suelo (Ntalli et al., 2020; Roskopf et al., 2020). Entre ellos, los nematodos fitopatógenos que suponen un problema ampliamente distribuido afectando a diferentes cultivos (Avato et al., 2013; Fourie et al., 2016; Dutta et al., 2019; Talavera et al., 2019). Existen varios nematodos fitopatógenos que se pueden clasificar en función del daño generado en la planta como son los generadores de agallas (*Meloidogyne* spp.), quistes (*Heterodera* spp. y *Globodera* spp.) y lesiones radiculares (*Pratylenchus* spp.) (Jones et al., 2013). Los nematodos agalladores del

género *Meloidogyne* son los más extendidos geográficamente y tienen capacidad de causar graves daños en diferentes cultivos (Sasser, 1980; Ijoyah y Koutatouka, 2009; Klein et al., 2012; Jones et al., 2013). Las formas juveniles (J2) penetran en la raíz e inducen la formación de agallas, mediante la inyección de proteínas efectoras en células que las convierte en células de alimentación especializadas (células gigantes) (Ishida et al., 2020). Tras madurar el J2 a hembra adulta, deposita una masa de huevos hacia el exterior. El agallamiento de la raíz es el síntoma más claro de enfermedad afectando al desarrollo radicular y, en consecuencia, a la toma de nutrientes y al correcto desarrollo de la planta, generando pérdidas de producción en función del grado de infección (Jones et al., 2013). Dentro de este género, la especie *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White, 1919) Chitwood 1949, está reconocida como una de las más destructivas y con mayor número de especies hospedadoras (Avato et al., 2013; Jones et al., 2013). Entre los cultivos afectados, la lechuga (*Lactuca sativa* L.) es uno de los que más pérdidas registra en diferentes regiones (Correia et al., 2019; Koenning et al., 1999;) pero la literatura relacionada es bastante escasa.

Los nematodos son los metazoos más abundantes y solo unos pocos son patógenos. La mayoría de especies son de vida libre y presentan diferentes fuentes de alimento, lo que les hace ocupar posiciones clave dentro de la red trófica del suelo (Bongers, 1990; Bongers y Ferris, 1999; Ferris et al., 2001). Por tanto, la interpretación de la estructura de la comunidad de nematodos puede aportar información relevante en la evaluación de perturbación y estrés en el suelo, además de ser muy útil para monitorizar cambios en la estructura y funcionamiento de la red trófica (Bongers y Ferris, 1999; Cesarz et al., 2015). Dada la relevancia de este análisis, algunos autores desarrollaron una serie de índices basados en la presencia y abundancia de las diferentes familias (Bongers, 1990; Yeates et al., 1993; Bongers y Bongers, 1998; Bongers y Ferris, 1999; Ferris et al., 2001; Ferris, 2010). Para escoger los índices o análisis adecuados de una comunidad de nematodos, es importante tener en cuenta que los suelos agrícolas están sujetos a perturbaciones y condiciones de estrés frecuentes derivados del propio manejo (laboreo, fertilización, fumigación, etc.) que producen cambios en la diversidad de la comunidad. En este ensayo, junto con la presencia de *M. incognita*, también se evaluó el efecto de la biodesinfección en la estructura de la nematofauna considerando las familias pertenecientes a los diferentes grupos tróficos (bacteriófagos: Ba; fungívoros: Fu; herbívoros: He; predadores: Pr; omnívoros: Om). Además, estos análisis pueden contribuir en la interpretación del desarrollo de supresividad tras la realización de este tipo de tratamientos (Carrascosa et al., 2014), aunque son pocos los trabajos de biodesinfección en los que se aplica.

La incorporación de materia orgánica al suelo incrementa la actividad microbiana por los procesos de degradación que se dan y que se ven incrementados en las condiciones generadas durante la biodesinfección. Además, no solo se produce un aumento en la actividad, sino que también aumentan las poblaciones de organismos antagonistas en detrimento de los patógenos pudiendo lograrse la supresividad del suelo (Alabouvette et al., 1996; Janvier et al., 2007). Un suelo supresivo es capaz de albergar al patógeno sin que éste genere enfermedad debido a la elevada presión de organismos antagonistas ocupando el

mismo nicho (Baker y Cook, 1974). El concepto de supresividad de suelos se presenta con más detalle en el capítulo de Introducción (apartado 2.6.1).

Para tal fin, en este ensayo de biodesinfección se aplicó estiércol fresco, por ser la enmienda más empleada debido a su alta eficacia, junto con el bagazo de cerveza y la torta de colza. El bagazo de cerveza se obtiene tras la cocción de la cebada y, actualmente, tiene salida limitada en el mercado. Principalmente se emplea como pienso para el ganado y en algunos ensayos se probó su efectividad en biodesinfecciones en el Sureste de España (Guerrero-Díaz et al., 2014; Guerrero et al., 2019) y es que su alto contenido en azúcares (C lábil) hacen de este un potencial subproducto a emplear en biodesinfección. La torta de colza (*Brassica napus*) de las variedades tipo "Canola" o "00", es el subproducto obtenido tras la extracción del aceite. La torta resultante tras el prensado se emplea para pienso animal por su elevado contenido en proteína y ausencia de glucosinolatos (<15µmol/g), de difícil digestión. A pesar del escaso contenido en glucosinolatos, este subproducto demostró eficacia contra *M. incognita* en estudios previos (Gamliel et al., 2000; Mazzola et al., 2001; Guerrero-Díaz et al., 2014; Guerrero et al., 2019), principalmente atribuida al alto contenido en N que promueve la actividad microbiana y la liberación de compuestos nematocidas como el amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) y algunos ácidos grasos volátiles (AGV) (Mazzola et al., 2001; Dutta et al., 2019).

En este ensayo, se aplicaron estas enmiendas de forma conjunta para realizar un tratamiento de biodesinfección en un invernadero comercial con importantes pérdidas en el cultivo de lechuga generadas por *M. incognita*. Los objetivos principales fueron (i) evaluar la efectividad de estos subproductos como enmiendas de biodesinfección en la reducción de la enfermedad causada por *M. incognita* y (ii) el efecto supresivo del tratamiento, (iii) además de su impacto en la comunidad de nematodos a corto y largo plazo. Para ello, se evaluó el desarrollo de la enfermedad a través del índice de agallamiento, la producción de lechuga y la presencia del patógeno en el suelo. La supresividad fue estimada a partir de la actividad y diversidad microbiana midiendo la respiración del suelo junto con el análisis del perfil fisiológico a nivel de la comunidad de bacterias heterótrofas (Biolog EcoPlates™) y de la nematofauna. La información que puede aportar el estudio de la estructura de la comunidad de nematodos puede ser muy útil en la interpretación del estado del suelo. En este caso, se calculó la presencia relativa del fitoparásito *M. incognita* junto con la de las familias identificadas en las muestras. Los efectos de la biodesinfección con estos subproductos se analizaron a corto y largo plazo, antes y después del tratamiento, después del primer cultivo tras el tratamiento y pasado un año.

## **5.2. Materiales y métodos**

### **Ubicación del ensayo y diseño experimental**

Este ensayo fue llevado a cabo en la explotación 1 en los años 2018 y 2019. La localización y características del suelo vienen descritas en el apartado 4.1.1. de Procedimientos Generales,



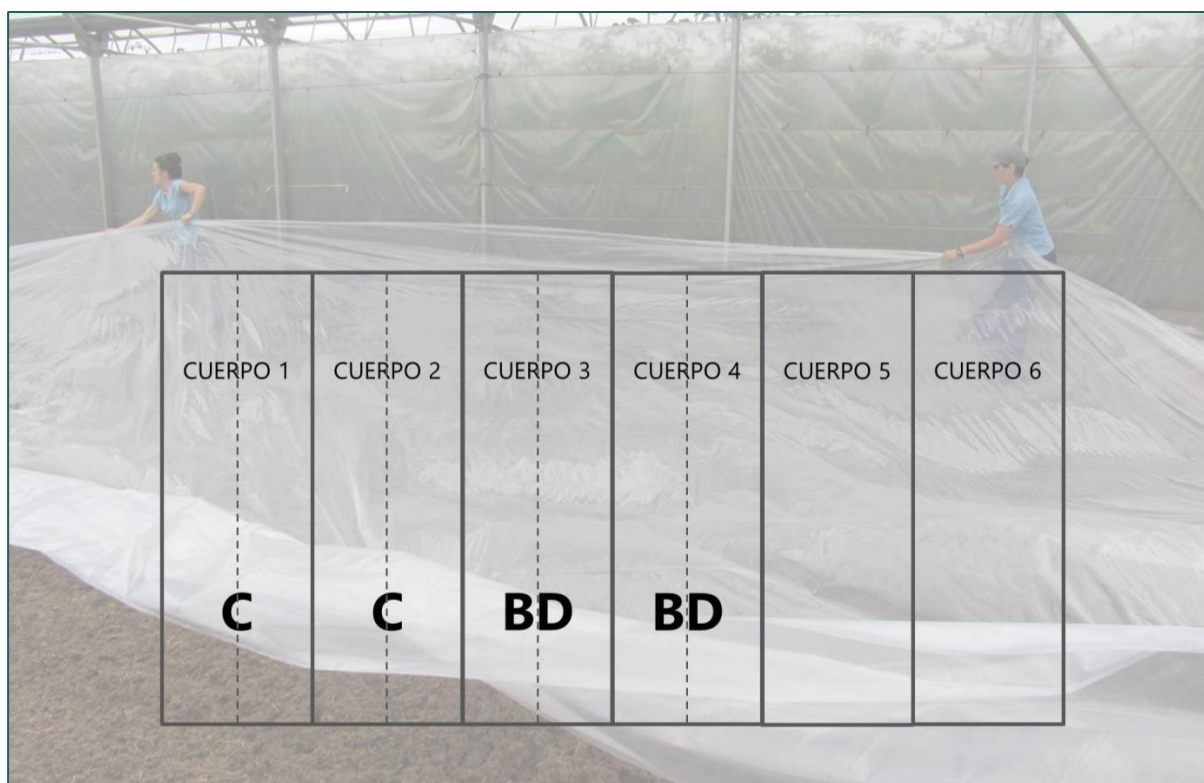
junto con más información referente al manejo y los antecedentes de la finca. La biodesinfección se realizó en un invernadero con cultivo de lechuga (*Lactuca sativa*) afectado por *M. incognita*. Este nematodo fitopatógeno, generador de agallas en la raíz, provocó pérdidas cercanas al 50% en el cultivo que precedió al ensayo, si bien los daños comenzaron cuatro años antes, tras casi 20 años de monocultivo intensivo.

**Tabla 5.1** | Caracterización físico-química de las enmiendas aplicadas: bagazo de cerveza (BC), torta de colza (TC) y estiércol fresco vacuno (EFV). En la última columna y al final de la tabla se incluyen los datos teóricos calculados para la mezcla. Valores expresados sobre el peso seco.

ENMIENDA	EFV	TC	BC	MEZCLA
Materia seca (%)	14.75	93.80	25.81	25.34
pH	8.89	5.35	3.85	7.96
CE (mS/cm)	8.19	3.13	2.12	6.98
Materia orgánica (%)	65.36	93.94	96.32	71.89
C orgánico (%)	37.91	54.41	55.87	41.69
N total Kjeldahl (%)	1.48	3.77	3.10	1.92
C/N	25.65	7.60	18.00	22
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (%)	0.73	1.99	1.13	0.92
K <sub>2</sub> O (%)	3.62	1.25	1	3.07
SO <sub>3</sub> (%)	4.62	0.36	<0.01	3.65
CaO (%)	3.05	1.59	0.46	2.62
MgO (%)	0.38	0.49	0.32	0.39
Na (%)	0.23	0.02	<0.01	0.18
Fe (mg/kg)	0.11	0.04	0.02	0.09
Mn (mg/kg)	126.26	43.99	27.71	106.53
Cu (mg/kg)	14.70	11.37	7.92	13.62
Zn (mg/kg)	75.85	46.96	65.80	71.38
B (mg/kg)	17.42	28.91	1.12	17.17
Cd (mg/kg)	<0.2	<0.2	<0.2	-
Pb (mg/kg)	7.09	<1	<1	5.69
Hg (mg/kg)	<0.4	<0.4	<0.4	-
Cr (mg/kg)	5.06	0.45	2.00	4.20
Ni (mg/kg)	2.98	0.38	0.94	2.46
Dosis (kg/m <sup>2</sup> )	3.0	0.5	0.4	3.9
C (mg/g suelo)	3.1	0.7	0.6	4.4
N (kg/ha)	473	177	120	733

Las enmiendas seleccionadas para la biodesinfección fueron estiércol fresco de vaca (EFV), torta de colza (TC) peletizada y bagazo de cerveza (BC). El estiércol, mezclado en un 20% con paja, se incorporó a una dosis de 20kg/m<sup>2</sup> en peso fresco (85% de humedad). La torta de colza (*Brassica napus* "Canola") se obtuvo de las granjas experimentales del centro de NEIKER-BRTA en Arkaute (Araba). La torta se aplicó en forma de pellets a una dosis de 0,5kg/m<sup>2</sup> en peso fresco (6% de humedad), cantidad similar a los estudios referenciados.

Apenas existen bibliografía sobre el empleo de bagazo de cerveza en estos tratamientos (Molina, P. 2017), así que para este ensayo se adaptó la dosis a fin de obtener una mezcla de enmiendas con las características necesarias, en este caso se incorporaron  $1,5\text{kg}/\text{m}^2$  en peso fresco (74% de humedad). Este subproducto se obtuvo de una cervecería local (BOGA Basque Craft Beer) que descarta semanalmente el bagazo para gestionarlo como residuo. La caracterización de cada enmienda y de la mezcla se incluyen en la Tabla 5.1. El conjunto de enmiendas aportado supuso un aporte total cercano a  $4\text{kg}/\text{m}^2$  en una proporción de 10% BC, 12% TC y 78% EFV (peso seco), con un valor C/N de 22 y un contenido en C orgánico ( $4,4\text{mgC}/\text{g}$ ) similar al mínimo recomendado en los tratamientos ASD ( $4\text{mgC}/\text{g}$ ) (Butler et al., 2014).



**Figura 5.1** | Esquema de los cuerpos de invernadero empleados para el ensayo. Cuerpos 1 y 2 como controles sin tratar (C) y cuerpos 3 y 4 biodesinfectados (BD). Las líneas discontinuas marcan la división para generar 2 bloques o réplicas por cuerpo (4 bloques/tratamiento). De fondo, fotografía tomada durante la colocación del plástico en los cuerpos tratados.

El invernadero de tipo multicapilla donde se ejecutó el ensayo está conformado por seis cuerpos, de  $400\text{m}^2$  ( $8\times 50\text{m}$ ) cada uno, de los cuales se emplearon cuatro, dos se biodesinfectaron y otros dos sirvieron de controles no tratados. En estos últimos se incorporó estiércol a la misma dosis pero sin plástico y se mantuvieron sin cultivar durante la biodesinfección (Figura 5.1). Cada túnel de invernadero empleado en el ensayo se dividió virtualmente en dos de forma longitudinal a fin de generar dos parcelas por cuerpo, lo que serían cuatro parcelas o réplicas por tratamiento, tanto para el tratamiento de biodesinfección, como para el control. Este experimento se planteó con un diseño completo por bloques con un tamaño de  $200\text{m}^2$  ( $4\times 50\text{m}$ ) cada uno. Las enmiendas se incorporaron con

ayuda de un tractor y, posteriormente, todos los cuerpos del ensayo se regaron por aspersión durante 15 minutos ( $40\text{L/h/m}^2$ ) ( $10\text{L/m}^2$ ). Finalmente, se cubrió la superficie de los tratados con plástico transparente de polietileno de 200 galgas, suministrado por RAISAFILM. La biodesinfección comenzó el 1 de agosto y finalizó el 19 de septiembre de 2018, un total de siete semanas. También se colocó un plástico específico de invernadero a modo de pared para separar los dos cuerpos restantes no incluidos en este ensayo.

El diseño de este experimento consistió en dos factores, (1) tiempo y (2) tratamiento. El factor tratamiento consta de dos niveles: control (C) y biodesinfectado (BD); mientras que en el factor tiempo fueron cuatro los niveles: antes de la biodesinfección (T1) una vez retirado el plástico al finalizar la biodesinfección (T2), cosechado el primer cultivo después del tratamiento (T3) y un año después de la biodesinfección (T4) tras soportar cuatro cultivos de lechuga. No todas las variables pudieron ser analizadas en todos los tiempos, cuestión detallada en los siguientes apartados.

### **Muestreo y procesado de muestras**

Se tomaron muestras de suelo en todos los tiempos y de raíz en todos en los que hubo cultivo previo (T1, T3 y T4), al igual que los datos de producción. El primer muestreo (T1) se realizó el 28 de julio de 2018, una vez recogido el último corte de lechuga y antes de incorporar las enmiendas para la biodesinfección. El segundo (T2) fue el 23 de septiembre, después de retirar el plástico una vez finalizado el tratamiento y habiendo dejado airear el suelo durante cuatro días. El tercer muestreo (T3) se realizó el 16 de noviembre, tras cosechar el primer cultivo después del tratamiento. El último muestreo (T4) fue el 5 de agosto de 2019, un año después de la biodesinfección.

Las muestras de suelo se tomaron con un muestreador de núcleo (2,5cm de diámetro) en 10 puntos aleatorios de cada parcela, para formar una mezcla compuesta de los primeros 25cm de suelo. Cada muestra, formada por 1,8-2kg de suelo fresco, se removió manualmente a fin de homogeneizarla y se conservó a 4°C hasta su uso durante un máximo de dos meses. Parte de la muestra se tamizó por 2mm hasta obtener 200g que fueron empleados para los análisis biológicos, otra parte (600g) se mantuvo en frío sin procesar para la extracción de nematodos y el resto se secó y molió para los análisis de caracterización fisicoquímica. En el caso de las muestras de raíz, se tomaron 20 unidades por parcela de forma aleatoria y se mantuvieron a 4°C durante 2 días.

### **Variables analizadas y tratamiento de datos**

#### Temperatura

Durante el tratamiento de biodesinfección se registró la temperatura en el interior del invernadero y en el suelo a 15, 30 y 45cm de profundidad. Con este fin, se colocaron sondas de temperatura unidas a un registrador de datos HOBO (Weather Station, OCC, US, H8-4 32K) que tomó medidas cada 15 minutos. La sonda para la temperatura ambiental dentro del

invernadero se situó entre los cuerpos 2 y 3. En el caso de los suelos, se colocó una sonda a cada profundidad mencionada en los cuerpos tratados 3 y 4. Con los datos registrados se calculó la temperatura media para cada hora a fin de sumar el número de horas a cada temperatura registrada o número de horas acumuladas.

#### Caracterización físico-química de suelo y enmiendas

La caracterización fisicoquímica del suelo se llevó a cabo en todos los tiempos de muestreo, excepto en T3, tomando muestras compuestas de los dos cuerpos tratados y los dos controles (1 muestra/tratamiento). Las variables se analizaron de acuerdo a los métodos estándares (MAPA, 1994), detallados en el apartado de Procedimientos Generales 4.6. Las variables medidas incluyen la textura y otros datos de fertilidad como macro y micronutrientes. Además, se midió la concentración de metales pesados con relevancia agronómica mediante análisis ICP (USEPA, 2007). Así mismo, se caracterizaron las enmiendas, siguiendo el mismo procedimiento, para determinar la dosis a incluir de cada una y generar la mezcla de enmiendas con las características deseadas. En el caso del estiércol fresco, también se analizó la presencia de coliformes fecales (*Escherichia coli* y *Salmonella* spp.) de acuerdo a los estándares vigentes (ISO-7251:2005 e ISO 6579-1:2017, respectivamente).

#### Evaluación del desarrollo de enfermedad

La evaluación del efecto de la biodesinfección en el desarrollo de la enfermedad en el cultivo de lechuga se realizó estimando el índice de nodulación de acuerdo a la escala de Bridge y Page (1980) en T1, T3 y T4. También se realizó la cuantificación del patógeno *M. incognita* en todos los tiempos de muestreo mediante la técnica de embudo Baerman (Barker et al., 1985), presentada en el siguiente apartado y detallada en Procedimientos Generales (apartado 4.2.1.). En la extracción realizada en el primer muestreo, se determinó la especie de *Meloidogyne* causante del daño por la morfología del área perineal, explicado en el apartado mencionado de Procedimientos Generales. Además, se calcularon los datos de producción de planta comercial a criterio del agricultor. Este aportó el dato del número de cajas por parcela, forma de manejo por la que se regía, y con ello se estimó el número de plantas/m<sup>2</sup> cosechadas para cada parcela.

#### Comunidad de nematodos

La nematofauna fue evaluada en los cuatro momentos de muestreo. La extracción de nematodos se realizó de la misma forma que para la cuantificación de *M. incognita*, mediante la técnica de embudo Baermann (Barker et al., 1985). En resumen, se tomaron tres subréplicas de cada muestra de suelo natural (200g/subréplica, peso húmedo) que se disgregaron con agua mediante movimientos suaves para filtrar la suspensión a través de un tamiz de 45µm. La parte retenida se recogió y se mantuvo 24h con agua en un recipiente invertido y colocado sobre un embudo Baermann con un paño ("Kleenex") para filtrar el sedimento.

Durante ese tiempo, se dejó a los nematodos migrar hacia el extremo inferior del embudo donde se recogieron con un volumen de agua conocido. Los detalles de la técnica se describen en el apartado de Procedimientos Generales 4.2.1. La solución recogida del embudo se visualizó al microscopio a 200X para la identificación morfológica de los nematodos a nivel de familia. Para este capítulo, el análisis de la nematofauna se realizó con los datos de las familias, más específico que el análisis presentado en la publicación de este ensayo (Gandariasbeitia et al., 2021) en la que se empleó la clasificación únicamente por grupos tróficos. Con los valores obtenidos tras la cuantificación se calculó el número de individuos de cada familia en 100g de suelo (peso seco) y la abundancia relativa de las familias identificadas. La evaluación del efecto en la nematofauna se realizó mediante el análisis de las variaciones en la composición de la comunidad en cada momento y tratamiento. Al ser los nematodos dependientes de otros organismos como fuentes de alimentación, la composición de la comunidad aporta información relevante sobre el estado de la salud del suelo (Stockdale y Watson, 2009; Lu et al., 2020).

#### Variables microbiológicas

Las variables microbiológicas se midieron en todos los tiempos excepto en el primer muestreo. En estos casos, se midió la tasa de respiración del suelo (RS), siguiendo una adaptación de la norma ISO 16072:2002 descrita en el apartado 4.9.1. Este procedimiento se basa en la medición del C, por valoración de NaOH con HCl, procedente del CO<sub>2</sub> de la respiración del suelo húmedo incubado a 30°C durante 72h. También se analizaron cambios en la comunidad de bacterias heterótrofas empleando Biolog EcoPlates™ (Garlan y Mills, 1991; Insam, 1997). Esta última técnica consiste en la medición de actividad de estos microorganismos en función de la degradación de 31 sustratos de C diferentes distribuidos por triplicado en microplacas de 96 pocillos. Estos sustratos se pueden clasificar en 6 grupos diferentes: (1) aminos-amidas, (2) aminoácidos, (3) carbohidratos, (4) ácidos carboxílicos, (5) miscelánea y (6) polímeros. La actividad se determina por colorimetría del sustrato que aumenta según se consume y, para ello, se mide la absorbancia a 590 y 750nm durante una semana cada 24h, mínimo. Mediante este análisis se pueden detectar cambios en el perfil metabólico de la comunidad de bacterias heterótrofas (más detalles explicados en el apartado 4.9.6 de Procedimientos Generales). Para ello, se analizó la absorbancia media de los grupos de sustratos y se calculó el desarrollo medio del color por pocillo (AWCD: *average well color development*), el número de sustratos utilizados (NUS: *number of substrates used*), así como el desarrollo del color medio del conjunto de pocillos durante el tiempo de incubación. También se analizaron las absorbancias máximas por grupos de sustratos y se ejecutó un análisis de componentes principales (PCA: *principal component analysis*) con los valores de absorbancia máxima de los 31 sustratos de cada muestra.

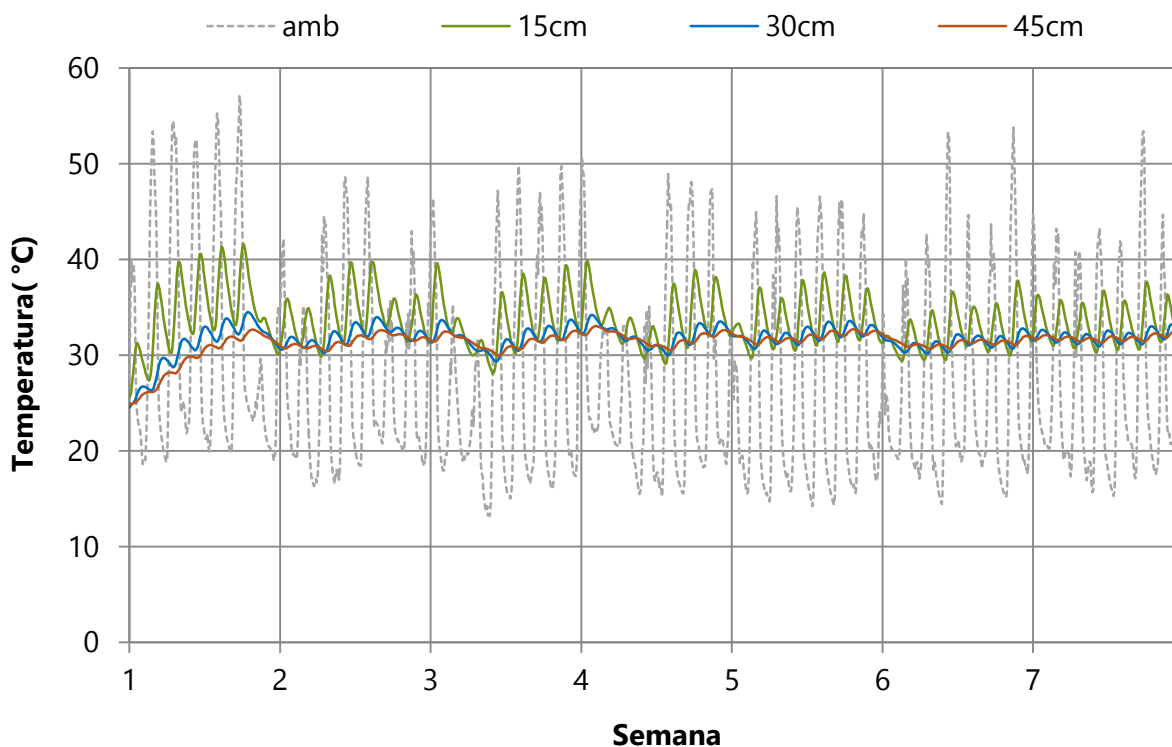
### Análisis de datos

Los resultados estadísticos de este capítulo se obtuvieron con el software RStudio. Para ello, se estudiaron los factores tiempo y tratamiento individualmente, así como la combinación de ambos. Para los datos univariantes se evaluó la normalidad de los residuos con el test Shapiro–Wilks y en el caso de los datos no paramétricos se aplicó el test de Kruskal-Wallis para el análisis de varianza junto con el post-hoc de Mann-Whitney ( $P = 0,05$ ). A las variables con distribución paramétrica se aplicó el análisis de la varianza ANOVA para cada factor individualmente y la combinación, complementado con el test Tukey-HSD. En todos los casos se ajustó el P-valor frente a una tasa general de error de tipo I ( $\alpha=0,05$ ). La combinación de tiempo y tratamiento se consideró factor fijo y cada réplica o parcela como factor aleatorio anidado en cada combinación. Las diferencias entre los niveles del factor resultante de la combinación de tiempo y tratamiento se representaron en los gráficos con letras minúsculas y las diferencias entre tiempos con letras mayúsculas. El grado de significación entre tratamientos a cada tiempo se señaló mediante el número de asteriscos, siendo “\*”  $P \leq 0,05$ , “\*\*”  $P \leq 0,01$  y “\*\*\*”  $P \leq 0,001$ .

Los resultados de las variables se representaron en gráfico de caja y bigotes que indican la distribución de datos por cuartiles. La caja se delimita según el valor de los cuartiles 1 ( $Q1=25\%$  de datos) y 3 ( $Q3=75\%$  de datos) e incluye dentro la mediana o cuartil 2 ( $Q2$ ). Los extremos de los bigotes se prolongan hasta 1,5 veces el rango intercuartílico ( $Q3-Q1$ ) para  $Q1$  y  $Q3$ . La nematofauna se representa mediante gráfico de barras con las abundancias relativas de las familias detectadas. En este caso, se realizó un análisis de la varianza multivariable con permutaciones (PERMANOVA) empleando matrices de distancia y disimilitudes (Bray-Curtis) para comparar las comunidades a cada tiempo y en cada tratamiento. Con este fin, se empleó la función ADONIS y su PERMANOVA. Además, se ejecutó un análisis de escalamiento dimensional no métrico (NMDS: *non-metric multidimensional scaling*) que permite la visualización de los datos, también, en función de las matrices de distancia. El nivel de agrupación se valora en función del valor de estrés (Kruskal y Wish, 1978) resultante, mejor cuanto más cercano a 0. Se dan por válido, sin riesgo de falsa inferencia, los valores de estrés  $<0,1$ , se deben tomar con cautela los valores cercanos 0.2 y descartar el análisis si sobrepasa 0,3 (Clark, 1993). Para los datos obtenidos mediante las placas Biolog Ecoplates™, además de analizarse AWCD, NUS, el desarrollo de actividad y las absorbancias máximas por grupos de sustrato, también se realizó un análisis de componentes principales (PCA: *principal component analysis*) tomando los valores máximos de absorbancia de los 31 sustratos para cada muestra. Además, para el análisis de las comunidades de nematodos y bacterias heterótrofas también se calcularon los índices de diversidad de Shannon y riqueza de Chao (Chao, 1984) y los respectivos análisis de la varianza. De esta forma se pudieron evaluar posibles variaciones en el número de especies (riqueza) y en su abundancia (diversidad).

### 5.3. Resultados y discusión

En este estudio, la combinación de EFV+BC+TC demostró efectividad contra *M. incognita* incluso un año después del tratamiento en una región de clima templado. Esto demostró que la limitación en radiación solar no fue impedimento para la obtención de buenos resultados, como ya probaron estudios precedentes con otros patosistemas (Núñez-Zofío et al., 2011; Ojinaga et al., 2020). Durante las siete semanas de tratamiento, se registró una temperatura máxima de 57,2°C dentro del invernadero, con más de una semana por encima de 50°C (Figura 5.2). En el suelo las temperaturas máximas alcanzadas a las diferentes profundidades fueron 41,6°C a 15cm, 34,5°C a 30cm y 33°C a 45cm (Tabla 5.2). A pesar de que la máxima registrada en la capa superior estuvo por debajo de las que se suelen alcanzar en regiones Mediterráneas (45-55°C), también en esas áreas se observan efectos positivos a temperaturas <42°C (Kaşkavalci, 2007; Núñez-Zofío et al., 2013).



**Figura 5.2** | Temperaturas medias medidas durante las siete semanas (01/08/2018 – 19/09/2018) de tratamiento en el invernadero (amb) y en los cuerpos tratados (3 y 4) a 15, 30 y 45cm de profundidad.

La radiación solar es crítica para alcanzar altas temperaturas pero este efecto queda limitado a las capas superiores del suelo (Katan, 2017). En la Figura 5.2 se puede ver este fenómeno en la primera semana de tratamiento (2-6 de agosto) cuando la temperatura ambiental fue más elevada. La temperatura en la capa superior aumentó con la ambiental mientras que en capas más profundas se mantuvo más estable. Así y todo, en estas últimas se acumularon suficientes horas a temperaturas subletales (30-35°C), más de 800h por encima de 31°C en ambas (Tabla 5.2). La exposición durante muchas horas (>200h) a temperaturas subletales debilita a los nematodos haciéndolos más sensibles a los biocidas



generados durante la biodesinfección e incluso a algunos organismos antagonistas (Oka, 2010). En la capa superior (15cm), se acumularon 16h entre 40-42°C y 336h por encima de 35°C, que fueron suficientes para reducir la población del patógeno y, con ello, el desarrollo de la enfermedad, como se verá en los apartados siguientes y demostraron algunos autores previamente en otras condiciones y patosistemas (Guerrero-Díaz et al., 2014; Wang y McSorley, 2008).

**Tabla 5.2** | Número de horas acumuladas a partir de 24°C durante la biodesinfección dentro del invernadero (amb) y en las parcela tratadas (BD) a 15, 30 y 45cm de profundidad. Se incluyen al final de la tabla la temperatura media, mínima y máxima para cada caso.

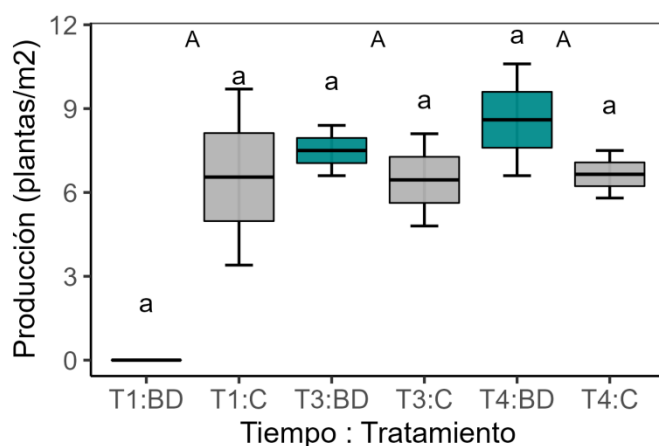
°C	amb	15cm	30cm	45cm
<b>24</b>	34	-	5	5
<b>25</b>	26	2	5	12
<b>26</b>	14	2	19	17
<b>27</b>	23	6	2	7
<b>28</b>	21	12	9	18
<b>29</b>	29	46	28	25
<b>30</b>	17	116	162	178
<b>31</b>	22	186	140	618
<b>32</b>	24	173	655	287
<b>33</b>	16	166	131	4
<b>34</b>	20	126	15	-
<b>35</b>	15	110	-	-
<b>36</b>	22	80	-	-
<b>37</b>	20	61	-	-
<b>38</b>	19	40	-	-
<b>39</b>	26	29	-	-
<b>40</b>	22	10	-	-
<b>41</b>	16	6	-	-
<b>42≥49</b>	128	-	-	-
<b>50≥57</b>	30	-	-	-
<b>media (°C)</b>	27.5	33.6	31.7	31.4
<b>min. (°C)</b>	13.2	25.5	24.5	24.8
<b>máx. (°C)</b>	57.2	41.6	34.5	33.0

**Tabla 5.3** | Caracterización fisicoquímica del suelo antes (T1) y después de la biodesinfección (T2), así como pasado un año (T4). Excepto T1, que es una mezcla de todos los cuerpos, para T2 y T4 se muestran valores de las parcelas tratadas (BD) y los controles (C). Valores sobre el peso seco del suelo (CE: conductividad eléctrica). Algunos valores expresados en complejo cambio (meq/100g) y extracto soluble (meq/L).

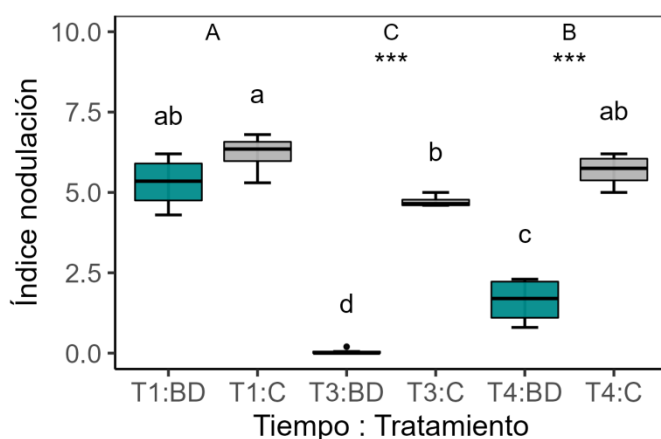
TIEMPO - TRATAMIENTO	T1	T2-C	T2-BD	T4-C	T4-BD
Arena (%)	40	49	32	20	25
Limo (%)	37	36	50	63	58
Arcilla (%)	23	15	18	17	17
Materia seca (%)	76.75	72.70	74.41	78.84	78.58
pH (1:5)	7.47	7.49	7.41	7.35	7.49
CE (dS/m)	0.74	0.57	2.43	0.81	1.04
Materia orgánica (%)	5.82	5.90	7.55	5.45	6.22
N total Kjeldahl (%)	0.32	0.31	0.37	0.31	0.35
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/kg)				46.82	30.54
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (meq/L)	0.07	0.05	0.44	0.67	0.85
C orgánico (%)	3.38	3.42	4.38	3.16	3.61
C/N	10.62	11.08	11.93	10.38	10.42
K (meq/100g)	0.85	0.98	1.79	0.43	0.60
K (meq/L)	0.44	0.19	2.51	0.20	0.36
Ca (meq/100g)	25.50	29.33	25.16	24.80	25.25
Ca (meq/L)	6.29	4.41	20.94	7.35	8.40
Mg (meq/100g)	3.14	3.03	3.12	2.50	2.83
Mg (meq/L)	1.70	1.02	4.85	1.32	1.72
Na (meq/100g)	0.16	0.17	0.23	0.08	0.16
Na (meq/L)	0.66	0.17	2.87	0.51	1.01
SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (meq/L)	5.29	3.76	18.24	4.10	5.45
P asimilable (mg/kg)	228.8	260	207.40	187	174.40
Fe asimilable (mg/kg)	62.66	58.08	249.92	65.78	159.62
Mn asimilable (mg/kg)	11.56	12.06	195.34	29.15	31.13
Cu asimilable (mg/kg)	8.76	8.12	14.18	8.52	9.96
Zn asimilable (mg/kg)	15.12	14.14	17.68	13.75	11.17
B asimilable (mg/kg)	1.22	1.12	1.34	0.98	1.03
Cd (mg/kg)	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
Pb (mg/kg)	20.24	17.32	14.63	25.28	22.26
Hg (mg/kg)	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
Ni (mg/kg)	14.31	12.33	10.92	15.76	16.19
Cr (mg/kg)	17.42	13.63	11.66	23.60	23.02

Además de la temperatura, los cambios en la composición microbiana pueden contribuir en gran medida a disminuir la población del patógeno. Estos cambios se producen por las condiciones ambientales generadas durante la biodesinfección (temperatura, humedad y anaerobiosis, principalmente) pero también por la incorporación de materia orgánica. Las características de las enmiendas aplicadas en estos tratamientos pueden determinar los cambios en la comunidad de microorganismos del suelo (López-Pérez y

Sánchez-Moreno, 2022). Una elección adecuada de subproductos orgánicos puede contribuir tanto en reducir la enfermedad como en mejorar la fertilidad del suelo. Estos cambios se pudieron comprobar en los análisis de las propiedades fisicoquímicas del suelo. Tras la biodesinfección, todas las variables químicas aumentaron en los suelos tratados excepto el pH, el Ca del complejo cambio, el P asimilable y los metales pesados tóxicos (Tabla 5.3). El incremento del resto de valores respondió a la incorporación de materia orgánica y a la mineralización de los nutrientes por la actividad microbiana bajo las condiciones de la biodesinfección. Señal de esta mineralización fue el mayor incremento de los nutrientes (K, Ca, Mg y Na) en el extracto soluble respecto al complejo cambio. Además, fueron llamativos los aumentos en la concentración de Fe y Mn en las parcelas tratadas que son indicativos de condiciones reductoras y, además, tienen efecto biocida, (Fernández-Bayo et al., 2018). Este ambiente reductor generado durante la biodesinfección vino dado por la ausencia de oxígeno, tanto por la saturación del suelo tras el riego como por el incremento de la actividad microbiana. Pasado un año, tras soportar cuatro ciclos de lechuga, la mayoría de valores decrecieron en las parcelas tratadas pero aún se mantuvieron más altos que las no tratadas.



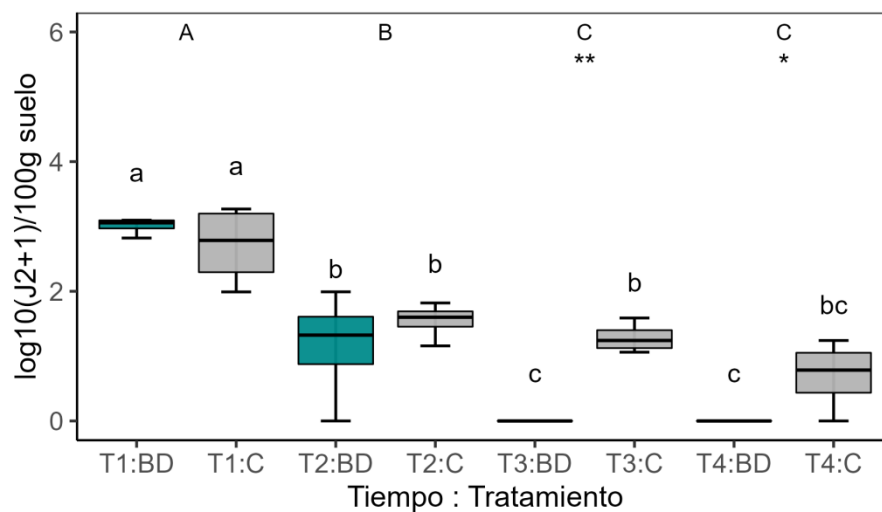
**Figura 5.3** | Datos de producción (plantas comerciales/m<sup>2</sup>) en los cuerpos tratados (BD) y controles (C) antes del tratamiento (T1), después de cosechar el primer cultivo tras el tratamiento (T3) y un año después de la biodesinfección (T4). Las letras minúsculas indican las diferencias entre las combinaciones de tiempo y tratamiento y las mayúsculas las diferencias entre tiempos.



**Figura 5.4** | Índice de nodulación en raíz (Bridge y Page, 1980) de plantas recogidas en las parcelas tratadas (BD) y controles (C) antes del tratamiento (T1), después de cosechar el primer cultivo tras el tratamiento (T3) y un año después de la biodesinfección (T4). Las letras minúsculas indican las diferencias entre las combinaciones de tiempo y tratamiento y las mayúsculas las diferencias entre tiempos. Los asteriscos representan el grado de significación entre tratamientos a cada tiempo ("\*\*\*"  $P \leq 0,001$ ).

El incremento en las variables de fertilidad, junto con la reducción de la población del patógeno, pudo contribuir al aumento de la producción en los cuerpos tratados. En éstos no se cosechó nada en el ciclo previo al ensayo pero tras la biodesinfección se recogió más

del 60% del cultivo (7,5 plantas/m<sup>2</sup>). A pesar de no observarse diferencias estadísticamente significativas, la producción en los cuerpos control se mantuvo estable en un valor cercano al 50% (6 plantas/m<sup>2</sup>) en todos los tiempos, mientras que en los tratados siguió aumentando incluso pasado un año, con un valor  $P=0,08$  respecto al muestreo inicial (Figura 5.3). De igual manera, el grado de nodulación de las raíces disminuyó drásticamente en las parcelas tratadas y se mantuvo con índices bajos un año después (<2,5). En estos casos, los análisis mostraron diferencias altamente significativas ( $P\leq 0,001$ ) entre tratamientos (Figura 5.4). Esta reducción de la enfermedad fue el resultado de la disminución de la población del patógeno en el suelo gracias a la biodesinfección.

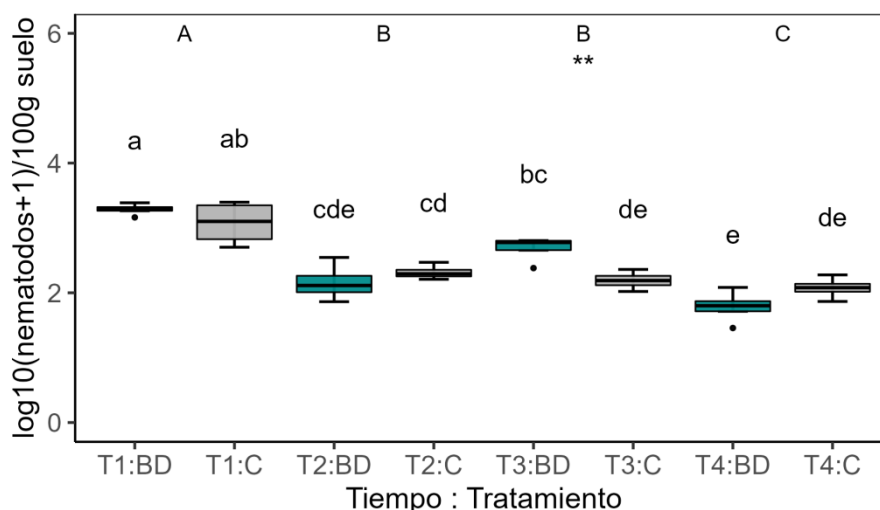


**Figura 5.5** | Cantidad de juveniles J2 de *M. incognita* (log10) dentro de la población de nematodos en las parcelas biodesinfectadas (BD) y controles no tratados (C) antes del tratamiento (T1), después del tratamiento (T2), una vez cosechado el primer cultivo tras el tratamiento (T3) y un año después de la biodesinfección (T4). Las letras minúsculas indican las diferencias entre las combinaciones de tiempo y tratamiento y las mayúsculas las diferencias entre tiempos. Los asteriscos representan el grado de significación entre tratamientos a cada tiempo ("\*"  $P\leq 0,05$ ; "\*\*\*"  $P\leq 0,01$ ).

Al estudiar la población de *M. incognita*, se observó una reducción significativa en los suelos tratados después del primer cultivo tras la biodesinfección ( $P\leq 0,01$ ) y un año después ( $P\leq 0,05$ ) respecto a los controles (Figura 5.5). En estos tiempos no se detectaron J2 de *M. incognita* en los suelos tratados pero sí se observó nodulación en las correspondientes muestras de raíz. De acuerdo a Tzortzakakis (2010), la nodulación y la presencia de *M. incognita* pueden no estar necesariamente correlacionadas. Algunos huevos pueden desprenderse de la raíz y permanecer latentes en las capas más profundas del suelo hasta eclosionar bajo condiciones favorables (Curtis et al., 2009). Esto podría explicar el comienzo de agallamiento en las lechugas cultivadas un año después en las parcelas tratadas, que presentaban valores muy bajos lo que permitió su correcto desarrollo también favorecido, probablemente, por la mejora de las condiciones de fertilidad del suelo.

El efecto de la biodesinfección en este patógeno pudo verse más claramente después del primer cultivo tras el tratamiento y un año después que justo al finalizar el tratamiento. Esto se debe a que los nematodos son organismos más complejos que

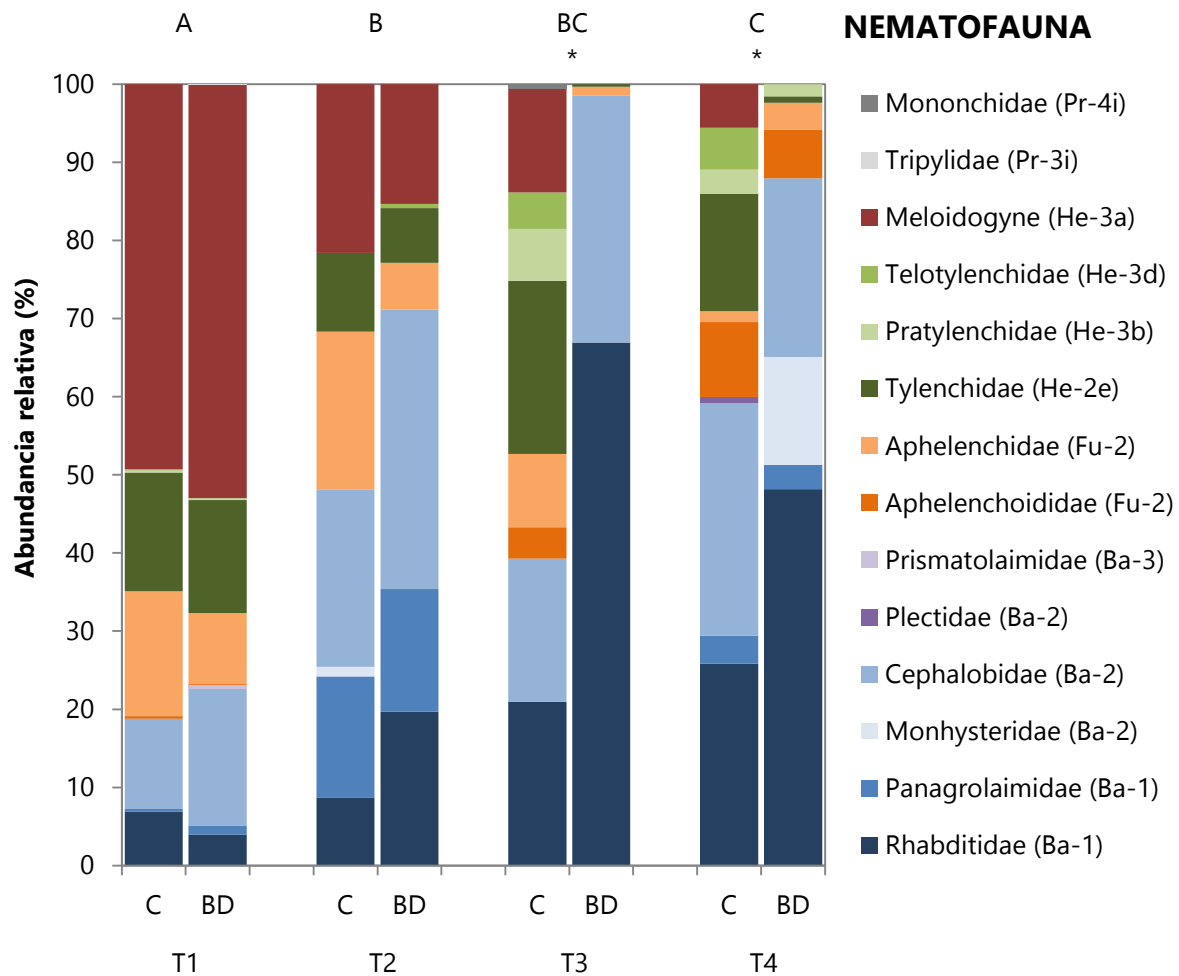
requieren más tiempo para recuperarse tras sufrir perturbaciones como el laboreo o la incorporación de materia orgánica. Una muestra de esto fue la disminución observada en la totalidad de la población en todas las parcelas (tratadas y controles) después del tratamiento y en los siguientes muestreos (Figura 5.6) que pudo deberse a los laboreos realizados entre los ciclos de cultivo. Así y todo, al igual que con la presencia de J2 de *M. incognita*, los cambios en la estructura de la nematofauna se detectaron a partir del primer cultivo tras el tratamiento y no al finalizar la biodesinfección.



**Figura 5.6** | Número de nematodos ( $\log_{10}$ ) en 100g de suelo (peso seco) en las parcelas biodesinfectadas (BD) y controles (C) antes del tratamiento (T1), después de tratamiento (T2), tras cosechar el primer cultivo después del tratamiento (T3) y pasado un año del tratamiento (T4). Las letras minúsculas indican las diferencias entre las combinaciones de tiempo y tratamiento y las mayúsculas las diferencias entre tiempos. Los asteriscos representan el grado de significación entre tratamientos a cada tiempo (\*\*  $P \leq 0,05$ ).

Al evaluar la composición de la nematofauna se pudo observar que antes del tratamiento los suelos presentaban una estructura muy similar. Los herbívoros predominaban (>60%) siendo el patógeno el de mayor presencia (cerca del 50%) (Figura 5.7). Mientras los fungívoros estuvieron representados en una proporción algo baja, pero habitual en suelos agrícolas, los bacteriófagos se encontraron en muy bajo porcentaje (<25%). Después de la biodesinfección, no se detectaron diferencias estadísticas entre tratamientos, pero sí respecto al inicio. En ambos casos los bacteriófagos aumentaron pero en mayor medida en los suelos tratados, en los que llegó a representar cerca del 70%. Por el contrario, la población de herbívoros disminuyó a un 20-30%, aun predominando *M. incognita* en ambos tratamientos. No fue hasta después del primer cultivo tras la biodesinfección cuando se vieron diferencias claras y significativas entre tratamientos, tendencia que se mantuvo hasta un año después. El principal cambio en esos tiempos fue la dominancia de bacteriófagos en detrimento de los herbívoros en las parcelas biodesinfectadas. Tras cosechar el primer cultivo en los cuerpos tratados, los bacteriófagos representaron >95% de la población aunque con reducción en la riqueza de este grupo, representado principalmente por Rhabditidae y Cephalobidae. Estas familias poseen mayor capacidad colonizadora y tasa de reproducción que otras del mismo grupo trófico (Bongers, 1990; Bongers y Bongers, 1998). Rhabditidae son grandes

oportunistas que crecen masivamente en condiciones de enriquecimiento y actividad bacteriana (Bongers, 1998) que se producen tras la incorporación de materia orgánica junto a las condiciones ambientales derivadas de la biodesinfección que pareció promover la proliferación de bacterias. Lo contrario sucedió con la población de fungívoros que sí disminuyó en el muestreo posterior a la cosecha del cultivo siguiente a la biodesinfección por ser más sensibles a las perturbaciones. Esto también sería indicativo de una merma en la población fúngica de la que son directamente dependientes como fuente de alimento, aunque pasado un año acabó recuperándose.

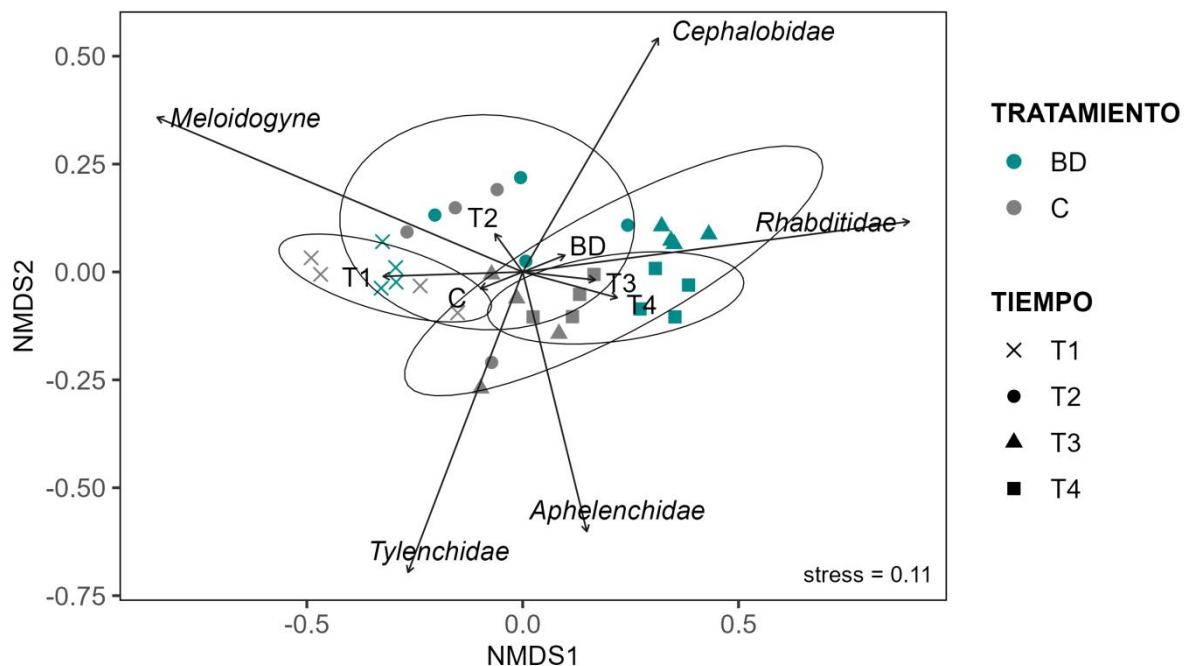


**Figura 5.7** | Valores medios de abundancia relativa (%) de familias de nematodos identificados en las muestras de suelo de las parcelas biodesinfectadas (BD) y controles (C) en los diferentes tiempos; antes del tratamiento (T1), finalizado el tratamiento (T2), después del cosechar el primer cultivo tras la biodesinfección (T3) y pasado un año del tratamiento (T4). En verdes los herbívoros (He), en naranjas los fungívoros (Fu) y en azules y morados los bacteriófagos (Ba). El patógeno, perteneciente al orden *Meloidogyne*, se diferencia en rojo intenso. Las letras mayúsculas indican diferencias de comunidades entre tiempos y los asteriscos las diferencias entre tratamientos en el mismo tiempo.

A pesar de que la biodesinfección alteró la estructura de la nematofauna en los suelos tratados, un año después se observó una recuperación pero sin presencia del patógeno y con baja representación de herbívoros (2,4%). La población de nematodos bacteriófagos se mantuvo alta (>85%) en los cuerpos tratados y, también, aumentó su diversidad al sumarse representantes de dos familias más (Panagrolaimidae y

Monhysteridae). La población de fungívoros se recuperó hasta componer cerca del 10% y estuvo conformada por dos familias en similares proporciones (Aphelenchoididae y Aphelenchidae). Por el contrario, en los suelos no tratados la abundancia de bacteriófagos fue menor (<60%) y la diversidad y abundancia de herbívoros mayor (29%), incluido el patógeno. En concordancia con estudios previos, los efectos de la biodesinfección en los nematodos fitopatógenos se prolongó en el tiempo gracias al favorecimiento de microorganismos antagonistas como los nematodos de otros grupos tróficos al ocupar el mismo nicho ecológico (Oka 2010; Ntalli et al., 2020). Además, también se podría concluir que la biodesinfección, a pesar de generar una fuerte perturbación inicialmente, contribuyó a una reestructuración favorable de la comunidad de nematodos en el largo plazo.

Estas diferencias en la nematofauna también se pudieron ver en el análisis NMDS (Figura 5.8) que mostró un valor de estrés bueno (muy cercano al 0,1) con una clara agrupación por tiempos (elipses). En este análisis, la población de un año después del tratamiento quedó directamente enfrentada en el eje NMDS1 a la del comienzo del ensayo, con una transición en forma de abanico en los tiempos intermedios. Considerando los tres muestreos una vez realizado el tratamiento (T2, T3 y T4), las parcelas biodesinfectadas se localizaron, en su mayoría, en los valores positivos de NMDS1 y en contraposición al centroide de las parcelas control. En esta gráfica se incluyen las familias con mayor significación en los resultados del análisis y que pertenecen a grupos tróficos diferentes indicando el efecto de la biodesinfección en el conjunto de la comunidad.



**Figura 5.8** | Análisis NMDS (*non-metric multidimensional scaling*) de las poblaciones de nematodos identificados en las muestras de suelo de las parcelas biodesinfectadas (BD) y controles no tratados (C) en los diferentes tiempos; antes del tratamiento (T1), finalizado el tratamiento (T2), después del cosechar el primer cultivo tras la biodesinfección (T3) y pasado un año del tratamiento (T4). Las elipses muestran las agrupaciones obtenidas en función del factor tiempo para un intervalo de confianza del 95%.



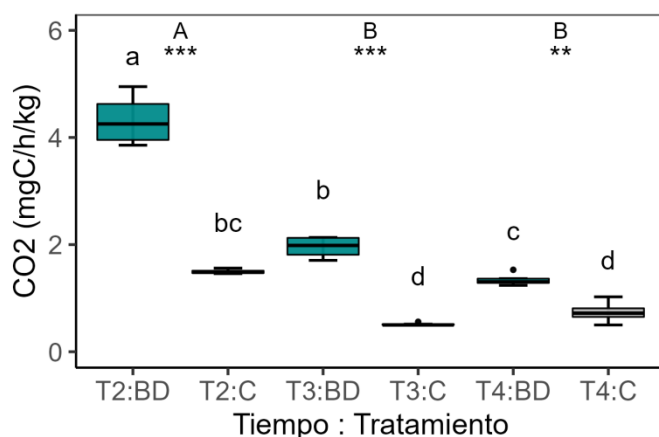
La alteración en la estructura de la nematofauna entre tiempos y tratamientos también se pudo evaluar a través de los índices de diversidad y riqueza. Éstos mostraron diferencias significativas entre tratamientos después del cultivo tras la biodesinfección, que se mantuvieron hasta un año después (Tabla 5.4). En estos dos momentos ambos valores fueron significativamente más bajos en los suelos tratados respecto a los controles. Así y todo, se observó una tendencia al aumento de diversidad y riqueza a largo plazo en los datos resultantes pasado un año. Es importante considerar para este análisis que los valores más altos de diversidad y riqueza en los suelos no tratados se debieron, seguramente, a la mayor población de herbívoros incluido el patógeno, en contraste con la baja presencia de éstos en las parcelas tratadas junto a la elevadísima presencia de bacteriófagos. Por tanto, en este caso, los valores más bajos en ambos índices no implicaría peor estructura para las condiciones en las que se está evaluando.

**Tabla 5.4** | Valores de diversidad (Shannon) y riqueza (Chao) de la nematofauna en las parcelas biodesinfectadas (BD) y en las parcelas control (C) antes del tratamiento (T1), después del tratamiento (T2), tras cosechar el primer cultivo después del tratamiento (T3) y un año después de la biodesinfección (T4). Las letras minúsculas indican las diferencias entre las combinaciones de tiempo y tratamiento y las mayúsculas las diferencias entre tiempos. Los asteriscos representan el grado de significación entre tratamientos a cada tiempo ("\*\*\*"  $P \leq 0,01$ ; "\*\*\*\*"  $P \leq 0,001$ ).

Tiempo	Tratamiento	DIVERSIDAD				RIQUEZA			
		media	ES			media	ES		
T1	C	1.4	0.2	b	AB	8.0	0.7	a	A
	BD	1.4	0.1	b		10.3	0.9	abc	
T2	C	1.6	0.1	b	AB	6.3	0.9	cd	B
	BD	1.4	0.2	ab		5.0	1.1	bcd	
T3	C	1.9	0.0	c	B	8.8	0.3	d	B
	BD	0.7	0.1	a		3.0	0.0	ab	
T4	C	2.0	0.1	b	A	9.5	0.5	cd	AB
	BD	1.3	0.1	a		5.3	0.8	ab	

Como se pudo comprobar en las variables de la nematofauna estudiadas, los efectos de la biodesinfección en esta población se vieron pasadas unas semanas. Esto se debió, en gran medida, a que muchos de los nematodos dependen de otros organismos menos complejos, como bacterias y hongos, que responden antes a los cambios. La disponibilidad de estas fuentes de alimento resulta determinante en la estructura de la nematofauna (Bongers, 1999; Treonis et al., 2010), al igual que la presencia o ausencia de plantas. Esto implica que la composición de esta comunidad puede dar indicios del estado de los niveles inferiores de la red trófica del suelo. El aumento de la población de bacteriófagos en los cuerpos biodesinfectados pareció ser consecuencia del incremento de la actividad bacteriana producida durante el tratamiento. Esto se comprobó con los elevados valores de tasa de respiración del suelo medidos en las parcelas tratadas después de la biodesinfección (Figura 5.9). Dado que la población de nematodos disminuyó en los cuerpos tratados respecto a los

controles, los altos valores de respiración se atribuyeron, principalmente, a la actividad bacteriana por ser la población más favorecida con la incorporación de materia orgánica como fue el caso. La respiración del suelo se mantuvo significativamente más alta en los suelos tratados en todos los tiempos medidos, siendo especialmente elevada al finalizar el tratamiento. La obtención de valores de respiración significativamente más altos en todos los tiempos medidos implicaría que la biodesinfección tuvo un efecto favorable en la microbiología del suelo a largo plazo que contribuyó a amortiguar el impacto derivado del manejo.

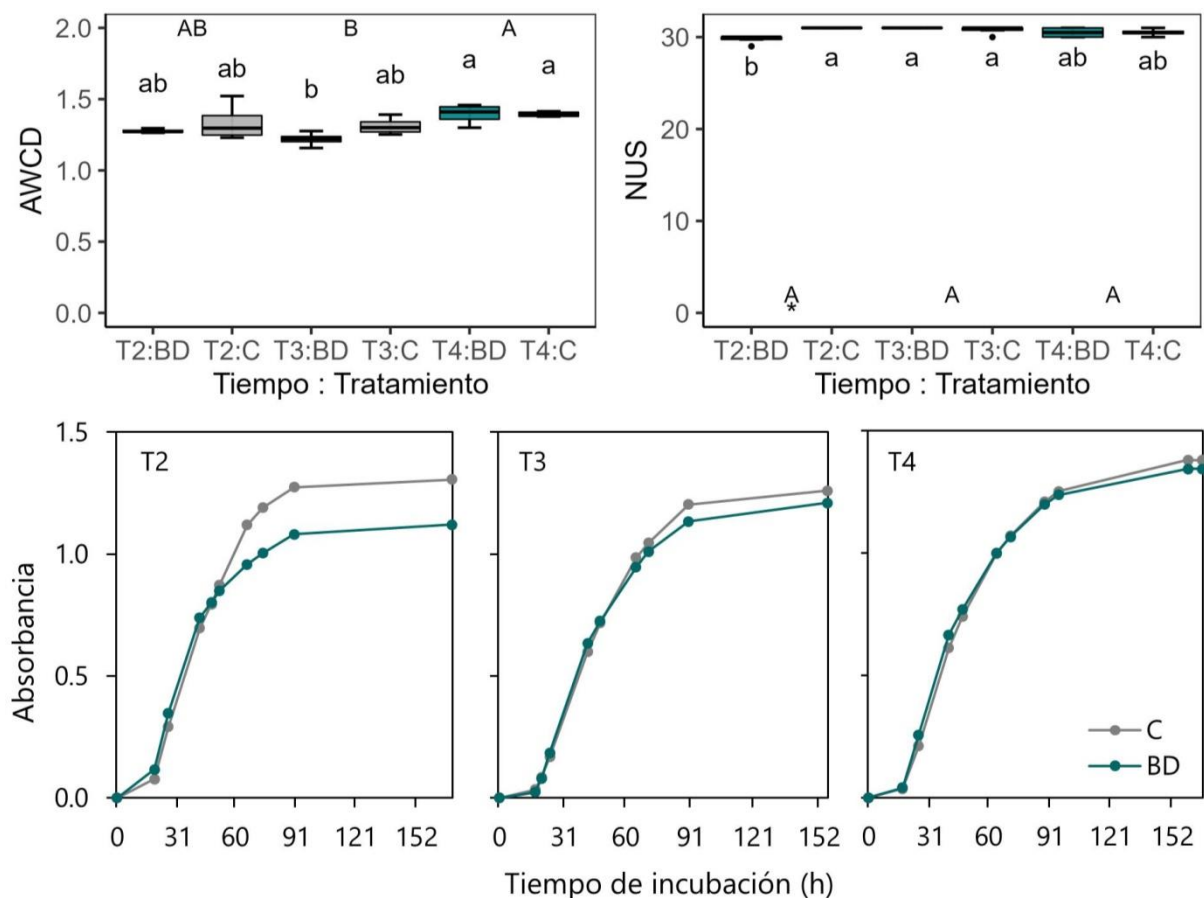


**Figura 5.9** | Valores de la tasa de respiración del suelo en los suelos tratados (BD) y en los controles (C) después del tratamiento (T2), después de cosechar el primer cultivo tras el tratamiento (T3) y pasado un año (T4). Las letras minúsculas indican las diferencias entre las combinaciones de tiempo y tratamiento y las mayúsculas las diferencias entre tiempos. Los asteriscos representan el grado de significación entre tratamientos a cada tiempo ("\*\*\*"  $P \leq 0,01$ ; "\*\*\*\*"  $P \leq 0,001$ ).

Los cambios en la composición bacteriana se estudiaron mediante el análisis de la actividad metabólica de la comunidad de bacterias heterótrofas clasificadas por perfil fisiológico empleando placas Biolog EcoPlates™. Al contrario de lo que sucedió con la respiración, la media del desarrollo del color por consumo de sustrato (AWCD) fue algo más baja en las parcelas tratadas especialmente después del cultivo, aunque pasado un año este valor aumentó igualándose al control (Figura 5.10). Así mismo, se observó que el número de sustratos utilizados (NUS) al finalizar el tratamiento fue significativamente más bajo en los tratados respecto a los controles pero volvieron a recuperarse después del cultivo manteniéndose hasta el año siguiente. Sin embargo, al analizar la velocidad de consumo de los sustratos durante el periodo de incubación se pudo observar cómo en los suelos tratados la actividad comenzó un poco antes que en los controles (Figura 5.10). Una vez cosechado el cultivo, la actividad de consumo de sustratos fue similar en los tratamientos y más aún pasado un año. La interpretación del conjunto de datos indicaría que, en un primer momento, parte de la población se vio afectada por la biodesinfección mientras que otra se vio muy favorecida aumentando su actividad pero en poco tiempo se reestableció la actividad y la diversidad de poblaciones.

Esta idea estuvo, en parte, respaldada por los resultados de diversidad y riqueza calculados. Aunque no se observaron diferencias significativas en los valores de riqueza, sí se observó una disminución significativa en la diversidad de los suelos tratados al finalizar la biodesinfección (Tabla 5.5). Este valor se recuperó una vez cosechado el primer cultivo tras el tratamiento y se mantuvo estable hasta pasado un año. En estudios previos se demostró que algunos organismos antagonistas como *Trichoderma*, *Bacillus* y *Pseudomonas* spp.

incrementaron sus poblaciones tras los tratamientos de biodesinfección, en algunos casos, generando suelos supresivos (Moosavi et al., 2020; Roskopf et al., 2020; Stapleton, 2000). Es más, las especies de *Bacillus* tienen la capacidad de formar endosporas que les permiten sobrevivir largos periodos de tiempo en condiciones desfavorables (Haghighi et al., 2011) como las que se dan durante la biodesinfección. Además, también se relaciona la actividad de estos organismos con el aumento en la disponibilidad de determinados nutrientes como Ca, Mg, K, Cu, Zn y Mn (Sooriyaarachchi et al., 2021). A pesar de no disponer de datos metagenómicos para conocer el efecto del tratamiento en la población bacteriana completa, las placas Biolog EcoPlates™ permitieron conocer el efecto sobre las bacterias heterótrofas en función de su actividad medida por el consumo de sustratos específicos.



**Figura 5.10** | Resultados de placas Biolog EcoPlates™. Arriba, desarrollo medio del color de los pocillos (AWCD) por absorbancia y número de sustratos usados (NUS). Debajo, desarrollo de absorbancia media del conjunto de sustratos durante el tiempo de incubación. Valores medidos en los suelos de las parcelas tratadas (BD) y controles (C) al finalizar la biodesinfección (T2), después del siguiente cultivo al tratamiento (T3) y pasado un año (T4). Las letras minúsculas indican las diferencias entre las combinaciones de tiempo y tratamiento y las mayúsculas las diferencias entre tiempos. Los asteriscos representan el grado de significación entre tratamientos a cada tiempo ("\*"  $P \leq 0,05$ ).

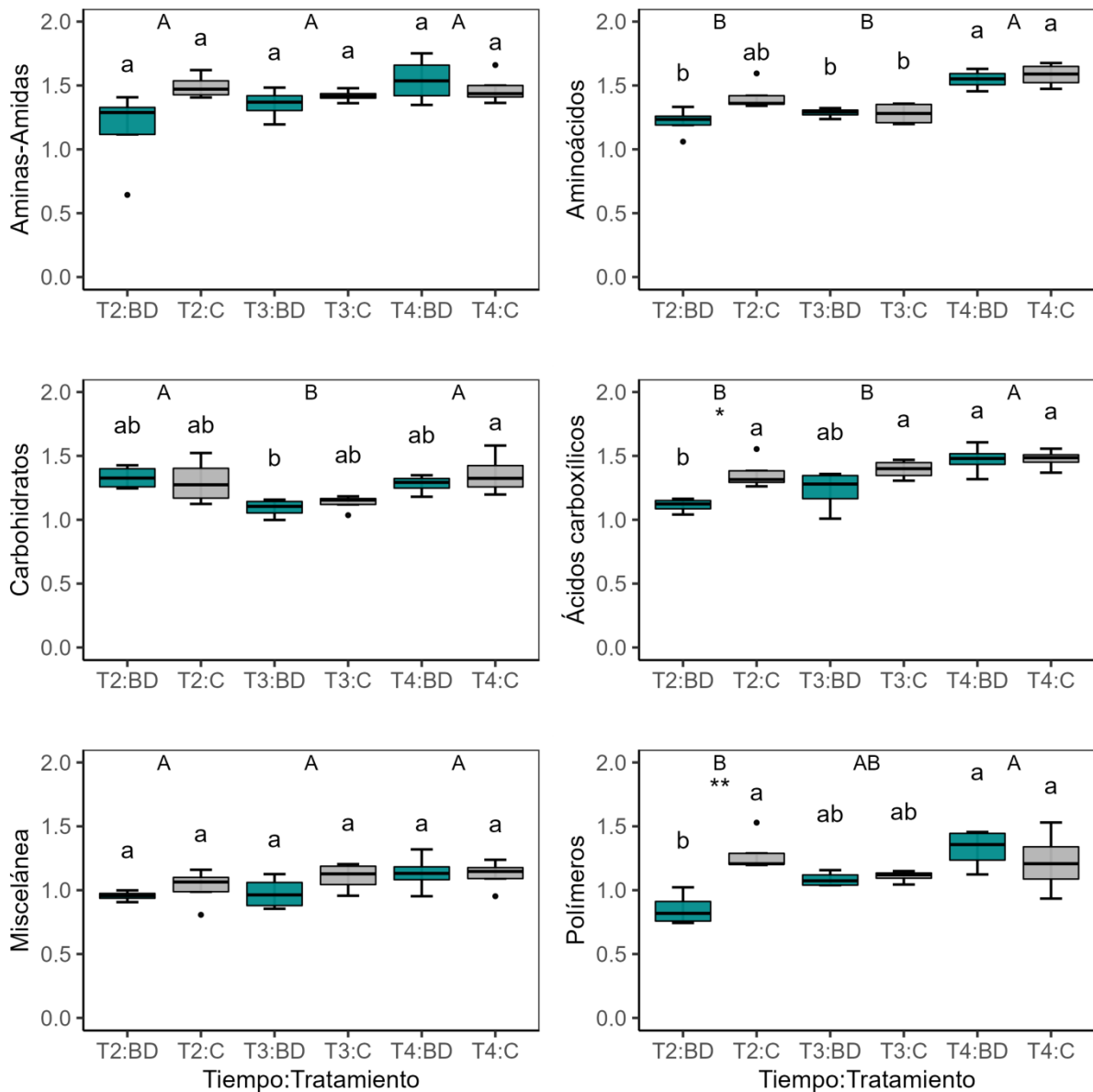
A través de los valores de absorbancia por grupos de sustratos, se pudo observar que las poblaciones de bacterias que más se vieron afectadas fueron las consumidoras de ácidos carboxílicos y polímeros. En ambos casos, después del tratamiento, las absorbancias fueron significativamente menores en los suelos tratados respecto a los controles (Figura

5.11). En el resto de los grupos también se observó una disminución en estos valores en los suelos tratados, salvo en el caso de los carbohidratos. Parece que las consumidoras de carbohidratos fueron las que mejor toleraron o se beneficiaron de las condiciones de biodesinfección respecto al resto. Esto pudo deberse a las características de la materia orgánica aportada que contenía gran proporción de este tipo de moléculas en diferentes formas como celulosa y hemicelulosa. Estas fuentes de C junto con el N incluido en la mezcla de enmiendas, y bajo las condiciones de biodesinfección, pudieron favorecer y acelerar la actividad y proliferación de este grupo de bacterias. Pasado un año, los valores en los cuerpos tratados se reestablecieron siendo similares a los controles, incluso algo mayores en el caso de las consumidoras de aminos-amidas y las de polímeros.

**Tabla 5.5** | Índices de diversidad (Shannon) y riqueza (Chao) en función de los valores máximos de absorbancia obtenidos en cada sustrato de las placas Biolog EcoPlates™. Valores de los suelos de las parcelas tratadas (BD) y controles (C) después de la biodesinfección (T2), después del primer cultivo tras el tratamiento (T3) y un año después de la biodesinfección (T4). Las letras minúsculas indican las diferencias entre las combinaciones de tiempo y tratamiento y las mayúsculas las diferencias entre tiempos. Los asteriscos representan el grado de significación entre tratamientos a cada tiempo ("\*\*\*"  $P \leq 0,001$ ).

Tiempo	Tratamiento	DIVERSIDAD					RIQUEZA			
		media	EE				media	EE		
T2	C	3.4	0.0	b			31.0	0.0	a	
	BD	3.3	0.0	a	***	B	31.0	0.0	a	A
T3	C	3.4	0.0	a		A	31.0	0.0	a	A
	BD	3.4	0.0	a			30.8	0.3	a	
T4	C	3.4	0.0	a		A	31.0	0.0	a	A
	BD	3.4	0.0	a			30.8	0.3	a	

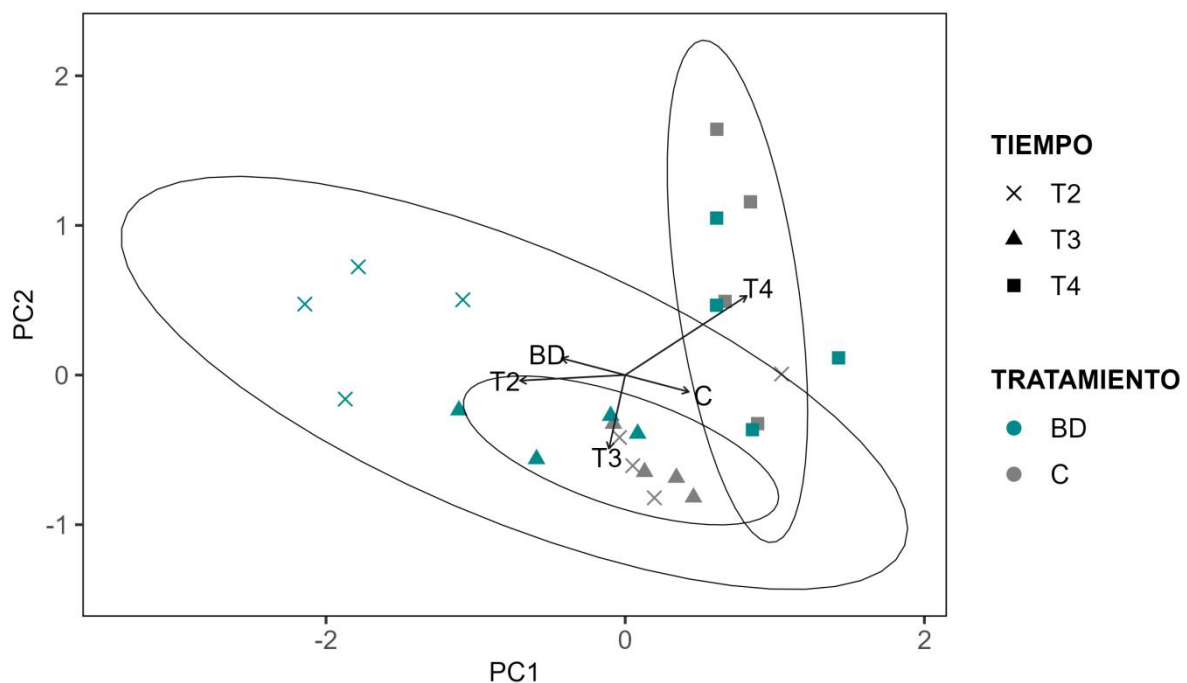
Este efecto en la recuperación de la diversidad de este grupo de bacterias se observó en el PCA realizado con los datos de absorbancia de los 31 sustratos presentes en las placas (Figura 5.12). En este análisis se pudo comprobar la diferencia entre los primeros muestreos tras la biodesinfección y un año después, así como una clara agrupación por tiempos. Tanto a la finalización del tratamiento, como tras cosechar el primer cultivo, las muestras de las parcelas tratadas se localizaron desplazadas hacia los valores negativos del primer componente principal (PC1), pudiendo ser este el grado de consumo de los diferentes sustratos. Esto se entiende porque, de igual manera, las muestras de los controles se mantuvieron en todos los tiempos en los valores positivos de este eje y las muestras de las tratadas de un año después también. Pasado un año, todas las muestras se localizan más agrupadas en los valores positivos del eje PC1 pero, en este caso la variación en la distribución se da en el eje del segundo componente (PC2), probablemente, relacionado, con la variabilidad entre parcelas.



**Figura 5.11** | Absorbancia media por grupo de sustratos de Biolog EcoPlates™ de las parcelas tratadas (BD) y controles (C) después del tratamiento (T2), después de cosechar el primer cultivo tras el tratamiento (T3) y un año después de la biodesinfección (T4). Las letras minúsculas indican las diferencias entre las combinaciones de tiempo y tratamiento y las mayúsculas las diferencias entre tiempos. Los asteriscos representan el grado de significación entre tratamientos a cada tiempo ("\*"  $P \leq 0,05$ ; "\*\*\*"  $P \leq 0,01$ ).

El estudio de parte de la población de bacterias heterótrofas junto con la nematofauna y la respiración del suelo permitió entender mejor los procesos de la biodesinfección a temperaturas subletales. Además, los resultados fisicoquímicos obtenidos ayudaron a completar la interpretación a pesar de la ausencia de análisis estadísticos por la falta de réplicas. Todos estos factores dependen en gran medida de las características de la mezcla de enmiendas aplicadas en estos tratamientos. La combinación de enmiendas orgánicas juega un papel crucial y requiere profundizar en ello para el diseño de mezclas apropiadas. El estiércol fresco ha sido la enmienda empleada tradicionalmente por su demostrada eficacia (Roskopf et al., 2020) pero, en este caso, el objetivo era mejorar los

resultados y reducir parte de la cantidad de estiércol añadiendo subproductos con determinadas características. En otros estudios, la TC demostró reducir patógenos de suelo en tratamientos de biodesinfección a pesar de la ausencia de glucosinolatos (Mazzola et al., 2001). Su efecto se atribuye al elevado contenido en N que puede transformarse en amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) por la actividad microbiana (Oka, 2010). Por otro lado, la incorporación de BC como fuente lábil de carbono pudo promover la degradación de la materia orgánica y, con ello, la liberación de AGVs con efecto biocida (ácido acético, butírico, fórmico y propiónico, entre otros). Es más, algunos de estos ácidos débiles contribuyen a la liberación del K adsorbido y de otros nutrientes (Oka, 2010) como se pudo observar en los resultados fisicoquímicos del suelo. Además, es de destacar el aumento de Fe y Mn después del tratamiento, que también tienen efecto biocida y son indicativos de condiciones reductoras o anaerobias generadas durante la biodesinfección (Fernández-Bayo et al., 2018).



**Figura 5.12** | Resultados del análisis de componentes principales (PCA: *principal component analysis*) considerando los datos de absorbancias máximas de los 31 sustratos de las placas Biolog EcoPlates™ de las muestras de los suelos tratados (BD) y controles (C) después del tratamiento (T2), después de cosechar el primer cultivo tras el tratamiento (T3) y un año después de la biodesinfección (T4). Los puntos representan cada muestra y las elipses muestran las agrupaciones obtenidas en función del factor tiempo para un intervalo de confianza del 95%.

De entre todos los procesos, tanto fisicoquímicos como biológicos, no existe consenso sobre cuál es el principal promotor en la reducción del patógeno y se valora más el efecto del conjunto. En este caso, se consideró que el patógeno estuvo expuesto suficientes horas a temperaturas subletales que le hicieron vulnerable a los biocidas liberados durante la degradación de la materia orgánica aportada ( $\text{NH}_4^+$ , AGVs, Fe y Mn), como se contempló previamente en estudios similares (Mazzola et al., 2001; Cohen et al., 2005; Mocali et al., 2015). Además, parece que las temperaturas subletales junto con las enmiendas orgánicas



seleccionadas propiciaron la colonización de organismos antagonistas. Por ello, se podría concluir que el efecto antagonista juega un papel crucial en los resultados a largo plazo al generar suelos supresivos e, incluso, favorecer el desarrollo del cultivo. De hecho, estos resultados también podrían haber explicado el aumento en la productividad, e incluso la cosecha adelantada del primer cultivo, después de la biodesinfección en los suelos tratados como consecuencia de la disponibilidad de nutrientes por el aumento de actividad microbiana, junto con la disminución de la población del patógeno.



**Figura 5.13** | Imagen del invernadero en el que se ejecutó el ensayo con el cultivo de lechuga un año después del tratamiento. A la izquierda, el cuerpo 1 sin tratar (control), con desarrollo irregular por el ataque de *Meloidogyne incognita*. A la derecha, el cuerpo 3, biodesinfectado, con plantas bien desarrolladas y sin incidencia de enfermedad.

En resumen, la aplicación de los subproductos agroindustriales seleccionados en combinación con el estiércol fresco demostró efectos supresivos contra el patógeno y contribuyó a restaurar el equilibrio en la red trófica del suelo. La evaluación de la estructura de la nematofauna aportó información relevante del estado de la comunidad trófica, por lo que ayudó a entender mejor los efectos de la biodesinfección en la salud del suelo. En cuanto a las variables de actividad microbiológica, la respiración del suelo se confirmó como una medida sensible, sencilla, asequible y práctica. Los resultados obtenidos con las placas Biolog EcoPlates™ resultaron útiles al ser valores de actividad y no sólo de presencia. Así y todo, la implementación de análisis metagenómicos contribuiría a una mejor interpretación del efecto de la biodesinfección en las comunidades microbianas del suelo tan determinantes en los resultados de estas prácticas.

En conclusión, este ensayo prueba la efectividad de la biodesinfección con determinados subproductos agroindustriales en áreas geográficas con baja radiación solar. Esto sugiere que las temperaturas elevadas (>42°) no son imprescindibles para conseguir efectos positivos en estos tratamientos. Es más, puede que mantener temperaturas subletales contribuya en la mejor colonización por los organismos antagonistas. En algunos casos, estos



tratamientos aplicados en áreas muy cálidas puede alcanzar temperaturas cercanas a la pasteurización (>50°C) con el consecuente daño a poblaciones beneficiosas. Por tanto, acumular suficientes horas a temperaturas subletales puede ser suficiente, y favorable, para promover procesos de biodesinfección con efecto a corto y largo plazo. Además, el aporte de materia orgánica que incluye junto con las condiciones generadas durante el tratamiento puede estimular la actividad microbiana y, con ello, la dinámica de nutrientes en beneficio del cultivo. El estudio del efecto de temperatura subletales y de diferentes mezclas de enmiendas en la microflora indígena resulta imprescindible para entender los procesos de supresividad del suelo en este tipo de tratamientos.





# CAPÍTULO 6



Aplicación de diferentes mezclas de subproductos agroindustriales para biodesinfección de suelos contra *Meloidogyne incognita* en cultivo de lechuga bajo invernadero





## 6. Aplicación de diferentes mezclas de subproductos agroindustriales para biodesinfección de suelos contra *M. incognita* en cultivo de lechuga bajo invernadero

---

Estudio publicado en la revista *FRONTIERS In Sustainable Food Systems* en 2022:

Gandariasbeitia, M., López-Pérez, J. A., Juaristi, B. and Larregla, S. (2022). Sunflower Seed Husk as Promising By-Product for Soil Biodisinfestation Treatments and Fertility Improvement in Protected Lettuce Crop. *Front. Sust. Food Syst.* 6:901654. Doi: 10.3389/fsufs.2022.901654

En este capítulo se amplía la información aportada en dicho artículo al presentarse datos y análisis no incluidos en la publicación.

### 6.1. Introducción

En las últimas décadas muchos productos fitosanitarios han sido prohibidos o tienen un uso restringido por razones de salud humana y ambiental. Al mismo tiempo, los agricultores tienen que lidiar con el desarrollo de resistencia por parte de los patógenos a un amplio espectro de estos productos. De hecho, esta situación fue la que impulsó a muchos agricultores a probar nuevas prácticas, siendo la biodesinfección una de las más aceptadas. Esta técnica ha demostrado ser eficaz en la lucha contra patógenos de suelo, además de mejorar las propiedades edáficas (Klein et al., 2012; Mocali et al., 2015). Incluso, en regiones de clima cálido ha sido incorporada al manejo de cultivos intensivos por su alta eficacia gracias al efecto térmico generado por las altas temperaturas que se alcanzan en estas áreas geográficas (Katan y Gamliel, 2014).

A pesar de que estos tratamientos se realizan en climas cálidos y durante los meses más calurosos, la desinfección anaerobia (ASD: *anaerobic soil disinfestation*), otro enfoque de biodesinfección, trata de compensar la falta de temperaturas elevadas con condiciones anaerobias y con el aumento de la actividad microbiana (Blok et al., 2000; Momma et al., 2013). Las condiciones anaerobias o reductoras en el suelo se consiguen mediante su saturación con riego abundante antes de la colocación de la cubierta plástica. Además, una elevada actividad microbiana puede contribuir en generar estas condiciones y está fuertemente influenciada por la cantidad y las características de la enmienda orgánica incorporada. La concentración de C y N y su ratio en la mezcla final juegan un papel importante en la eficacia del tratamiento (Shrestha et al., 2021a; Testen et al. 2021). Además, el tipo de fuente de C seleccionado también puede condicionar los procesos dados durante

la biodesinfección. Las fuentes de C lábil, de estructura molecular sencilla, son fácilmente degradables por la acción microbiana, mientras que las poco lábiles o recalcitrantes requieren más tiempo para ser descompuestas (Liu et al., 2016). Por ello, en áreas con radiación solar limitada, como la de este estudio, la selección de enmiendas apropiadas resulta clave para mejorar los procesos microbiológicos del tratamiento y suplir así la falta de efecto térmico. Eso sí, la selección de enmiendas supone todo un reto dado que son muchos los materiales susceptibles de ser empleados. Los subproductos agroindustriales son una alternativa muy interesante al resultar productos accesibles y promover la economía circular. Además, muchos de estos subproductos han demostrado ser eficaces en tratamientos de biodesinfección contra diferentes patógenos (Guerrero-Díaz et al., 2014; Testen et al., 2021), pero para ello es importante conocer las características de estos productos para valorar su capacidad como biodesinfectante o mejorador de suelos.

La cáscara de pipa de girasol puede contener cerca de un 48% de celulosa y 17% de lignina (Shaukat et al., 2021), que pueden ser fuentes de C interesantes para estos tratamientos. Además, el girasol (*Helianthus annuus*) es uno de los cultivos comestibles más importantes y con amplia distribución geográfica debido a su adaptabilidad. Actualmente, este cultivo está presente en seis continentes con una producción anual de 50 millones de toneladas, de las cuales cerca de la mitad se producen en países Europeos (Perea-Moreno et al., 2018; FAO, 2021). Considerando que la cáscara de la pipa constituye entre un 30-50% de la semilla y que se descarta, cada año se generan millones de toneladas de este material de desecho. Esta biomasa se emplea, principalmente, en piensos para el ganado pero se están evaluando nuevos usos debido a su alto contenido energético (Perea-Moreno et al., 2018; Shaukat et al., 2021). Sin embargo, todas las referencias en el sector agrícola están relacionadas con su uso como pienso (Robertiello et al., 1984; Osman et al., 2018) y no se encontró nada relativo a su empleo como enmienda orgánica. Según las características de la enmienda incorporada, las comunidades de microorganismos capaces de degradarlo se verán favorecidas. Las poblaciones degradadoras de lignina pueden inducir efectos antagonistas que ejercen presión en la población del patógeno, incluyendo *Meloidogyne* spp. (Simmons et al., 2016; Fernández-Bayo et al., 2019; Shea et al., 2022).

El nematodo agallador *Meloidogyne incognita* Chitwood (1949) es una de las especies más dañinas, ampliamente distribuida y con elevado número de cultivos hospedantes (Avato et al., 2013; Jones et al., 2013). El agallamiento o nodulación de la raíz es el principal síntoma producido por este patógeno en la planta. Las formas juveniles (J2) presentes en el suelo penetran en la raíz para acabar su desarrollo madurando a hembra adulta y durante su proceso de alimentación se induce la formación de nódulos en la raíz y se realiza la puesta de huevos expuestos al exterior. En función del grado de nodulación, el desarrollo del sistema radicular y la capacidad para la toma de nutrientes puede verse reducida con las consecuentes pérdidas en la producción (Bridge y Page, 1980; Jones et al., 2013).

Los nematodos del suelo son uno de los metazoos más abundantes y solo unas pocas especies generan daños en los cultivos. La mayoría son especies de vida libre con

diferentes grupos tróficos que ocupan posiciones clave abarcando diferentes niveles en la red trófica del suelo (Bongers, 1990; Bongers y Ferris, 1999). Por ello, el estudio de la comunidad de nematodos o nematofauna es un buen indicador de cambios en la estructura microbiana del suelo (Bongers y Ferris, 1999; Cesarz et al., 2015) y puede ser implementada en la evaluación de estos estudios (Ney et al., 2019; Gandariasbeitia et al., 2021; Shea et al., 2022). La biodesinfección genera una perturbación transitoria en toda la comunidad del suelo que tiende a recuperarse después del tratamiento y el tipo de enmienda juega un papel determinante al favorecer ciertas poblaciones y mecanismos que pueden afectar a los resultados (Liu et al. 2016; Fernández-Bayo et al., 2019). De hecho, algunos de estos mecanismos pueden suplir la falta de efecto térmico en áreas geográficas con poca radiación solar. Por ello, el estudio de variables microbiológicas junto con las fisicoquímicas del suelo puede ayudar en la mejor interpretación de los procesos de biodesinfección y los cambios en las variables de fertilidad, importante a tener en cuenta en los suelos agrícolas.

Este ensayo se llevó a cabo en la misma explotación del capítulo anterior, ubicada en una región húmeda con baja radiación solar. Tras 20 años de monocultivo intensivo de lechuga producida de manera convencional, el patógeno generó resistencia a los plaguicidas lo que supuso pérdidas de producción considerables. La biodesinfección se aplicó en el mismo invernadero multicapilla del capítulo anterior pero en los cuerpos que quedaron sin tratar. En este ensayo se comparó la mezcla de enmiendas empleada el año anterior (estiércol fresco vacuno + bagazo de cerveza + torta de colza) con otras tres mezclas diferentes. Las nuevas mezclas contenían estiércol fresco y cáscara de pipa de girasol en diferentes proporciones y acompañados o no, según la mezcla, de los otros dos subproductos seleccionados (torta de colza y bagazo de cerveza). En este caso, también se incluyó como subproducto el salvado de trigo por ser una de las enmiendas orgánicas más empleadas en ASD. El salvado es una fuente lábil de C que promueve la actividad microbiana que en la biodesinfección contribuye a generar condiciones reductoras o anaeróbicas. Todas las mezclas o tratamientos presentaban contenido similar de C pero diferentes concentraciones de N, por tanto, diferían en el ratio C/N.

El objetivo de este ensayo fue evaluar el efecto de la cáscara de pipa de girasol como enmienda para tratamientos de biodesinfección y los diferentes ratios C/N junto con el efecto fertilizante de cada mezcla. Para ello, se estudió el desarrollo de la enfermedad y el efecto en la población del patógeno. Además, se evaluaron cambios en las poblaciones de bacterias, hongos y nematodos junto con algunas variables relacionadas con la actividad microbiana y los valores fisicoquímicos del suelo. La evaluación se realizó en tres momentos diferentes, antes del tratamiento, después del tratamiento y una vez cosechado el primer cultivo tras el tratamiento.



## 6.2. Materiales y métodos

### Ubicación del ensayo y diseño experimental

Este ensayo se realizó en la misma explotación que el capítulo anterior (Capítulo 5) y en el mismo invernadero multicapilla de seis cuerpos. Ante los resultados positivos obtenidos contra *M. incognita* en el anterior ensayo, el agricultor decidió tratar al año siguiente (2019) los suelos de los cuatro cuerpos que quedaron sin biodesinfectar (cuerpos 1, 2, 5 y 6). Todos los cuerpos del invernadero habían soportado el mismo manejo de 4-5 ciclos de lechuga al año, en convencional, desde 1995 hasta la biodesinfección en 2018 (Capítulo 5). La localización y las características del suelo, junto con detalles sobre los antecedentes y el manejo, viene descrito en el Capítulo 4 de Procedimientos Generales (apartado 4.1.1).

**Tabla 6.1** | Caracterización físico-química de las enmiendas aplicadas: estiércol fresco vacuno (EFV), torta de colza (TC), bagazo de cerveza (BC), salvado de trigo (ST) y cáscara de pipa de girasol (CPG). Valores expresados sobre el peso seco.

ENMIENDAS	EFV	TC	BC	ST	CPG
Materia seca (%)	15.21	93.8	25.81	90.08	91.06
pH	8.05	5.35	3.85	6.48	5.99
CE (mS/cm)	5.2	3.13	2.12	2.48	2.34
Materia orgánica (%)	75.47	93.94	96.32	95.41	90.78
C orgánico (%)	43.78	54.49	55.87	55.47	52.76
N total Kjeldahl (%)	1.55	3.77	3.1	2.37	0.87
C/N	28	14	18	23	61
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (%)	0.73	1.99	1.13	0.92	0.19
K <sub>2</sub> O (%)	1.76	1.25	0.1	1.35	1.06
SO <sub>3</sub> (%)	0.49	0.36	<0.01	0.13	0.17
CaO (%)	1.79	1.59	0.46	0.21	0.54
MgO (%)	0.35	0.49	0.32	0.54	0.32
Na (%)	0.11	0.02	<0.01	0.01	<0.01
Fe (mg/kg)	0.04	0.04	0.02	0.01	0.01
Mn (mg/kg)	120.88	43.99	27.71	91.31	13.41
Cu (mg/kg)	15.31	11.37	7.92	11.91	9.93
Zn (mg/kg)	72.85	46.96	65.8	67.98	11.92
B (ppm)	15.8	28.91	1.12	2.87	16.72
Cd (mg/kg)	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
Pb (mg/kg)	1.14	<1	<1	<1	<1
Hg (mg/kg)	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4
Cr (mg/kg)	6.68	0.45	2	0.3	2.13
Ni (mg/kg)	3.89	0.38	0.94	0.72	1.79

Los subproductos seleccionados en esta ocasión fueron: bagazo de cerveza, torta de colza (*Brassica napus*), salvado de trigo (*Triticum aestivum*) y cáscara de pipa de girasol (*Helianthus annuus*). Éstos se caracterizaron (Tabla 6.1) para crear, junto con estiércol fresco vacuno (EFV), diferentes combinaciones de mezclas como tratamientos de biodesinfección. El EFV se obtuvo del mismo ganadero que en el ensayo anterior, también mezclado con cerca de un 20% de paja. El bagazo de cerveza (BC) fue ofrecido una cervecería cercana (Mungía, Bizkaia), al igual que los pellets de torta de colza (TC) que provinieron de las granjas experimentales de la sede de NEIKER-BRTA en Arkaute (Araba). El salvado de trigo (ST) se obtuvo de una cooperativa de piensos (MIBA Coop.) próxima (Mungía, Bizkaia), al igual que la cáscara de pipa de girasol (CPG) aplicada en forma de pellets.

Combinando los diferentes subproductos con el estiércol se diseñaron cuatro tratamientos: M1, M2, M3 y M4. Todos contenían la misma cantidad de EFV (3kg/m<sup>2</sup>, peso seco) y de subproductos combinados (1kg/m<sup>2</sup>, peso seco) (Tabla 6.2). El tratamiento M1 presentaba los mismos subproductos y características similares al aplicado en el ensayo anterior en los cuerpos 3 y 4 (EFV+BC+TC). El resto de tratamientos contenían CPG en diferentes cantidades, siendo M4 el único que lo contenía como único subproducto junto con el EFV, por tanto en mayor cantidad. En los tratamientos M2 y M3 se combinó CPG con ST y TC, respectivamente. Todos los tratamientos aportaron, teóricamente, cerca de 6mgC/g de suelo (peso seco) y variaban en el ratio C/N, por tanto, en la concentración de N. El valor C/N más bajo fue de 23 para el tratamiento M1, seguido de M2 y M3 con 29 y 31, respectivamente, y siendo M4 la mezcla con el valor más alto, 34.

**Tabla 6.2** | Características de las mezclas de enmiendas (EFV: estiércol fresco vacuno; TC: torta de colza; BC: bagazo de cerveza; ST: salvado de trigo; CPG: cáscara de pipa de girasol) aplicadas como tratamientos (M1, M2, M3 y M4) en la biodesinfección. Valores expresados sobre el peso seco.

Tratamiento	Enmienda	kg/m <sup>2</sup>	C/N	mgC/g suelo	kgN/ha
<b>M1</b>	EFV	3.0	23	6	808
	TC	0.5			
	BC	0.5			
<b>M2</b>	EFV	3.0	29	6	648
	ST	0.6			
	CPG	0.4			
<b>M3</b>	EFV	3.0	31	6	610
	BC	0.2			
	CPG	0.8			
<b>M4</b>	EFV	3.0	34	6	555
	CPG	1.0			

Los cuatro tratamientos se distribuyeron en cuatro cuerpos del invernadero de forma aleatoria según un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones por tratamiento (Figura 6.1). Con este fin, cada uno de los cuatro cuerpos afectados se dividió virtualmente en tres, generando 12 parcelas de unos 130m<sup>2</sup> cada una (8x16m<sup>2</sup>). Dado que los

dos cuerpos de invernadero restantes (3 y 4) se biodesinfectaron el año anterior, no se pudieron emplear como controles y no hubo opción de incluir parcelas no tratadas debido a las necesidades del agricultor. A pesar de la falta de controles, se contó con la referencia del tratamiento M1 que ya mostró efectividad frente a las parcelas no tratadas (Capítulo 5). Por esta razón, este ensayo se centra en evaluar el efecto de diferentes mezclas sobre el patógeno, respecto al inicio, y detectar posibles diferencias entre los tratamientos. La evaluación de la biodesinfección se llevó a cabo en tres momentos diferentes, antes del tratamiento, finalizado el tratamiento y una vez cosechado el primer cultivo tras la biodesinfección. Los factores de tiempo y tratamiento se analizaron como factor combinado y de forma individual para detectar diferencias entre tiempos y entre tratamientos a cada tiempo. Para este ensayo también se muestreó y se realizaron los correspondientes análisis un año después del tratamiento, sin embargo, el agricultor cultivó tomate en los cuerpos 5 y 6 que desequilibró y alteró el análisis. Por esta razón, este experimento carece de resultados a largo plazo como el anterior.



**Figura 6.1** | Esquema del invernadero con los túneles empleados en el ensayo (cuerpos 1, 2, 5 y 6) y la distribución de las parcelas. El ensayo lo formaban 12 parcelas en las que se aplicaron cuatro tratamientos (M1, M2, M3 y M4) en tres parcelas cada uno formando tres bloques (A, B y C) con distribución aleatoria de cada tratamiento. De fondo, foto tomada tras la aplicación de las enmiendas correspondientes a cada tratamiento, previo a la incorporación en el suelo con tractor antes del riego y de la colocación del plástico.

La biodesinfección de este ensayo se llevó a cabo en verano y duró siete semanas, del 18 de julio al 4 de septiembre de 2019. Primero, se aplicó la cantidad de enmienda correspondiente a cada parcela y se incorporó al suelo mediante laboreo con la ayuda de un tractor hasta unos 25cm de profundidad. Después, se regó mediante aspersión durante 20 minutos a razón de 40L/h/m<sup>2</sup> (13L/m<sup>2</sup>) y se cubrió con plástico transparente totalmente impermeable a los gases (TIF: *Total Impermeable Film*) suministrado por Riviera Blumen. Los bordes de la cubierta plástica se enterraron 10-15cm en el suelo, evitando dejar bolsas de aire, para reducir la difusión de gases.

### **Muestreo y procesado de muestras**

Las muestras de suelo se tomaron de forma aleatoria en 10 puntos de cada parcela empleando un muestreador de suelo de 2,5cm de diámetro. Con esto, se obtuvieron cerca de 2kg de suelo por parcela (peso fresco). Este procedimiento se llevó a cabo en tres momentos. Primero (T1), tras cosechar el último cultivo previamente a la biodesinfección, el 15 de julio; segundo (T2), el 7 de septiembre, una vez retirado el plástico tras la biodesinfección y dejado airear el suelo durante unos pocos días; y tercero (T3), después de cosechar el primer cultivo tras la biodesinfección, el 6 de noviembre. Las muestras se conservaron a 4°C hasta la realización de las analíticas. Para el estudio del patógeno *M. incognita* y la nematofauna se mantuvo la muestra sin procesar. En el caso de las variables biológicas el suelo se tamizó por 2mm, mientras que para las fisicoquímicas fue secada y molida.

Además, para evaluar el desarrollo de la enfermedad se tomaron 10 muestras de raíces de lechuga en puntos aleatorios de cada parcela, esto es, un total de 30 muestras por tratamiento. Las raíces se muestrearon al cosechar el cultivo precedente a la biodesinfección (T1) y el siguiente (T3). Con estas muestras se evaluó el índice de nodulación como síntoma del desarrollo de enfermedad y en el último muestreo, también se emplearon para la cuantificación de huevos de *M. incognita*.

Durante el tratamiento de biodesinfección se colocaron sondas de temperatura específicas del registrador de datos Campbell CR1000X (Campbell Scientific) en el suelo y dentro del invernadero. Para la temperatura del suelo se colocaron dos sondas, una a 15cm y otra a 30cm de profundidad, en una de las parcelas de cada tratamiento (Figura 6.1). Además, se colocó una sonda en el interior del invernadero para registrar la temperatura ambiental y en uno de los cuerpos del invernadero sin tratar. Las mediciones se registraron cada 15 minutos durante las seis semanas de tratamiento.

### **Variables analizadas y tratamiento de datos**

#### Temperatura

El efecto en la temperatura se evaluó calculando el valor medio para cada hora en cada sonda. Con ello, se pudieron observar las variaciones a lo largo de las siete semanas de biodesinfección, además de estimar el número de horas acumuladas a cada temperatura. Los

cálculos se realizaron con los datos obtenidos de una única sonda colocada en una parcela de cada tratamiento a 15 y 30 cm de profundidad. En uno de los cuerpos sin tratar se hizo lo mismo con el fin de conocer el incremento de temperatura del suelo por la biodesinfección (Figura 6.1). También se registró la temperatura ambiente dentro del invernadero. Todas las mediciones se realizaron cada 15 minutos durante el tiempo de la biodesinfección para trabajar con los valores medios por hora registrados en cada tratamiento. De esta forma, se pudo calcular el número de horas que estuvo el suelo a determinada temperatura, esto es, el número de horas acumuladas a temperaturas letales y/o subletales.

#### Caracterización fisicoquímica de enmiendas y suelos

Las enmiendas orgánicas seleccionadas se caracterizaron para diseñar las cuatro mezclas. Para ello, se analizaron la materia seca, la materia orgánica, el C orgánico total y el N Kjeldahl junto con P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K<sub>2</sub>O, B, Fe, Zn, Cu y Mn (Tabla 6.1). En el caso de las muestras de suelo, se analizaron más variables químicas de fertilidad (Tabla 6.2). Ambos análisis fueron realizados por un laboratorio acreditado (MOPRILAB – Laboratorio Químico de Análisis Agrícola) siguiendo los métodos estándar MAPA (1994) como se detalla en el apartado 4.6 de Procedimientos Generales y de la misma forma que en el capítulo anterior (Capítulo 5).

#### Índice de nodulación y cuantificación de huevos en raíz

El índice de nodulación de raíces se estimó siguiendo la escala de Bridge y Page (1980), al igual que en el Capítulo 5. En esta escala el 0 hace referencia a una raíz sana sin nódulos y el 10 representa el máximo grado de agallamiento, cuando la raíz apenas se desarrolla y pierde sus capacidades. Esta escala permite conocer el nivel de desarrollo de la enfermedad en el cultivo. Con este fin, se tomaron 54 raíces de cada parcela (162 por tratamiento) y se lavaron cuidadosamente bajo el grifo para la evaluación visual. Las raíces recogidas en el último muestreo, una vez evaluado el índice de nodulación, también fueron empleadas para la cuantificación de huevos de *M. incognita*. Con tal fin, se calculó el número de huevos por gramos de raíz (peso fresco) de acuerdo al procedimiento desarrollado por Hussey y Barker (1973). En resumen, las raíces lavadas se baten en NaClO al 0,05% y se pasa la solución por doble tamiz de 75 y 25µm. Se recoge la parte retenida en la malla de 25µm para diluirla en un volumen conocido y visualizar en lupa a 40X. Más detalles de esta técnica se pueden encontrar en el apartado de Procedimientos Generales 4.2.1.2. El número de huevos en las raíces puede ser un buen indicador de la capacidad de supervivencia del patógeno (Kokalis-Burelle et al., 2013).

#### Cuantificación de *M. incognita* y estudio de nematofauna

Para el estudio de efecto en el patógeno *M. incognita* y en la nematofauna, se realizó la extracción de nematodos en cada muestra de suelo sin procesar, en los siguientes 15 días del muestreo, según el método de embudo de Baermann (Barker, 1985). Este procedimiento se

llevó a cabo de la misma forma que en el capítulo anterior (Capítulo 5) y queda detallado en el apartado 4.2.1.1 de Procedimientos Generales.

#### Respiración del suelo

La tasa de respiración del suelo, al igual que en el capítulo anterior (Capítulo 5), se midió de acuerdo al procedimiento estándar ISO 16072:2002, en el que se incuban las muestras húmedas a 30°C durante 72h en oscuridad conteniendo un recipiente con NaOH 0,2N. Finalizada la incubación, se cuantifica la emisión de CO<sub>2</sub> del suelo por valoración con HCl 0,1N. Esta variable es una de las más empleadas en la evaluación del estado de salud del suelo (Bünemann et al., 2018; Guo, 2021).

#### Carbono de la biomasa microbiana (CBM) y orgánico soluble (COS)

Las variables del C de la biomasa microbiana (CBM) y el C orgánico soluble (COS) se emplean habitualmente como indicadores de fertilidad para la evaluación de alteraciones en el suelo por las prácticas de manejo (Guo, 2021; Li et al., 2021). La concentración de CBM se realizó según Vance et al. (1987) mediante fumigación con cloroformo y K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como extractante. En el caso del COS, el procedimiento fue similar pero sin fumigación y empleando agua destilada para la extracción (Wei et al., 2008). La reacción colorimétrica se realizó en ambos casos con ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y crómico (H<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>) y se midió la absorbancia a 445nm en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1800, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón). El valor del CBM indica la cantidad de C contenida en la masa microbiana mientras que el COS refleja la fracción de C orgánico soluble resultante de la actividad microbiana. Estas dos fracciones del C orgánico total se consideran indicadores sensibles de las dinámicas del C en el suelo, controladas por procesos físicos, químicos y biológicos (Scaglia y Adani, 2009; Li et al., 2021).

#### Actividades enzimáticas

Las actividades enzimáticas analizadas en este ensayo fueron: glucosidasa (GLU), galactosidasa (GAL), fosfatasa ácida (PAC), fosfatasa alcalina (PAK) y arilsulfatasa (ARYL). Su determinación se hizo siguiendo el método estándar ISO 20130:2018. Este procedimiento se llevó a cabo en microplacas de 96 pocillos, lo que permitió analizar más muestras con menos material. El método se basa en la medición de la actividad de cada enzima por colorimetría, medida en espectrofotómetro (Synergy HTX Multimode Reader, Agilent Technologies, California, EEUU), en función de la cantidad de sustrato específico consumido durante un tiempo de incubación determinado. Las condiciones de incubación y los sustratos varían para cada enzima, según lo descrito en el apartado 4.9.5 de Procedimientos Generales. Las enzimas extracelulares del suelo provienen de exudados de plantas y, sobre todo, de los microorganismos y juegan un papel fundamental en la degradación de la materia orgánica y su mineralización (Burns, 1978). La actividad enzimática del suelo es sensible a las condiciones ambientales y varía con las estaciones y las perturbaciones antropogénicas. Su

estudio contribuye a la mejor comprensión de los efectos provocados por la biodesinfección en la comunidad microbiológica.

#### Perfil fisiológico a nivel de comunidad de bacterias heterótrofas (Biolog EcoPlates™)

Los datos obtenidos con las placas Biolog EcoPlates™ sobre el perfil fisiológico a nivel de comunidad de las bacterias heterótrofas (CLPP: *Community-Level Physiological Profiles*) se basan en la actividad de estas poblaciones en función del consumo del sustrato presente en cada pocillo de la microplaca. Cada placa contiene 31 fuentes de sustrato diferentes distribuidas por triplicado en los 96 pocillos (Garland y Mills, 1991; Insam, 1997). Estos sustratos pueden ser agrupados en seis familias: (1) aminos-amidas, (2) aminoácidos, (3) carbohidratos, (4) ácidos carboxílicos, (5) miscelánea y (6) polímeros. Para ello, se dispensaron los extractos de suelo en la microplaca y se incubaron a 30°C en oscuridad durante una semana. Durante ese tiempo se tomaron mediciones de la absorbancia a 590nm cada 12 horas en un lector de placas (Synergy HTX Multimode Reader, Agilent Technologies, California, EEUU). Los sustratos que componen y más detalles de esta técnica se pueden encontrar en el correspondiente apartado dentro del Capítulo 4 de Procedimientos Generales (apartado 4.9.6).

La actividad metabólica se evaluó calculando la media del desarrollo del color de los pocillos (AWCD: *Average Well Color Development*). También se estudió el número de sustratos empleados (NUS: *Number of Substrates Used*), aquellos con valores de absorbancia >0,25, para conocer las comunidades de bacterias que se ven afectadas o favorecidas por los tratamientos de biodesinfección. A pesar de que esta técnica no ofrece datos sobre composición genética, provee de información sobre poblaciones activas de bacterias heterótrofas que puede ser muy útil para interpretar otros resultados y comprender mejor los efectos de la biodesinfección.

#### Comunidades de bacterias y hongos

La extracción de ADN para el análisis de las poblaciones de bacterias y hongos se realizó con 0,3g de suelo fresco empleando el kit DNeasy PowerSoil Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania). Para la caracterización de la comunidad de bacterias se amplificaron las regiones V4-V5 (400-500pb) del gen ribosomal 16S mediante PCR (*polymerase chain reaction*) empleando los cebadores 515FB y 926R (Walters et al., 2016). En el caso de la comunidad de hongos, se emplearon los cebadores ITS86Fy y ITS4 (Sommermann et al., 2018) para amplificar la región ITS2. Las secuencias fueron leídas en la plataforma Illumina MiSeq v3 (2x300bp) (Comeau et al. 2017) y procesadas con QIIME2 versión 19.10 (Bolyen et al., 2018). Se depuraron los datos brutos eliminando los cebadores y filtrando los contaminantes para generar variantes de secuencia del amplicón (ASV) con la herramienta Deblur. Finalmente, se obtuvieron las unidades taxonómicas operativas (OTU) de los ASV utilizando el complemento clasificador de características QIIME2 (método Sklearn) contra las bases de datos SILVA 132 (bacterias) y UNITE 7 (hongos). La abundancia relativa de taxones se calculó para OTUs agrupados hasta el



nivel de género o el siguiente nivel taxonómico superior identificado en cada una de las muestras de suelo. Para los análisis estadísticos posteriores, se descartaron aquellos taxones con una abundancia relativa inferior al 0,1% en el conjunto de muestras.

### Análisis de datos

Al igual que en el ensayo anterior, todos los datos fueron analizados con el software RStudio. También en este caso se estudiaron tiempo y tratamiento como factores principales de forma independiente y su combinación. En los casos de los datos univariantes se estudió la normalidad de los residuos con el test Shapiro–Wilks. Para las variables con una distribución no paramétrica se aplicó el test de Kruskal-Wallis para la determinación de la significación ( $P \leq 0,05$ ) junto con el test post-hoc de Mann-Whitney ( $P = 0,05$ ). En la mayoría de casos, con distribución paramétrica, se ejecutó el análisis de la varianza ANOVA para la determinación de la significación ( $P \leq 0,05$ ) de cada factor individualmente y su interacción, complementado con el test Tukey-HSD para la separación de medias. Los resultados de las variables medidas se representan con gráfica de caja y bigotes que muestran la distribución de datos por cuartiles. La caja viene delimitada por los cuartiles 1 (Q1) arriba y 3 (Q3) abajo. La línea intermedia es el segundo cuartil (Q2) que responde a la mediana, mientras que el valor medio quedaría localizado en la mitad de la caja. Los extremos de los bigotes representan los valores hasta 1,5 veces el rango intercuartílico ( $Q3 - Q1$ ) para el Q3 y Q1, considerándose como anómalos los valores fuera de este rango.

Los análisis multivariantes como los relativos a las diferentes comunidades microbianas analizadas (nematodos, bacterias y hongos) se realizaron aplicando el test multivariable Adonis y su PERMANOVA incluidos en la librería Vegan. Estos resultados se muestran en los diagramas de barras representando los datos de abundancia relativa en cada caso. Además, se incluyeron análisis de distribución de datos en función de los valores de distancia Bray-Curtis de las abundancias relativas. En cada caso se ejecutaron los análisis recomendados o más empleados en la respectiva bibliografía. Con los datos de abundancia relativa de nematodos, bacterias (16S) y hongos (ITS) se ejecutó un análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS: *non-metric multidimensional scaling*). La calidad del resultado de este análisis viene dada por el nivel de estrés, siendo los valores cercanos o inferiores a 0,1 los más fiables y debiendo descartar los cercanos o superiores a 0,3. Por otro lado, con los datos de actividad de bacterias heterótrofas obtenidos en las placas Biolog EcoPlates™ se realizó un análisis de componentes principales o PCA (*principal component analysis*) empleando los valores de la absorbancia máxima de cada sustrato. Para las variables químicas del suelo, además de los análisis de varianza individuales para cada variable, también se aplicó un análisis de redundancia (RDA: *Reduncancy analysis*) para evaluar el conjunto de datos, previa transformación logarítmica. Este modelo resume la variación dentro grupo de variables respuesta explicado por las variables explicativas tiempo y tratamiento, en este caso.

También se calcularon los índices de diversidad de Shannon y riqueza de Chao (Chao, 1984) con los datos de la abundancia relativa de nematodos, hongos y bacterias, así como con los obtenidos en los 31 sustratos de las placas Biolog EcoPlates™. Ambos índices aportan información relevante sobre la estructura de las comunidades del suelo. Mientras el índice de riqueza hace referencia al número de especies o grupos de clasificación, el de diversidad integra la uniformidad en la representación.

En las gráficas correspondientes se representan con letras minúsculas las diferencias entre los niveles del factor resultante de la combinación de tiempo y tratamiento, y en mayúsculas las diferencias entre tiempos. El grado de significación entre tratamientos viene representado en todas las gráficas en función del número de asteriscos "\*" ( $P \leq 0,05$ ), "\*\*\*" ( $P \leq 0,01$ ) y "\*\*\*\*" ( $P \leq 0,001$ ).

### 6.3. Resultados y discusión

Este estudio reafirmó el éxito de la biodesinfección contra *M. incognita* en climas templados empleando diferentes subproductos junto con estiércol fresco. Lo que sostiene la hipótesis de que las temperaturas muy altas no son tan necesarias para la obtención de resultados positivos y enfatiza la importancia del resto de procesos de la biodesinfección. Muchos de estos mecanismos están vinculados a la actividad microbiana que, a su vez, está estrechamente ligada a la naturaleza de la materia orgánica aportada y a las condiciones ambientales generadas. Con los cuatro tratamientos se obtuvieron resultados positivos y similares, pero se pudieron observar algunas tendencias que contribuyeron a detectar posibles diferencias en los procesos dados durante la biodesinfección en cada tratamiento.

Al evaluar las propiedades fisicoquímicas de los suelos, la gran mayoría de las variables de fertilidad (CE, materia orgánica, macro y micronutrientes) aumentaron significativamente después del tratamiento (Tabla 6.3). Una vez soportado el primer cultivo tras la biodesinfección, la mayoría de estos valores disminuyó aunque muchos continuaron siendo significativamente más altos respecto al inicio. Al igual que en el ensayo anterior (Capítulo 5), se pudo observar una disminución significativa en las concentraciones de Cr y Pb en todos los tratamientos después de la biodesinfección. También en este caso, los niveles de Fe y Mn aumentaron muy significativamente tras la biodesinfección y el Fe se mantuvo con valores altos hasta el final del ensayo ( $83 \pm 16$  -  $142 \pm 15$  mg/kg), finalizado el cultivo. Así como el incremento del Mn podría atribuirse, en parte, a la incorporación del EFV, el aumento del Fe únicamente pudo ser debido a los procesos generados durante la biodesinfección al contener todas las enmiendas aportadas concentraciones muy bajas de este elemento ( $< 0,11$  mg/kg). Los suelos pueden contener importantes cantidades de hierro pero, mayoritariamente en formas no solubles que pueden transformarse en formas disponibles bajo condiciones reductoras y por la acción de determinados microorganismos (Hayat et al., 2010; Boroujeni et al., 2021).

**Tabla 6.3** | Caracterización fisicoquímica del suelo antes de la biodesinfección (T1), después (T2) y al finalizar el cultivo siguiente a la biodesinfección (T3). Valores medios de las parcelas para cada tratamiento (M1, M2, M3 y M4) expresados sobre el peso seco el suelo. Los asteriscos indican en grado de significación ("\*" P≤0,05; "\*\*\*" P≤0,01; "\*\*\*\*" P≤0,001) entre tiempos (respecto al primer y segundo muestreo, PT1 Y PT2 respectivamente), además se incluyen flechas indicando si los valores aumentan (↑) o disminuyen (↓) entre tiempos considerando el conjunto de tratamientos. El valor en negrita indica significación entre tratamientos en un tiempo determinado. Algunos valores expresados en complejo cambio (meq/100g) y extracto soluble (meq/L). CE: conductividad eléctrica.

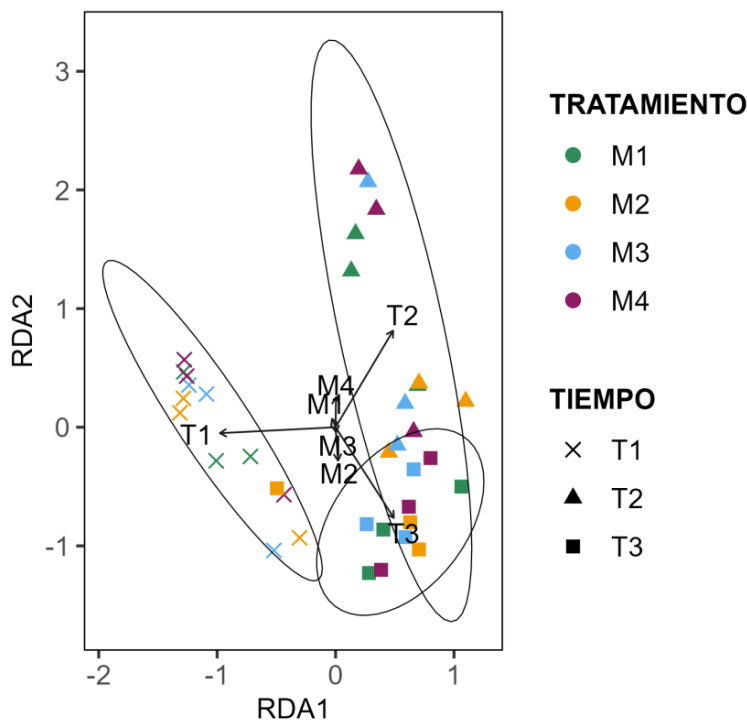
TIEMPO	T1				T2					T3					
TRATAMIENTO	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4	P T1	M1	M2	M3	M4	P T1	P T2
Arena (%)	20.0	20.8	18.5	24.5	28.8	34.1	32.1	34.9		36.6	43.8	44.6	40.3		
Limo (%)	62.1	61.5	62.5	59.0	50.2	50.6	50.5	46.0		33.0	40.7	40.3	42.8		
Arcilla (%)	17.9	17.3	18.7	16.5	21.0	15.3	17.4	19.1		20.5	15.5	15.1	16.9		
Materia seca (%)	79.7	78.8	80.1	81.5	78.8	77.2	77.3	78.0		77.4	76.3	76.8	77.0		
pH (1:5)	7.4	7.4	7.5	7.4	7.4	7.4	7.3	7.4		7.4	7.3	7.3	7.3		
CE (dS/m)	1.19	0.98	0.86	1.30	2.05	2.10	2.17	2.48	↑***	1.92	1.84	1.73	1.88	↑**	
Materia orgánica (%)	6.0	5.5	5.6	5.9	6.8	6.8	6.6	7.5	↑***	6.5	5.6	6.6	6.6	↑*	↓*
N total Kjeldahl (%)	0.34	0.32	0.32	0.34	0.35	0.34	0.35	<b>0.41</b>	↑**	0.34	0.34	0.36	0.37		
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/kg)	39.8	68.0	60.6	67.3	365	318	592	292	↑***	508	380	433	432	↑***	
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (meq/L)	0.2	0.8	0.5	0.3	1.5	2.0	4.9	1.4		7.3	4.6	3.6	5.1	↑***	
C orgánico (%)	3.5	3.2	3.2	3.4	4.0	4.0	3.8	4.4	↑***	3.8	3.5	3.8	3.8	↑**	↓*
C/N	10.4	10.0	10.2	10.2	11.5	11.6	10.8	10.8	↑**	11.2	11.0	10.8	10.3		
K (meq/100g)	0.4	0.4	0.4	0.4	1.3	1.6	1.7	1.7	↑***	1.1	1.2	1.3	1.3	↑***	↓**
K (meq/L)	0.2	0.2	0.2	0.2	1.6	1.9	1.7	2.5	↑***	0.6	0.8	0.6	0.7		↓***
Ca (meq/100g)	24.8	24.6	25.5	25.6	24.5	23.5	24.5	24.4		24.1	22.6	24.3	23.9	↓*	
Ca (meq/L)	12.3	9.3	8.2	13.6	16.6	14.5	15.6	18.7	↑*	14.6	10.1	12.2	13.5		
Mg (meq/100g)	2.6	2.6	2.6	2.6	2.8	2.9	3.1	2.9	↑***	2.9	2.7	2.9	2.9	↑**	
Mg (meq/L)	2.3	1.7	1.5	2.4	3.6	3.5	3.7	4.3	↑***	3.3	2.3	3.1	3.0		
Na (meq/100g)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.3	0.2	***	0.3	0.3	0.3	0.3	↑***	↑**
Na (meq/L)	0.7	0.5	0.6	0.6	2.1	2.5	2.3	2.8	↑***	1.7	1.6	2.2	1.8	↑***	↓**
SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (meq/L)	10.8	6.6	5.5	11.9	9.8	7.0	7.9	12.7		6.9	4.4	7.2	7.3		
P asim. (mg/kg)	187	195	184	183	199	136	211	231	↑*	202	207	211	202		
Fe asim. (mg/kg)	59.6	58.7	57.6	58.6	184	166	122	153	↑***	142	84	112	121	↑***	↓**
Mn asim. (mg/kg)	27.8	26.8	28.7	26.0	79.0	65.0	34.2	96.5	↑**	15.7	12.0	12.7	15.8		↓***
Cu asim. (mg/kg)	7.9	8.5	7.9	7.7	12.1	11.7	10.9	12.9	↑***	9.0	7.7	8.3	8.4		↓***
Zn asim. (mg/kg)	13.0	13.6	13.0	13.0	15.1	15.8	15.4	16.7	↑***	11.6	11.9	12.2	12.5		↓***
B asim. (mg/kg)	0.9	1.0	0.9	0.9	1.3	1.1	1.3	1.2	↑**	1.1	1.1	1.1	1.1		
Cd (mg/kg)	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2		<0.2	<0.2	<0.2	<0.2		
Pb (mg/kg)	22.4	23.9	23.8	24.4	20.3	20.9	20.9	20.8	↓**	20.9	20.9	22.9	21.4	↓*	
Hg (mg/kg)	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5		<0.5	<0.5	<0.5	<0.5		
Cr (mg/kg)	23.4	25.0	18.9	20.6	17.9	17.8	20.4	18.5	↓*	20.9	20.0	17.8	18.4		
Ni (mg/kg)	15.4	16.6	15.5	15.3	15.5	14.4	15.4	15.5		15.1	14.5	14.0	14.3	↓**	

Los incrementos en Fe y Mn confirmarían la generación de condiciones reductoras durante la biodesinfección, ya que ambos se reducen fácilmente ante la falta de oxígeno. Estos elementos pueden actuar como biocidas contribuyendo en el control del patógeno (Fernández-Bayo et al., 2018). Además, también forman parte de los micronutrientes esenciales para las plantas junto con otros como el Zn, B, y Cu que también aumentaron muy significativamente tras la biodesinfección. La intensidad de la reducción de Fe está regulado, en gran medida, por el C lábil presente como fuente de energía para los microorganismos y donante de electrones, que hace aumentar las condiciones reductoras (Khan et al., 2019). Además, la reducción del Fe en presencia de C orgánico es uno de los factores que contribuyen en la movilización del P, que también aumentó significativamente después de la biodesinfección, especialmente en M3 y M4 (211 y 231mg/kg, respectivamente) quedando disponible para el cultivo. En suelos anegados la desorción, disolución e hidrólisis de fosfatos de Fe contribuyen a la liberación del P, siendo estos procesos desencadenados por el C orgánico disuelto proveniente de la mineralización de la materia orgánica (Khan et al. 2019). Por lo tanto, en condiciones reductoras, entradas de C lábil favorecerían la toma de P por plantas y microorganismos que, de otro modo, estaría estrechamente ligado a los minerales de Fe del suelo.

De entre todas las variables químicas analizadas, únicamente se detectaron diferencias entre tratamientos en el caso de la concentración de N total al finalizar la biodesinfección. El tratamiento M4 mostró valores significativamente más altos siendo la mezcla de enmiendas con menor aporte de N (555kgN/ha) (Tabla 6.2). Después del cultivo, la concentración bajó pero se mantuvo más alta que en el resto de tratamientos aunque sin diferencias significativas. Este incremento pudo estar relacionado con la tasa de mineralización por el valor C/N más alto (34) que el resto de tratamientos junto con el alto contenido en hemicelulosa y lignocelulosa como fuente de C que influye en la actividad microbiana y, por tanto, en la mineralización de nutrientes. Shrestha et al. (2021b) demostraron que empleando enmiendas orgánicas de esta naturaleza la mayor parte de N inorgánico medido en el suelo tras la biodesinfección estaba mayoritariamente como  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ , formas asimilables para las plantas que contribuyen a mejorar el desarrollo del cultivo. A pesar de que este tratamiento solo presentó valor significativamente mayor en el contenido total de N, mostró los valores más altos en la mayoría de estas variables respecto al resto de tratamientos después de la biodesinfección. De hecho, el aprovechamiento de estos nutrientes por el cultivo pudo verse traducido en la disminución de la concentración de muchas de las variables químicas medidas al final del ensayo, tras soportar un ciclo de lechuga.

En la evaluación del conjunto de datos químicos del suelo con tiempo y tratamiento como factores, el modelo RDA obtenido mostró significación para el factor tiempo y no así para los tratamientos. En este análisis se pudo ver cómo las muestras del primer tiempo se agruparon con muy poca distancia entre ellas (Figura 6.2). Por el contrario, tras la biodesinfección todas las muestras quedaron dispersadas reflejando la perturbación que supusieron los tratamientos. Esto pareció amortiguarse tras el cultivo de lechuga al final del

ensayo, ya que las muestras se distribuyeron cercanas entre sí en los valores positivos de ambos ejes y en oposición al grupo de muestras del comienzo. En cuanto a los tratamientos no hubo diferenciación clara aunque sí se pudo ver que M1 y M4 se colocaron cercanos entre sí y contrapuestos a M2 y M3 también con centroides cercanos. No se encontró una justificación clara que explicara esto dado que fue el tratamiento M4 el que mostró los valores más altos en la mayoría de variables. Por esta razón, se hubiera esperado observar cierta separación de M4 del resto de tratamientos.



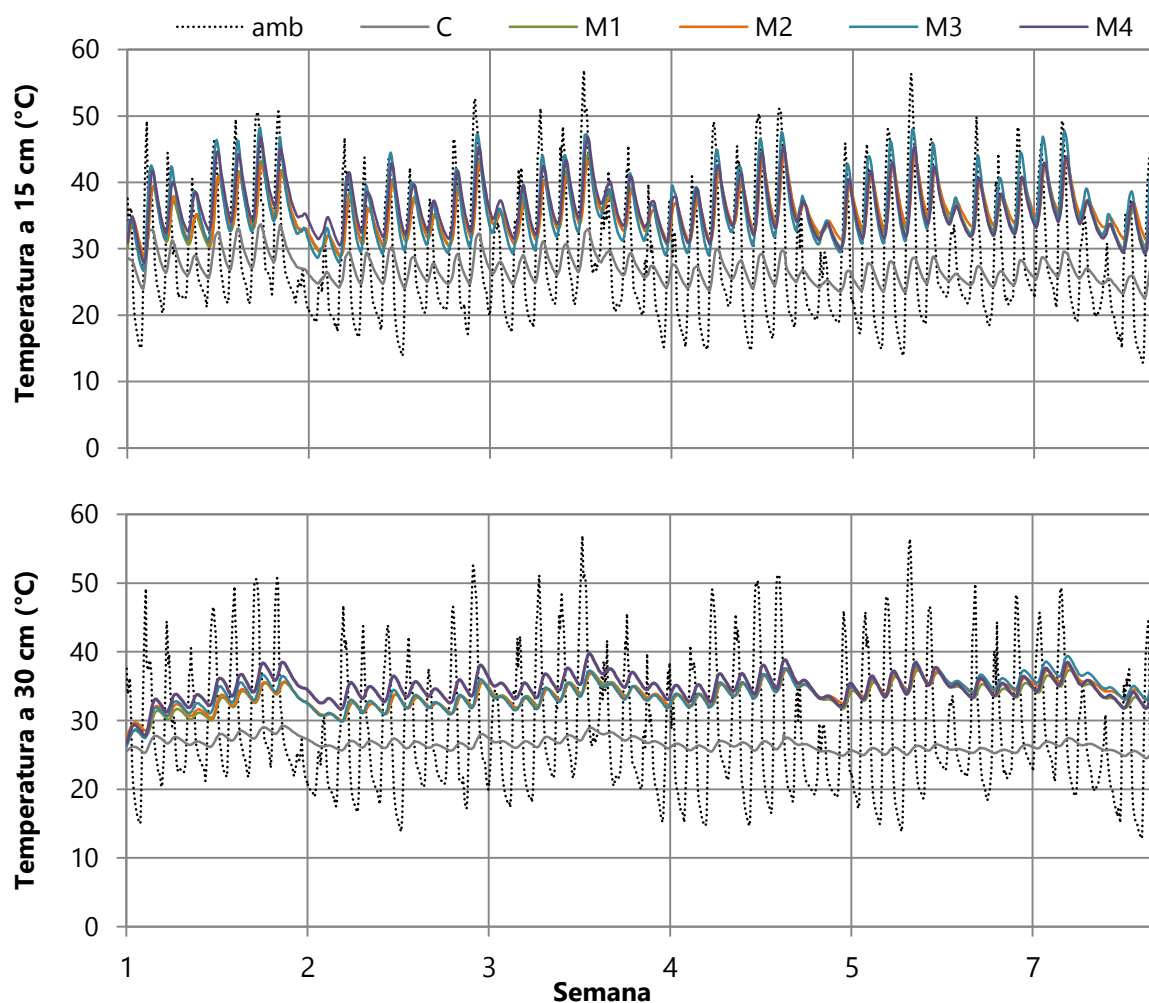
**Figura 6.2** | Análisis discriminante de redundancia (RDA) de datos químicos del suelo de los cuatro tratamientos (M1, M2, M3, M4) en los tres tiempos evaluados: antes (T1) y después de la biodesinfección (T2) y al finalizar el siguiente cultivo a la biodesinfección (T3). Las elipses indican la agrupación por tiempos para un intervalo de confianza del 95%.

La mezcla del tratamiento M4 contenía CPG como único subproducto junto con el estiércol, por tanto, en mayor cantidad ( $1\text{kg/m}^2$ ) y el C/N más alto (34). Esta enmienda contiene grandes proporciones de celulosa, hemicelulosa y lignina. Estos biopolímeros son estructuras complejas de polisacáridos que son degradados, principalmente, por actinobacterias y hongos termófilos. Su degradación está estrechamente ligada a la generación de humus dependiendo de factores como pH, humedad, temperatura, etc. (Yang et al., 2021). Los ratios C/N por encima de 25 y las temperaturas mesofílicas favorecen la degradación de la lignocelulosa (Gaiind y Pandey, 2005). A este respecto, el tratamiento M4 fue el único en registrar más de 500h por encima de  $35^\circ\text{C}$  en las dos profundidades medidas (Tabla 6.4), siendo el tratamiento con temperaturas más elevadas en la capa profunda (30cm) pero no en la más superficial (15cm) (Figura 6.3). Este fenómeno pudo ser consecuencia del aumento de la actividad microbiana durante la biodesinfección en las capas profundas del suelo, resultando en la mayor mineralización de nutrientes en los suelos tratados con M4.

**Tabla 6.4** | Número de horas acumuladas (°C) durante la biodesinfección en una parcela de cada tratamiento (M1, M2, M3, M4) y una no tratada (C) a 15 y 30cm de profundidad de suelo. También se incluyen las horas acumuladas de la temperatura ambiental dentro del invernadero (amb). Al final de la tabla se indican los valores de temperatura media, máxima y mínima para cada caso.

°C	amb	15cm					30cm				
		C	M1	M2	M3	M4	C	M1	M2	M3	M4
30	26	35	69	37	67	25	-	70	50	35	1
31	22	21	90	99	93	76	-	104	107	120	29
32	29	31	137	95	120	120	-	190	170	169	100
33	21	9	130	158	109	135	-	269	245	220	226
34	28	-	137	140	101	139	-	199	214	208	225
35	24	-	123	147	89	107	-	180	211	176	255
36	24	-	108	117	77	105	-	68	76	109	142
37	30	-	82	90	67	95	-	24	35	50	87
38	13	-	52	64	68	67	-	-	-	13	39
39	18	-	59	59	51	68	-	-	-	6	7
40	19	-	38	44	38	48	-	-	-	-	-
41	19	-	38	34	35	45	-	-	-	-	-
42	20	-	22	24	36	32	-	-	-	-	-
43	16	-	17	12	32	22	-	-	-	-	-
44	15	-	-	-	23	18	-	-	-	-	-
45	17	-	-	-	18	12	-	-	-	-	-
46	16	-	-	-	20	6	-	-	-	-	-
47	9	-	-	-	14	-	-	-	-	-	-
48	9	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-
49≤57	39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
media (°C)	28.5	27.0	35.3	35.5	35.9	36.1	26.5	33.5	33.8	34.0	34.8
min. (°C)	12.9	22.5	27.9	28.8	26.8	27.9	24.5	26.7	27.8	26.3	26.7
máx. (°C)	56.9	33.7	44.7	43.8	48.2	46.8	29.2	37.6	38.0	39.4	39.7

La temperatura máxima alcanzada dentro del invernadero fue de 56,9°C, similar al ensayo del año anterior (57,2°C), pero estuvo menos de una semana por encima de 50°C (Figura 6.3). Una de las primeras observaciones fue el incremento de la temperatura por la biodesinfección en todas las parcelas tratadas que presentaron valores máximos de más de 10 grados respecto al control. Entre las parcelas biodesinfectadas, se observaron variaciones entre tratamientos en los rangos de temperatura medidos. Las temperaturas máximas se registraron en aquellos con mayor C/N (M3 y M4) tanto a 15 como a 30cm de profundidad (Tabla 6.4). La temperatura más alta a 15cm de profundidad fue 48,2°C en el tratamiento M3, seguido de M4 con 46,8°C. En un primer momento, se podría atribuir la máxima temperatura en M3 a la ubicación de la parcela al localizarse en el centro del invernadero. Aunque pudo tener parte de efecto, esto fue descartado al detectar importantes diferencias entre M2 y M4, ambos en los extremos del cuerpo 2 (Figura 6.1).

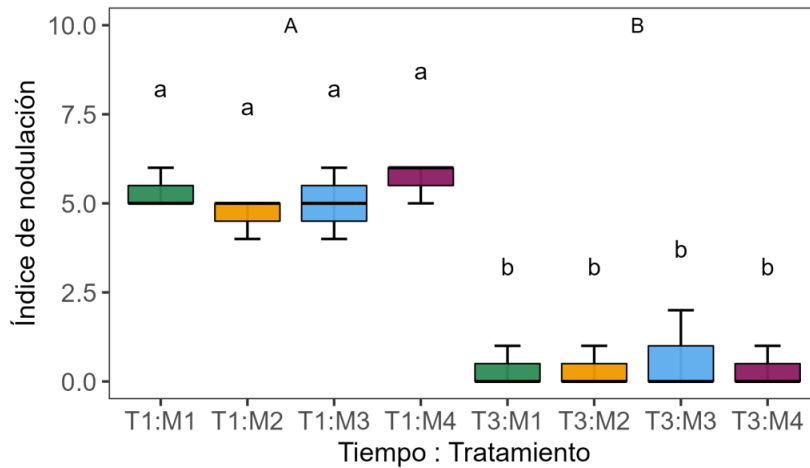


**Figura 6.3** | Temperaturas medidas durante las siete semanas (18/07/2019 – 04/09/2019) de tratamiento dentro del invernadero (amb) y en los cuerpos tratados con los diferentes tratamientos (M1, M2, M3, M4) a 15 y 30cm de profundidad. Además, se incluye la medición en una parcela no tratada (C), sin enmiendas ni cubierta plástica.

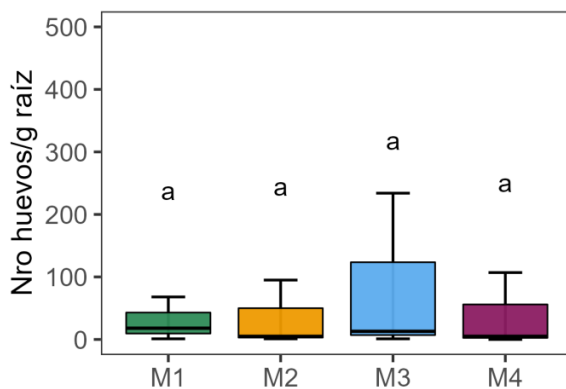
A pesar de las diferencias entre tratamientos en el máximo de temperaturas alcanzadas y número de horas acumuladas, los cuatro demostraron reducir la enfermedad significativamente. En el cultivo anterior a la biodesinfección, las raíces presentaban un grado similar de nodulación en todas las parcelas, alrededor de 5 según la escala de Bridge y Page (1980) (Figura 6.4). El índice de nodulación no fue severo pero suficiente para afectar el desarrollo radicular y limitar la entrada de nutrientes (Bridge y Page, 1980), generando pérdidas en la producción. El cultivo implantado tras la biodesinfección mostró una clara mejoría respecto al anterior, con raíces sanas o con escasa nodulación (<2). La reducción de nódulos fue similar en todos los tratamientos aunque M3 presentó valores ligeramente más altos, lo que se vio también reflejado en el número de huevos en la raíz (Figura 6). A pesar de la falta de referencia inicial del número de huevos, los valores obtenidos después de la biodesinfección mostraron baja capacidad de multiplicación (Meyer et al., 2015). Estos resultados confirmarían que las temperaturas altas (>45°C) no son indispensables para obtener efectos positivos en la biodesinfección como se vio en estudios anteriores en esta región climática (Ojinaga et al., 2020; Gandariasbeitia et al., 2021). Es más, la acumulación de



horas de exposición a temperaturas subletales puede ser igual o más efectiva contra este patógeno (Wang y McSorley, 2008). En este ensayo todos los tratamientos acumularon más de 500h por encima de 35°C a 15cm de profundidad y más de 250h a 30cm, lo que demostró ser suficiente para dañar *M. incognita* y, en consecuencia, reducir la enfermedad.



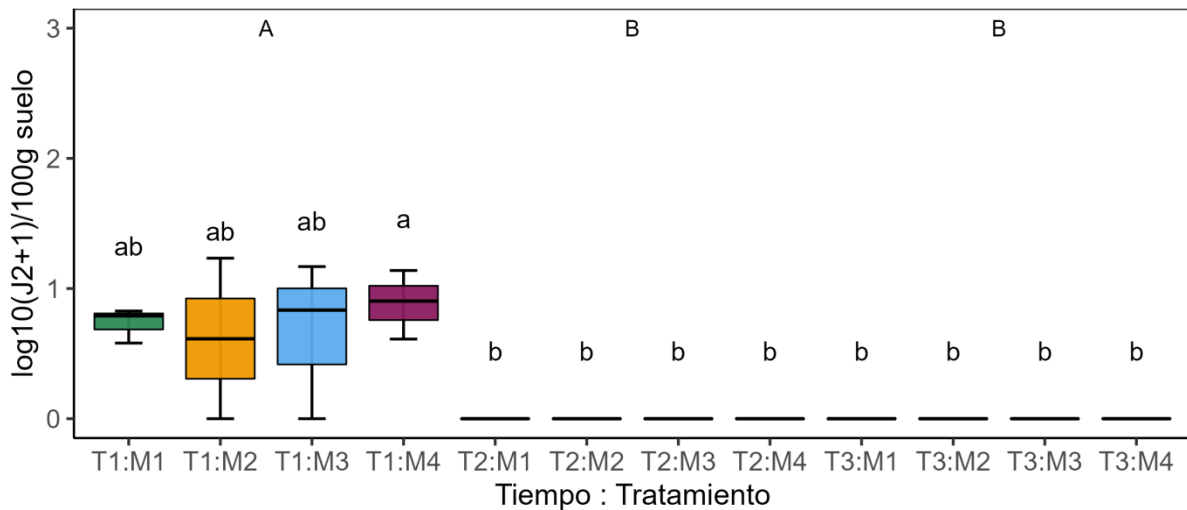
**Figura 6.4** | Índice de nodulación en raíz (Bridge y Page, 1980) para los cuatro tratamientos (M1, M2, M3, M4) de plantas muestreadas antes de la biodesinfección (T1) y tras cosechar el cultivo siguiente (T3). Las letras minúsculas indican las diferencias entre la combinación de tiempo y tratamiento y las mayúsculas las diferencias entre tiempos.



**Figura 6.5** | Número de huevos por gramo de raíz (peso fresco) de plantas muestreadas en las parcelas de los cuatro tratamientos (M1, M2, M3, M4) después de cosechar el primer cultivo tras la biodesinfección (T3). Las letras minúsculas indican las diferencias entre tratamientos.

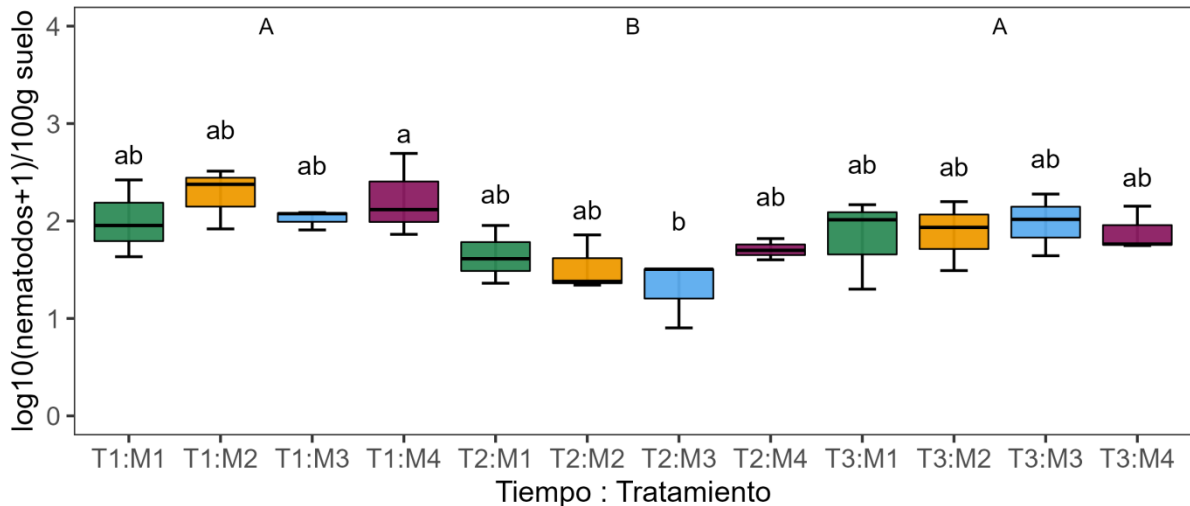
Antes de la biodesinfección, la presencia del patógeno fue similar en todas las parcelas, alrededor del 10% de la población (Figura 6.6). Después de la biodesinfección, su población se redujo en todos los tratamientos. Solo se detectó algún juvenil de *M. incognita* en una de las parcelas tratadas con M4 pero en escasa representación. Tras cosechar el primer cultivo de lechuga después de la biodesinfección no se detectaron juveniles en ninguna de las parcelas. Esto no implica que la población desapareciera completamente, de hecho, los huevos de *M. incognita* pueden desprenderse de la raíz y permanecer en latencia en las capas más profundas del suelo hasta eclosionar bajo condiciones favorables (Curtis et al., 2009). Esto podría explicar la presencia de nódulos y huevos en el cultivo posterior, indicando presencia del patógeno aunque en tan baja densidad que no se detectó en la extracción. Aunque las técnicas moleculares como la qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*) son más precisas, también podrían cuantificar la presencia de individuos muertos si su material genético aún no se ha degradado. En concreto, para la evaluación de la nematofauna se requeriría conocer y trabajar con muchas secuencias genómicas incrementando el coste del análisis respecto a la identificación visual. La clasificación por

características morfológicas es una metodología más económica pero requiere cierto grado de cualificación. La dificultad de esta técnica se incrementa con el aumento del nivel taxonómico, aunque la identificación por grupos tróficos, menos detallada pero menos compleja, puede ser suficiente para obtener información representativa de los análisis (Seesao et al., 2017).

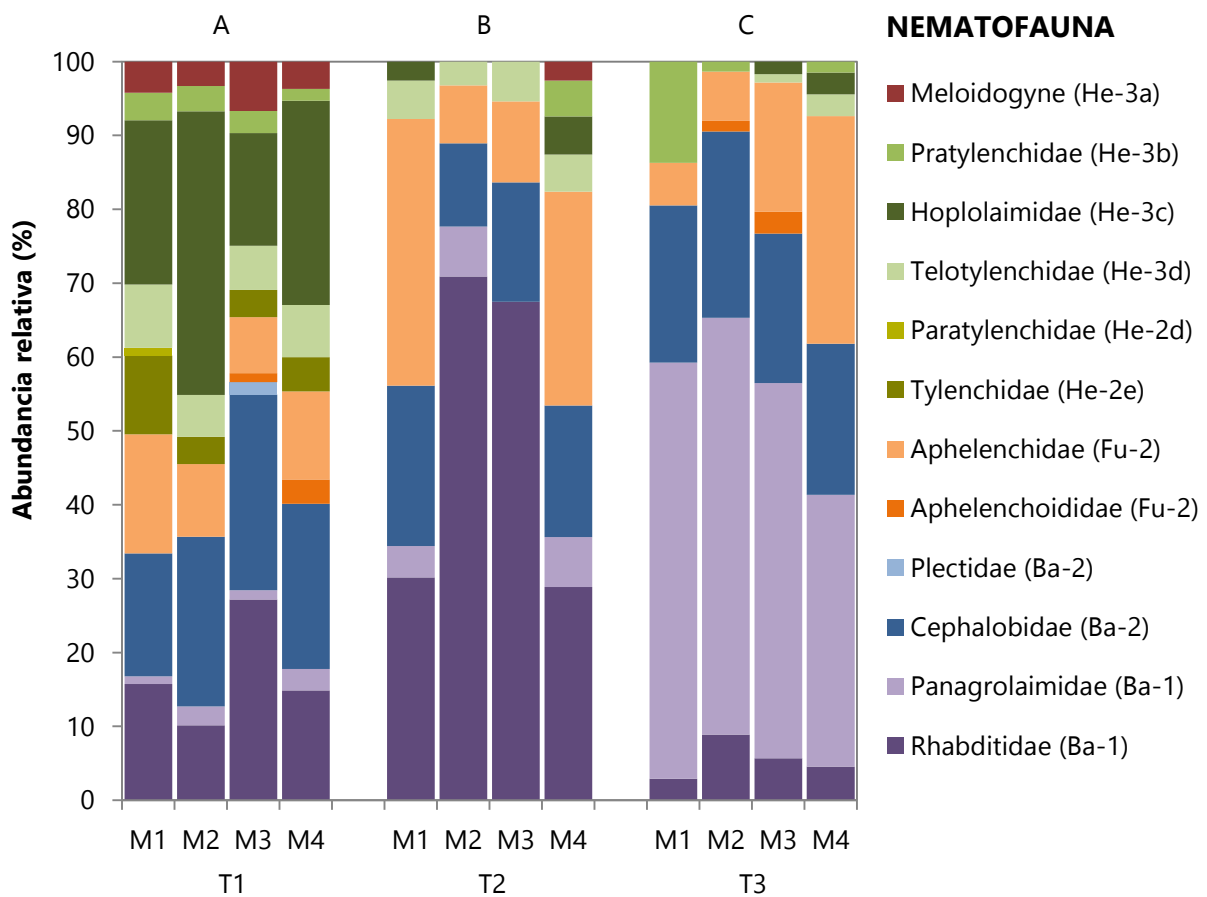


**Figura 6.6** | Valor del número de juveniles de *M. incognita* (en log<sub>10</sub>) cuantificados en las parcelas biodesinfectadas con los cuatro tratamientos (M1, M2, M3, M4) antes del tratamiento (T1), después (T2) y tras cosechar el siguiente cultivo (T3). Las letras minúsculas indican las diferencias entre la combinación de tiempo y tratamiento y las mayúsculas las diferencias entre tiempos.

Al igual que en el ensayo anterior (Capítulo 5), se pudo observar una disminución en la población general de nematodos por los efectos de la biodesinfección, con diferencias significativas antes y después de los tratamientos, aunque con tendencia a la recuperación una vez cosechado el siguiente cultivo (Figura 6.7). En ninguno de los tiempos se dieron diferencias estadísticas entre tratamientos. En lo que se refiere a la estructura de la población, igualmente, se detectaron diferencias significativas entre los diferentes tiempos pero no entre tratamientos, siendo la proporción de herbívoros y bacteriófagos la principal diferencia entre los tiempos evaluados (Figura 6.8). Al comienzo del ensayo, los herbívoros y los bacteriófagos mostraron una abundancia similar en todas las parcelas (35-55%). Al finalizar la biodesinfección, los bacteriófagos aumentaron su población hasta constituir más de un 55% en todos los tratamientos, llegando a superar el 80% en M2 y M3, en detrimento de los herbívoros que vieron mermada su población representando menos de un 20% en todos los tratamientos. Dentro de los bacteriófagos, los pertenecientes a la familia Rhabditidae fueron los más favorecidos tras la biodesinfección, sobre todo en el caso de M2 y M3 en los que llegaron a representar más de un 65% de la población total. Esto pudo deberse a la elevada tasa de reproducción de esta familia en condiciones favorables, como es el aumento de la población de bacterias por la aportación de materia orgánica, como sería el caso. El resto de familias de bacteriófagos presentes no experimentaron variaciones importantes en su población después de la biodesinfección. Respecto a los fungívoros, no variaron mucho en M2 y M3, sin embargo, en M1 y M4 su proporción fue mayor que al comienzo del ensayo.



**Figura 6.7** | Número de nematodos (log10) en 100g de suelo (peso seco) en las parcelas biodesinfectadas con los cuatro tratamientos (M1, M2, M3, M4) antes de la biodesinfección (T1), después (T2) y tras cosechar el siguiente cultivo (T3). Las letras minúsculas indican las diferencias entre la combinación de tiempo y tratamiento y las mayúsculas las diferencias entre tiempos.



**Figura 6.8** | Abundancia relativa de las familias de nematodos identificados y el grupo trófico al que pertenecen (He: herbívoros, en verdes; Fu: fungívoros, en naranjas; Ba: bacteriófagos, en azules y morados). Se incluye el valor cp para cada familia y en el caso de los He se indica en minúsculas la subcategoría descrita en el Capítulo 4 de Procedimientos Generales) en las parcelas biodesinfectadas con los cuatro tratamientos (M1, M2, M3, M4) antes del tratamiento (T1), después (T2) y tras cosechar el siguiente cultivo (T3). Se diferencia la proporción del patógeno *Meloidogyne* en rojo intenso. Las letras mayúsculas indican las diferencias entre tiempos.

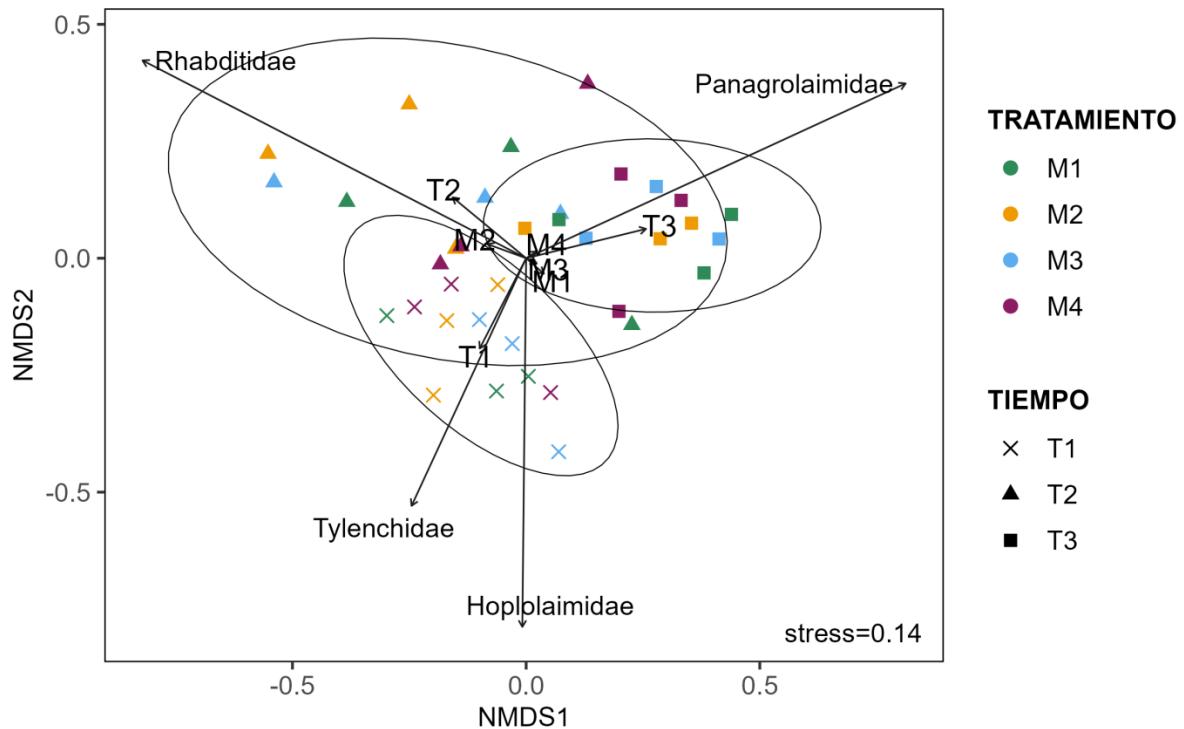
La estructura de la nematofauna volvió a variar significativamente en todos los tratamientos una vez soportado el cultivo de lechuga siguiente a la biodesinfección. Los bacteriófagos continuaron siendo el grupo dominante en todos los tratamientos (60-90%) pero, en esta ocasión, la familia Panagrolaimidae desplazó casi por completo a Rhabditidae. Esto pudo deberse a la buena capacidad de Panagrolaimidae para resistir condiciones de anoxia respecto a otros grupos (Contiliani et al. 2020). Por otro lado, los bacteriófagos Cephalobidae se mantuvieron estables durante todos los tiempos muestreados. La población de fungívoros se recuperó, incluso aumentó en los tratamientos M3 y M4 respecto al estado inicial. Ambos tratamientos presentaban mayor contenido en CPG, por lo tanto en lignina, subproducto que favorecería la presencia de hongos. Los fungívoros estuvieron representados en todos los tiempos por la familia Aphelenchidae y en mucha menor proporción, solo en algunas parcelas, también por Aphelenchoididae. El efecto de la biodesinfección siguió ejerciendo presión sobre la población de herbívoros tras la implantación del cultivo. Los nematodos bacteriófagos y fungívoros pudieron tener un efecto antagónico contra los nematodos fitoparásitos al competir por los mismos nichos ecológicos (Oka et al., 2010; Gandariasbeitia et al., 2021). La estructura general de la nematofauna al finalizar el ensayo fue más equilibrada en los tratamientos M3 y M4 en los que abundan bacteriófagos (60-80%) y fungívoros (20-30%), mientras que los herbívoros se mantienen en baja densidad (<10%). Por otro lado, el tratamiento M2 fue el que más redujo la población de herbívoros y favoreció la de bacteriófagos en los dos tiempos evaluados después de la biodesinfección.

**Tabla 6.5** | Índices de diversidad (Shannon) y riqueza (Chao) de la nematofauna. Valor medio y error estándar (EE) de las parcelas biodesinfectadas con los cuatro tratamientos (M1, M2, M3, M4) antes del tratamiento (T1), después (T2) y tras cosechar el siguiente cultivo (T3). Las letras minúsculas indican las diferencias entre la combinación de tiempo y tratamiento y las mayúsculas entre tiempos.

Tiempo	Tratamiento	DIVERSIDAD				RIQUEZA			
		media	EE			media	EE		
T1	M1	1.8	0.1	a	A	8.0	1.0	ab	A
	M2	1.7	0.1	ab		7.3	0.7	abc	
	M3	1.7	0.2	ab		8.0	0.6	ab	
	M4	1.8	0.0	a		8.3	0.9	a	
T2	M1	1.1	0.3	ab	B	3.7	0.9	d	B
	M2	0.6	0.4	b		2.3	0.9	d	
	M3	0.9	0.4	ab		3.3	0.7	d	
	M4	1.4	0.1	ab		5.0	0.0	abcd	
T3	M1	1.1	0.2	ab	B	3.7	0.3	d	B
	M2	1.2	0.0	ab		4.7	0.3	bcd	
	M3	1.2	0.2	ab		4.3	0.3	cd	
	M4	1.3	0.2	ab		5.0	1.0	abcd	

Estas variaciones en la composición también se pudieron detectar en los índices de diversidad de Shannon y riqueza (Chao). Los valores de ambas variables disminuyeron significativamente en todos los tratamientos al finalizar la biodesinfección (Tabla 6.5). Después del cultivo los valores se mantuvieron significativamente más bajos respecto al inicio

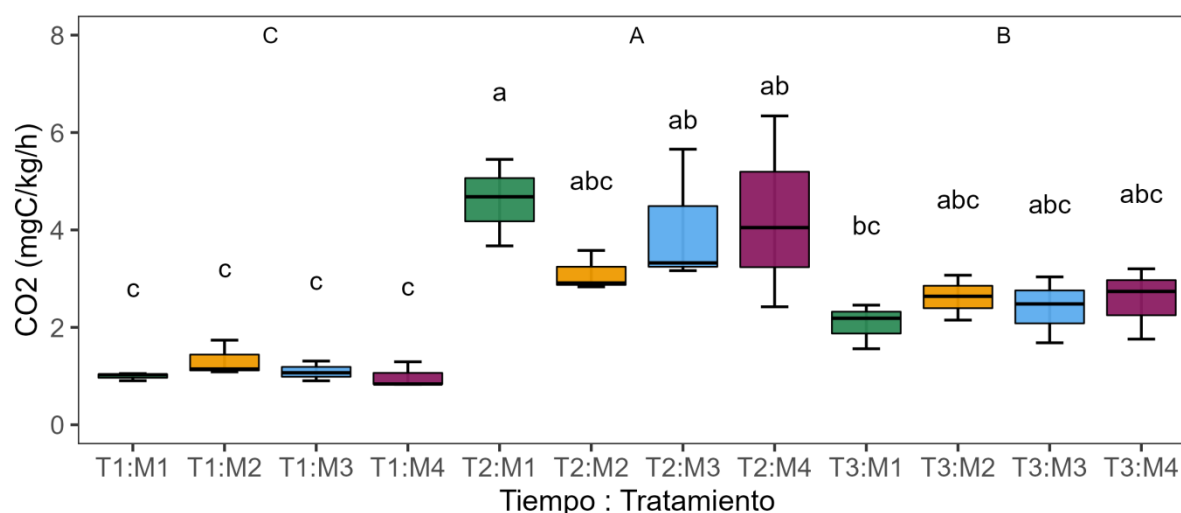
aunque se observó cierta tendencia a la recuperación. La nematofauna de los suelos tratados con M2 se vio más afectada en términos de diversidad posiblemente debido al dominio de los bacteriófagos frente al resto de grupos, aunque se recuperó después del cultivo. Se podría añadir que M4 fue el tratamiento en el que menos afectados se vieron estos índices tanto al finalizar la biodesinfección como después del cultivo.



**Figura 6.9** | Análisis NMDS (*non-metric multidimensional scaling*) de las poblaciones de la nematofauna presente en las parcelas biodesinfectadas con los cuatro tratamientos (M1, M2, M3, M4) antes del tratamiento (T1), después (T2) y tras cosechar el siguiente cultivo después del tratamiento (T3). Las elipses indican la agrupación por tiempos para un intervalo de confianza del 95%.

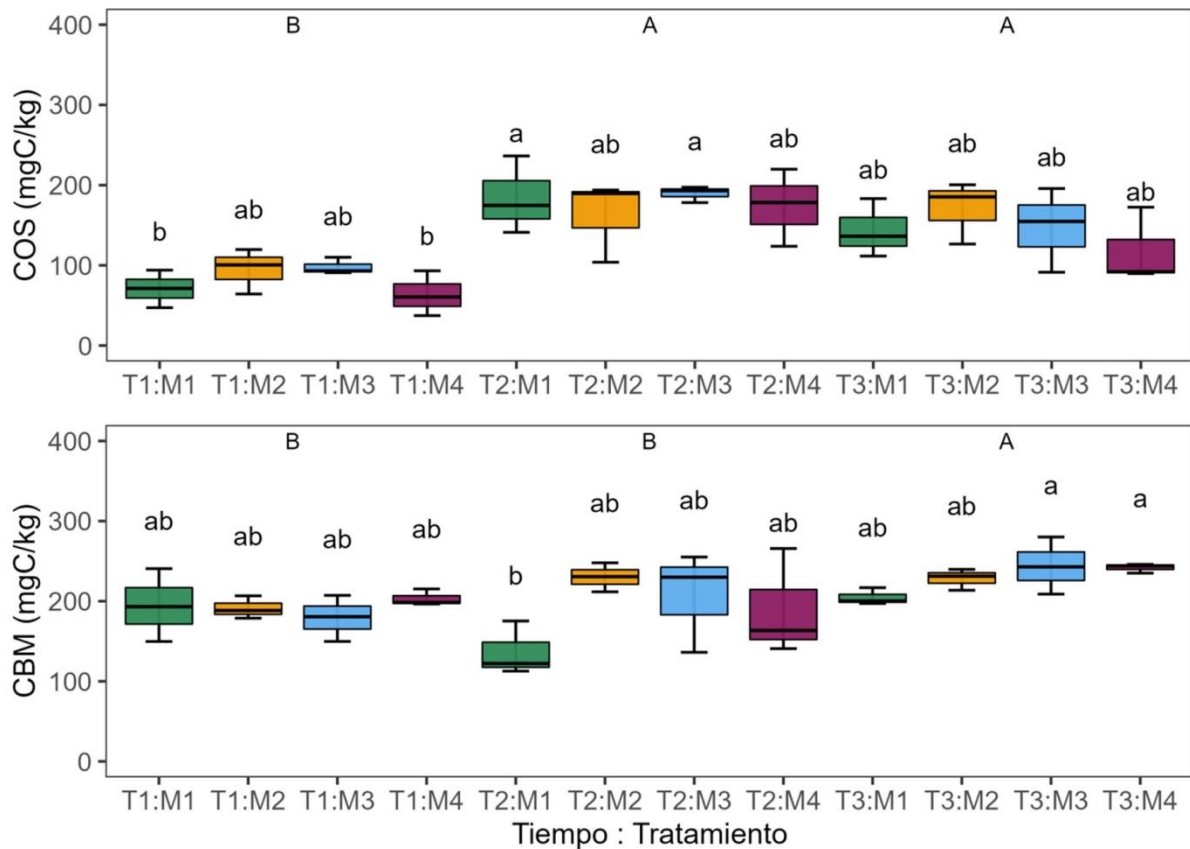
El NMDS de la nematofauna mostró resultados aceptables en la agrupación por tiempos con un valor de estrés de 0,14 (Figura 6.9). En este análisis se observó el impacto de la biodesinfección con la elevada dispersión de las muestras a este tiempo y cómo pasado el cultivo la población se estabiliza quedando más agrupada y enfrentada al tiempo anterior a la biodesinfección. En cuanto a los tratamientos, no se agruparon de forma clara pero sí se observó cómo M2 se distanció del resto. El centroide de M2 se localizó en los valores negativos de NMDS1, mientras que los del resto de tratamientos se posicionaron en los valores positivos del eje. Esto podría estar relacionado con los índices de diversidad y riqueza relativamente más bajos al finalizar la biodesinfección en este tratamiento. Además, se incluyeron las familias que más contribuyeron en la agrupación, localizándose al final de la flecha el punto de mayor abundancia. En este caso, también se pudo observar como los herbívoros (Tylenchidae y Hoplolaimidae) se situaron en el mismo sentido que el grupo de muestras antes de la biodesinfección, mientras que los bacteriófagos Rhabditidae y Panagrolaimidae se localizaron cercanos a los centroides del segundo y tercer tiempo, respectivamente.

Generalmente, en la biodesinfección se puede producir una disminución de diversidad y/o riqueza microbiana de algunas poblaciones pero se genera un aumento en la actividad de aquellas favorecidas por las condiciones de enriquecimiento y otros procesos ligados a la biodesinfección (Liu et al. 2016; Fernández-Bayo et al., 2019). Esta perturbación, transitoria, permite la rápida recuperación de determinadas poblaciones llegando, en muchas ocasiones, incluso a mejorar la estructura de la red trófica (Shea et al., 2022; Yan et al., 2022). Esto pudo comprobarse en este ensayo a través del resto de variables microbiológicas analizadas. El incremento de la actividad se pudo comprobar mediante la tasa de respiración del suelo que pasó de valores medios cercanos a 1mgC/kg/h a valores que rondaron los 4mgC/kg/h después de la biodesinfección (Figura 6.10). No se observaron diferencias estadísticas entre tratamientos pero la respiración media en M2 fue ligeramente más baja que en el resto tras la biodesinfección, aunque este valor se igualó al de los demás tratamientos al final del ensayo. En el último muestreo, una vez cosechado el primer cultivo siguiente a la biodesinfección, los valores de respiración bajaron significativamente en relación al muestreo anterior pero continuaron siendo significativamente superiores a los obtenidos al comienzo del ensayo, entre 2<3mg C/kg/h en todos los tratamientos.



**Figura 6.10** | Tasa de respiración del suelo en las parcelas biodesinfectadas con los cuatro tratamientos (M1, M2, M3, M4) antes del tratamiento (T1), después (T2) y tras cosechar el primer cultivo después del tratamiento (T3). Las letras minúsculas indican las diferencias entre la combinación de tiempo y tratamiento y las mayúsculas las diferencias entre tiempos.

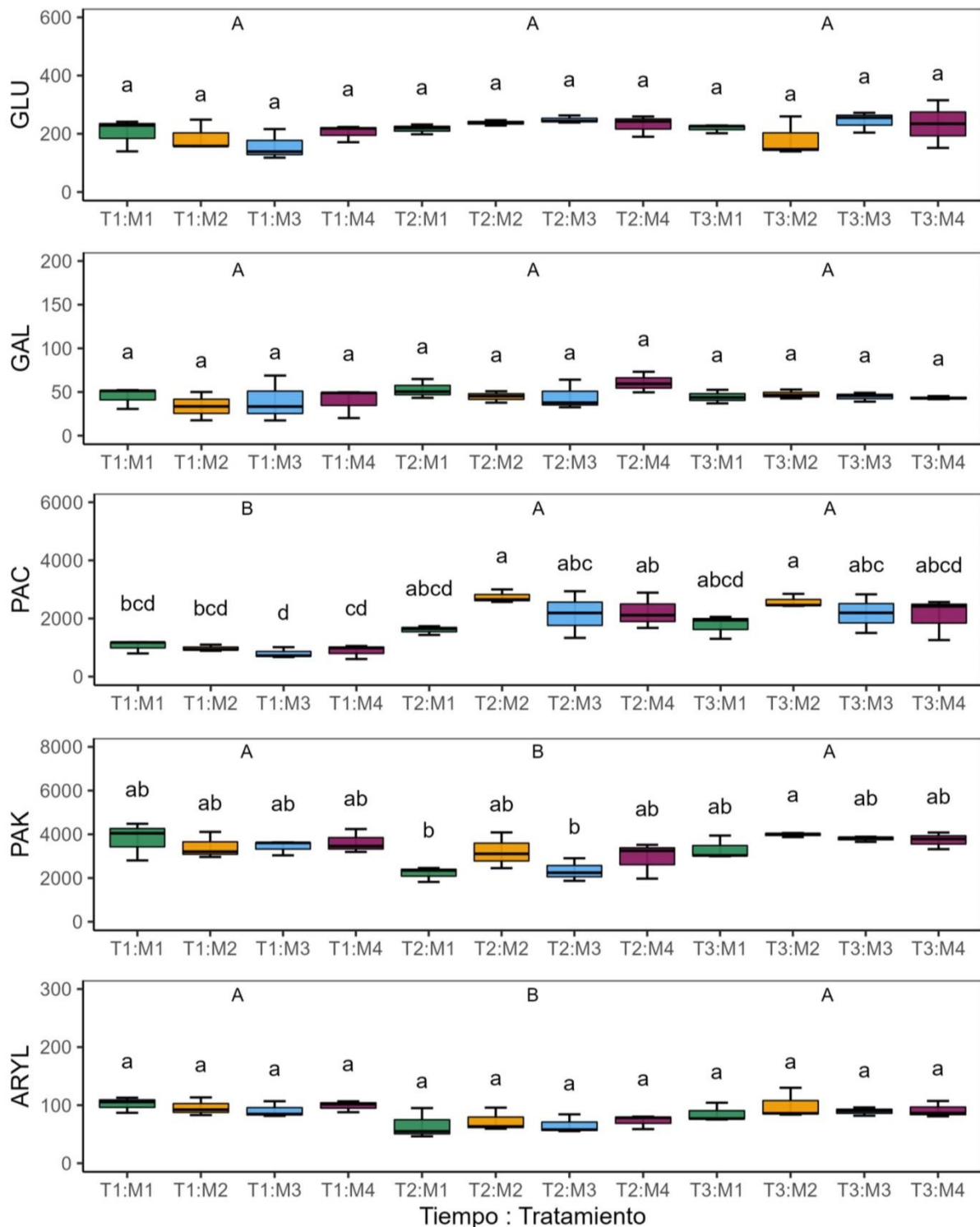
Este aumento en la actividad microbiana también pudo verse reflejado en el COS, que aumentó significativamente en todos los tratamientos después de la biodesinfección y del cultivo posterior (Figura 6.11). Este incremento fue, probablemente, fruto de la elevada tasa de degradación de la materia orgánica incorporada. Por el contrario, el CBM no experimentó un aumento significativo hasta el final del ensayo (Figura 6.11). Esto indicaría la recuperación y mejora de las poblaciones microbianas pasadas unas semanas de la biodesinfección y tras la implantación del cultivo. Este crecimiento microbiano pudo favorecer la continuidad en la movilización de nutrientes pasada la biodesinfección, que explicaría los valores altos de COS una vez cosechado el cultivo.



**Figura 6.11** | Carbono orgánico soluble (COS) y de la biomasa microbiana (CBM) medido en el suelo de las parcelas biodesinfectadas con los cuatro tratamientos (M1, M2, M3, M4) antes de la biodesinfección (T1), después (T2) y tras cosechar el primer cultivo una vez realizada la biodesinfección (T3). Las letras minúsculas indican las diferencias entre la combinación de tiempo y tratamiento y las mayúsculas entre los tiempos.

Entre las variables biológicas, las actividades enzimáticas también están reconocidas como buenos indicadores de actividad. Los microorganismos producen este tipo de enzimas para degradar la materia orgánica, que comienzan transformándola en compuestos cada vez más sencillos (humificación) hasta generar moléculas inorgánicas (mineralización) asimilables por las plantas. En este ensayo, no se encontraron diferencias estadísticas entre tratamientos en ninguno de los tiempos pero sí entre tiempos en algunas de las actividades medidas (Figura 6.12). La GLU y GAL fueron las únicas que no experimentaron cambios significativos entre los diferentes tiempos, aunque se observó un ligero aumento en los valores medios de GLU al finalizar la biodesinfección. La PAC fue la única actividad enzimática medida que aumentó significativamente tras la biodesinfección y se mantuvo con valores similares hasta cosechar el cultivo siguiente. En cambio, los valores de PAK y ARYL fueron significativamente más bajos después de la biodesinfección en todos los tratamientos, aunque estos valores se recuperan al final del ensayo. Esta diferencia entre las fosfatasas se podría explicar por las condiciones generadas en la biodesinfección que tienen asociada la bajada del pH habiendo favorecido las poblaciones acidófilas en detrimento de las basófilas. Aunque no fueron diferencias significativas, los valores medios de la PAC parecieron mostrar una tendencia creciente en M2, tanto tras la biodesinfección como después del cultivo.

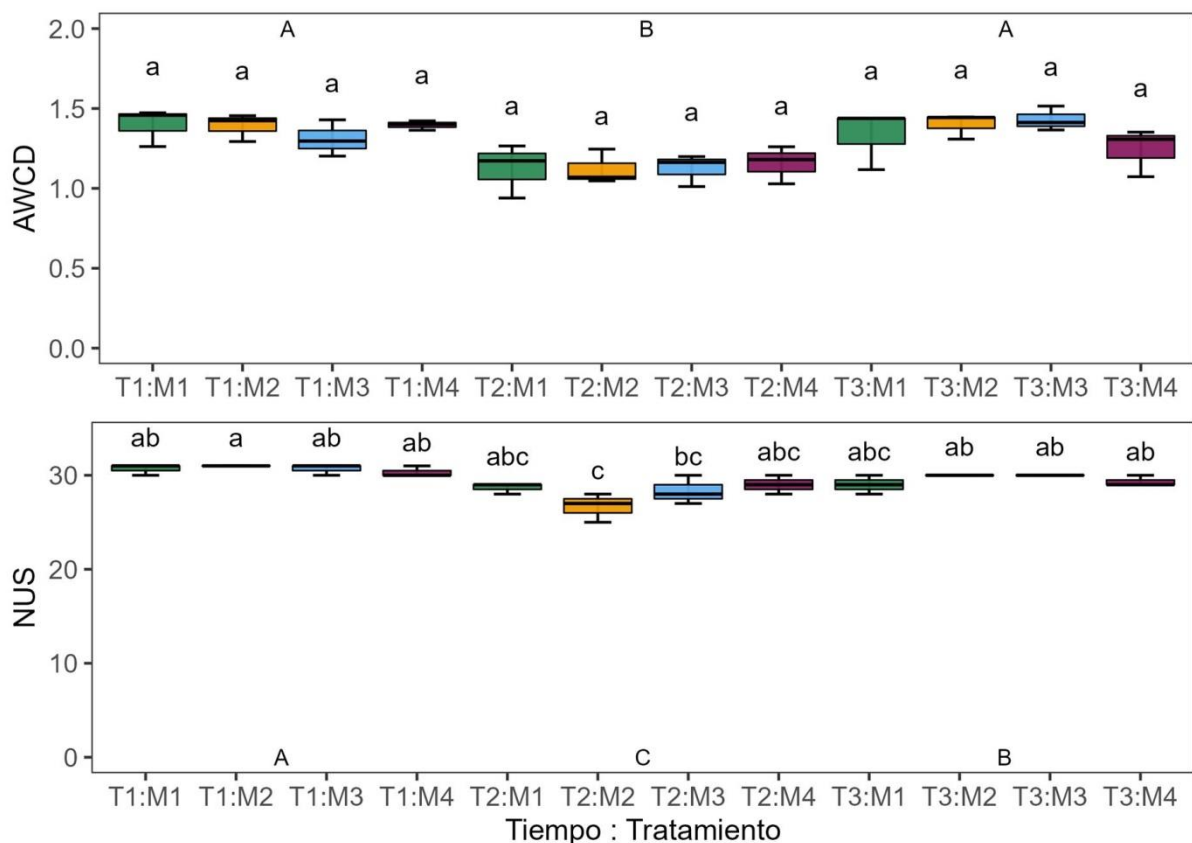




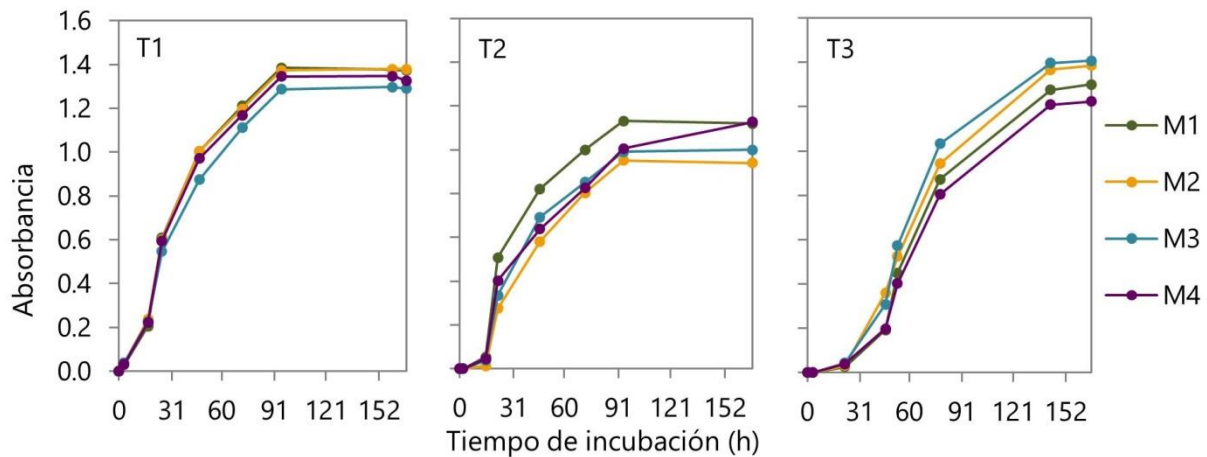
**Figura 6.12 |** Actividades enzimáticas (GLU: glucosidasa; GAL: galactosidasa; PAC: fosfatasa ácida; PAK: fosfatasa alcalina; ARYL: arilsulfatasa) medidas en las parcelas biodesinfectadas con los tratamientos (M1, M2, M3, M4) antes (T1), después (T2) del tratamiento y tras cosechar el cultivo siguiente (T3). Valores están expresados en nmolPNP/g/min (PNP: para-nitrofenol). Las letras minúsculas indican las diferencias entre las combinaciones de tiempo y tratamiento y las mayúsculas entre los tiempos.

La producción de PAC se atribuye a los procesos de mineralización del P orgánico (Boroujeni, et al., 2021). El P está presente en el suelo en forma orgánica e inorgánica, siendo la fracción inorgánica la mayoritaria, entre el 35-70% del P total, y varía en función del

material de origen del suelo. Sin embargo, en su mayoría son fosfatos insolubles y, por lo tanto, no asimilables por las plantas hasta que son movilizados. El resto de la proporción del P total se encuentra en residuos de plantas y animales en formas no disponibles hasta que se mineralizan por la acción de los microorganismos mediante procesos enzimáticos, esenciales para el correcto funcionamiento de las dinámicas del suelo (Rawat et al., 2021; Manzoor et al., 2022). La cantidad y naturaleza de materia orgánica junto con los organismos presentes en el suelo influyen en la producción de enzimas (Chettri et al., 2021). Por lo tanto, el aumento de los valores de PAC tras la biodesinfección pudo estar relacionado con procesos de mineralización del P orgánico incorporado con las enmiendas. Estos resultados se corresponderían con los valores del P asimilable medido en los suelos después de la biodesinfección que aumentaron significativamente salvo en M2. Esta menor disponibilidad del P pudo ser la razón del mayor incremento de PAC en este tratamiento, lo que podría provocar una mayor mineralización del P más adelante.



**Figura 6.13** | Resultados de placas Biolog EcoPlates™ del desarrollo medio de color por pocillo (AWCD) y del número de sustratos usados (NUS). Datos de las parcelas biodesinfectadas con los cuatro tratamientos (M1, M2, M3, M4) antes de la biodesinfección (T1), después (T2) y tras cosechar el siguiente cultivo (T3). Las letras minúsculas indican las diferencias entre la combinación de tiempo y tratamiento y las mayúsculas las diferencias entre tiempos.



**Figura 6.14** | Desarrollo de absorbancia (592nm) media del conjunto de sustratos durante el tiempo de incubación de las placas Biolog EcoPlates™ de muestras de suelo tomadas de las parcelas biodesinfectadas con los cuatro tratamientos (M1, M2, M3, M4) antes del tratamiento (T1), después (T2) y tras cosechar el primer cultivo después del tratamiento (T3).

La información sobre la actividad microbiana generada durante la biodesinfección, fue complementada con los resultados obtenidos con las placas Biolog EcoPlates™ que se traduce en la capacidad degradadora de la población de bacterias heterótrofas. En todos los tratamientos, los valores de AWCD y NUS disminuyeron significativamente después de la biodesinfección (Figura 6.13) con diferencia estadística del NUS en el tratamiento M2 antes y después del tratamiento. Mientras que los valores de AWCD se recuperaron después del cultivo, los valores del NUS aumentaron ligeramente pero se mantuvieron significativamente más bajos que al comienzo. Por otro lado, considerando la evolución de la actividad en el conjunto de sustratos, pudo verse que la tasa de consumo fue similar al inicial pero con valores de absorbancia más bajos (Figura 6.14) seguramente debido a la disminución del NUS. Después del cultivo, la actividad se ralentizó pero al finalizar la incubación se alcanzaron valores similares a los del inicio del ensayo, sobre todo en los tratamientos M2 y M3. De nuevo, a pesar del impacto inicial en parte de la población, ésta tendió a la recuperación. Esta afección en parte de estas poblaciones por la biodesinfección pudo observarse en los índices de diversidad y riqueza calculados. Al finalizar la biodesinfección, la diversidad disminuyó significativamente, especialmente en M2 (Tabla 6.6). Mientras que la riqueza se mantuvo estable y no fue hasta cosechado el cultivo cuando se observó una bajada significativa. Esto implicaría que ciertas poblaciones pudieron verse favorecidas frente a otras como se viene planteando.

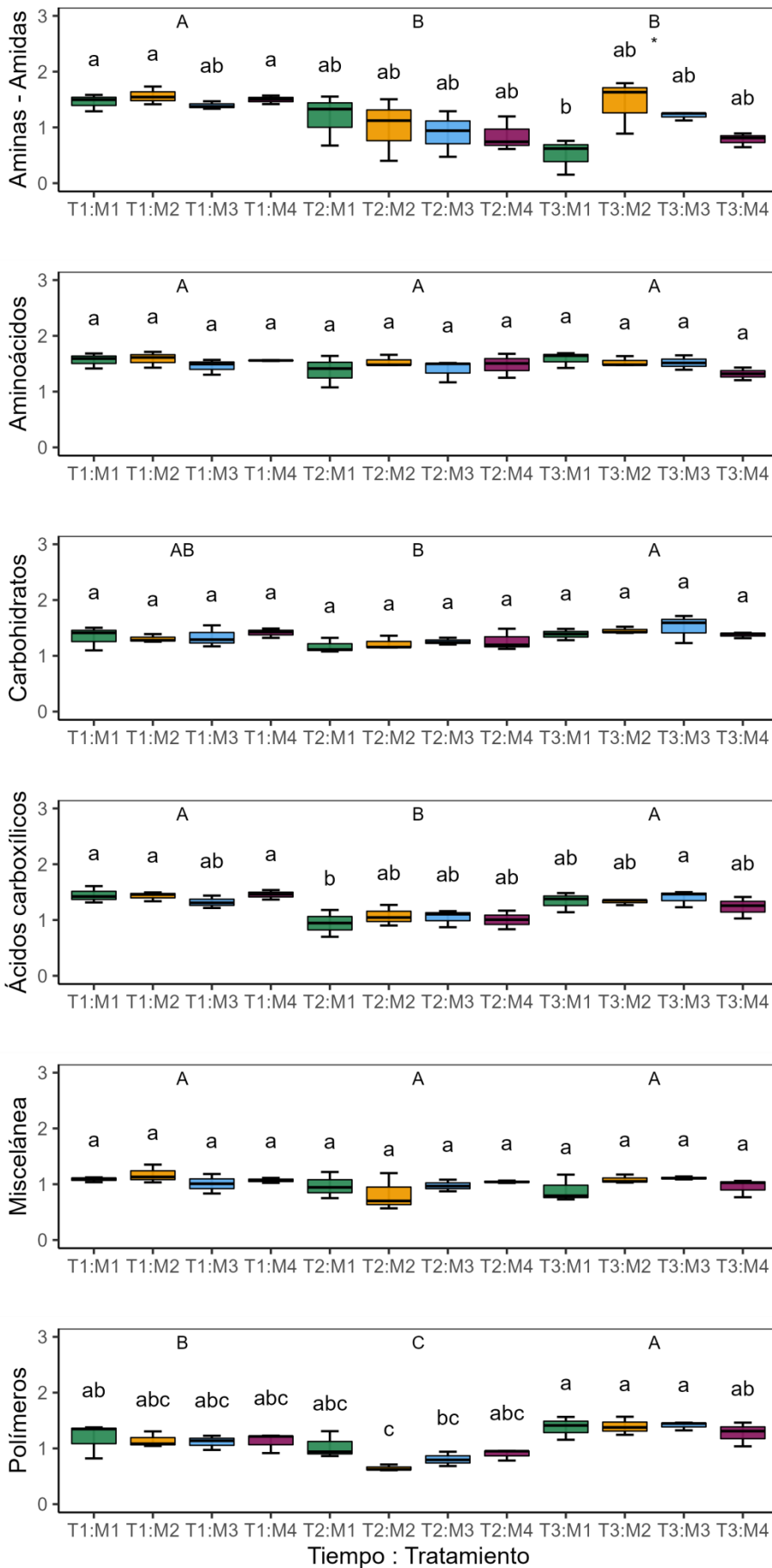
Para profundizar en este análisis también se evaluó la absorbancia media de los grupos de sustratos. Efectivamente, la diversidad después de la biodesinfección se redujo porque varias de las poblaciones se vieron resentidas como las degradadoras de aminas-amidas, ácidos carboxílicos y polímeros (Figura 6.15). En todos los tratamientos las absorbancias en estos sustratos disminuyeron significativamente tras la biodesinfección por lo que parte de estas poblaciones se vieron afectadas negativamente. Esto explicaría la disminución significativa del índice de diversidad después de la biodesinfección. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el ensayo del capítulo anterior, en el que también

fueron estas poblaciones las más afectadas. Una vez cosechado el cultivo siguiente a la biodesinfección, la mayoría de valores se recuperaron, incluso las poblaciones degradadoras de los polímeros aumentaron significativamente respecto al inicio del ensayo. Los polímeros son fuentes recalcitrantes de C por lo que los microbios descomponedores de este tipo de sustratos podrían haberse visto favorecidos por las enmiendas aportadas, promoviendo su actividad degradadora y haciéndola más eficiente (Zhao et al., 2020).

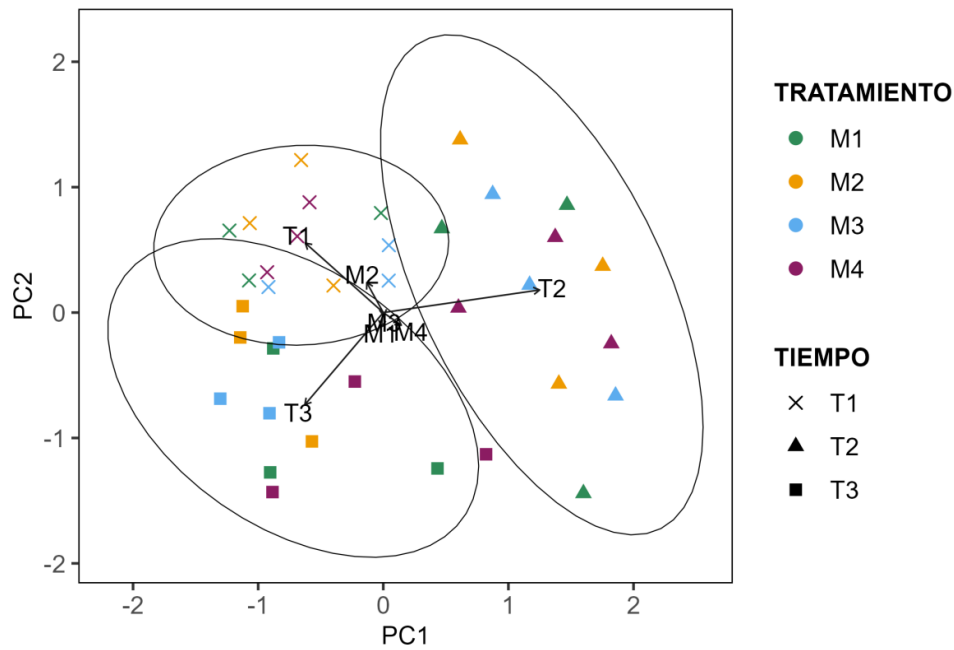
**Tabla 6.6** | Índices de diversidad (Shannon) y riqueza (Chao) en función de las absorbancias máximas de los 31 sustratos de las placas Biolog EcoPlates™. Valor promedio y error estándar (EE) de las parcelas biodesinfectadas con los cuatro tratamientos (M1, M2, M3, M4) antes del tratamiento (T1), después (T2) y tras cosechar el primer cultivo después del tratamiento (T3). Las letras minúsculas indican las diferencias entre la combinación de tiempo y tratamiento y las mayúsculas entre tiempos.

Tiempo	Tratamiento	DIVERSIDAD			RIQUEZA				
		media	EE		media	EE			
T1	M1	3.38	0.01	ab	A	31.0	0.0	a	A
	M2	3.38	0.01	a		31.0	0.0	a	
	M3	3.38	0.00	ab		31.0	0.0	a	
	M4	3.38	0.01	a		31.0	0.0	a	
T2	M1	3.31	0,01	bcd	B	30.3	0.3	ab	A
	M2	3.27	0.03	d		31.0	0.0	a	
	M3	3.31	0.01	cd		31.0	0.0	a	
	M4	3.32	0.01	abcd		31.0	0.0	a	
T3	M1	3.34	0.01	abc	A	30.0	0.6	ab	B
	M2	3.38	0.00	ab		30.7	0.3	a	
	M3	3.37	0.01	abc		30.3	0.3	ab	
	M4	3.35	0.01	abc		29.3	0.3	b	

Es reseñable que los valores de absorbancia de las aminos-amidas no se recuperaron al final del ensayo y se mantuvieron significativamente más bajas, a diferencia del resto de sustratos. Sin embargo, el tratamiento M2 mostró valores de absorbancia media mayores que el resto de tratamientos siendo el único en el que se recuperaron los valores iniciales, que fueron significativamente más altos que M1 ( $P=0,02$ ). Esta fue una de las pocas variables en las que se dieron diferencias estadísticas entre tratamientos. Además, en M2 también disminuyó significativamente la absorbancia de los grupos de polímeros después del tratamiento respecto a los valores iniciales y finales del ensayo. Estas diferencias en M2 pudieron estar, en parte, relacionadas con la separación de este tratamiento del resto en el PCA (Figura 6.16). De igual manera que en la nematofauna, el tratamiento M2 se diferenció hacia el lado opuesto del resto de tratamientos localizados muy próximos entre sí. Este análisis también agrupó de forma clara los diferentes tiempos y no así los tratamientos, quedando el comienzo y el final del ensayo en contraposición con la finalización de la biodesinfección en el PC1. A su vez, en el PC2 quedaron enfrentados el comienzo y el final del ensayo. Con esto se podría suponer que el PC1 (32%) estaría relacionado con la abundancia o diversidad, mientras que el PC2 (18%) podría estar ligado a la actividad, aunque entre los dos componentes solo explican el 50% de la variación, por lo que sería una posible aproximación.



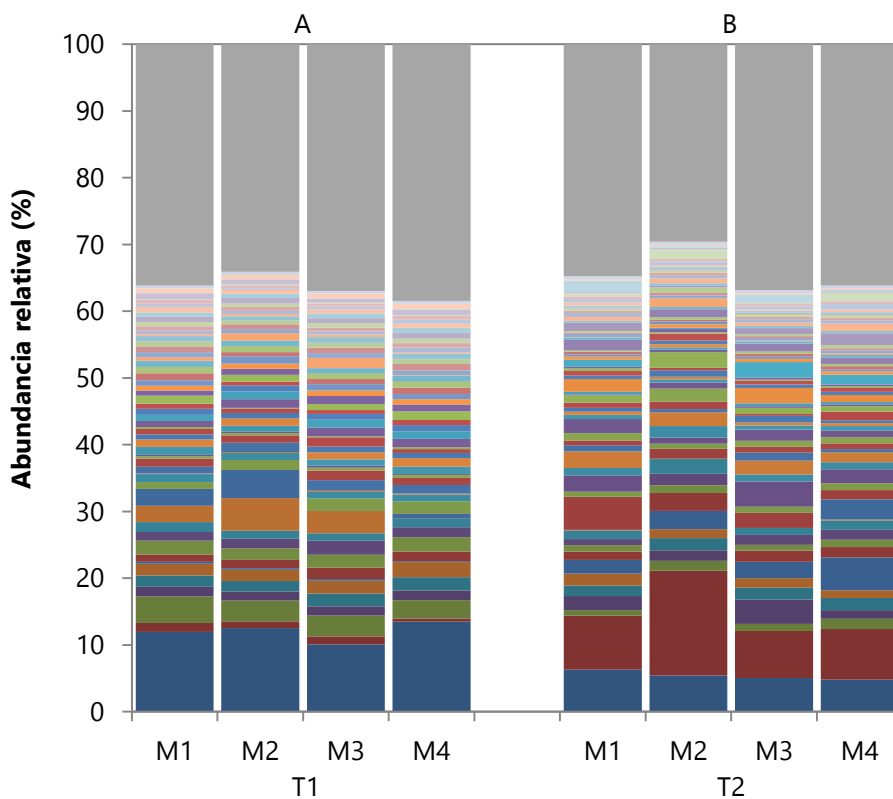
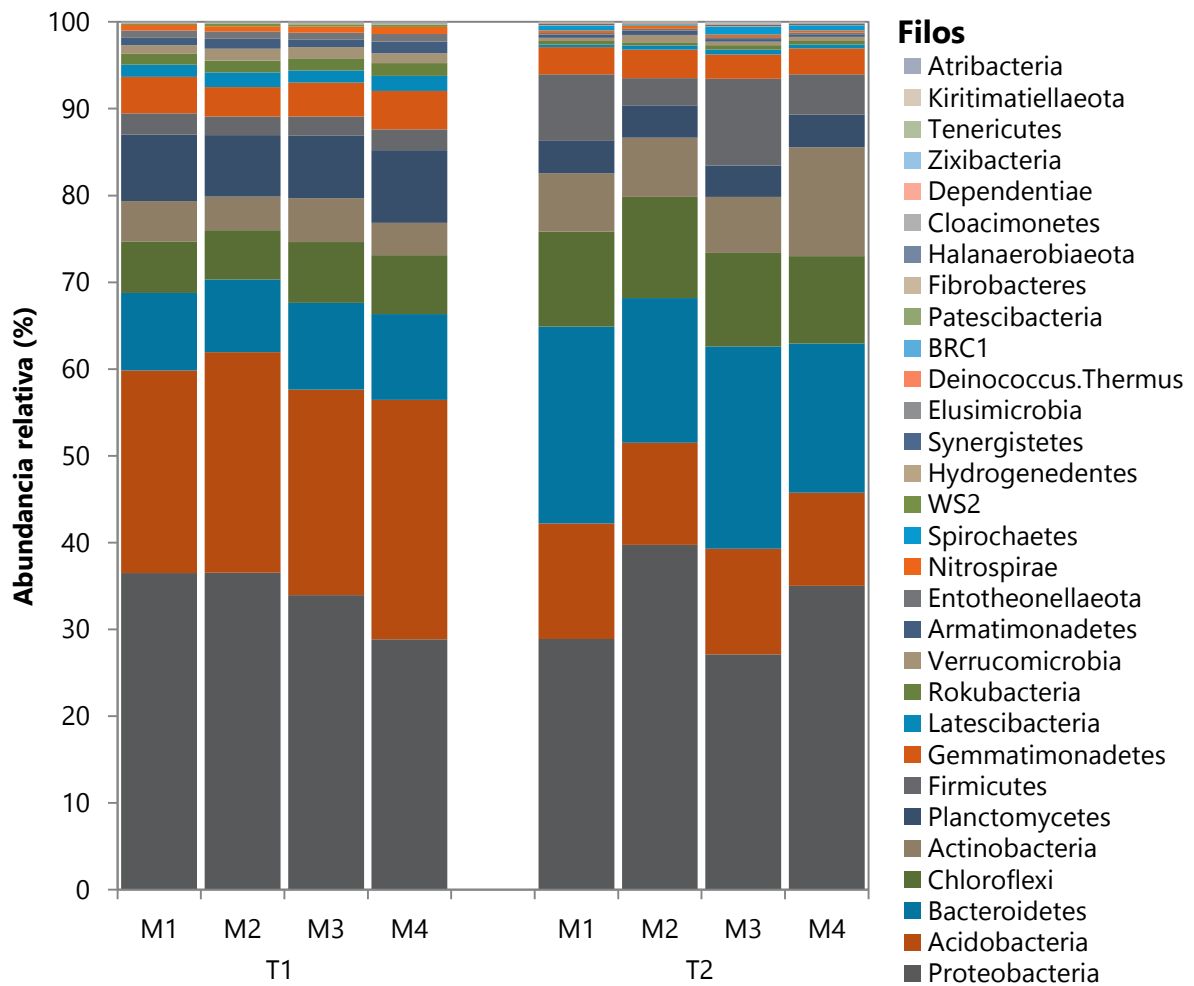
**Figura 6.15** | Absorbancia media de los grupos de sustratos en las placas Biolog EcoPlates™ de los suelos de las parcelas biodesinfectadas con los cuatro tratamientos (M1, M2, M3, M4) antes del tratamiento (T1), después (T2) y tras cosechar el primer cultivo después del tratamiento (T3). Las letras minúsculas indican las diferencias entre las combinaciones de tiempo y tratamiento y las mayúsculas las diferencias entre tiempos. Los asteriscos representan el grado de significación entre tratamientos a cada tiempo ("\*" P<0,05).



**Figura 6.16** | Análisis de componentes principales (PCA: *principal component analysis*) de las absorbancias máximas medidas de los 31 sustratos de las placas Biolog EcoPlates de las muestras de suelo recogidas en las parcelas biodesinfectadas con los cuatro tratamientos (M1, M2, M3, M4) antes del tratamiento (T1), después (T2) y tras cosechar el primer cultivo después del tratamiento (T3). Las elipses indican la agrupación por tiempos para un intervalo de confianza del 95%.

Los datos obtenidos de la secuenciación para identificar las poblaciones edáficas de bacterias y hongos antes y después del tratamiento acabaron de complementar los resultados microbiológicos. En las abundancias relativas de las OTUs identificadas para la población de bacterias se pudo observar la alta similitud de las poblaciones al comienzo del ensayo y cómo cambiaron significativamente en todos los tratamientos tras la biodesinfección también de forma similar, sin diferencias estadísticas entre tratamientos (Figura 6.18). En todos ellos se produjo un aumento de Bacteroidetes y Firmicutes, principalmente, y de Chloroflexi y Actinobacteria de forma menos llamativa. Todos estos son grupos saprófitos que se habrían visto beneficiados por las enmiendas orgánicas de la biodesinfección (Shea et al., 2022).

Firmicutes aumentó notablemente su población en los tratamientos M3 y M1 y en menor medida en M4 y M2. Este grupo de bacterias tienen la capacidad de degradar polisacáridos en condiciones anaerobias, además de producir ácidos durante la degradación que actuarían como biocidas para el patógeno (Fernández-Bayo et al., 2019; Simmons et al., 2016). Bacteroidetes se encargan de la degradación de estructuras recalcitrantes como celulosa, lignina y quitina, mientras que los grupos de Actinobacteria están ligados a la degradación de aminoácidos, ácidos orgánicos y azúcares, estructuras fácilmente degradables (Treseder et al., 2011; Eilers et al., 2010). Por el contrario, las poblaciones de Acidobacteria y Planctomycetes disminuyeron tras la biodesinfección. Acidobacteria son en su mayoría especies oligótrofas que se habrían visto afectadas por la incorporación de materia orgánica como se comprobó en estudios previos (Shea et al., 2022; Li et al., 2021; Achmon et al., 2020).



**Figura 6.18 |** Abundancia relativa (%) de filos (arriba) y OTUs (abajo) 16S, para bacterias, detectados en los suelos de las parcelas con los 4 tratamientos (M1, M2, M3, M4) antes (T1) y después (T2) de la biodesinfección. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tiempos, considerando los datos de las OTUs.



**OTUs 16S**

- Otros (<0.5%)
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.CCD24.
- Proteobacteria\_D2.Deltaproteobacteria\_D3.NB1-j.
- Firmicutes\_D2.Bacilli\_D3.Bacillales\_D4.Bacillaceae\_D5.Fictibacillus
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.PLA13\_Ambiguoustaxa\_Ambiguoustaxa
- Actinobacteria\_D2.Actinobacteria\_D3.Corynebacteriales\_D4.Nocardiaceae\_D5.Rhodococcus
- Planctomycetes\_D2.Planctomycetacia\_D3.Pirellulales\_D4.Pirellulaceae\_D5.uncultured
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.Xanthomonadales\_D4.Xanthomonadaceae\_D5.Luteimonas
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.Betaproteobacteriales\_D4.Burkholderiaceae
- Nitrospirae\_D2.Nitrospira\_D3.Nitrospirales\_D4.Nitrospiraceae\_D5.Nitrospira
- Entotheonellaeota\_D2.Entotheonellia\_D3.Entotheonellales\_D4.Entotheonellaceae\_D5.unculturedbacterium
- Proteobacteria\_D2.Alphaproteobacteria\_D3.Rhizobiales\_D4.Methyloligellaceae\_D5.uncultured
- Proteobacteria\_D2.Alphaproteobacteria\_D3.uncultured.
- Gemmatimonadetes\_D2.AKAU4049\_Ambiguoustaxa\_Ambiguoustaxa\_Ambiguoustaxa
- Proteobacteria\_D2.Alphaproteobacteria\_D3.Rhizobiales\_D4.Rhizobiaceae\_D5.Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium
- Gemmatimonadetes\_D2.Gemmatimonadetes\_D3.Gemmatimonadales\_D4.Gemmatimonadaceae
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.Betaproteobacteriales\_D4.Burkholderiaceae\_D5.Hydrogenophaga
- Proteobacteria\_D2.Alphaproteobacteria\_D3.Dongiiales\_D4.Dongiaceae\_D5.Dongia
- Planctomycetes\_D2.Planctomycetacia\_D3.Pirellulales\_D4.Pirellulaceae\_D5.Pirellula
- Acidobacteria\_D2.Blastocatellia(Subgroup4)\_D3.Blastocatellales\_D4.Blastocatellaceae\_D5.uncultured
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.Betaproteobacteriales\_D4.Burkholderiaceae\_D5.Cupriavidus
- Proteobacteria\_D2.Alphaproteobacteria\_D3.Rhizobiales\_D4.Hyphomicrobiaceae\_D5.Pedomicrobium
- Chloroflexi\_D2.Anaerolineae\_D3.SBR1031\_Ambiguoustaxa\_Ambiguoustaxa
- Proteobacteria\_D2.Deltaproteobacteria.
- Proteobacteria\_D2.Alphaproteobacteria\_D3.Rhizobiales\_D4.Rhodomicrobiaceae\_D5.Rhodomicrobium
- Acidobacteria\_D2.Subgroup6\_D3.unculturedmicroorganism\_D4.unculturedmicroorganism\_D5.unculturedmicroorganism
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.Betaproteobacteriales\_D4.Nitrosomonadaceae\_D5.MND1
- Bacteroidetes\_D2.Bacteroidia\_D3.Bacteroidales\_D4.Marinilabiliaceae\_D5.Ruminofilibacter
- Bacteroidetes\_D2.Bacteroidia\_D3.Chitinophagales\_D4.Chitinophagaceae
- Bacteroidetes\_D2.Bacteroidia\_D3.Cytophagales\_D4.Microscillaceae
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.GammaproteobacterialincertaeSedis\_D4.UnknownFamily\_D5.Acidibacter
- Proteobacteria\_D2.Deltaproteobacteria\_D3.Myxococcales\_D4.bacteriap25
- Bacteroidetes\_D2.Bacteroidia\_D3.Bacteroidales\_D4.SB-5\_D5.unculturedbacterium
- Acidobacteria\_D2.Subgroup5.
- Acidobacteria\_D2.Blastocatellia(Subgroup4)\_D3.Pyrinomonadales\_D4.Pyrinomonadaceae\_D5.RB41
- Bacteroidetes\_D2.Bacteroidia\_D3.Cytophagales\_D4.Microscillaceae\_D5.Chryseolinea
- Actinobacteria\_D2.Actinobacteria\_D3.Micrococcales\_D4.Micrococcaceae
- Bacteroidetes\_D2.Bacteroidia\_D3.Chitinophagales\_D4.Chitinophagaceae\_D5.uncultured
- Planctomycetes\_D2.Phycisphaerae\_D3.Tepidisphaerales\_D4.WD2101soilgroup\_D5.unculturedbacterium
- Planctomycetes\_D2.Planctomycetacia\_D3.Pirellulales\_D4.Pirellulaceae\_D5.Pir4lineage
- Bacteroidetes\_D2.Bacteroidia\_D3.Chitinophagales\_D4.Chitinophagaceae\_D5.Flavisolibacter
- Bacteroidetes\_D2.Bacteroidia\_D3.Chitinophagales\_D4.Chitinophagaceae\_D5.Niastella
- Proteobacteria\_D2.Alphaproteobacteria\_D3.Sphingomonadales\_D4.Sphingomonadaceae\_D5.Sphingomonas
- Acidobacteria\_D2.Thermoanaerobaculia\_D3.Thermoanaerobaculales\_D4.Thermoanaerobaculaceae\_D5.Subgroup10
- Chloroflexi\_D2.Anaerolineae\_D3.Anaerolineales\_D4.Anaerolineaceae\_D5.uncultured
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.Steroidobacteriales\_D4.Steroidobacteraceae\_D5.Steroidobacter
- Bacteroidetes\_D2.Bacteroidia\_D3.Bacteroidales\_D4.BacteroidetesvadinHA17
- Acidobacteria\_D2.Holophagae\_D3.Subgroup7.
- Bacteroidetes\_D2.Rhodothermia\_D3.Rhodothermales\_D4.Rhodothermaceae\_D5.uncultured
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.Pseudomonadales\_D4.Pseudomonadaceae\_D5.Azotobacter
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.Pseudomonadales\_D4.Moraxellaceae\_D5.Acinetobacter
- Bacteroidetes\_D2.Bacteroidia\_D3.Cytophagales\_D4.Microscillaceae\_D5.uncultured
- Bacteroidetes\_D2.Bacteroidia\_D3.Chitinophagales\_D4.Chitinophagaceae\_D5.Terrimonas
- Gemmatimonadetes\_D2.Gemmatimonadetes\_D3.Gemmatimonadales\_D4.Gemmatimonadaceae\_D5.uncultured
- Chloroflexi\_D2.Anaerolineae\_D3.SBR1031\_D4.A4b\_D5.unculturedbacterium
- Actinobacteria\_D2.Actinobacteria\_D3.Streptomyces\_D4.Streptomyces\_D5.Streptomyces
- Acidobacteria\_D2.Acidobacteriia\_D3.Solibacteriales\_D4.Solibacteraceae(Subgroup3)\_D5.Bryobacter
- Chloroflexi\_D2.Anaerolineae\_D3.Anaerolineales\_D4.Anaerolineaceae\_D5.UTCFX1
- Firmicutes\_D2.Bacilli\_D3.Bacillales\_D4.Bacillaceae\_D5.Bacillus
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.Xanthomonadales\_D4.Xanthomonadaceae\_D5.Lysobacter
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.Pseudomonadales\_D4.Pseudomonadaceae\_D5.Pseudomonas
- Acidobacteria\_D2.Subgroup6

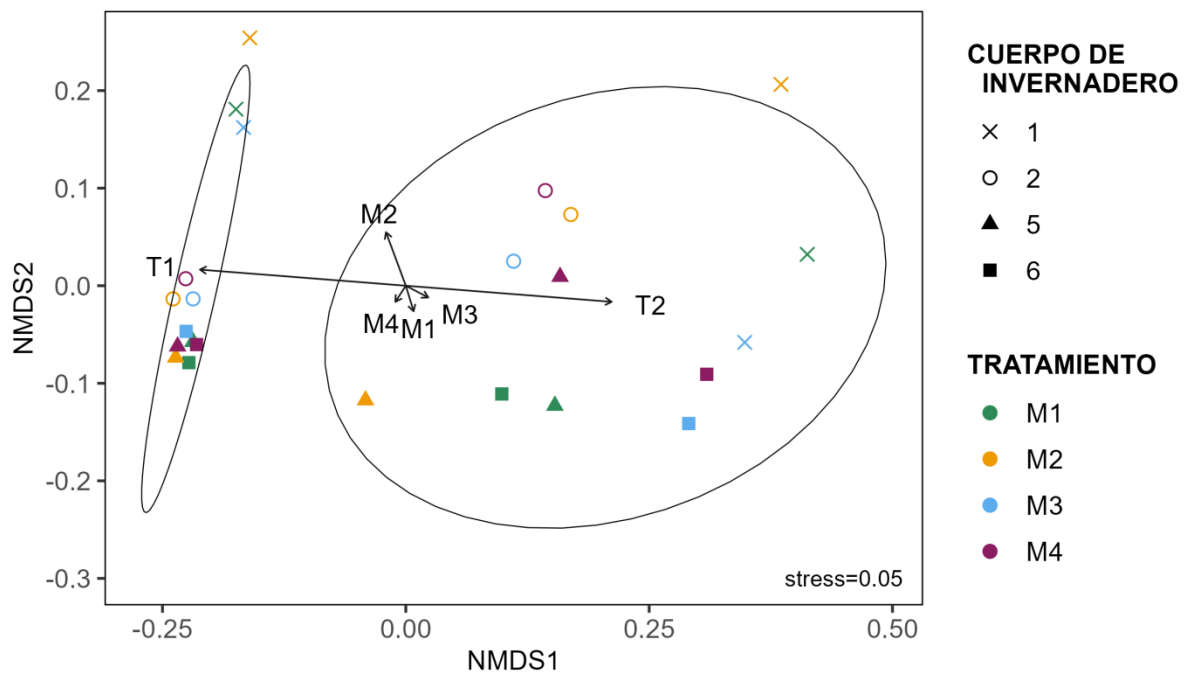
Entre los grupos favorecidos por la biodesinfección, dentro del filo Actinobacteria, el género *Streptomyces* fue el que más aumentó en todos los tratamientos tras la biodesinfección, apenas presente al cominezo del enzayo (<0,3%). El incremento fue llamativo en M4, en el que aumentó en casi un 5%, mientras que en M1 fue en el que menos se desarrolló (2,1%). Algunas especies de *Streptomyces* están reconocidas como promotoras en la formación de humus, vitaminas, antibióticos y biopesticidas (Tiwari et al., 2021; Shea et al., 2022). Dentro de Firmicutes, *Bacillus*, *Fictibacillus* y *Paenibacillus* fueron los géneros que más aumentaron en todos los tratamientos. De entre ellos, el incremento más claro se dio en las especies de *Bacillus* en el tratamiento M3 que pasó de representar el 1,4% al 3,6%. En el caso de Proteobacterias, el efecto de la biodesinfección no fue tan claro, mientras que aumentaron ligeramente en M2 y M4, disminuyeron en M1 y M3. Dentro de este filo, las especies del género *Pseudomonas* fueron las más favorecidas en todos los tratamientos, especialmente en M2. Este cambio fue uno de los más destacados dentro de la población de bacterias, al pasar de una abundancia inicial cercana al 1% en todos los tratamientos a representar entre un 7-8% después de la biodesinfección, siendo llamativo el caso de M2 con una población cercana al 16%.

**Tabla 6.7** | Índices de diversidad (Shannon) y riqueza (Chao) de la población de bacterias según los datos de abundancia relativa de OTUs 16S. Valor medio y error estándar (EE) de las parcelas biodesinfectadas con los cuatro tratamientos (M1, M2, M3, M4) antes (T1) y después (T2) de la biodesinfección. Las letras minúsculas indican las diferencias entre las combinaciones de tiempo y tratamiento y las mayúsculas las diferencias entre tiempos.

Tiempo	Tratamiento	DIVERSIDAD			RIQUEZA		
		media	EE		media	EE	
T1	M1	4.4	0.1	a	226.7	1.2	b
	M2	4.3	0.1	a	223.3	0.9	b
	M3	4.5	0.1	a	224.7	2.6	b
	M4	4.5	0.0	a	222.7	1.8	b
T2	M1	4.4	0.2	a	238.7	1.5	a
	M2	4.1	0.3	a	237.7	1.7	a
	M3	4.5	0.1	a	235.7	2.4	a
	M4	4.5	0.1	a	240.3	1.3	a

Varias de las especies de *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces* están reconocidas como bioestimulantes y con capacidad para el control de patógenos hasta el punto que, actualmente, algunas de ellas se comercializan para tales fines. Diferentes especies pertenecientes a estos géneros podrían solubilizar P y K, mejorar la fijación de N y producir hormonas reguladoras del crecimiento de las plantas (Rawat et al., 2021). También tienen la capacidad de producir sideróforos que contribuyen en la liberación del Fe haciéndolo disponible. El Fe es un elemento esencial para todos los organismos vivos y en presencia de oxígeno se encuentra presente, principalmente, como ion férrico ( $Fe^{3+}$ ) generando hidróxidos y oxidróxidos de Fe que son insolubles, esto es, en forma no disponible. Las plantas son capaces de reconocer los complejos Fe-sideróforo microbianos y captarlos como forma de obtención del Fe. Además, la producción eficiente de sideróforos por parte de estos

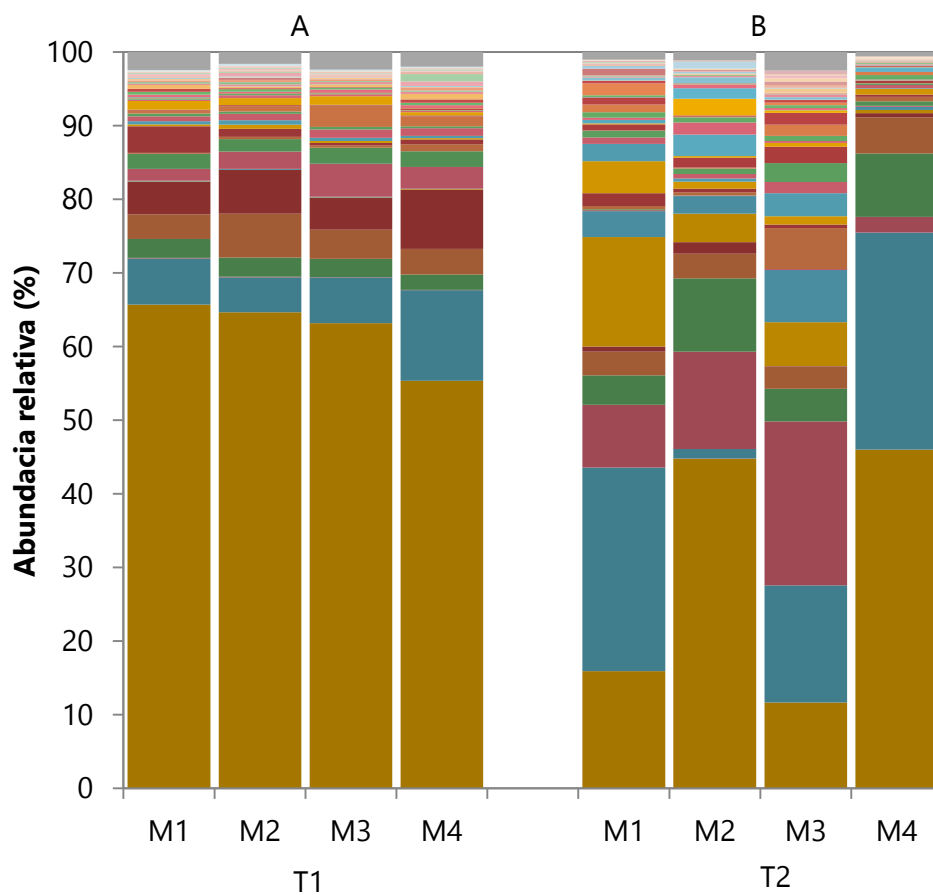
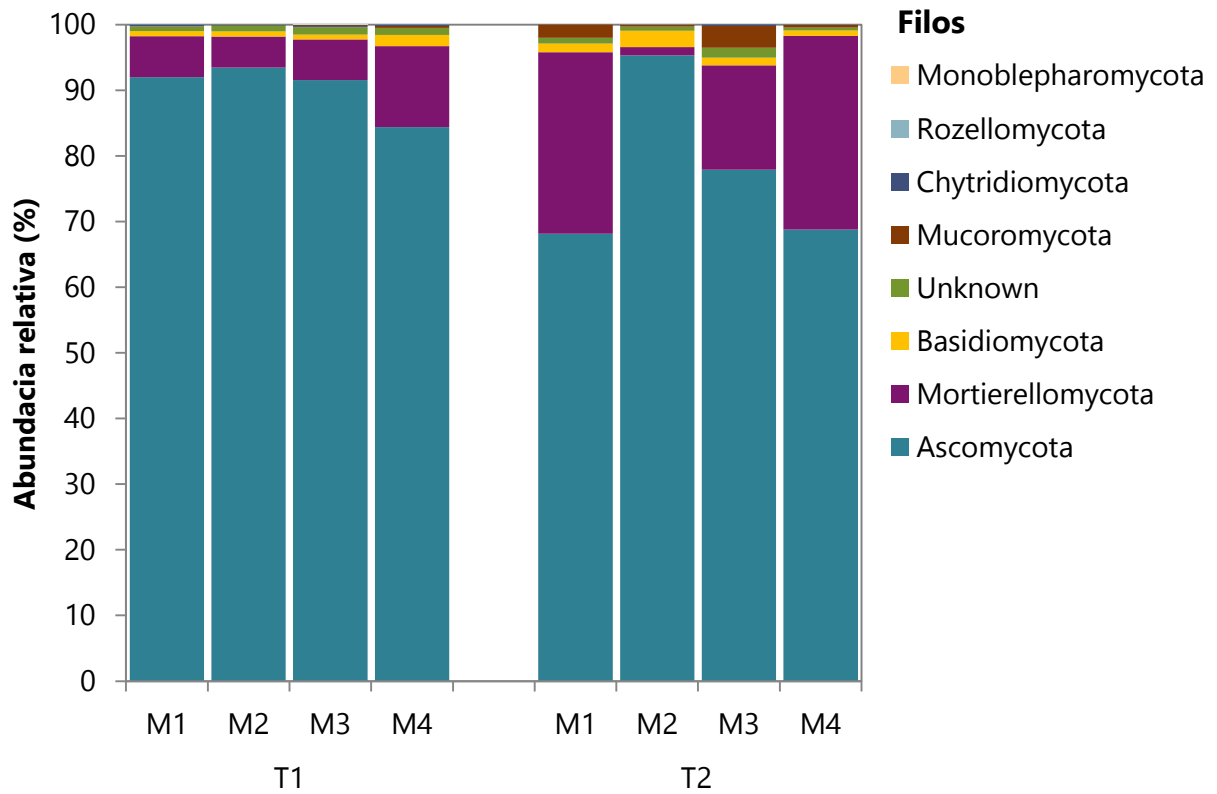
microorganismos limita la toma de Fe a los patógenos que no lo hacen tan eficientemente, lo que dificulta su proliferación (Beneduzi et al., 2012). No solo eso, sino que muchas de estas especies, sobretodo de *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp, también tienen la capacidad de producir cianuro de hidrógeno (HCN). Este es un compuesto biocida para los patógenos que no causa daño a las plantas y que podría actuar de forma sinérgica con los antibióticos, también generados por estos organismos, en la supresión de los patógenos (Salimi y Hamedi, 2021).



**Figura 6.19** | Análisis NMDS (*non-metric multidimensional scaling*) de las poblaciones de bacterias presentes en las parcelas biodesinfectadas con los cuatro tratamientos (M1, M2, M3, M4) antes (T1) y después (T2) del tratamiento) según los valores de abundancia relativa de OTUs. Se simboliza el número de cuerpo de invernadero en el que se localiza cada muestra. Las elipses indican la agrupación por tiempos para un intervalo de confianza del 95%.

Estudios recientes apuntan que la abundancia de grupos saprofitos más que el aumento en diversidad podría ser un importante mecanismo de supresividad (Shea et al., 2022). En este ensayo, la diversidad no mostró diferencias estadísticas entre tiempos a diferencia de la riqueza que aumentó significativamente en todos los tratamientos de forma muy similar (Tabla 6.7). Esto indicaría que se produjo un incremento en el número de especies tras la biodesinfección, que también podría explicar las diferencias significativas entre tiempos. En el NMDS también se pudo observar una muy clara agrupación por tiempos, con un valor de estrés óptimo ( $<0,1$ ) (Figura 6.19). Las muestras del comienzo se localizaron en los valores negativos del NMDS, mientras que tras la biodesinfección todas se distribuyeron por los valores positivos. Ante esta clara separación, para esta gráfica se decidió diferenciar el cuerpo de invernadero en el que se encontraba cada parcela a fin de detectar posibles efectos debidos al manejo. Efectivamente, se pudo observar mayor cercanía por cuerpo de invernadero que por tratamiento en ambos tiempos. De nuevo, en este tipo de análisis la población de bacterias del tratamiento M2 se volvió a diferenciar del resto al

ubicarse en los valores positivos del NMDS2, frente al resto que se agruparon en los valores negativos.



## OTUs ITS

- Otros (<0.1%)
- Ascomycota\_c.Pezizomycetes\_o.Pezizales\_f.Pyronemataceae\_g.Pseudaleuria
- Ascomycota\_c.Leotiomycetes\_o.Thelebolales\_f.Pseudeurotiaceae\_g.Pseudogymnoascus
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Sordariales\_f.Chaetomiaceae\_g.Melanocarpus
- Ascomycota\_c.Pezizomycetes\_o.Pezizales\_f.Ascodesmidaceae\_g.Cephalophora
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Microascales\_f.Microascaceae
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Microascales\_f.Microascaceae\_g.Lophotrichus
- Basidiomycota\_c.Agaricomycetes\_o.Agaricales\_f.Bolbitiaceae\_g.Conocybe
- Ascomycota\_c.Eurotiomycetes\_o.Eurotiales\_f.Trichocomaceae\_g.Thermomyces
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Hypocreales\_f.Hypocreales\_fam\_Incertae\_sedis\_g.Emericellopsis
- Ascomycota
- Basidiomycota\_c.Agaricomycetes
- Ascomycota\_c.Pezizomycetes\_o.Pezizales\_f.Pezizaceae\_g.Peziza
- Ascomycota\_c.Dotheomycetes\_o.Pleosporales\_f.Sporormiaceae\_g.Preussia
- Ascomycota\_c.Pezizomycetes\_o.Pezizales\_f.Pyronemataceae\_g.unidentified
- Ascomycota\_c.Dotheomycetes\_o.Pleosporales\_f.Leptosphaeriaceae
- Ascomycota\_c.Eurotiomycetes\_o.Onygenales\_f.unidentified\_g.unidentified
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Sordariales\_f.Chaetomiaceae\_g.Botryotrichum
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Hypocreales\_f.Stachybotryaceae\_g.Stachybotrys
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Sordariales\_f.Sordariales\_fam\_Incertae\_sedis\_g.Madurella
- Ascomycota\_c.Dotheomycetes\_o.Capnodiales\_f.Cladosporiaceae\_g.Cladosporium
- Basidiomycota\_c.Agaricomycetes\_o.Geastrales\_f.Geastraceae\_g.Geastrum
- Ascomycota\_c.Dotheomycetes\_o.Pleosporales\_f.Sporormiaceae\_g.Westerdykella
- Ascomycota\_c.Eurotiomycetes\_o.Onygenales\_f.Onygenales\_fam\_Incertae\_sedis\_g.Chrysosporium
- Ascomycota\_c.Dotheomycetes\_o.Capnodiales
- Ascomycota\_c.Dotheomycetes\_o.Pleosporales\_f.Pleosporaceae\_g.Alternaria
- Ascomycota\_c.Dotheomycetes\_o.Pleosporales\_f.Pleosporaceae\_g.Curvularia
- Mucoromycota\_c.Mucoromycetes\_o.Mucorales\_f.Rhizopodaceae\_g.Rhizopus
- Mucoromycota\_c.Mucoromycetes\_o.Mucorales\_f.Mucoraceae\_g.Actinomucor
- Basidiomycota\_c.Agaricomycetes\_o.Agaricales\_f.Psathyrellaceae\_g.Coprinopsis
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Microascales\_f.Microascaceae\_g.Kernia
- Ascomycota\_c.Dotheomycetes\_o.Pleosporales\_f.Didymellaceae\_g.Epicoccum
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Glomerellales\_f.Plectosphaerellaceae\_g.Gibellulopsis
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Sordariales
- Ascomycota\_c.Pezizomycetes\_o.Pezizales\_f.Pyronemataceae\_g.Trichophaeopsis
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Sordariales\_f.Sordariales\_fam\_Incertae\_sedis\_g.Remersonia
- Desconocido
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Sordariales\_f.Lasiochaetaceae\_g.Cladorrhinum
- Ascomycota\_c.Dotheomycetes\_o.Pleosporales\_f.Didymellaceae
- Ascomycota\_c.Leotiomycetes\_o.Thelebolales\_f.Pseudeurotiaceae\_g.Pseudeurotium
- Ascomycota\_c.Pezizomycetes\_o.Pezizales\_f.Ascobolaceae\_g.Ascobolus
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Hypocreales\_f.Nectriaceae
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Glomerellales\_f.Plectosphaerellaceae\_g.Plectosphaerella
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Microascales\_f.Microascaceae\_g.Scedosporium
- Ascomycota\_c.Eurotiomycetes\_o.Eurotiales\_f.Aspergillaceae\_g.Aspergillus
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Hypocreales\_f.Nectriaceae\_g.Gibberella
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Sordariales\_f.Chaetomiaceae\_g.Zopfiella
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Sordariales\_f.Chaetomiaceae
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Sordariales\_f.Chaetomiaceae\_g.Mycothermus
- Mortierellomycota\_c.Mortierellomycetes\_o.Mortierellales\_f.Mortierellaceae\_g.Mortierella
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Hypocreales\_f.Nectriaceae\_g.Fusarium

**Figura 6.20 |** Abundancia relativa (%) de filos y OTUs ITS, para hongos, detectados en los suelos de las parcelas con los 4 tratamientos (M1, M2, M3, M4) antes (T1) y después (T2) de la biodesinfección. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tiempos, considerando los datos de las OTUs.

En el caso de la población fúngica, su estructura cambió significativamente al finalizar la biodesinfección en todos los tratamientos respecto al comienzo del ensayo (Figura

6.20). El filo Ascomycota, dominante en todas las parcelas al inicio (85-95%), vio reducida su población en todos los tratamientos tras la biodesinfección, excepto en M2. Pertenecientes a este filo, las especies del género *Fusarium* fueron las principales representantes al comienzo del ensayo (55-65%) y se vieron fuertemente afectadas en M1 y M3 después de la biodesinfección (<20%) y, en menor medida, en M2 y M4 (45-46%). Dentro del género *Fusarium* son muy conocidas las especies patógenas, como son algunas formas especializadas de *F. oxysporum*, pero la mayoría son saprófitas y algunas con capacidad de solubilizar el P y otros nutrientes (Salimi y Hamedí, 2021).

El género más beneficiado del filo Ascomycota fue *Mycothermus* que aumentó su población después de la biodesinfección en todos los tratamientos, aunque en M4 en menor medida. *Mycothermus* spp. son hongos termófilos que se habrían visto beneficiadas por las condiciones de altas temperaturas alcanzadas durante la biodesinfección. Este grupo de hongos tiene la ventaja de degradar más eficientemente la celulosa y hemicelulosa en ambientes de alta temperatura (Wang et al., 2017) como sería la biodesinfección. Sin embargo, precisamente en el tratamiento con las temperaturas más altas, M4, fue donde menos aumentó la población. Quizás el alto contenido en lignina de esta mezcla pudo favorecer a otros microorganismos más que el efecto de la temperatura, desplazando estas especies a las de *Mycothermus*. El género *Aspergillus*, otro Ascomycota, también aumentó su población tras la biodesinfección en todos los tratamientos salvo en M4. Éstos también son termófilos y toleran condiciones reductoras (Wang et al., 2022a), ambientes generados durante la biodesinfección. En algunas especies de *Aspergillus* está demostrada su capacidad solubilizadora de P, K y Zn, además de otras funciones promotoras del crecimiento de las plantas (Yadav et al., 2019).

**Tabla 6.8** | Valores de diversidad (Shannon) y riqueza (Chao) de la población de hongos según los datos de abundancia relativa de OTUs ITS. Valor medio y error estándar (EE) de las parcelas biodesinfectadas con los cuatro tratamientos (M1, M2, M3, M4) antes (T1) y después (T2) de la biodesinfección. Las letras minúsculas indican las diferencias entre la combinación de tiempo y tratamiento y las mayúsculas las diferencias entre tiempos.

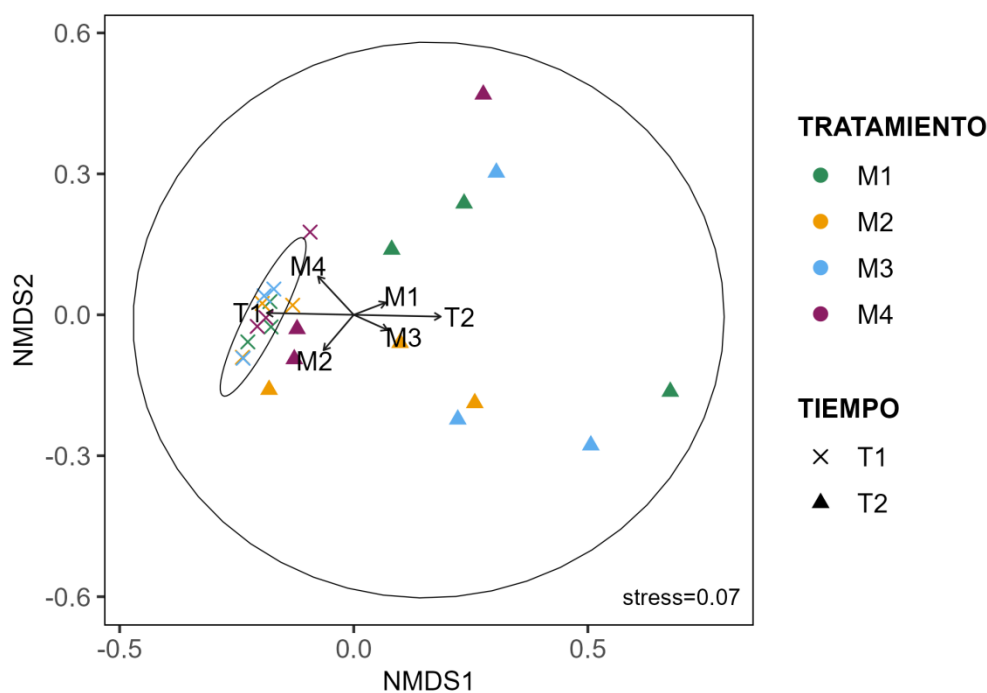
Tiempo	Tratamiento	DIVERSIDAD			RIQUEZA		
		media	EE		media	EE	
T1	M1	1.6	0.1	a	42.7	2.0	a
	M2	1.6	0.3	a	43.0	2.6	a
	M3	1.6	0.3	a	42.0	1.5	a
	M4	1.8	0.1	a	43.3	1.2	a
T2	M1	2.0	0.1	a	40.0	2.6	a
	M2	1.9	0.5	a	33.3	5.8	a
	M3	2.2	0.2	a	34.0	2.6	a
	M4	1.3	0.1	a	37.0	3.6	a

Entre los filos, el más favorecido fue Mortierellomycota, representado exclusivamente por el género *Mortierella*. El aumento de su población después de la biodesinfección fue notoria en todos los tratamientos, salvo en M2 que se redujo. Mortierellomycota son organismos copiotrofos, presentes en ambientes ricos en nutrientes,



que se vieron favorecidos por el aporte de materia orgánica para la biodesinfección. Este grupo lleva a cabo la degradación primaria de los materiales más recalcitrantes y parece tener gran capacidad para almacenar C en el suelo, incluso algunos estudios le atribuyen efecto promotor del crecimiento de las plantas (Wu et al., 2021; Li et al., 2022).

Al igual que en la población bacteriana, los índices de riqueza de la población fúngica disminuyeron significativamente después de la biodesinfección, mientras los cambios en la diversidad no fueron significativos (Tabla 6.8). La mayor disminución en el índice de riqueza se dio en los tratamientos M2 y M3, siendo M1 en el que menos se redujo. A pesar de no se detectaron diferencias estadísticas entre tiempos en la diversidad, todos los tratamientos mostraron valores medios algo mayores a los iniciales excepto en M4 que fueron más bajos que al comienzo.



**Figura 6.21** | Análisis NMDS (*non-metric multidimensional scaling*) de las poblaciones de hongos presentes en las parcelas biodesinfectadas con los cuatro tratamientos (M1, M2, M3, M4) antes (T1) y después (T2) del tratamiento) según los valores de abundancia relativa de OTUs. Las elipses indican la agrupación por tiempos para un intervalo de confianza del 95%.

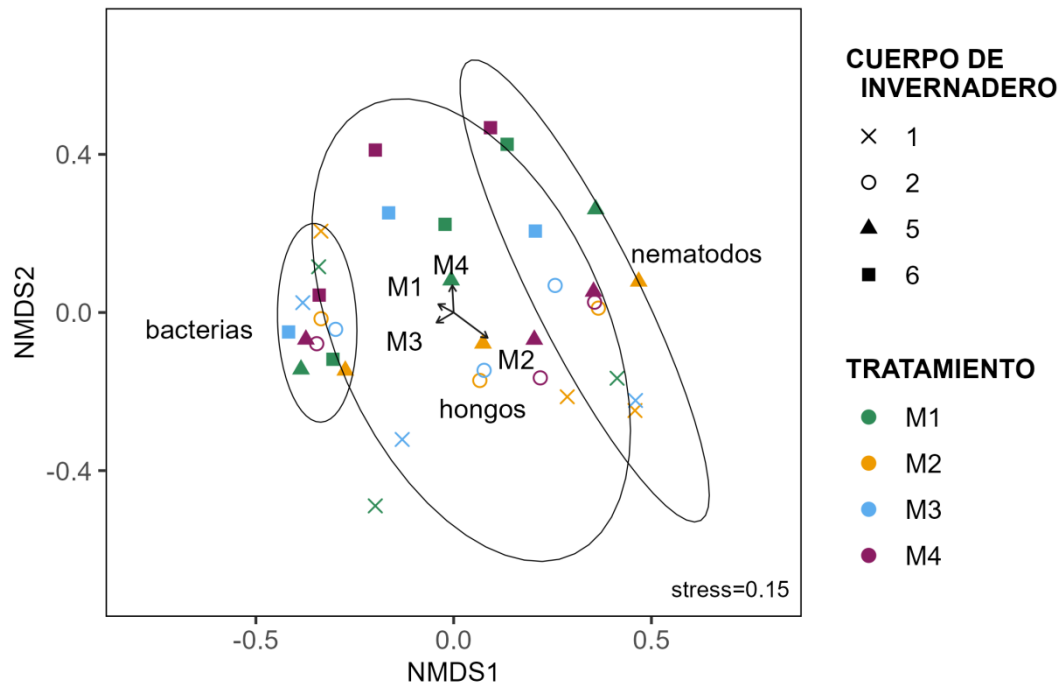
En el análisis NMDS de la población fúngica los resultados no fueron tan evidentes como en la bacteriana, a pesar de que el nivel de estrés obtenido también fue muy bueno (<0,1). Esto pudo deberse a la buena agrupación de las muestras en el primer tiempo, situándose todas en los valores negativos de NMDS1 (Figura 6.21). Al contrario que las muestras después de la biodesinfección que mostraron elevada dispersión en los dos ejes, pero la mayoría en los valores positivos de NMDS1, muestra del impacto en la población. Dada la elevada disgregación de estas muestras, para este análisis se diferenciaron las muestras icónicamente por tiempos y no por cuerpos de invernadero como en el caso de las bacterias, en el que la fuerte agrupación por tiempos no daba lugar a error. Además, cabe añadir que, la cercanía entre las muestras del mismo cuerpo de invernadero no fue tan clara



en la población fúngica como lo fue en la bacteriana. En cuanto a los tratamientos, no se detectó una diferenciación evidente del M2 respecto al resto de tratamientos, como se pudo ver en la población de bacterias y de nematodos. Es más, en este caso, todos los tratamientos están enfrentados en uno de los dos ejes o en ambos. Se podría destacar que las muestras de M2 y M4 se localizaron cercanas a las del comienzo del ensayo, mientras que M1 y M3 se ubicaron contrapuestas y más cercanas al centroide de las muestras tomadas después de la biodesinfección. Esto indicaría que las poblaciones fúngicas de los tratamientos M2 y M4 pudieron verse menos afectadas por la biodesinfección que las de los tratamientos M1 y M3.

Con este estudio se pretendió profundizar más en las posibles diferencias que pudieran darse empleando mezclas de enmiendas con diferentes características. La única condición común fue el aporte de C de los cuatro tratamientos o mezclas (6mgC/kg suelo) cumpliendo el mínimo recomendado de 4mgC/kg de suelo (peso seco) para promover las condiciones de anaerobiosis durante la biodesinfección (Butler et al., 2014; Shrestha et al., 2021a). A pesar de que no se pudo medir el potencial redox, el incremento en las concentraciones de Fe y Mn al finalizar la biodesinfección podría tomarse como indicador de condiciones reductoras que, además, pudieron contribuir en la liberación de AGVs durante los procesos de degradación (Oka, 2010). La liberación de estos biocidas sumado a las condiciones de temperaturas subletales tuvo efectos nocivos para el patógeno y es que los cuatro tratamientos resultaron prácticamente igual de efectivos contra *M. incognita*. Además, se observó un crecimiento de poblaciones antagonistas que consiguieron desplazar al patógeno incluso una vez establecido el cultivo.

El efecto de la biodesinfección fue claro en todos los tratamientos, los cuatro mostraron resultados muy similares aunque se pudo apreciar que el M4 presentó los resultados más altos en la mayoría de macro y micronutrientes en el suelo. Mientras que en los datos de comunidades microbianas, el M2 se diferenció del resto de los tratamientos en los análisis de distribución multidimensional NMDS. Dada la especial relevancia del efecto antagonista de las poblaciones microbianas, se quiso profundizar en el efecto de los tratamientos sobre el conjunto de estas poblaciones. Para ello, se completaron los resultados ejecutando un análisis NMDS con los datos conjuntos de población de bacterias, hongos y nematodos al finalizar la biodesinfección. En este caso, se diferenciaron los cuerpos del invernadero en la gráfica a pesar del desequilibrio en la representación de tratamientos pero se pretendía comprobar el posible efecto del cuerpo. Efectivamente, la distribución de muestras de las poblaciones microbianas mostró mayor cercanía por cuerpos que por tratamientos en las tres poblaciones analizadas (Figura 6.22). En este análisis, que evalúa un solo tiempo y diferentes comunidades, el tratamiento M2 se separó claramente del resto. Esto implicaría que este tratamiento generó un impacto diferente al resto en las poblaciones microbianas. Además del efecto beneficioso del aporte de ST en las poblaciones microbianas, las bajas temperaturas registradas en este tratamiento durante la biodesinfección pudieron contribuir en una mejor reestructuración de las comunidades del suelo.



**Figura 6.22** | Análisis NMDS (*non-metric multidimensional scaling*) de las poblaciones de bacterias, hongos y nematodos presentes en las parcelas biodesinfectadas con los cuatro tratamientos (M1, M2, M3, M4) después de la biodesinfección (T2) según los valores de abundancia relativa de OTUs de bacterias y hongos y de familias en el caso de los nematodos. Las elipses indican la agrupación por poblaciones para un intervalo de confianza del 95%.

Entre los subproductos probados en este ensayo, el ST y la CPG se consideraron los más interesantes a emplear en biodesinfección. La incorporación conjunta de ambos podría ser una mezcla de subproductos muy interesante al combinarse una fuente lábil con otra más recalcitrante de C, junto con estiércol fresco. Esto tendría un efecto positivo en multitud de procesos esenciales para la salud del suelo agrícola. Además, como se ha comentado anteriormente, la cantidad y tipo de C orgánico, la concentración de  $\text{Fe}_2^+$  y la frecuencia de la oscilación del potencial redox son impulsores clave de las tasas de reducción de  $\text{Fe}_3^+$  y movilización de P, mediada por determinados microorganismos (Khan et al., 2019). Este fenómeno es particularmente interesante dada la relevancia del P como macronutriente y la problemática asociada a su producción como fertilizante inorgánico, cada vez más escaso y con trazas de metales pesados como el Cd que acaban acumulándose en los suelos agrícolas generando toxicidad (Günther et al., 2018; Chandrajith y Dissanayake, 2009). La biodesinfección, con su respectiva incorporación de C mediante subproductos orgánicos, favorecería no solo la mineralización del P sino de otros muchos nutrientes como se ha podido comprobar en diferentes ensayos de este tipo. Aunque el ST ya tiene demostrados sus beneficios como enmienda en biodesinfección, la CPG se presentó como un subproducto muy interesante no empleado previamente. Su alto contenido en lignina hace de este subproducto un sustrato idóneo para los procesos de humificación, siendo los compuestos húmicos grandes reservorios de C y nutrientes esenciales para la vida en del suelo (Tuomela et al., 2000).

En conclusión, este ensayo vuelve a demostrar la eficacia del uso de determinados subproductos en los tratamientos de biodesinfección y destaca la CPG como un subproducto muy interesante tanto para la reducción de la enfermedad por *M. incognita* como para la mejora de la fertilidad. Además del aumento de nutrientes en el suelo, en este ensayo se pudo comprobar que estos tratamientos favorecieron a algunos géneros de bacterias (*Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp. y *Bacillus* spp.) y hongos (*Aspergillus* spp. y *Mortierella* spp.) promotores del crecimiento de las plantas. Eso pudo hacer más resistente al cultivo del posible ataque de los pocos individuos que pudieron resistir a la biodesinfección. De todas formas, el efecto antagonista de estos y otros microorganismos como los nematodos de otras familias y grupos tróficos, ejercieron una fuerte presión que pudo tener efecto prolongado en el tiempo (Gandariasbeitia et al., 2021). Dada la importancia de este efecto, en próximos ensayos sería interesante centrarse en la mejora del efecto antagonista y supresor completando su evaluación incluyendo, al menos, un análisis a la finalización del cultivo posterior a la biodesinfección de las poblaciones de hongos y bacterias.

Para finalizar, como se ha contemplado durante la discusión, pudiera ser que las temperaturas subletales sean más favorables para lograr efectos antagonistas y de supresividad, incluso a medio y largo plazo. Una vez estudiados los rangos de temperatura registrados en los dos ensayos realizados en la misma explotación con diferentes tratamientos y en diferentes cuerpos de invernadero, se podría concluir que un mínimo de 250h acumuladas por encima de los 35°C serían suficientes para reducir de forma considerable la población de *M. incognita*. Además, temperaturas >44°C podrían suponer mayor perturbación a poblaciones interesantes como antagonistas. En definitiva, este tipo de tratamientos mejora la salud de los suelos agrícolas ejerciendo una doble acción, la lucha contra el patógeno y la fertilización orgánica. Todo ello, promovido por la acción microbiana y las condiciones generadas durante la biodesinfección. Además, esta técnica podría incluirse en los manejos de más regiones geográficas de las que se practica actualmente. Incluso podría realizarse fuera de los meses más calurosos pudiendo ajustarse mejor al manejo anual de cada explotación.





# CAPÍTULO 7



Evaluación en condiciones controladas de diferentes estrategias de biodesinfección contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*







## 7. Evaluación en condiciones controladas de diferentes estrategias de biodesinfección contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*

---

### 7.1. Introducción

El manejo intensivo de monocultivos está estrechamente vinculado al desarrollo de enfermedades, muchas de ellas producidas por patógenos de suelo. En el caso del cultivo de lechuga en la CAPV, además del nematodo *Meloidogyne incognita*, el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (FOLac) es otro de los principales patógenos de suelo causante de importantes pérdidas, al igual que en muchas otras regiones. De hecho, el primer registro de este patógeno se dio en Japón en 1955 (Matuo y Motohashi, 1967) y desde entonces se ha ido extendiendo por diferentes países de varios continentes (Randall et al., 2020). La especie *Fusarium oxysporum* puede estar presente en muchos suelos como parte de la población fúngica sin causar enfermedad en el cultivo. Sin embargo, dentro de esta especie se incluyen determinadas formas fitoparásitas específicas de diversos cultivos, llegando a describirse más de 150 formas especializadas patógenas (Rana et al., 2017). Entre ellas, una de las más extendidas es FOLac que, a su vez, tiene descritas cuatro razas siendo la raza 1 la mayoritaria en los países europeos.

La infección por FOLac se conoce como marchitamiento o Fusariosis vascular de la lechuga y es una de las enfermedades más importantes de este cultivo por las pérdidas en la producción y por la dificultad de su manejo. La raza 1 de esta especie es la principal causante de estas pérdidas, cuya presencia se registró en España en 2017 (Guerrero et al., 2020). Sin embargo, en años recientes se confirmó la entrada de la raza 4 en Europa (Gilardi et al., 2017 y 2019) y en el 2021 se confirmó su presencia al sureste de España (Gálvez et al., 2023) con su consecuente problemática. La raza 1 prolifera en condiciones de temperaturas cálidas generando daños en el cultivo a partir de los meses de primavera y prolongándose hasta comienzos de otoño. Por otro lado, la raza 4 puede infectar a temperaturas bajas, pudiendo suponer un problema en los meses en los que la raza 1 no es capaz de proliferar. Las plantas afectadas por Fusariosis muestran hojas marchitas o amarillentas por necrosis vascular, visible en la parte interna del cuello de la planta que adquiere una tonalidad rosácea o marrón. Esta infección impide el desarrollo de la planta llegando a matarla.

La Fusariosis está considerada como una enfermedad devastadora por la falta de tratamientos sanitarios que la controlen de forma eficaz. Además, la particularidad del cultivo de lechuga, por el consumo de la hoja fresca, presenta más restricciones en la aplicación de fitosanitarios. Los primeros registros de Fusariosis en lechuga en la CAPV se dieron en 2017. Desde entonces, este patógeno no ha dejado de extenderse y proliferar en las explotaciones



locales de lechuga comercial debido al monocultivo junto con la ausencia de tratamientos efectivos. Ante la creciente problemática de esta enfermedad, el sector, demandante de soluciones eficaces, destinó un invernadero de una explotación afectada por FOLac para realizar una biodesinfección en 2021. Con este fin y como prueba preliminar, se decidió ejecutar el siguiente ensayo en condiciones controladas en cámara de cultivo para evaluar diferentes mezclas de biodesinfección y profundizar en el manejo de este patógeno.

En este ensayo en condiciones controladas, se probaron cuatro mezclas de enmiendas orgánicas para la biodesinfección más un control no tratado (sin enmienda y sin plástico). Las mezclas se diseñaron de acuerdo a la información recogida en la bibliografía relacionada de biodesinfección contra FOLac, sumada a la experiencia obtenida en los ensayos anteriores. Las mezclas constaron de dos enmiendas principales, el estiércol fresco de vaca y el compost acompañadas de otros subproductos en menor cantidad. El estiércol fresco es una enmienda con demostrada eficacia, mientras que el compost, una enmienda más estable, se seleccionó como alternativa al estiércol. Además, el compost fue aplicado en estudios similares contra FOLac obteniendo buenos resultados (Fernández-Bayo et al., 2018; Gilardi et al., 2020;). Estas enmiendas principales conformaban la mayor parte de cada mezcla probada (7,5g/kg de suelo, peso seco) y, en ambos casos, fueron acompañadas de salvado de trigo o de Biofence®, un producto comercial a base de semilla de *Brassica carinata*, en menor proporción (1-2g/kg suelo, peso seco). El salvado de trigo es uno de los subproductos más empleados en las desinfecciones anaerobias por aumentar la actividad microbiana y con ello, entre otros efectos, disminuir el oxígeno presente. Por otro lado, todos los productos derivados de material vegetal de especies pertenecientes a la familia Brassicaceae están reconocidos como efectivos biofumigantes por su contenido en glucosinolatos. Estos se transforman en isotiocianatos al hidrolizarse, que son compuestos similares a los biocidas de síntesis y actúan de forma muy parecida (Kirkegaard et al., 1993). Además, a los cuatro tratamientos de biodesinfección se les añadió cáscara de pipa de girasol, por el efecto positivo demostrado en el ensayo anterior (Capítulo 6). Además, sirvió para ajustar las dosis de todos los tratamientos para un aporte de 5mgC/kg de suelo, cercano al mínimo recomendado para promover condiciones anaerobias. Por lo tanto, los tratamientos diferían en la mezcla de enmiendas y el C/N (15, 17, 25 y 29).

Este ensayo se llevó a cabo durante cuatro semanas en cámara de cultivo y, una vez finalizado, se ejecutó un bioensayo de seis semanas con plantas de lechuga para evaluar el desarrollo de Fusariosis. El objetivo fue evaluar diferentes mezclas de enmiendas contra FOLac en condiciones controladas para determinar la mezcla más apropiada para aplicar en el ensayo posterior de campo. Por un lado, se evaluó el compost respecto al estiércol como enmienda principal. Por otro lado, se analizaron las posibles diferencias entre el tratamiento con salvado de trigo o Biofence® que se asemejarían a los enfoques de desinfección anaerobia del suelo (ASD) y biofumigación, respectivamente. El efecto de cada tratamiento se evaluó a través de la población de FOLac después de la biodesinfección junto con una serie de variables químicas y biológicas de los suelos. El bioensayo posterior se llevó a cabo para determinar el grado de desarrollo de Fusariosis en el cultivo susceptible. Los resultados

obtenidos contribuyeron en la toma de decisiones para el diseño del siguiente ensayo en condiciones reales de campo.

## **7.2. Materiales y métodos**

### **Origen y producción de inóculo**

El inóculo empleado para este ensayo se obtuvo de plantas con síntomas de Fusariosis muestreadas en una prospección por las explotaciones locales afectadas por FOLac. Para ello, se desinfectaron los cuellos de lechugas con síntomas por inmersión en lejía al 0,5% durante 3 minutos para, finalmente, aclarar con agua destilada y secar. Dentro de una cámara de flujo laminar se realizó un corte longitudinal del tallo para extraer parte del tejido interno afectado, con coloración marrón-rosada, y sembrarlo en placas Petri con medio selectivo Komada (Komada et al., 1975). Las placas se mantuvieron en oscuridad a 25°C durante tres semanas, hasta obtener una colonia suficientemente grande que fue enviada MICROGAIA BIOTECH para confirmar el patógeno FOLac raza 1.

El inóculo para el ensayo se tomó de la colonia desarrollada en el medio selectivo una vez confirmado el patógeno (FOLac raza 1). Para su multiplicación, se pasó a medio PDA (agar de dextrosa de patata) a fin de generar colonias libres de antibióticos, presentes en el medio Komada, que pudieran influir en los resultados del ensayo. Las nuevas placas se incubaron en oscuridad a 25°C hasta que la superficie del medio quedó totalmente tapizada, cerca de tres semanas. El contenido de 50 placas se batió en 1L de agua destilada esterilizada hasta crear un batido uniforme. La mezcla resultante se filtró por una malla de 75µm con ayuda de un embudo y bomba de vacío para retener el micelio y otros restos. El producto filtrado se diluyó x10 para la cuantificación de conidias, unidades formadoras de colonias (UFC), en una cámara de recuento Fuchs-Rosenthal. Una vez conocida la concentración de la solución inicial, se ajustó la dosis de manera que se inocularon  $2 \times 10^4$  UFC/g (peso seco) ( $4,3 \log_{10}(\text{UFC}+1)/\text{g}$ ).

### **Diseño experimental y procedimiento**

Este ensayo se realizó en condiciones controladas en una cámara de cultivo dentro de las instalaciones de NEIKER-BRTA (Derio, Bizkaia). El suelo provenía de uno de los invernaderos de estas mismas instalaciones, sin antecedentes de patógenos, y presentaba textura franca (52% arena, 38% limo, 10% arcilla) con un contenido de 3% de materia orgánica y pH 7,5. El suelo fue tamizado por 1cm para descartar bloques grandes y se empleó en su estado natural, sin esterilizar, a fin de no anular el efecto antagonista de la microbiota endémica.

En este ensayo se probaron cuatro tratamientos de biodesinfección empleando cinco enmiendas orgánicas diferentes, además de un tratamiento control sin enmienda ni plástico. Como enmiendas principales se probaron el estiércol fresco vacuno (EFV) y el compost (COM). El estiércol contenía cerca de un 20% de paja y fue obtenido de una

ganadería cercana, además fue el que se emplearía para el ensayo en campo. El compost provino de la planta municipal de compostaje de Artigas (Bizkaia) generado con un 75% de material estructurante (podas) y 25% de residuos orgánicos urbanos. Estas enmiendas fueron combinadas, según el tratamiento, con cáscara de pipa de girasol (CPG), salvado de trigo (ST), ambas suministradas por MIBA Coop. (Mungía, Bizkaia), y el producto comercial de pellets de *Brassica carinata* Biofence® (BF) fabricado por Triumph (Italia). Para el diseño de los tratamientos se caracterizaron todas las enmiendas salvo BF, del que se tomaron los datos del fabricante (Tabla 7.1). Tanto el COM como el EFV se combinaron con ST o con BF, en función del tratamiento, en las mismas cantidades. La CPG se aplicó en todos los tratamientos en la cantidad necesaria para ajustarlos a las características deseadas. De manera que se generaron cuatro tratamientos de biodesinfección: CA (COM+ST+CPG), CB (COM+BF+CPG), MA (EFV+ST+CPG) y MB (EFV+BF+CPG). En todos los tratamientos se aplicó la misma cantidad total de enmiendas, con mismo aporte de C (5mg/kg de suelo, peso seco), por tanto, se diferenciaron en la mezcla de enmiendas y en el valor C/N (CA=17, CB=15, MA=29, MB=25) (Tabla 7.2).

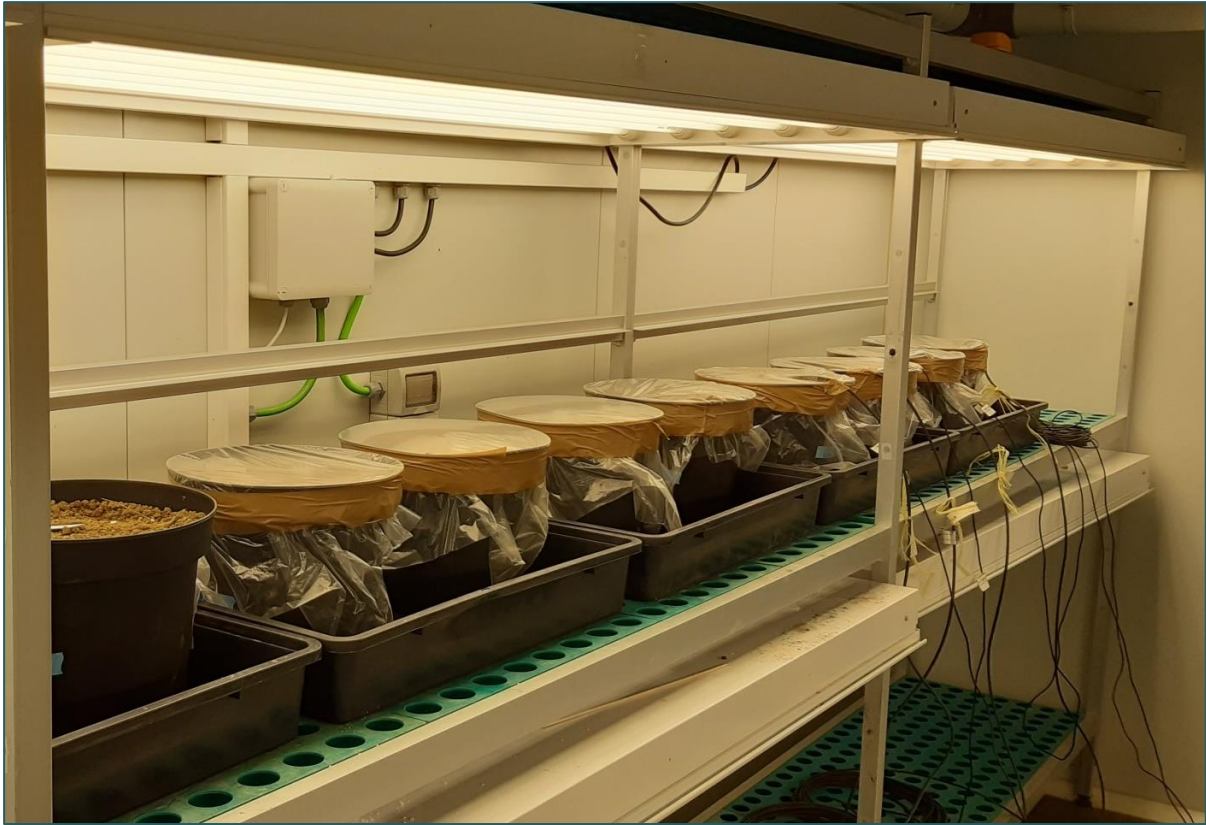
**Tabla 7.1** | Características físico-químicas de las enmiendas aplicadas: compost (COM), estiércol fresco vacuno (EFV), salvado de trigo (ST), cáscara de pipa de girasol (CPG) y Biofence® (BF) (\*Datos facilitados por el fabricante). Valores expresados sobre el peso seco.

ENMIENDAS	EFV	COM	ST	CPG	BF*
Materia seca (%)	37.97	78.3	90.08	91.06	100
pH	8.5	7.8	6.5	6.0	
CE (mS/cm)	6.9	4.0	2.48	2.34	
Materia orgánica (%)	78.02	68.15	95.41	90.78	90.2
C orgánico (%)	45.26	39.53	55.34	52.66	
N total Kjeldahl (%)	1.54	2.46	2.37	0.87	6.2
C/N	29.31	16.09	23.37	60.61	8.46
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (%)	0.96	1.03	1.55	0.19	3
K <sub>2</sub> O (%)	2.2	1.9	1.35	1.06	1.6
SO <sub>3</sub> (%)	0.53	0.52	0.13	0.17	
CaO (%)	1.75	6.05	0.21	0.54	
MgO (%)	0.39	0.41	0.54	0.32	
Na (%)	0.28	0.24	<0.01	<0.01	
Fe (mg/kg)	0.12	0.68	0.01	0.01	
Zn (mg/kg)	102.1	120.94	67.98	11.92	
Cu (mg/kg)	19.92	39.48	11.91	9.93	
Mn (mg/kg)	173.8	203.4	91.31	13.41	
B (ppm)	13.21	34.3	2.87	16.72	
Cd (mg/kg)	<0.20	<0.20	<0.20	<0.20	
Pb (mg/kg)	1.81	11.55	<1.00	<1.00	
Hg (mg/kg)	<0.40	<0.20	<0.40	<0.40	
Cr (mg/kg)	4.34	16.99	0.3	2.13	
Ni (mg/kg)	3.31	7.7	0.72	1.79	

**Tabla 7.2** | Características de los cuatro tratamientos de biodesinfección y las enmiendas y cantidades aportadas en cada uno (COM: compost; EFV: estiércol fresco vacuno; ST: salvado de trigo; BF Biofence®; CPG: cáscara de pipa de girasol). Valores expresados sobre el peso seco.

Tratamiento	Enmienda	g/kg suelo	kg/m <sup>2</sup>	C/N	mgC/g suelo	kgN/ha
<b>CA</b>	COM	7.5	2.2	17	5	850
	ST	2.0	0.6			
	CPG	1.5	0.4			
<b>CB</b>	COM	7.5	2.2	15	5	917
	BF	1.0	0.3			
	CPG	2.5	0.7			
<b>MA</b>	EFV	7.5	2.2	29	5	510
	ST	2.0	0.6			
	CPG	1.5	0.4			
<b>MB</b>	EFV	7.5	2.2	25	5	578
	BF	1.0	0.3			
	CPG	2.5	0.7			

Cada tratamiento constaba de cuatro réplicas que consistieron en cuatro macetas de 7L (22x16x20cm) que contenían 6kg de suelo (peso seco), previamente tamizado (<1cm), cada una. A continuación, se inocularon 100ml de solución con FOLac ajustada a  $2 \times 10^4$  UFC/g de suelo (peso seco) ( $4,3 \log_{10}$  (UFC+1)/g). Cada réplica de suelo inoculado se homogeneizó individualmente de forma manual. Además, en cada maceta se incluyó una bolsa con 50g de suelo inoculados con 500µl a la concentración ajustada ( $2 \times 10^4$  UFC/g o  $4,3 \log_{10}$  (UFC+1)/g) igual que en el resto del suelo. Los suelos inoculados se mantuvieron cinco días sin manipular para el acondicionamiento del inóculo, al pasar de un medio a otro, antes del tratamiento de biodesinfección. Finalizado este tiempo, se procedió a la incorporación de las enmiendas correspondientes a cada maceta y, tras una homogeneización manual en bandeja, se devolvió el material a cada maceta enterrando una de las bolsitas inoculadas en cada una de las réplicas. Las macetas se colocaron de forma aleatoria en dos baldas a la misma altura en una cámara de cultivo y sobre bandejas para asegurar el riego hasta la saturación antes de la colocación del plástico transparente tipo TIF (totalmente impermeable) de Riviera Blumen. En dos macetas de cada tratamiento se incluyeron una sonda de redox y otra de temperatura conectadas a un registrador de datos. Es preciso adelantar que algunas de las sondas de redox dieron ciertos fallos que impidieron el análisis de estos datos. El 17 de marzo de 2021, se taparon con plástico todas las macetas, salvo los controles, ajustado con una goma elástica y cinta adhesiva a la maceta, y se mantuvieron durante cuatro semanas bajo un ciclo de 14h de luz a 35°C y 10h de oscuridad a 25°C (Figura 7.1). El 14 de abril se retiró el plástico pero las macetas se mantuvieron una semana más destapadas antes de la toma de muestras y del comienzo del bioensayo.



**Figura 7.1** | Fotografía de parte del ensayo de biodesinfección de suelo en condiciones controladas, en cámara de cultivo, con diferentes mezclas de subproductos contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*.

Pasado el tiempo de aireación, se homogeneizó cada muestra manualmente en una bandeja y se tomaron 300g de cada una para los análisis químicos y biológicos. Además, se recogieron todas las bolsitas con tierra inoculada para la cuantificación de UFC de FOLac. El resto del suelo fue empleado para el posterior bioensayo realizado por la técnica de capas de suelo (Núñez-Zofío et al., 2011). Con este fin, se sustituyeron las macetas por unas alargadas de unos 13,5L (75x12x15cm) a las que se añadieron 2cm de perlita en la base y sobre la que se distribuyó todo el volumen de suelo tratado, previamente homogeneizado. Para la capa más superficial, en la que se asentaría la plántula, se incluyeron 3cm del mismo suelo natural (sin tratar ni inocular) para asegurar el correcto enraizamiento (Figura 7.2). Una vez distribuidas las capas, se trasplantaron cinco plántulas de lechugas (4-6 hojas verdaderas) en cada macetero o réplica (20 plantas/tratamiento) y se mantuvieron en la cámara de cultivo durante seis semanas a las mismas condiciones de temperatura y fotoperiodo que en la biodesinfección. Para este bioensayo se incluyó un sexto tratamiento con otras cuatro réplicas que contenían el mismo suelo del ensayo pero sin inocular con FOLac como control negativo, libre del patógeno. Una vez pasadas las seis semanas de crecimiento, se tomaron valores de desarrollo de enfermedad de cada planta y se confirmó la infección por FOLac.



**Figura 7.2** | Imagen del bioensayo con plantas de lechuga en condiciones controladas siguiendo un diseño por capas de suelo, tras la biodesinfección del suelo con diferentes mezclas de subproductos contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. Debajo se incluye una fotografía del momento de la preparación de las macetas por capas. De fondo, fotografía del bioensayo en la cámara de cultivo.

### **Muestreo y procesamiento de muestras**

Para los análisis químicos y biológicos del suelo se tomaron 300g (peso fresco) de cada maceta, una vez retirado el plástico y tras dejar airear el suelo cinco días. Para la cuantificación de UFC de FOLac, mediante qPCR, se empleó el suelo contenido en las bolsitas enterradas en cada maceta. Las muestras de suelo para estos análisis biológicos se tamizaron por 2mm y fueron conservadas a 4°C hasta las respectivas analíticas, excepto las muestras para la qPCR de FOLac que se mantuvieron a -20°C. Para los análisis químicos se tomaron 100g de suelo (peso fresco) que se secaron en estufa a 75°C con ventilación durante dos días para ser finalmente molidos. En lo que refiere al bioensayo, se tomaron 20 plantas con síntomas de Fusariosis de forma aleatoria, a las que se diseccionó el cuello para tomar muestra del tejido interno dañado y sembrarlo en medio selectivo para la confirmación del desarrollo de enfermedad por FOLac.

### **VARIABLES ANALIZADAS Y TRATAMIENTO DE DATOS**

#### Caracterización físico-química de suelo y enmiendas

En esta ocasión, la caracterización de los suelos no fue tan completa como en los ensayos previos de campo (Capítulos 5 y 6) debido al elevado coste que ello supone. Por esta razón, únicamente se analizaron los valores de pH, N y C total de cada muestra de suelo, junto con

el peso seco para los cálculos de las variables biológicas. El pH fue medido con pHmetro (GLP 22, Crison Instruments™, Barcelona) en una disolución 1:5. La cuantificación de C y N totales se realizó en un lector de infrarrojo COM AID Leco® tras combustión completa a 950°C, para lo que se emplearon 0,2g del suelo seco y molido.

En el caso de las enmiendas, ya se conocían los datos del ST y la CPG del mismo origen en todos los ensayos. Para el EFV, procedente de otra explotación ganadera, y el COM se realizaron los análisis físico-químicos completos en el laboratorio externo habitual (MOPRILAB, Abarán Murcia) siguiendo los métodos estándar propuestos por MAPA (1994). El producto BF no fue analizado dado que el fabricante aporta los datos mínimos necesarios para el diseño de las mezclas destinadas a la biodesinfección.

### Temperatura

La temperatura fue medida en dos de las cuatro réplicas de cada tratamiento, incluido el control. El registrador de datos Campbell CR1000X (Campbell Scientific) se programó para que tomara medidas cada 15 minutos durante toda la biodesinfección. Con los datos registrados se calculó la temperatura media para cada hora en cada tratamiento y con estos valores se obtuvieron el número de horas acumuladas a cada temperatura para cada tratamiento.

### Cuantificación de FOLac y evaluación de la enfermedad

La cuantificación de FOLac se realizó mediante qPCR de las muestras de suelo contenidas en las bolsitas enterradas en las macetas, una vez finalizado el tratamiento de biodesinfección. También se incluyó una muestra del suelo empleado en el bioensayo posterior como control negativo (libre de FOLac). El ADN de las muestras de suelo se extrajo en 0,35g (peso fresco) con Invisorb Spin Soil DNA Kit-QIAGEN (QIAGEN N.V., Venlo, Holanda) siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante y la concentración de ADN se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop (ND-1000, Thermo Scientific, Wilmington, DE). Para la qPCR de FOLac raza 1 se seleccionaron los cebadores Hani (5'-GAACCCTCCAACATTCAACA-3') y Hanilatt3rev (5'-ATTCAGTGTACACCAACCTTTT-3') descritos por Pascuali et al. (2007) pero adaptando las condiciones de PCR de Cabral et al. (2018). En resumen, se empleó un volumen final de reacción de 20µl tomando 2,5µl de la solución con ADN (25ng ADN/µl). La amplificación en el termociclador (SureCycler 8800, Agilent Technologies; California, EEUU) se programó con los siguientes ciclos: 50°C durante 2 minutos, 90°C otros 2 minutos, 45 ciclos a 95°C de 10 segundos y 58°C durante un minuto. Una vez finalizada, se obtuvo el umbral de ciclo para cada muestra y, junto con los valores resultantes de la recta de calibración, se calcularon las UFC/g de suelo (peso seco) que fueron expresadas y analizadas en  $\log_{10}(\text{UFC}+1)/\text{g}$ . La descripción completa de este procedimiento se encuentra en el Capítulo 3 de Procedimientos Generales.

A la finalización del bioensayo, precedido por la biodesinfección, tras seis semanas de crecimiento, se tomaron valores de desarrollo de enfermedad de cada planta en una



escala del 0-3. Se otorgó el valor 0 a las plantas sanas, 1 a aquellas con primeros síntomas de enfermedad, 2 para las que presentaron marchitamiento notable y 3 para las plantas totalmente marchitas o muertas.

### Variabes biológicas

En este capítulo, además de analizar algunas variables biológicas ya presentadas en los Capítulos 5 y 6, se incluyó la determinación del N potencialmente mineralizable (NPM). Esta variable se considera una medida indirecta del N disponible, representando la fracción más fácilmente degradable por los microorganismos. En este caso se analizó la mineralización anaeróbica del N, siguiendo el procedimiento de Canali y Benedetti (2006) para la medición del NH<sub>4</sub> por colorimetría a una longitud de onda de 670nm en espectrofotómetro (Shimadzu UV-1800, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón).

El resto de variables biológicas analizadas, ya descritas previamente, fueron:

- Tasa de respiración del suelo
- Carbono de la biomasa microbiana (CBM)
- Carbono orgánico soluble (COS)
- Actividades enzimáticas: glucosidasa (GLU), galactosidasa (GAL), fosfatasa ácida (PAC), fosfatasa alcalina (PAK), ureasa (URE)

Dentro de las actividades enzimáticas se incluyó la URE, que no había sido analizada previamente. El procedimiento fue el mismo que para el resto de actividades enzimáticas (ISO 20130:2018) pero variando las condiciones de incubación y el sustrato, principalmente. Este procedimiento se describe detalladamente, con el resto de actividades enzimáticas, en el Capítulo 3 de Procedimientos Generales, al igual que el de las otras variables biológicas incluidas.

### Comunidades de bacterias y hongos

La evaluación de las comunidades bacterianas y fúngicas se realizó por PCR de la misma forma que para el ensayo anterior (Capítulo 6), detallada en el Capítulo 3 de Procedimientos generales. En resumen, se extrajo el ADN de 0,3g de suelo (peso fresco) con DNeasy PowerSoil Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania) y se amplificaron las regiones V4-V5 (400-500pb) del gen ribosomal 16S para la comunidad de bacterias (Walters et al., 2016) y la región ITS2 para la de hongos (Sommermann et al., 2018). Los resultados se leyeron en la plataforma Illumina MiSeq v3 (2x300bp) (Comeau et al. 2017) y fueron procesadas con QIIME2 versión 19.10 (Bolyen et al., 2018). Finalmente, se obtuvieron las unidades taxonómicas operativas (OTU) de los ASV con las bases de datos SILVA 132 (bacterias) y UNITE 7 (hongos). Con estos datos se calcularon las abundancias relativas para cada OTU y se consideraron aquellos con abundancia >0,1% del conjunto muestral.

### Análisis de datos

En este ensayo todas las variables medidas presentan un solo tiempo, después de la BIODESINFECCIÓN para todas aquellas medidas en el suelo o al finalizar el bioensayo en el caso del desarrollo de la enfermedad. Por tanto, se tomó el tratamiento como único factor a comparar mediante análisis de la varianza (ANOVA) y el posterior test de Tukey HSD ( $P=0,05$ ) para variables con distribución normal de los residuos o el test de Kruskal-Wallis junto con el de Mann-Whitney ( $P=0,05$ ) para las variables no paramétricas. La normalidad de los residuos se evaluó con el test Shapiro–Wilks. Estos resultados vienen presentados en tablas o gráficas de cajas y bigotes indicando las diferencias estadísticas con letras minúsculas.

Para la evaluación de las poblaciones de hongos y bacterias, se procedió de la misma forma que en el capítulo anterior (PERMANOVA, NMDS), al igual que para el análisis conjunto de las variables químicas y biológicas del suelo del suelo (PCA). En los análisis que procedía también se indicaron las diferencias estadísticas con letras minúsculas.

### 7.3. Resultados y discusión

En este ensayo en condiciones controladas se pudo comprobar cierto efecto en la población del FOLac y de Fusariosis en los tratamientos de biodesinfección. Los cuatro tratamientos evaluados (CA, CB, MA, MB) mostraron claras diferencias respecto al control no tratado (C) en la mayoría de variables medidas. Además, entre los tratamientos de biodesinfección que respondían a diferentes enfoques también se observaron diferencias, sobre todo en función de la enmienda principal, estiércol fresco o compost madurado.

**Tabla 7.3 |** Caracterización fisicoquímica del suelo al finalizar la biodesinfección con los valores medios de las réplicas para cada tratamiento de biodesinfección (CA, CB, MA, MB) y el control no tratado (C) expresados sobre el peso seco el suelo. Las letras minúsculas indican las diferencias estadísticas ( $P\leq 0,05$ ) entre los tratamientos.

Tratamiento	C		CA		CB		MA		MB						
	media	EE	media	EE	media	EE	media	EE	media	EE					
pH	7.48	0.02	a	7.37	0.04	ab	7.43	0.01	ab	7.45	0.08	ab	7.27	0.05	b
C (%)	2.05	0.02	b	2.42	0.04	a	2.35	0.01	a	2.34	0.06	a	2.28	0.05	a
N (%)	0.18	0.00	b	0.21	0.00	a	0.21	0.00	a	0.20	0.00	ab	0.20	0.00	ab

La incorporación de 10g de enmiendas orgánicas por kg de suelo (cerca de  $3,2\text{kg/m}^2$ , en peso seco, considerando 25cm de profundidad y densidad aparente de  $1,45\text{g/cm}^3$ ) supuso un incremento en el contenido de C y N del suelo respecto al control sin enmiendas (Tabla 7.3). La concentración de C total incrementó significativamente ( $P\leq 0,05$ ) en todos los tratamientos respecto al control pero sin diferencias estadísticas entre ellos, aunque este incremento fue algo mayor en los tratamientos con base de COM (CA y CB). El N total también aumentó significativamente en CA y CB ( $P=0,01$ ) pero no de igual manera en MA y MB ( $P=0,2$ ) respecto al control. Estos resultados pudieron responder a la mayor

concentración de N presente en las mezclas CA y CB (850 y 917kg/ha, respectivamente) y al mismo aporte de C (5mg/g suelo) (Tabla 7.2).

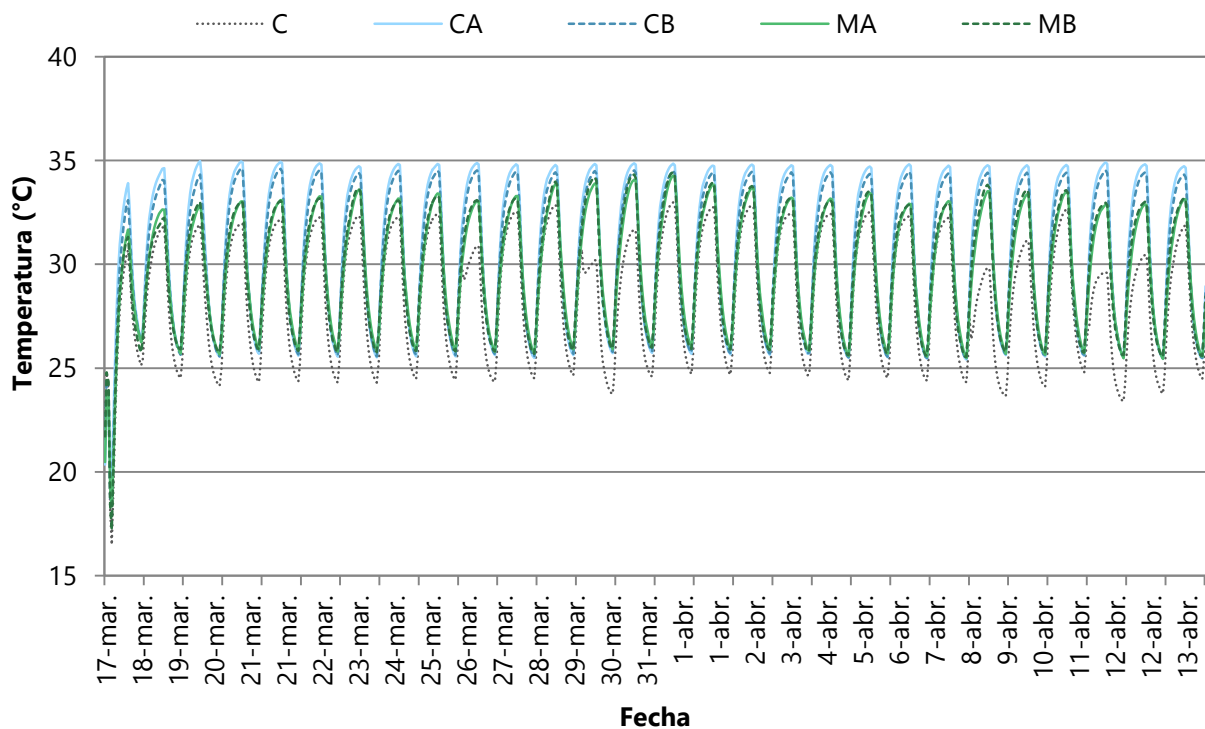
En cuanto a la temperatura, ninguno de los tratamientos superó los 35°C durante las cuatro semanas de biodesinfección, que fue el valor seleccionado como temperatura máxima dentro de la cámara de cultivo. Sí se pudo observar un ligero aumento de la temperatura en todos los tratamientos de biodesinfección, que superaron los 34°C, respecto al control que justo alcanzó 33°C de máxima (Tabla 7.4). Entre los tratamientos de biodesinfección, aquellos con base de COM (CA y CB) mostraron mayor número de horas acumuladas a 34°C (>100h) que los que contenían EFV (<15h), que lo hicieron a temperaturas más bajas (>100h a 32°C). Estos resultados contrastan con lo esperado, dado que el estiércol fresco, aun sin madurar, debería haber aumentado la actividad microbiana pudiendo haberse traducido en un ligero incremento de temperatura. Curiosamente, mientras que la oscilación de la temperatura durante la biodesinfección fue homogénea en los dos tratamientos con COM, en los dos que contenían EFV (MA y MB) se observó un ligero aumento entre la segunda y tercera semana (28 de marzo – 1 de abril) de biodesinfección (Figura 7.3). Esto sí podría explicarse como consecuencia del aumento de la actividad degradadora de una enmienda menos estabilizada que el COM.

°C	C	CA	CB	MA	MB
25	87	77	67	48	68
26	45	90	100	106	91
27	54	39	35	64	62
28	50	46	55	45	58
29	68	30	27	58	43
30	73	42	55	64	48
31	89	42	31	66	76
32	92	35	81	124	123
33	-	80	84	85	83
34	-	186	131	6	14
<b>media (°C)</b>	28.44	30.65	30.38	29.79	29.81
<b>min. (°C)</b>	16.50	19.92	18.61	18.34	17.21
<b>máx. (°C)</b>	32.98	34.97	34.63	34.28	34.43

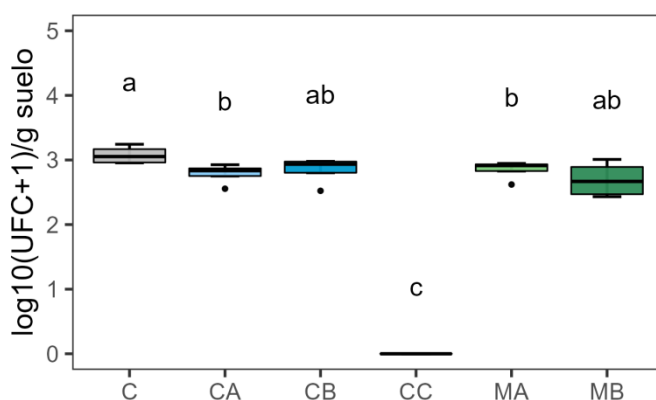
**Tabla 7.4** | Número de horas acumuladas a las diferentes temperaturas (°C) registradas durante la biodesinfección en todos los tratamientos (CA, CB, MA, MB) y en el control no biodesinfectado (C). Al final de la tabla se indican los valores de temperatura media, máxima y mínima para cada caso.

En este ensayo en cámara de cultivo no se alcanzaron temperaturas suficientemente elevadas (>35°C), como indican estudios similares (Shrestha et al., 2021a), para garantizar la reducción de FOLac. Sin embargo, la acumulación de suficientes horas a más de 30°C podrían ser suficientes para disminuir significativamente su población (Pastrana et al., 2022; Randall et al., 2020). En este caso, el mayor contraste de temperaturas de los suelos tratados respecto al control se dio a partir de los 33°C, al acumularse cerca de 80h a esta temperatura solo en los suelos biodesinfectados. Estas condiciones pudieron ser suficientes para contribuir en la reducción de la concentración de FOLac en los suelos tratados respecto al control, de acuerdo a los resultados de la cuantificación por qPCR. Sin embargo, a pesar de que las

mezclas con COM registraron más horas a mayor temperatura que el resto, fueron los tratamientos que contenían ST (CA y MA) los que mostraron una reducción significativa de UFC de FOLac respecto al control ( $P=0,03$ ) (Figura 7.4). También disminuyó de forma importante en MB ( $P=0,1$ ) pero no tanto en CB ( $P=0,3$ ). Estos resultados reafirmarían que, además de la temperatura, el tipo de enmienda puede ser determinante en la reducción del patógeno.



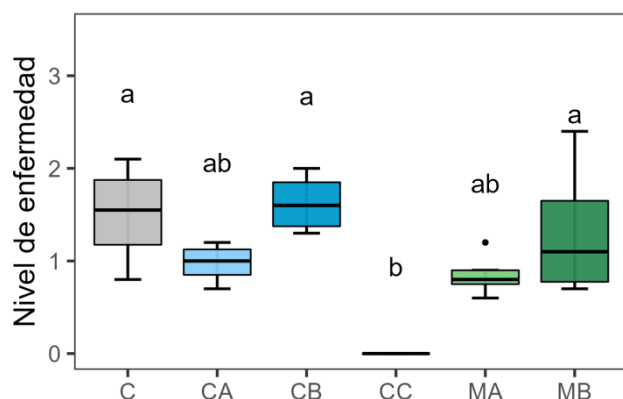
**Figura 7.3** | Temperaturas medidas por hora y tratamiento durante las cuatro semanas de ensayo (17/03/2021 – 14/04/2021) en los suelos de los tratamientos de biodesinfección (CA, CB, MA, MB) y del control no tratado (C).



**Figura 7.4** | Número de UFC de FOLac ( $\log_{10}$ ) por gramo de suelo (peso seco) detectadas en los suelos biodesinfectados con los diferentes tratamientos (CA, CB, MA, MB) y en el control sin tratar (C), además del control negativo, sin FOLac (CC), incluido para el bioensayo. Las letras minúsculas indican las diferencias estadísticas entre los tratamientos (Test de Kruskal-Wallis).

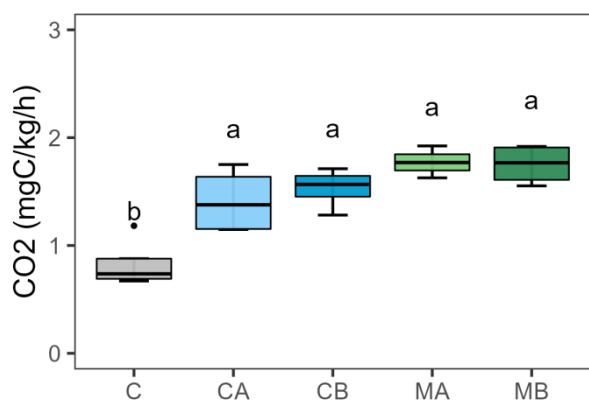
El efecto de la biodesinfección en la población de FOLac también pudo verse en el desarrollo de enfermedad en las plantas del bioensayo posterior, para el cual se incluyó un tratamiento más como control negativo no inoculado (CC), verificando la ausencia del patógeno mediante qPCR (Figura 7.4). Los resultados del bioensayo mostraron un correcto

desarrollo de las plantas, sin síntomas, en el control negativo, resultando estadísticamente diferente al resto ( $P \leq 0,05$ ) (Figura 7.5). A través del bioensayo, se pudo comprobar que la concentración de FOLac estuvo relacionada con el desarrollo de síntomas, siendo CA y MA los que mostraron mayor efecto en la reducción de la enfermedad aunque sin significación respecto al control. A pesar de que la inoculación se ajustó a  $2 \times 10^4$  UFC/g ( $4,3 \log_{10}(\text{UFC}+1)/\text{g}$ ), el control no tratado mostró una concentración menor ( $< 2 \times 10^3$  UFC/g o  $< 3,3 \log_{10}(\text{UFC}+1)/\text{g}$ ), cerca de un 10% de reducción respecto al valor inicial. Esto pudo deberse a que la baja viabilidad de las microconidias ( $< 20\%$ ) que se emplearon como inóculo (Ma et al., 2013; Gordon, 2017; Rana et al., 2017) o que parte fue afectado por la temperatura. A pesar de esto, la concentración estuvo por encima del mínimo requerido para generar enfermedad, estimado en  $1-2 \times 10^2$  UFC/g ( $2-2,3 \log_{10}(\text{UFC}+1)/\text{g}$ ) (Pastrana et al., 2022). El hecho de que la disminución del inóculo de FOLac y de síntomas del bioensayo no correspondiera con las temperaturas más elevadas, puso de manifiesto la relevancia de las características de las enmiendas y, con ello, los procesos biológicos generados, como ya observaron otros autores (Shrestha et al., 2021a).



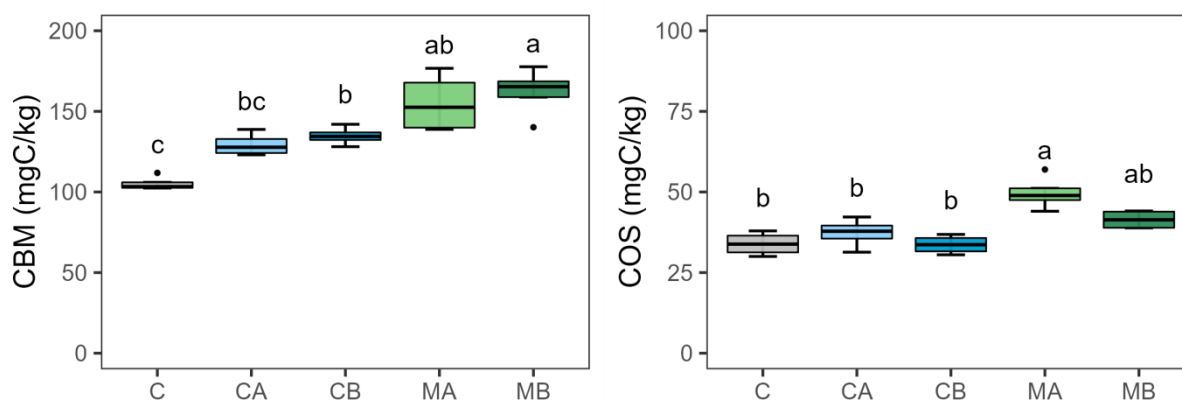
**Figura 7.5** | Valores de la escala del grado de enfermedad (Fusariosis) determinado en las plantas de lechuga desarrollada en los suelos biodesinfectados con los diferentes tratamientos (CA, CB, MA, MB), en el control sin tratar (C) y en el control negativo, sin FOLac (CC), incluido para el bioensayo. Las letras minúsculas indican las diferencias estadísticas entre los tratamientos

En todos los tratamientos de biodesinfección la tasa de respiración del suelo aumentó significativamente respecto al control, con valores medios más altos en los tratamientos con EFV (MA y MB) (Figura 7.6). Mientras que los valores de respiración en los suelos no tratados fueron  $< 1 \text{ mgC/h/g}$ , los tratamientos con EFV presentaron valores cercanos a  $1,7 \text{ mgC/h/kg}$ , y mayor diferencia estadística respecto al control ( $P < 0,001$ ). En el caso de CA y CB, la respiración no aumentó de igual manera ( $1,4$  y  $1,5 \text{ mgC/h/kg}$ , respectivamente) pero también de forma significativa ( $P = 0,01$  y  $P = 0,003$ , respectivamente) en relación al control. Este incremento en la actividad microbiana también se vio reflejado en el crecimiento de estas poblaciones a través del CBM, que aumentó significativamente en todos los tratamientos respecto al control, excepto en CA ( $P = 0,07$ ) (Figura 7.7). El mayor incremento del CBM se dio en MA y MB ( $155$  y  $162 \text{ mgC/kg}$ , respectivamente), cuyos valores aumentaron un 50% respecto al control ( $105 \text{ mgC/kg}$ ). Esto se vio traducido en un mayor incremento del COS también en estos tratamientos (Figura 7.7). Es más, en el caso del COS solo el tratamiento MA fue estadísticamente diferente al control ( $P < 0,001$ ) alcanzando valores medios cercanos a  $50 \text{ mgC/kg}$ , mientras que en CA y CB no aumentó tras la biodesinfección manteniendo valores muy similares al control ( $33-37 \text{ mgC/kg}$ ).



**Figura 7.6** | Tasa de respiración del suelo de las macetas biodesinfectadas con los diferentes tratamientos (CA, CB, MA, MB) y del control sin tratar (C) al finalizar la biodesinfección. Las letras minúsculas indican las diferencias estadísticas entre los tratamientos.

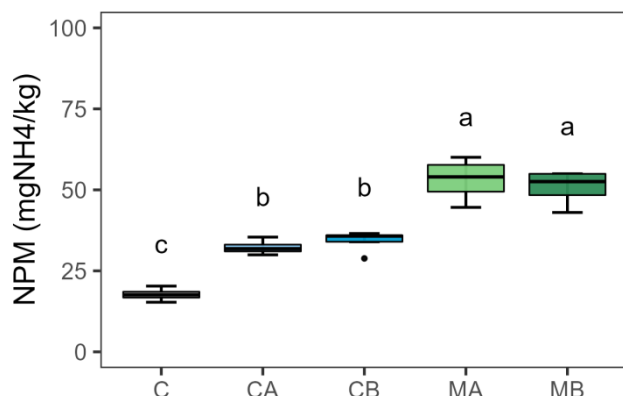
El claro incremento de CBM y COS en los tratamientos MA y MB respecto a CA y CB, demostró que las mezclas con EFV favorecieron más el crecimiento microbiano y su actividad durante la biodesinfección que aquellas con COM. Además, MA y MB fueron los tratamientos con mayor valor C/N (29 y 25, respectivamente), factor a considerar en estos tratamientos. Varios autores remarcan el papel fundamental que juega este ratio en los procesos microbiológicos de biodesinfección, siendo los valores cercanos a 25 los más indicados para esta práctica (Liu et al. 2016). Efectivamente, en los tratamientos con C/N de 25 y 29 (MB y MA, respectivamente) el CBM aumentó respecto al resto, especialmente MB. En cuanto al COS, fue MA (C/N=29) el que dio el valor más alto para el COS como resultado de una mayor actividad microbiana, que pudo contribuir en el control de Fusariosis en este tratamiento.



**Figura 7.7** | Valores del carbono orgánico soluble (COS) y de la biomasa microbiana (CBM) medido en los suelos biodesinfectados con los cuatro tratamientos (CA, CB, MA, MB) al finalizar la biodesinfección. Las letras minúsculas indican las diferencias estadísticas entre tratamientos.

De forma similar a las fracciones de C medidas, el NPM también experimentó mayor aumento en los tratamientos a base de EFV que en aquellos con COM. Aunque en todos los tratamientos de biodesinfección el NPM aumentó de forma significativa respecto al control, MA y MB presentaron valores medios superiores a 50mg/kg y mayor diferencia estadística respecto al control ( $P < 0,001$ ), que se mantuvo por debajo de 20mg/kg. En el caso de CA y CB, aunque también aumentaron de forma significativa respecto al control, mostraron valores significativamente más bajos (32 y 34mg/kg, respectivamente) que MA y MB ( $P < 0,001$ ). En este análisis se cuantificó el N amoniacal del suelo, compuesto presente en los estiércoles

frescos, lo que explicaría los valores significativamente más altos de MA y MB a pesar de contener menor cantidad de N total que CA y CB (Tabla 7.8).



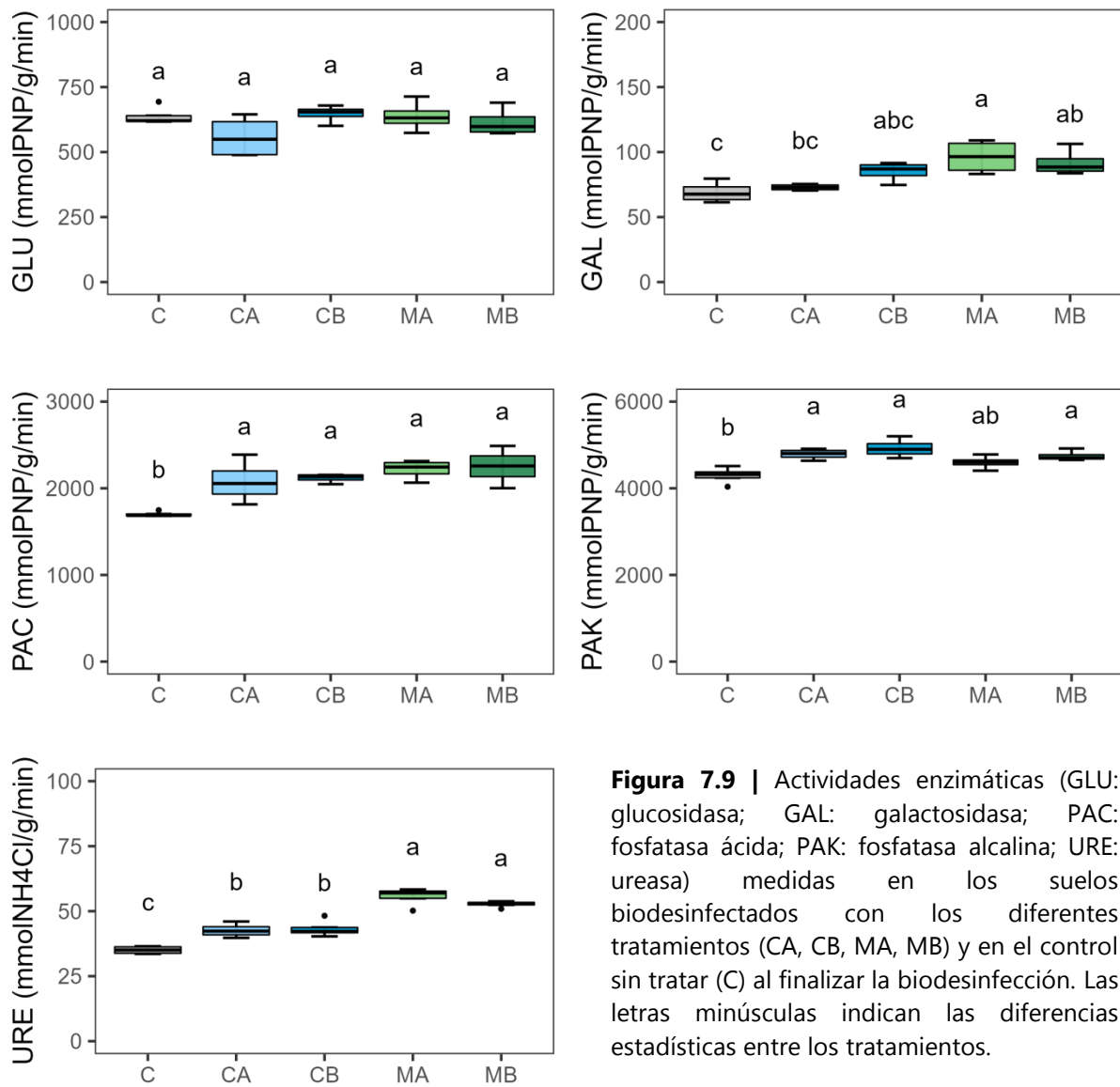
**Figura 7.8** | Nitrógeno potencialmente mineralizable medido en los suelos biodesinfectados con los diferentes tratamientos (CA, CB, MA, MB) y en el control sin tratar (C) al finalizar la biodesinfección. Las letras minúsculas indican las diferencias estadísticas entre los tratamientos.

Los resultados de las actividades enzimáticas medidas en este ensayo, fueron en consonancia con los resultados de las variables presentadas anteriormente. Los valores de la URE respondieron de igual forma que el NPM, dándose las mismas diferencias estadísticas entre tratamientos (Figura 7.9). Esta enzima actúa como catalizadora en la hidrólisis de la urea a  $\text{NH}_3^+$  y  $\text{CO}_2$  (Adetunji et al., 2017; Mencil et al., 2022), presente en los estiércoles frescos. Siendo la urea el compuesto limitante para la producción de esta enzima, su actividad fue mayor en los tratamientos con EFV y escasa en aquellos con COM. Los tratamientos MA y MB mostraron valores altos (56 y 53mmol  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{min}/\text{g}$ , respectivamente) y con diferencias muy significativas ( $P < 0,001$ ) respecto al control. También fueron estadísticamente más elevados en los tratamientos CA y CB ( $P < 0,01$ ) que presentaron valores algo más bajos (42 y 43mmol  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{min}/\text{g}$ , respectivamente) pero, aun así, significativamente más altos ( $< 0,01$ ) que el control (35mmol  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{min}/\text{g}$ ). En cambio, el contenido total de N en los suelos tratados con COM fue mayor que en MA y MB, lo que indicaría que en el caso del CA y CB gran parte del N podría estar en forma de nitratos (Shea et al., 2020).

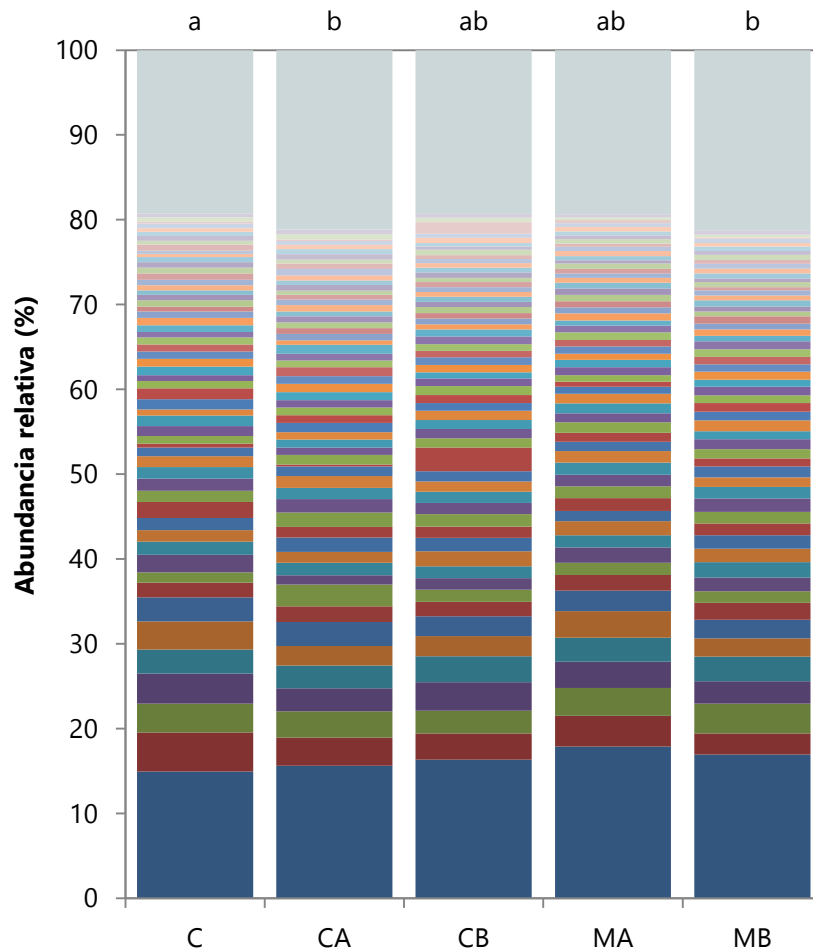
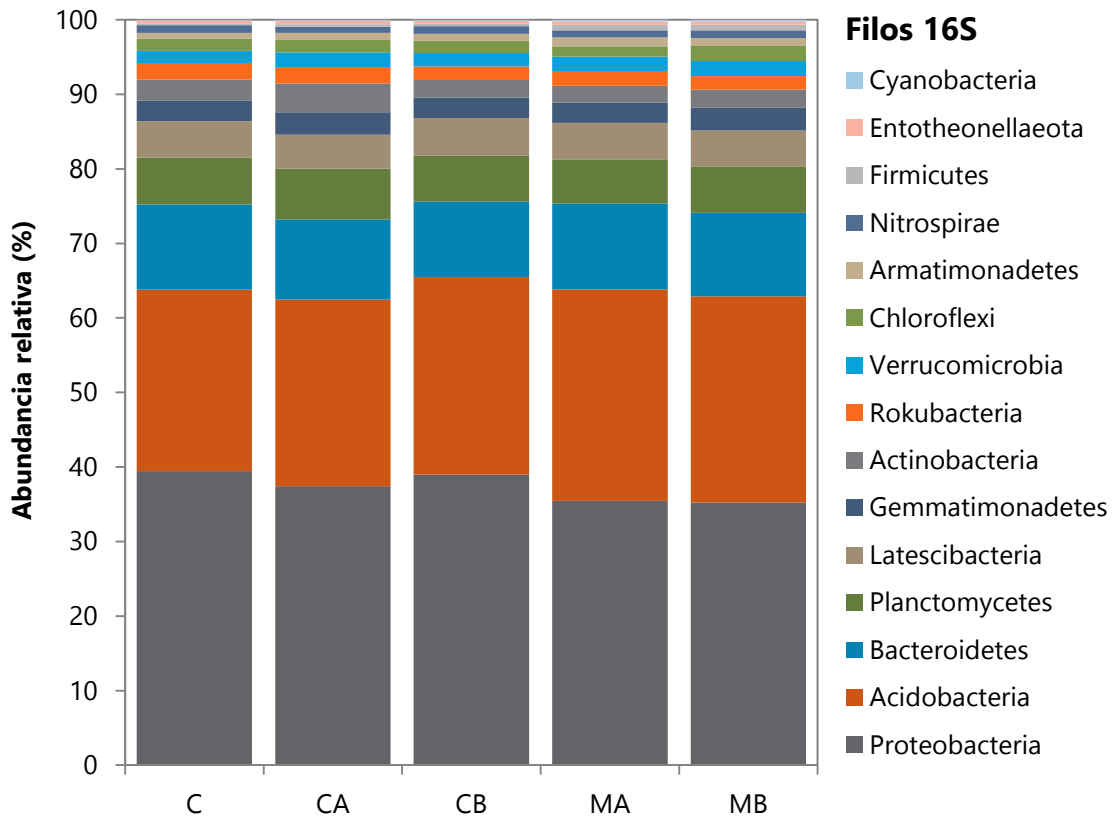
La GAL también fue mayor en los dos tratamientos con EFV (MA=96mmolPNP/min/g y MB=92mmolPNP/min/g) que en CA y CB (73 y 82mmolPNP/min/g, respectivamente) (Figura 7.9). De hecho, MA y MB mostraron alta significación respecto al control ( $P < 0,001$ ) y no así CA y CB ( $P = 0,97$  y  $P = 0,12$ , respectivamente). Sin embargo, la actividad de la GLU, otra enzima vinculada al ciclo del C, no sufrió variaciones en ninguno de los tratamientos tras la biodesinfección en relación al control, con valores similares en todos ellos (629-637mmolPNP/min/g). La actividad de la GAL, mayor en MA, está vinculada a la degradación de la lactosa, un disacárido de galactosa y glucosa. Por lo tanto, su degradación se encuentra asociada a la dinámica del C, que ya mostró ser elevada en MA con los valores más elevados del COS. En el caso de las enzimas asociadas a la dinámica del P, la PAC aumentó significativamente en todos los tratamientos de biodesinfección respecto al control, especialmente en MA y MB ( $P < 0,01$ ) (Figura 7.9). Los valores medios de PAC tras la biodesinfección aumentaron en más de 300mmolPNP/min/g en relación al control. La PAK también aumentó significativamente en los tratamientos de



biodesinfección respecto al control no tratado ( $P < 0,01$ ), salvo MA ( $P = 0,13$ ). El aumento de actividad de estas enzimas podría haber movilizado parte del P dejándolo disponible como se observó en el capítulo anterior.



**Figura 7.9** | Actividades enzimáticas (GLU: glucosidasa; GAL: galactosidasa; PAC: fosfatasa ácida; PAK: fosfatasa alcalina; URE: ureasa) medidas en los suelos biodesinfectados con los diferentes tratamientos (CA, CB, MA, MB) y en el control sin tratar (C) al finalizar la biodesinfección. Las letras minúsculas indican las diferencias estadísticas entre los tratamientos.



**Figura 7.10** | Abundancia relativa (%) de filós (arriba) y OTUs (abajo) 16S, para bacterias, detectados en los suelos con los tratamientos de biodesinfección (CA, CB, MA, MB) y el control sin tratar (C). Las letras minúsculas indican las diferencias estadísticas entre tratamientos tomando las OTUs con una abundancia >0,1% (datos de abundancia en el Anexo 1.2).

**OTUs 16S**

- Otros (<0.5)
- Gemmatimonadetes\_D2.Gemmatimonadetes\_D3.Gemmatimonadales\_D4.Gemmatimonadaceae\_D5.Gemmatimonas
- Actinobacteria\_D2.Thermoleophilia\_D3.Gaiellales\_D4.uncultured
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.Xanthomonadales\_D4.Xanthomonadaceae\_D5.Pseudoxanthomonas
- Rokubacteria\_D2.NC10\_D3.Rokubacteriales\_D4.uncultured bacterium
- Acidobacteria\_D2.Thermoanaerobaculia\_D3.Thermoanaerobaculales\_D4.Thermoanaerobaculaceae\_D5.Subgroup10
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.CCD24
- Proteobacteria\_D2.Alphaproteobacteria\_D3.Reyranellales\_D4.Reyranellaceae\_D5.Reyranella
- Acidobacteria\_D2.Blastocatellia(Subgroup4)\_D3.11-24
- Proteobacteria\_D2.Alphaproteobacteria\_D3.Rhizobiales\_D4.Xanthobacteraceae\_D5.uncultured
- Verrucomicrobia\_D2.Verrucomicrobiae\_D3.Pedospaerales\_D4.Pedospaeraceae
- Acidobacteria\_D2.Acidobacteriia\_D3.Solibacterales\_D4.Solibacteraceae(Subgroup3)\_D5.Bryobacter
- Proteobacteria\_D2.Alphaproteobacteria\_D3.Rhizobiales\_D4.Xanthobacteraceae\_D5.Pseudolabrys
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.Betaproteobacteriales\_D4.Nitrosomonadaceae\_D5.Ellin6067
- Bacteroidetes\_D2.Bacteroidia\_D3.Chitinophagales\_D4.Chitinophagaceae\_D5.Flavitalea
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.Xanthomonadales\_D4.Xanthomonadaceae\_D5.Arenimonas
- Proteobacteria\_D2.Deltaproteobacteria\_D3.NB1-j
- Planctomycetes\_D2.OM190
- Proteobacteria\_D2.Alphaproteobacteria\_D3.Rhizobiales\_D4.KF-JG30-B3
- Planctomycetes\_D2.Phycisphaerae\_D3.Tepidisphaerales\_D4.WD2101soilgroup\_D5.uncultured bacterium
- Latescibacteria\_D2.uncultured Acidobacterium sp.
- Acidobacteria\_D2.Subgroup11\_D3.uncultured bacterium
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.Steroidobacteriales\_D4.Steroidobacteraceae\_D5.uncultured
- Bacteroidetes\_D2.Bacteroidia\_D3.Chitinophagales\_D4.Saprosiraceae\_D5.uncultured
- Proteobacteria\_D2.Alphaproteobacteria\_D3.Rhizobiales\_D4.Hyphomicrobiaceae\_D5.Pedomicrobium
- Proteobacteria\_D2.Deltaproteobacteria\_D3.Myxococcales\_D4.bacteria p25
- Verrucomicrobia\_D2.Verrucomicrobiae\_D3.Chthoniobacteriales\_D4.Chthoniobacteraceae\_D5.Candidatus aeobacter
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.Betaproteobacteriales\_D4.Burkholderiaceae\_D5.uncultured
- Bacteroidetes\_D2.Bacteroidia\_D3.Chitinophagales\_D4.Chitinophagaceae\_D5.uncultured
- Planctomycetes\_D2.Planctomycetacia\_D3.Pirellulales\_D4.Pirellulaceae\_D5.Pirellula
- Rokubacteria\_D2.NC10\_D3.Rokubacteriales
- Acidobacteria\_D2.Holophagae\_D3.Subgroup7\_D4.uncultured Desulfovira sp.
- Proteobacteria\_D2.Deltaproteobacteria\_D3.Desulfarculales\_D4.Desulfarculaceae\_D5.uncultured
- Proteobacteria\_D2.Alphaproteobacteria\_D3.Rhizobiales\_D4.Xanthobacteraceae\_D5.Bradyrhizobium
- Acidobacteria\_D2.Subgroup17
- Acidobacteria\_D2.Subgroup5
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.Xanthomonadales\_D4.Xanthomonadaceae\_D5.Luteimonas
- Nitrospirae\_D2.Nitrospira\_D3.Nitrospirales\_D4.Nitrospiraceae\_D5.Nitrospira
- Bacteroidetes\_D2.Bacteroidia\_D3.Chitinophagales\_D4.Chitinophagaceae\_D5.Flavisolibacter
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.Pseudomonadales\_D4.Pseudomonadaceae\_D5.Pseudomonas
- Acidobacteria\_D2.Blastocatellia(Subgroup4)\_D3.Pyrinomonadales\_D4.Pyrinomonadaceae\_D5.RB41
- Bacteroidetes\_D2.Bacteroidia\_D3.Cytophagales\_D4.Microscillaceae
- Acidobacteria\_D2.Subgroup22
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.Gammaproteobacteria Incertae Sedis\_D4.Unknown Family\_D5.Acidibacter
- Planctomycetes\_D2.Phycisphaerae\_D3.Tepidisphaerales\_D4.WD2101soilgroup
- Bacteroidetes\_D2.Bacteroidia\_D3.Chitinophagales\_D4.Chitinophagaceae\_D5.Terrimonas
- Proteobacteria\_D2.Alphaproteobacteria\_D3.Dongiiales\_D4.Dongiaceae\_D5.Dongia
- Acidobacteria\_D2.Holophagae\_D3.Subgroup7
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.Steroidobacteriales\_D4.Steroidobacteraceae\_D5.Steroidobacter
- Proteobacteria\_D2.Alphaproteobacteria\_D3.Sphingomonadales\_D4.Sphingomonadaceae\_D5.Sphingomonas
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.Betaproteobacteriales\_D4.Nitrosomonadaceae\_D5.MND1
- Gemmatimonadetes\_D2.Gemmatimonadetes\_D3.Gemmatimonadales\_D4.Gemmatimonadaceae\_D5.uncultured
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.Betaproteobacteriales\_D4.SC-I-84
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.Xanthomonadales\_D4.Xanthomonadaceae
- Latescibacteria
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.Betaproteobacteriales\_D4.Burkholderiaceae
- Bacteroidetes\_D2.Bacteroidia\_D3.Chitinophagales\_D4.Chitinophagaceae
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.Xanthomonadales\_D4.Xanthomonadaceae\_D5.Lysobacter
- Acidobacteria\_D2.Subgroup6

Los tratamientos de biodesinfección aplicados tuvieron mayor efecto en la estructura de la comunidad de bacterias que en la de hongos. Mientras que las poblaciones bacterianas mostraron mayor diferencia estadística entre tratamientos ( $P=0,06$ ), aunque no

significativa, las fúngicas se mantuvieron similares ( $P=0,4$ ). En este ensayo en condiciones controladas, apenas se observaron cambios claros en las poblaciones microbianas como sucedió en el ensayo realizado en campo (Capítulo 6) pero hubo alguna tendencia a destacar. Dentro de la población bacteriana, el género *Pseudomonas* aumentó en el tratamiento CB respecto al control (2,8 y 0,4%, respectivamente) (Figura 7.10). Este ligero incremento también se dio en MA y MB (1,1 y 1%, respectivamente) pero no en CA (0,2%). También la población de *Pseudoxanthomonas* spp. aumentó en CB (1,4%) respecto al resto, incluido el tratamiento (0,1-0,4%). Ambas poblaciones se vieron favorecidas por las condiciones de enriquecimiento debido al aporte de materia orgánica que, además, en su degradación liberan ácidos orgánicos que pudieron estar implicados en la reducción de FOLac (Liu et al., 2016; Chen et al., 2018).

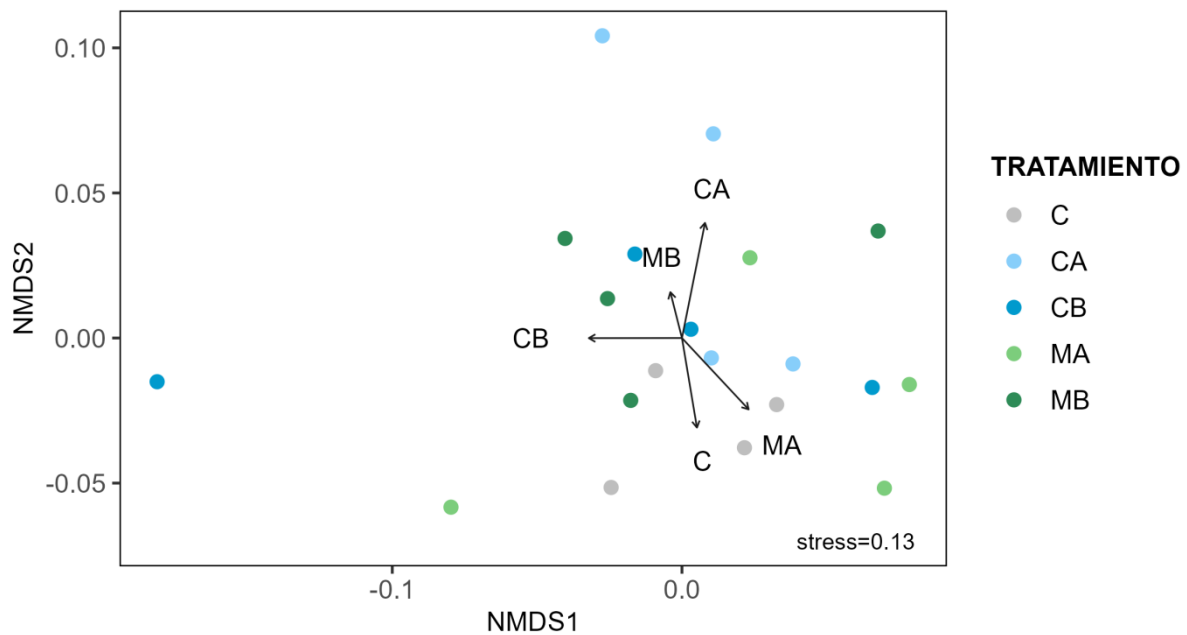
Otras bacterias asociadas a cultivos sanos son *Bacillus* spp. y *Streptomyces* spp. también presentes en los suelos de este ensayo. El incremento de estas poblaciones no fue tan notable como el de las anteriormente nombradas pero también se vieron favorecidas en algunos tratamientos de biodesinfección respecto al control, en el que apenas estuvieron representadas (0,1% en ambos géneros). En los tratamientos MA y MB las especies de *Bacillus* aumentaron hasta representar el 0,6% en ambos tratamientos, similarmente a *Streptomyces* spp que representaron 0,6 y 0,4% en MA y MB, respectivamente, después de la biodesinfección (Anexo 1.2). De acuerdo a estos resultados, algunos géneros de bacterias beneficiosas para el cultivo y con cierto efecto antagonista se vieron favorecidas en los tratamientos de biodesinfección respecto al control. De hecho, el incremento de estas poblaciones también se observó en el estudio anterior en campo, al igual que en estudios similares en los que su presencia se relacionó con suelos sanos libres de patógenos (Liu et al., 2016; Nakkeeran et al. 2021). Por ello, la presencia de estos grupos pudo contribuir en el control del patógeno y de la enfermedad en los tratamientos de biodesinfección respecto al control, especialmente en MA y MB.

**Tabla 7.5** | Índices de diversidad (Shannon) y riqueza (Chao) de la población de bacterias de los datos de abundancia relativa de OTUs 16S. Valores medios y error estándar (EE) de los suelos biodesinfectados con los cuatro tratamientos (CA, CB, MA, MB) y del control sin tratar (C) al finalizar la biodesinfección. Las letras minúsculas indican las diferencias estadísticas entre los tratamientos.

Tratamiento	DIVERSIDAD			RIQUEZA		
	media	ES		media	ES	
C	4.20	0.04	a	141.8	0.3	a
CA	4.23	0.02	a	141.0	1.4	a
CB	4.14	0.05	a	140.8	1.6	a
MA	4.11	0.06	a	142.0	0.4	a
MB	4.19	0.02	a	142.5	0.5	a

Entre las poblaciones bacterianas más afectadas destacó el género *Lysobacter* que disminuyó su población en los tratamientos de biodesinfección (1,1-1,8%) respecto al control (2,8%). Algunas especies de este género están reconocidas como beneficiosas para el cultivo y con efecto supresor de patógenos edáficos. Estas bacterias se encuentran formando parte

de la comunidad de suelos sanos y, además, pueden producir determinados compuestos antimicrobianos que protegen al cultivo de posibles infecciones (Wang et al., 2017). En trabajos similares sí se observó un aumento de su población (Walker et al., 2022), no así en este ensayo, quizás por darse en condiciones más artificiales o porque otras poblaciones se vieron más beneficiadas que estas, pudiendo llegar ser desplazadas por las más favorecidas. También disminuyó la población de *Terrimonas* que representaron cerca del 2% en el control, mientras que en los tratamientos de biodesinfección estuvo por debajo del 1,5%. Este grupo, en su mayoría, está caracterizado como estrictamente aerobio (Zhang et al., 2012). Por tanto, la reducción de *Terrimonas* spp. en los suelos tratados fue indicativo de generación de anaerobiosis durante la biodesinfección.



**Figura 7.11** | Análisis NMDS (*non-metric multidimensional scaling*) de las poblaciones de bacterias presentes en los suelos biodesinfectados con los cuatro tratamientos (CA, CB, MA, MB) y del control sin tratar (C) al finalizar la biodesinfección según los valores de abundancia relativa de OTUs

Sin embargo, estas ligeras variaciones en la estructura de la comunidad bacteriana solo fueron tendencias observadas, a falta de significación del análisis PERMANOVA. Esta similitud entre tratamientos en la población de bacterias también se pudo comprobar a través de los índices de diversidad y riqueza, que tampoco mostraron diferencias significativas (Tabla 7.5). A pesar de la ausencia de significación, se pudo detectar que la riqueza tendió ligeramente al aumento en los tratamientos con EFV y no así en los de COM. En el análisis NMDS, a pesar de obtener un buen nivel de estrés (0,13) no se observaron tendencias claras ni en la agrupación por la enmienda principal (EFV:M o COM:C), ni por los subproductos (ST:A o BF:B) (Figura 7.11). De acuerdo a este análisis, las muestras del tratamiento MA se distribuyeron cercanas a las del control en los valores negativos del segundo eje (NMDS2), mientras que MB y CA quedaron enfrentados a estos en los valores positivos. Los análisis de la población bacteriana no desvelaron ningún indicio, aparentemente, en relación a la mayor actividad microbiana observada en MA y MB a través

de las variables biológicas anteriormente presentadas. Es más, en la gráfica NMDS el centroide del tratamiento MA, que mostró valores más altos de actividad en la mayoría de las variables biológicas, se localizó próximo al de las muestras del control, lo que indicaría mayor similitud entre ambas poblaciones.

En el caso de la población fúngica, se observaron tendencias más claras en los tratamientos, aunque la diferencia estadística fue menor que en la población bacteriana. Algunos autores, sugieren que el análisis de la población fúngica puede resultar más predictiva del estado de salud del suelo que la población bacteriana (Liu et al., 2021). En este ensayo, el filo más abundante fue Ascomycota, siendo el género *Fusarium* el mayor representante, seguido de *Chaetomium* spp. (Figura 7.12). El género *Chaetomium* aumentó en el tratamiento CA (13,5%) respecto al resto, incluido el control (4,3-7,8%), después de la biodesinfección. Estos hongos están descritos como fuertes degradadores de celulosa que se habrían visto beneficiados por el aporte de materia orgánica, en gran parte de origen vegetal. Además, este género se vincula a suelos sanos y, al igual que *Acremonium*, presenta mecanismos de biocontrol debido a la producción de enzimas líticas y metabolitos antimicrobianos (Wang et al., 2017). El aumento de *Chaetomium* ya se ha observado en algunos suelos tratados con técnicas de biodesinfección, constituyendo parte de las poblaciones supresoras de enfermedades de suelo (Huang et al., 2015). El género *Acremonium* se detectó en todas las muestras de suelo pero en poca abundancia (0,3-0,8%) y sin diferencias estadísticas.

El género *Fusarium* fue abundante (15-18%), el mayor representante de Ascomycota, pero tampoco experimentó alteraciones en su población, aunque en condiciones de campo sí disminuyó tras la biodesinfección (Capítulo 6). Es importante destacar, que dentro de este género no sólo se encuentran algunas especies patógenas, sino que gran parte son especies beneficiosas y presentes en muchos suelos. Es más, algunos autores relacionaron el aumento de abundancia de especies no patógenas de *Fusarium* con suelos sanos, libres de Fusariosis (Yuan et al., 2020). De hecho, algunas de estas especies han demostrado su papel como agente de biocontrol y promotor del crecimiento de las plantas, algunas incluso forman parte de la microbiota de la planta (Rai et al., 2021; Rajkumar y Kurinjimalar, 2021). Otro género interesante, también del filo Ascomycota, presente en las muestras de este ensayo fue *Trichoderma*. Contrariamente a lo esperado, su población tampoco se vio ni beneficiada ni perjudicada por la biodesinfección manteniendo una representación similar en todos los tratamientos, incluido el control (0,8-1,4%).

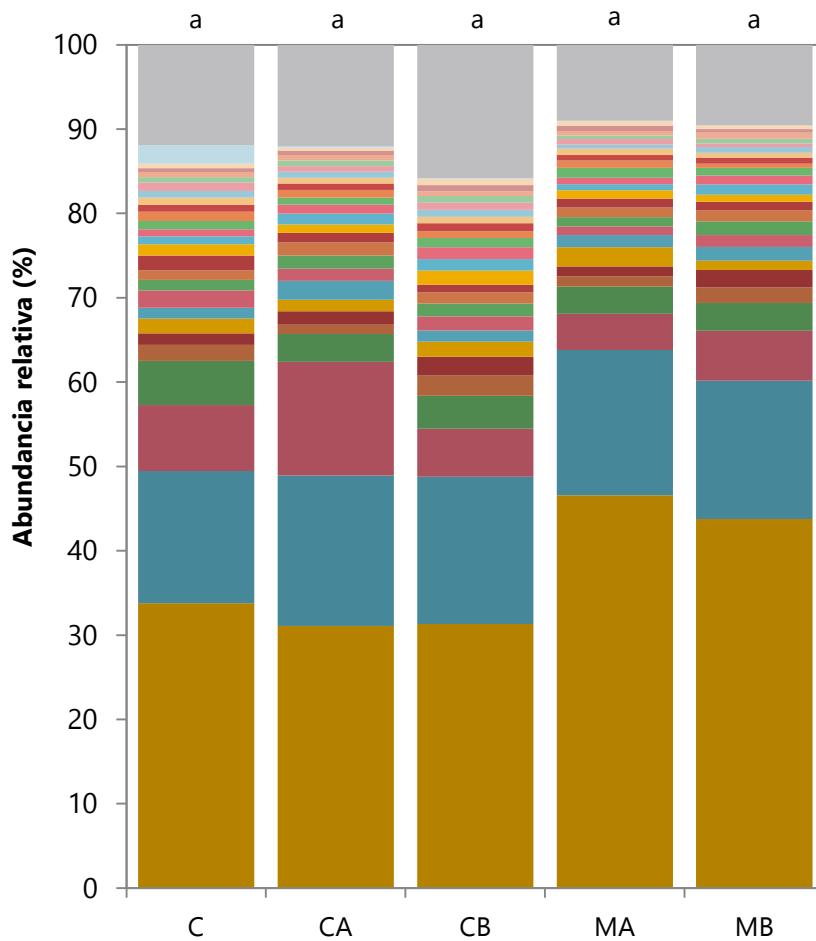
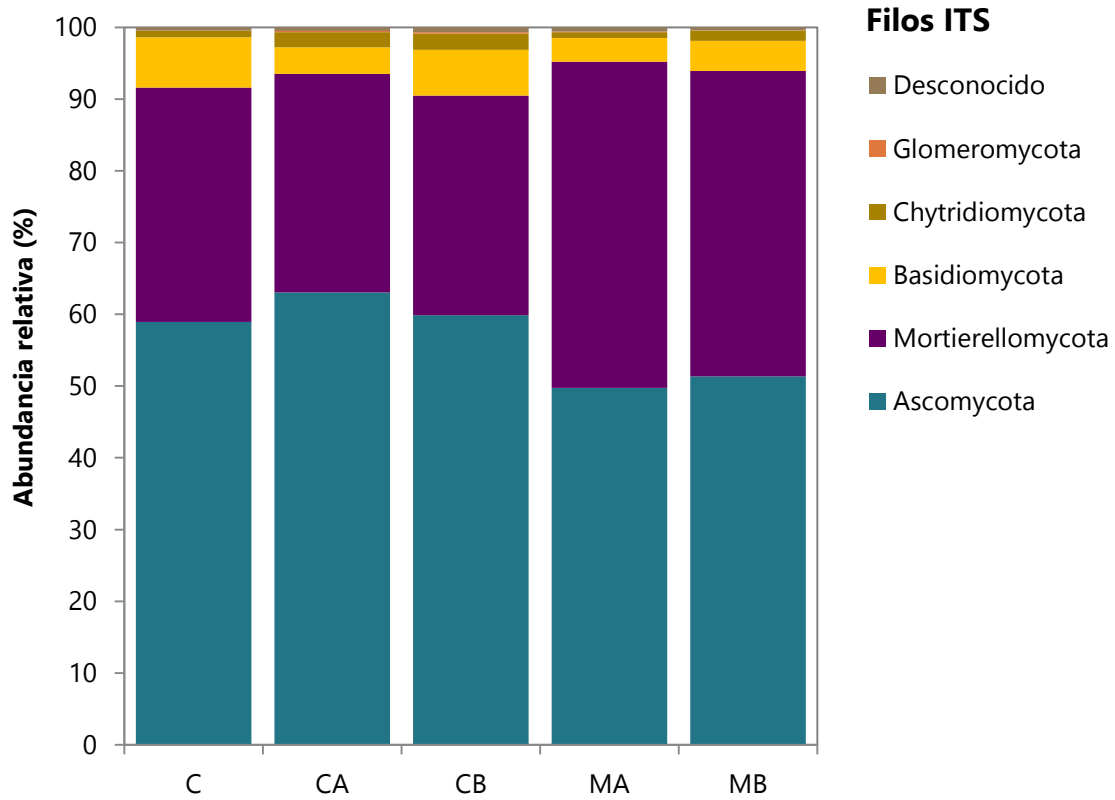
Después de Ascomycota, el siguiente filo más abundante fue Mortierellomycota, representado prácticamente en su totalidad por el género *Mortierella* que aumentó en los tratamientos MA y MB (46,6 y 43,7%, respectivamente) respecto al resto (31-34%) (Figura 7.12). Este género fue el más abundante en todos los tratamientos y, al igual que en la mayoría de mezclas evaluadas en campo que incluyeron EFV (Capítulo 6), también se vio favorecido en las mezclas con EFV de este ensayo. En otros trabajos también se observó el incremento de este grupo tras la biodesinfección (Walker et al., 2022). La abundancia de *Mortierella* se asocia a suelos sanos y es un grupo de microorganismos con efecto promotor

del crecimiento (Yuan et al., 2020; Li et al., 2022). Además, tienen la capacidad de producir metabolitos antagonistas que previenen de infecciones al cultivo. Todo esto hace de su abundancia buen bioindicador de suelos supresores (DeCorato et al., 2019).

Dentro del filo Basidiomycota, cuya población mermó en la mayoría de tratamientos de biodesinfección respecto al control, las especies del género *Conocybe* fueron las más afectadas. Algunos estudios correlacionaron positivamente este género a muestras de rizosfera de plantas con síntomas de enfermedad edáfica, llegando a proponerlo como bioindicador de rizosfera enferma (Wang et al., 2022b). Por lo tanto, la reducción de esta población en todos los tratamientos de biodesinfección (<0,2%) respecto al control (2,2%) indicaría el efecto positivo de esta práctica en la generación de suelos sanos. Considerando los géneros *Conocybe* y *Mortierella* como bioindicadores de rizosfera enferma y sana respectivamente, se podría concluir que los tratamientos de MA y MB generaron suelos con mayor capacidad supresora.

A pesar de las diferencias descritas en las abundancias de determinados géneros de hongos tras la biodesinfección, la ausencia de diferencias estadísticas entre tratamientos en la población fúngica también se vio reflejada en los índices de diversidad y riqueza. Ambos valores fueron similares en los suelos tratados y en los del control sin tratar (Tabla 7.6). En los resultados del índice de riqueza se pudo observar una tendencia al aumento en los tratamientos de biodesinfección (74-75,3) respecto al control (72,3). No fue así en los índices de diversidad que se mantuvieron muy similares o, incluso, disminuyeron ligeramente en los suelos tratados. En el análisis NMDS se pudo ver una tendencia en la agrupación de los tratamientos en función de la enmienda principal. Los centroides de los tratamientos con EFV se localizaron en los valores positivos del NMDS1, mientras que las muestras de CA y CB se distribuyeron, principalmente, en los valores negativos del eje (Figura 7.13). Entre los diferentes tratamientos de biodesinfección, el centroide de CA se localizó muy cercano al de las muestras del control, a diferencia del NMDS de la comunidad bacteriana, en el que fue el centroide de MA el más próximo al del control. En ambos análisis NMDS se pudo observar cómo las muestras del control se agruparon más cercanas entre ellas que las de los suelos tratados. Esto fue indicativo de la perturbación que supuso la biodesinfección, ligada a la heterogeneidad de respuesta debido a otros factores importantes que pueden variar entre réplicas o parcelas (temperatura, humedad, grado homogeneización de suelo y enmienda, etc.)





**OTUs ITS**

- Otros (<0.5%)
- Basidiomycota\_c.Agaricomycetes\_o.Agaricales\_f.Bolbitiaceae\_g.Conocybe
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Hypocreales\_f.Hypocreales\_fam\_Incertae\_sedis\_g.Acremonium
- k.Fungi
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Hypocreales\_f.Bionectriaceae\_g.Clonostachys
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Sordariales\_f.Sordariales\_fam\_Incertae\_sedis\_g.Staphylotrichum
- Ascomycota\_c.Dothideomycetes\_o.Pleosporales\_f.Phaeosphaeriaceae\_g.Setophoma
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Sordariales\_f.Chaetomiaceae
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Sordariales\_f.Lasiosphaeriaceae\_g.Cercophora
- Ascomycota\_c.Leotiomycetes\_o.Thelebolales\_f.Pseudeurotiaceae\_g.Pseudeurotium
- Ascomycota\_c.Dothideomycetes\_o.Pleosporales\_f.Didymellaceae
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Xylariales\_f.Microdochiaceae\_g.Microdochium
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Hypocreales\_f.Hypocreaceae\_g.Trichoderma
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Sordariales\_f.Lasiosphaeriaceae
- Ascomycota\_c.Eurotiomycetes\_o.Eurotiales\_f.Trichocomaceae\_g.Talaromyces
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Hypocreales\_f.Nectriaceae
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Hypocreales\_f.Nectriaceae\_g.Cylindrocarpon
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Hypocreales\_f.Clavicipitaceae\_g.Metarhizium
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Hypocreales\_f.Nectriaceae\_g.Fusicolla
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Sordariales\_f.Lasiosphaeriaceae\_g.Schizothecium
- Ascomycota\_c.Dothideomycetes\_o.Pleosporales\_f.Didymosphaeriaceae
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Glomerellales\_f.Plectosphaerellaceae\_g.Gibellulopsis
- Basidiomycota\_c.Agaricomycetes\_o.Cantharellales\_f.Cantharellales\_fam\_Incertae\_sedis\_g.Minimedusa
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Hypocreales\_f.Nectriaceae\_g.Gibberella
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Sordariales\_f.Chaetomiaceae\_g.Chaetomium
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Hypocreales\_f.Nectriaceae\_g.Fusarium
- Mortierellomycota\_c.Mortierellomycetes\_o.Mortierellales\_f.Mortierellaceae\_g.Mortierella

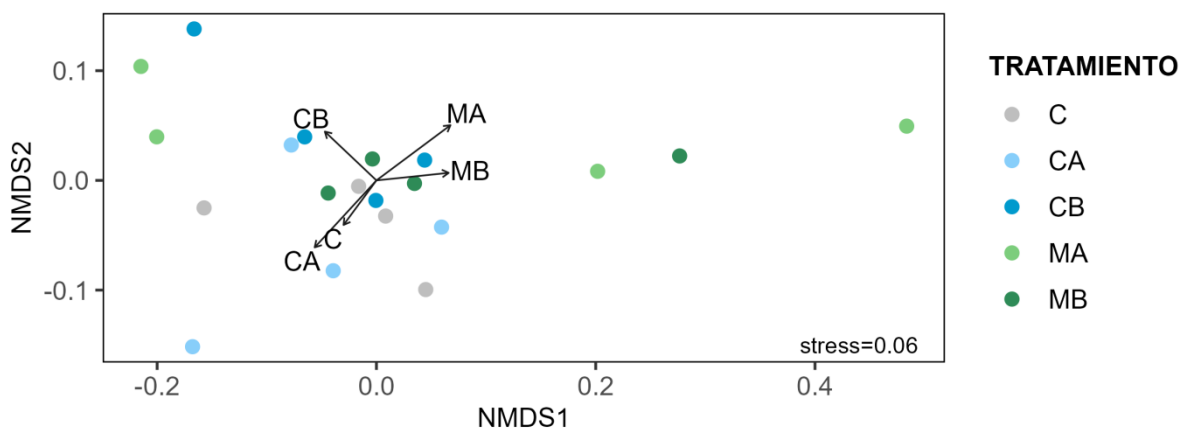
**Figura 7.12** | Abundancia relativa (%) de filos (arriba) y OTUs (abajo) ITS, para hongos, detectados en los suelos con los tratamientos de biodesinfección (CA, CB, MA, MB) y control sin tratar (C). Las letras minúsculas indican las diferencias estadísticas entre tratamientos tomando las OTUs con una abundancia >0,1% (valores de abundancia en el Anexo 1.3).

**Tabla 7.6** | Índices de diversidad (Shannon) y riqueza (Chao) de la población de bacterias a partir de los datos de abundancia relativa de OTUs 16S para bacterias. Valores medios y error estándar (EE) de los suelos biodesinfectados con los cuatro tratamientos (CA, CB, MA, MB) y del control sin tratar (C) al finalizar la biodesinfección. Las letras minúsculas indican las diferencias estadísticas entre los tratamientos.

Tratamiento	DIVERSIDAD			RIQUEZA		
	media	ES		media	ES	
C	2.74	0.07	a	72.5	1.0	a
CA	2.69	0.06	a	75.0	0.7	a
CB	2.88	0.10	a	74.3	1.2	a
MA	2.15	0.50	a	74.0	0.4	a
MB	2.39	0.26	a	75.3	0.5	a

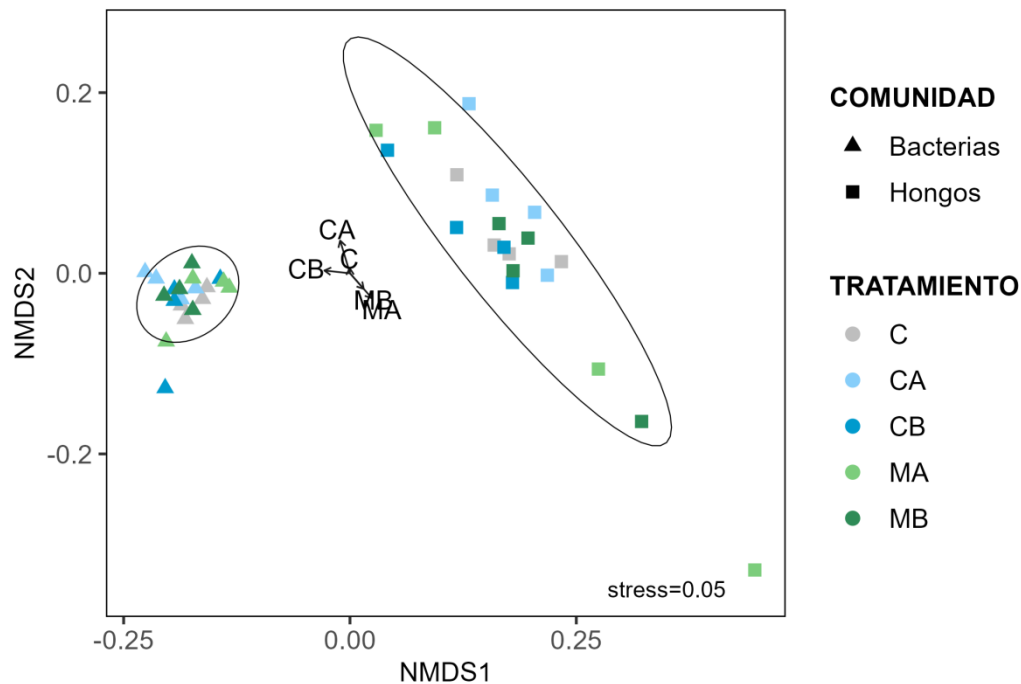
A fin de evaluar de forma conjunta las dos poblaciones microbianas analizadas, se incluyó otro análisis NMDS incluyendo ambos grupos. El resultado mostró una clara diferenciación entre las comunidades microbianas, con un valor de estrés óptimo (0,05),

localizándose cada comunidad a cada lado del eje NMDS1 (Figura 7.14). También se produjo mayor dispersión en las muestras pertenecientes a la comunidad fúngica, lo que pudo reflejar mayor impacto y variabilidad como respuesta a la biodesinfección. En este análisis los centroides de las muestras de los tratamientos MA y MB se ubicaron muy próximos entre sí, en los valores negativos del eje NMDS2 y en contraposición a los centroides de CA y CB. El centroide de las muestras control se situó en los valores cercanos al 0 en ambos ejes, entre los centroides de los dos grupos de tratamientos de biodesinfección según la enmienda principal (EFV o COM). Esta agrupación se asemejó más a la generada para el análisis de las poblaciones fúngicas, pudiendo estar fuertemente influenciada por estas. Esto podría respaldar la elección de la población fúngica respecto a la bacteriana como indicador más sensible de la salud de los suelos como se ha mencionado anteriormente. Puede que esto sea debido a la intrincada red de conexiones que forman los hongos en el suelo y con la planta que influyen en procesos vitales para ésta (Liu et al., 2021).



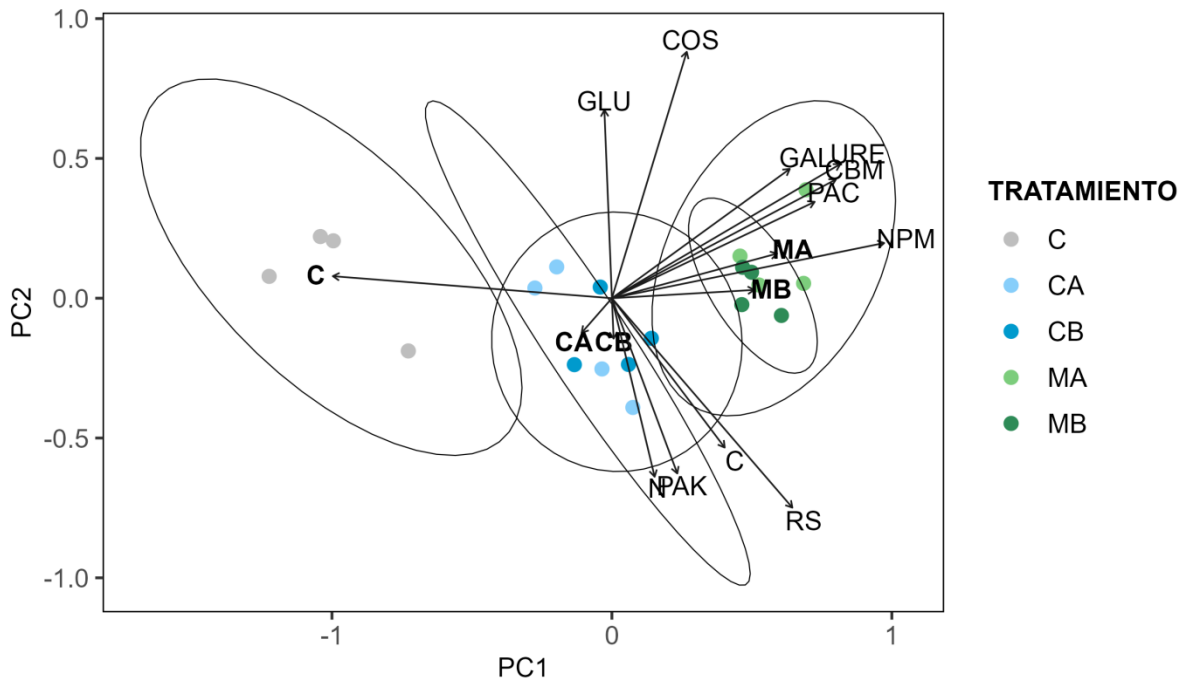
**Figura 7.13** | Análisis NMDS (*non-metric multidimensional scaling*) de las poblaciones de hongos presentes en los suelos biodesinfectados con los cuatro tratamientos (CA, CB, MA, MB) y del control sin tratar (C) al finalizar la biodesinfección según los valores de abundancia relativa de OTUs.

De manera similar al estudio de las comunidades microbianas, y a fin de complementar los resultados, también se realizó una evaluación conjunta de las variables químicas y biológicas a través de un análisis PCA. Los resultados mostraron una clara agrupación de las muestras por tratamientos, especialmente en función de la enmienda principal. En este análisis las muestras de los diferentes tratamientos se distribuyeron a lo largo del eje del primer componente (PC1) que explicó el 81% (Figura 7.15). Mientras las muestras del control se localizaron en los valores negativos de este eje, las de los suelos tratados con MA y MB quedaron agrupadas en los valores positivos, quedando CA y CB entre el control y los tratamientos con EFV en los valores cercanos al 0. También se pudo observar cómo la mayoría de las variables incluidas para el análisis, y con efecto significativo en el modelo, tendieron hacia la agrupación de las muestras de MA y MB, reflejando mayor actividad microbiana en estos tratamientos. Estos resultados se correspondieron a los obtenidos para cada variable individualmente y destacaron la calidad del EFV frente al COM como enmienda promotora de actividad microbiana, y mejora de la fertilidad, en procedimientos de biodesinfección de suelos.



**Figura 7.14 |** Análisis NMDS (*non-metric multidimensional scaling*) de las poblaciones de bacterias y hongos presentes en los suelos biodesinfectados con los cuatro tratamientos (CA, CB, MA, MB) y del control sin tratar (C) al finalizar la biodesinfección según los valores de abundancia relativa de OTUs. Las elipses indican la agrupación por comunidad para un intervalo de confianza del 95%.

Considerando el conjunto de resultados, la enmienda principal fue el elemento más determinante en generar diferencias entre los tratamientos de biodesinfección diseñados. Por un lado, las mezclas con COM como enmienda principal registraron mayor número de horas a temperaturas subletales. Por otro lado, los tratamientos MA y MB mostraron valores más altos de actividad microbiana que CA y CB. Sin embargo, los tratamientos que mejor controlaron la población de FOLac y el desarrollo de enfermedad fueron los tratamientos CA y MA, los dos que incluían ST en la mezcla. Entre los subproductos empleados en las técnicas de biodesinfección, el ST es bastante habitual, especialmente en tratamientos de ASD, debido a la naturaleza del C presente que favorece la actividad microbiana (Roskopf et al., 2014). La ausencia de datos del potencial redox y de otras variables químicas del suelo como el Fe y el Mn impidió dilucidar si en CA y MA se dieron mayores condiciones reductoras, que pudieran justificar la mayor reducción de FOLac. Teniendo en cuenta la comunidad fúngica como mejor indicador, el tratamiento CA fue en el único que incrementó el género *Chaetomium* y en MA y MB *Mortierella*. Ambos géneros están considerados beneficiosos para el cultivo e importantes antagonistas presentes en suelos supresivos (Huang et al., 2015; Yuan et al., 2020; Li et al., 2022), lo que indicó el efecto positivo de estos tratamientos.



**Figura 7.15** | Análisis PCA según las variables químicas (C y N) y biológicas (CBM: C de la biomasa microbiana; COS: C orgánico soluble; GAL: galactosidasa; GLU: glucosidasa; PAC: fosfatasa ácida; PAK: fosfatasa alcalina; URE: ureasa; NPM: N potencialmente mineralizable; RS: respiración del suelo), con mayor significación en el modelo, analizadas en los cuatro tratamientos (CA, CB, MA, MB) y el control sin tratar (C) después de la biodesinfección. Las elipses indican la agrupación por tratamientos para un intervalo de confianza del 95%.

Estos resultados van en consonancia con estudios similares de biodesinfección en los que se evaluó la microbiota y se observó la reestructuración de la comunidad hacia suelos supresivos (Randall et al., 2020; Shea et al., 2022; Yan et al., 2022). Sin embargo, el incremento de poblaciones antagonistas y beneficiosas para el cultivo no fue suficiente para reducir la población de FOLac a concentraciones inferiores a la infectividad ( $<50\text{UFC/g}$  suelo o  $<1,7\log_{10}(\text{UFC}+1)/\text{g}$ ) (Gordon y Koike, 2015). Probablemente, si las temperaturas alcanzadas durante la biodesinfección hubieran sido más elevadas ( $>35^{\circ}\text{C}$ ), hecho que se da en condiciones de campo en esta región en temporada estival, la concentración de FOLac se hubiera reducido más de lo obtenido. Así y todo se logró reducir su abundancia en los tratamientos de biodesinfección frente al control, incluso tratándose de un patógeno favorecido por las temperaturas de suelo similares a las registradas durante la biodesinfección ( $30\text{--}35^{\circ}\text{C}$ ) (Scott et al., 2010a). A pesar del escaso efecto térmico, los tratamientos CA y MA lograron reducir significativamente la población y, con ello, el desarrollo de enfermedad. Esto puso en relieve la importancia de la mezcla de enmiendas incorporada y el papel crucial desempeñado por la microbiología del suelo, a su vez, influenciado por la materia orgánica y las condiciones ambientales generadas durante la biodesinfección.

En conclusión, a pesar de las limitaciones ligadas a los ensayos en cámara de cultivo, este ensayo permitió observar el efecto de la biodesinfección contra FOLac, así como en la microbiología del suelo, y concluir que estos tratamientos contribuyen en la mejora de la fertilidad y salud de los suelos. A través de estos resultados, se pudo comprobar como

especies beneficiosas para el cultivo y asociadas a suelos supresores (*Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., *Chaetomium* spp. y *Mortierella* spp.) se vieron beneficiadas por los tratamientos aumentando su población en detrimento de especies patógenas como FOLac y otras relacionadas con rizosferas enfermas (*Conocybe* spp.). Esta mejora en la comunidad microbiana se pudo corroborar con el aumento de las variables biológicas asociadas a la actividad degradadora, con su consecuente movilización de nutrientes, en los tratamientos de biodesinfección, especialmente en aquellos a base de EFV. Por lo tanto, este ensayo permitió detectar diferencias entre los tratamientos de biodesinfección probados y evidenció el EFV como enmienda clave, junto con el ST. Precisamente, fueron los tratamientos con EFV, MA y MB, los que presentaban valores C/N entre 25 y 30. Este rango suele dar los mejores resultados y, además, se considera el óptimo para promover los procesos de degradación y favoreciendo la producción de nutrientes (Guo et al., 2019; Yang et al., 2021). Por todo ello, para el siguiente ensayo en condiciones de campo en una explotación comercial gravemente afectada por FOLac se decidió optar por la aplicación de un tratamiento similar a MA, reduciendo ligeramente la dosis.





## CAPÍTULO 8



Incorporación de compost tras biodesinfección de suelo con subproductos agroindustriales contra *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* y *M. incognita* en explotación de lechuga bajo invernadero







## 8. Incorporación de compost tras biodesinfección de suelo con subproductos agroindustriales contra *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* y *M. incognita* en explotación de lechuga bajo invernadero

---

### 8.1. Introducción

Las especies del género *Fusarium* son hongos ascomicetos filamentosos que pueden actuar como parásitos, endófitos o saprófitos. Las especies patógenas son las más estudiadas debido a las importantes pérdidas que generan en los cultivos comerciales. Entre ellas, destaca la especie *F. oxysporum* por su amplio espectro de cultivos hospedadores y por encontrarse ampliamente distribuido. Además, esta especie presenta formas de especialización en función del cultivo hospedante, de las que se han llegado a describir más de 150 formas especializadas o patotipos (Ma et al., 2013; Rana et al., 2017). Entre estos patotipos, *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (FOLac) es la forma que más daño está produciendo en los cultivos comerciales de lechuga en la CAPV, al igual que en otras muchas regiones. A su vez, este patotipo tiene descritas cuatro razas, siendo la raza 1 predominante en los países europeos y la generadora de daños en la región objeto de estudio. La enfermedad desarrollada en el cultivo por este patógeno se denomina Fusariosis vascular de la lechuga y provoca el marchitamiento de la planta. Los daños se pueden detectar a través del amarillamiento y secado de las hojas basales junto con la coloración marrón rojiza del interior del cuello de la planta debido a la necrosis vascular.

Desde los primeros registros de cultivos de lechuga afectados por FOLac en la CAPV, en 2017, la enfermedad se ha ido agravando y extendiendo en los últimos años. La Fusariosis es una de las enfermedades más difíciles de tratar debido a su elevada persistencia por la formación de propágulos resistentes en el medio y ausencia de tratamientos fitosanitarios efectivos. En este caso, al ser la raza 1 de FOLac la causante de enfermedad y siendo la temperatura un factor limitante para esta raza, su infectividad se hacía patente durante los meses más cálidos. Por tanto, en una región templada como la CAPV las pérdidas en el cultivo por Fusariosis se reducen a los meses de primavera y verano. Sin embargo, desde la aparición de la raza 4 en el país en 2021 (Gálvez et al., 2023), no se descarta su entrada en la CAPV en los próximos años. La presencia conjunta de ambas razas supondría pérdidas en la producción durante todo año, al ser la raza 4 infectiva a temperaturas más bajas que la raza 1.

Además, en las explotaciones comerciales de lechuga de la CAPV es habitual la presencia conjunta de FOLac y el nematodo fitopatógeno *Meloidogyne incognita*, con el que se trabajó para su control en capítulos anteriores (Capítulos 4 y 5) y que no hace sino agravar

el problema. Por un lado, el ataque de ambos patógenos debilita aún más el cultivo y, por otro, las heridas que generan las hembras de *M. incognita* al penetrar en la raíz facilitan la entrada de FOLac al sistema vascular (Manzanilla-López y Starr, 2009). Por lo tanto, el objetivo a la hora de mejorar la salud de los cultivos, debería centrarse más en generar suelos sanos y supresores, con capacidad para inhibir el desarrollo de enfermedades, y no tanto en erradicar cada patógeno individualmente. Además, el aumento de limitaciones en el uso de pesticidas sintéticos apremia la búsqueda de alternativas eficientes y menos agresivas. Este fue el caso de la biodesinfección, que tras haberse aplicado con resultados positivos en otros patosistemas de la CAPV (Núñez-Zofío, 2012; Gandariasbeitia et al., 2021 y 2022) fue bien recibida por los propietarios de la explotación. A esto se suma el efecto positivo demostrado frente a FOLac en otras regiones empleando esta práctica (Fernández-Bayo et al., 2018; Pastrana et al., 2022).

El agravamiento de las enfermedades edáficas en los cultivos comerciales de lechuga en la CAPV se traduce en importantes pérdidas económicas que ponen en jaque la producción y, con ello, a los agricultores. Ante esta situación, a la que se une la falta de tratamientos convencionales eficaces, en 2022 una cooperativa de productores destinó un invernadero de una de las explotaciones afectadas para evaluar la técnica de biodesinfección. A pesar de que las pérdidas en esta explotación fueron por FOLac, en estos suelos se daba la presencia conjunta con *M. incognita*. Por lo tanto, en este ensayo se evaluó el tratamiento sobre ambos patógenos y el desarrollo de las respectivas enfermedades, junto con los cambios en las propiedades del suelo. Considerando los resultados obtenidos en los ensayos anteriores (Capítulos 6 y 7), el salvado de trigo y la cáscara de pipa de girasol fueron los subproductos seleccionados junto al estiércol fresco vacuno para la mezcla de enmiendas a aplicar en esta biodesinfección. Las características de la mezcla reunían las condiciones consideradas más efectivas para la biodesinfección, como una aplicación de 5,5mgC/g de suelo (peso seco) ( $\geq 4\text{mgC/g}$ ) y un C/N de 30 pero reduciendo la dosis a 3,1kg/m<sup>2</sup> (peso seco). En este caso, se optó por evaluar la incorporación de compost tras la biodesinfección como tratamiento complementario. El compost es el resultado de la degradación de restos orgánicos, de origen vegetal o animal, y está considerada enmienda mejoradora de las propiedades del suelo. Además, esta enmienda puede incluir una serie de microorganismos considerados beneficiosos como *Trichoderma* spp. (hongos) y *Pseudomonas* spp. (bacterias) que podrían contribuir en el efecto supresor. Sin embargo, existe elevada variabilidad de resultados dependiendo del patógeno y el tipo de compost, entre otros, pudiendo dotar al suelo de carácter supresor o conducente (Bonanomi et al., 2010; De Corato et al., 2018).

De acuerdo a la bibliografía y a los ensayos realizados en este trabajo, el componente biológico se considera clave para el control de patógenos, así como para el desarrollo de suelos supresores. Por esta razón, se consideró que la incorporación de compost tras la perturbación inicial, aunque transitoria, que supone la biodesinfección podría contribuir en la mejora de resultados. En este ensayo, el tratamiento de biodesinfección se realizó, en los meses de verano, en algunos cuerpos del invernadero y se empleó el resto de los cuerpos como control no biodesinfectado. Una vez finalizada la biodesinfección y antes

del trasplante, se aplicó compost en parte de los suelos biodesinfectados y controles. El objetivo principal fue la evaluación del efecto de la biodesinfección, la aplicación solo de compost y el efecto conjunto de la biodesinfección sobre los patógenos, el cultivo y las propiedades del suelo. Para ello, además del estudio de la población de *FOLac* y *M. incognita* y de la producción de lechuga, se incluyeron un conjunto de variables fisicoquímicas y biológicas del suelo. El análisis conjunto de estas variables facilitan la comprensión de los mecanismos generados en el suelo para lograr frenar la proliferación de los patógenos, incluso lograr suelos supresores.

## 8.2. Materiales y métodos

### Ubicación del ensayo y diseño experimental

Este ensayo se llevó a cabo en la explotación 2, ubicada en el municipio de Gamiz-Fika (X: 514740, Y: 4797133), Bizkaia, a pocos kilómetros de la explotación 1 (Capítulos 5 y 6). Se trataba de una producción en convencional de monocultivo de lechuga bajo invernadero, con un manejo similar al usado en la explotación 1. En esta finca se llevaba cultivando lechuga de manera continuada durante más de 20 años, sin embargo, a partir de 2016 comenzaron las pérdidas de producción por Fusariosis que fueron aumentando progresivamente en los años sucesivos. Hasta que en 2022, ante el continuo incremento de pérdidas sumado a la falta de productos fitosanitarios efectivos, los productores cedieron uno de los invernaderos afectados para probar la biodesinfección. El suelo del invernadero empleado en este ensayo era franco-arcillo-limoso (29% arena, 36% limo y 35% arcilla) con pH 7,5 y un contenido del 6-7% de materia orgánica. Las plantas de lechuga cultivadas en este invernadero, además de Fusariosis, también presentaban nodulación en las raíces por *M. incognita*. Otros detalles y antecedentes de la explotación vienen descritos en el Capítulo 3 de Procedimientos Generales (apartado 4.1.2).

Los subproductos empleados en este ensayo fueron seleccionados por los resultados positivos obtenidos previamente en condiciones de campo contra *M. incognita* (Capítulo 6) y en cámara de cultivo contra FOLac (Capítulo 7). La mezcla de enmiendas orgánicas para la biodesinfección consistió en 2,2kg/m<sup>2</sup> de estiércol fresco vacuno (EFV), 0,5kg/m<sup>2</sup> de salvado de trigo (ST) y 0,4kg/m<sup>2</sup> de cáscara de pipa de girasol, lo que supuso un total de 3,1kg/m<sup>2</sup> (peso seco) considerando una profundidad de suelo de 20cm. Para el diseño de la mezcla se caracterizaron previamente las enmiendas a emplear, cuyos valores sirvieron para estimar los valores fisicoquímicos de la mezcla (Tabla 8.1). El diseño de esta mezcla se basó en la experiencia de ensayos anteriores (Capítulos 6 y 7) pero incluyendo una ligera disminución en el aporte de EFV y manteniendo el aporte mínimo necesario de 4mgC/g de suelo para promover anaerobiosis (5,5mgC/g) y un C/N mayor de 25 (30). Además, para este ensayo se incluyó el aporte de compost (COM) tras la biodesinfección y antes del trasplante del siguiente cultivo, a una dosis de 2,7kg/m<sup>2</sup>, para evaluar la posible mejora del resultado. El ST y la CPG tuvieron el mismo origen que en los ensayos anteriores

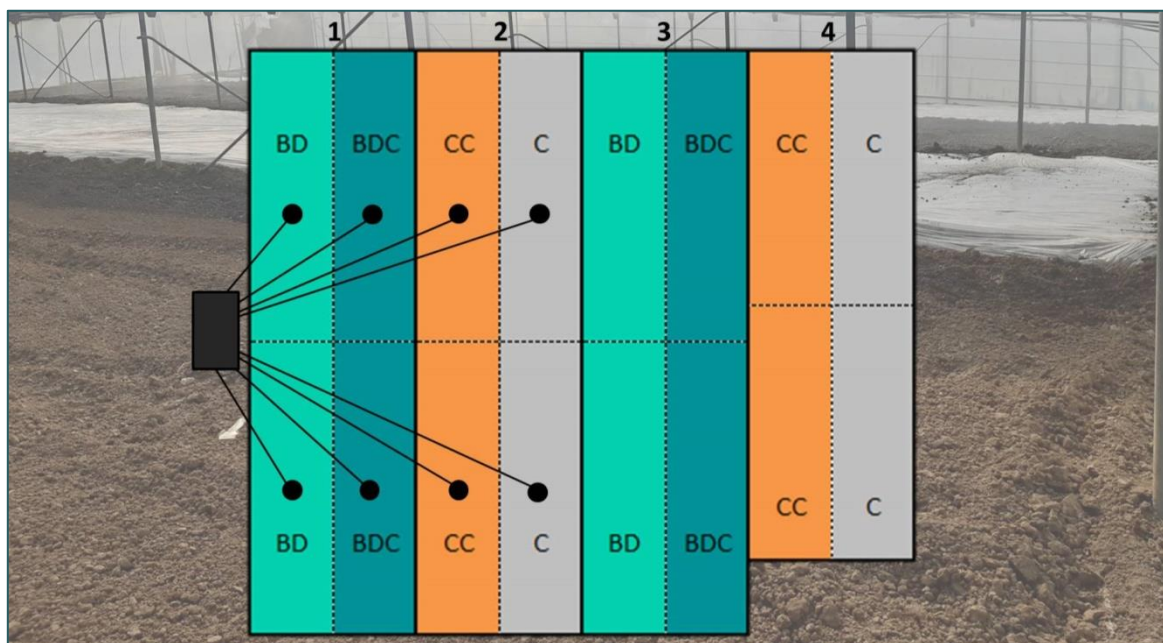
(Capítulos 6 y 7) (MIBA Coop., Bizkaia), no así el EFV que provino de otra explotación ganadera. El COM incorporado, fue el mismo empleado en el ensayo en condiciones controladas (Capítulo 7), obtenido de la planta de compostaje municipal (Artigas Konpostegia, Bizkaia). Este COM se produce, generalmente, empleando un 75% de material estructurante (restos de poda) y un 25% de residuos orgánicos urbanos.

**Tabla 8.1** | Caracterización fisicoquímica de las enmiendas aplicadas: estiércol fresco vacuno (EFV), salvado de trigo (ST), cáscara de pipa de girasol (CPG) y compost (COM). Se incluye en color los valores de la mezcla de enmiendas empleada para la biodesinfección (EFV+ST+CPG) con los valores estimados según la cantidad aplicada de cada enmienda. Valores expresados sobre el peso seco.

ENMIENDA	EFV	ST	CPG	MEZCLA	COM
Materia seca (%)	37.97	90.08	91.06	53.73	78.3
pH	8.5	6.5	6	7.8	7.8
CE (mS/cm)	6.9	2.48	2.34	5.56	4
Materia orgánica (%)	78.02	95.41	90.78	82.64	68.15
C orgánico (%)	45.26	55.34	52.66	47.94	39.53
N total Kjeldahl (%)	1.54	2.37	0.87	1.59	2.46
C/N	29	23	61	30	16
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (%)	0.96	1.55	0.19	0.96	1.03
K <sub>2</sub> O (%)	2.2	1.35	1.06	1.91	1.9
SO <sub>3</sub> (%)	0.53	0.13	0.17	0.42	0.52
CaO (%)	1.75	0.21	0.54	1.33	6.05
MgO (%)	0.39	0.54	0.32	0.41	0.41
Na (%)	0.28	<0.01	<0.01	-	0.24
Fe (mg/kg)	0.12	0.01	0.01	0.1	0.68
Mn (mg/kg)	102.1	67.98	11.92	84.58	120.94
Cu (mg/kg)	19.92	11.91	9.93	17.26	39.48
Zn (mg/kg)	173.8	91.31	13.41	138.93	203.4
B (mg/kg)	13.21	2.87	16.72	11.91	34.3
Cd (mg/kg)	<0.20	<0.20	<0.20	-	<0.20
Pb (mg/kg)	1.81	<1.00	<1.00	-	11.55
Hg (mg/kg)	<0.40	<0.40	<0.40	-	<0.20
Cr (mg/kg)	4.34	0.3	2.13	3.37	16.99
Ni (mg/kg)	3.31	0.72	1.79	2.67	7.7
Dosis (kg/m <sup>2</sup> )	2.2	0.5	0.4	3.1	2.7
C (mg/g suelo)	3.6	1.1	0.8	5.5	4.1
N (kg/ha)	333	128	35	496	837

El invernadero empleado en este ensayo era de tipo multicapilla formado por cuatro cuerpos de 30x6m (180m<sup>2</sup>) cada uno, salvo uno de ellos (cuerpo 4) que era ligeramente más corto (25x6m, 150m<sup>2</sup>). El diseño del ensayo fue un strip plot (parcelas en franjas) de dos factores con 4 unidades experimentales, o parcelas elementales, para permitir analizar el efecto de cada factor así como el efecto conjunto de ambos factores o interacción. El primer factor (aplicación de biodesinfección) presentó dos niveles: biodesinfectado y no biodesinfectado. El segundo factor (aplicación de compost) también presentó dos niveles: con compost y sin compost. Para ello, cada cuerpo de invernadero (6x30m<sup>2</sup>) se dividió por la

mitad de forma longitudinal y transversal generando cuatro parcelas por cuerpo, es decir, un total de 16 parcelas experimentales de 3x15m (45m<sup>2</sup>). La biodesinfección se realizó en dos de los cuatro cuerpos (1 y 3), mientras que los otros dos sirvieron de control no biodesinfectado (2 y 4) (Figura 8.1) (siendo el cuerpo 4 de menor tamaño, 15x6m, generó parcelas experimentales de 37m<sup>2</sup>). Tras la incorporación de enmiendas y previa colocación de la cubierta plástica, se enterraron a 15cm de profundidad cuatro sondas de temperatura y cuatro de potencial redox en uno de los cuerpos (1) tratados y en otro cuerpo control (2) conectados a un procesador de datos Campbell CR1000X (Campbell Scientific) para la temperatura y HOBO RX3004 para el potencial redox. Finalmente, se regó abundantemente por aspersión (40L/h/m<sup>2</sup>) en cuatro tiempos de 30 minutos con 6h de intervalo (80L/m<sup>2</sup>), y se colocó el plástico TIF transparente empleado previamente (Capítulos 6 y 7). La biodesinfección comenzó el 10 de julio de 2021 y la retirada del plástico se realizó el 23 de agosto, cumpliendo un total de casi seis semanas. Una vez finalizada la biodesinfección, se dejó airear el suelo durante cinco días, previa incorporación del COM, antes del siguiente trasplante. Para evaluar el efecto del COM, se aplicaron 2,7kg/m<sup>2</sup> (peso seco), de acuerdo a estudios similares (Lahoz et al., 2009), en una de las mitades longitudinales de cada cuerpo, tanto a los tratados (BDC) como a los controles (CC) (Figura 8.1). Por lo tanto, el ensayo constó de cuatro tratamientos (BD, BDC, C y CC) con cuatro parcelas o replicas cada uno. En este caso, para la distribución de los tratamientos se priorizó facilitar el manejo al agricultor, sacrificando la aleatoriedad y siguiendo el diseño de parcelas en franjas mencionado anteriormente.



**Figura 8.1** | Esquema del invernadero de cuatro cuerpos del ensayo con la disposición de los tratamientos y la distribución de parcelas según un diseño de strip plot (parcelas en franjas) de 2 factores con 4 unidades experimentales. El primer factor (aplicación de biodesinfección) presentó 2 niveles: biodesinfectado y no biodesinfectado. El segundo factor (aplicación de compost) presentó 2 niveles: con compost y sin compost antes del trasplante del cultivo siguiente. Se incluye la disposición de sondas de temperatura y potencial redox conectadas al registrador de datos. De fondo, fotografía del ensayo una vez colocada la cubierta plástica

## Muestreo y procesamiento de muestras

El procedimiento de la toma de muestra fue el mismo que se llevó a cabo en los ensayos anteriores en campo (Capítulos 5 y 6). En resumen, las muestras de suelo se tomaron con la ayuda de un muestreador (2,5x25cm) en 10 puntos aleatorios de cada parcela para conformar cerca de 2kg (peso fresco) de muestra heterogénea por parcela. Las muestras se conservaron a 4°C hasta los correspondientes análisis. Las muestras de suelo se tomaron antes del tratamiento (T1) el 6 de julio, después de la biodesinfección y tras incorporar el COM (T2) el 1 de septiembre y una vez cosechado el primer cultivo después de los tratamientos (T3) el 11 de noviembre. Parte de la muestra (300g, peso fresco) se tamizó para los análisis biológicos y otra parte (1kg, peso fresco) se secó y molió para la caracterización fisicoquímica, mientras que para el análisis de la nematofauna se mantuvo el suelo natural (600g).

Las muestras de lechuga se tomaron en los tiempos T1 y T3 al ir precedidos por un cultivo, aunque no todas las variables se pudieron analizar en ambos muestreos. En este caso, se tomaron ocho muestras de raíz de forma aleatoria por parcela (32 plantas/tratamiento) para la evaluación de la infección por *M. incognita*. Estas muestras se conservaron a 4°C por un máximo de dos semanas. Además, en el último muestreo (T3), correspondiente a la finalización del cultivo de lechuga posterior a los tratamientos, se tomaron cinco lechugas (parte aérea) por parcela (20 plantas/tratamiento) de forma aleatoria y evitando los bordes para la evaluación de variables nutricionales en hoja. Una vez en el laboratorio, las plantas se deshojaron y mezclaron para generar una muestra heterogénea por parcela. Las muestras de hojas de lechuga se conservaron a -80°C hasta los análisis, parte en forma de puré en metanol y el resto en hoja entera sin procesar.

## VARIABLES ANALIZADAS Y TRATAMIENTO DE DATOS

### Temperatura y potencial redox

Los registros de temperatura y redox durante las seis semanas de la biodesinfección se tomaron en el suelo a 15cm de profundidad en cuatro parcelas biodesinfectadas y en cuatro no tratadas. Además se incluyó una sonda de temperatura dentro del invernadero para registrar la temperatura ambiental (Figura 8.1). Las medidas se tomaron cada 15 minutos quedando guardadas en un registrador de datos Campbell CR1000X (Campbell Scientific). Estos datos se emplearon para calcular los valores medios de temperatura y potencial redox de cada hora para calcular los valores acumulados de ambas variables por tratamiento.

En el caso de la temperatura, se procedió de la misma forma que en los ensayos anteriores (Capítulos 5, 6 y 7). El cálculo del número de horas acumuladas en condiciones reductoras o de anaerobiosis se llevó a cabo según Butler et al. (2012b). Este procedimiento consiste en determinar el valor crítico del potencial redox (CEh) por debajo del cual se darían condiciones anaerobias en el suelo. Para ello, es necesario conocer el pH del suelo que, en este caso, fue medido junto con el potencial redox por la misma sonda. De acuerdo a la



fórmula propuesta por Rabenhorst y Castenson (2005) para determinar el CEh [CEh=595mV-60mV \*pH], el suelo de este ensayo presentó un valor CEh de 145mV para un pH de 7,5. Esto implicaría que todas las horas registradas con un valor <145mV se considerarían como condiciones anaerobias. A través de la suma de todos los valores con esta condición (<145mV) se obtuvo el valor del potencial redox acumulado (mVh), que para ser efectivo contra diversos patógeno debería superar los 50.000mVh (Shennan et al., 2018).

#### Caracterización fisicoquímica de enmiendas y suelos

Las enmiendas aplicadas en este ensayo fueron empleadas en ensayos anteriores (Capítulos 6 y 7) por lo que ya se disponía de su caracterización fisicoquímica. Únicamente el EFV tuvo que ser analizado por proceder de diferente origen (Tabla 8.1). Tanto las enmiendas como las muestras de suelo fueron caracterizadas por un laboratorio acreditado (MOPRILAB S.L. Abarán, Murcia). En ambos casos se analizaron variables de macro y micronutrientes, junto con metales y otras variables de fertilidad. Los procedimientos de estos análisis quedaron descritos en capítulos anteriores (Capítulos 5 y 6) y detallados en el apartado 4.6 del Capítulo 3 de Procedimientos Generales.

#### Cuantificación de FOLac

La determinación de la concentración de FOLac en el suelo se realizó mediante qPCR como viene descrito en el capítulo anterior (Capítulo 7) y detallado en el apartado 4.2.2 del Capítulo 3 de Procedimientos Generales. En resumen, se extrajo el ADN del suelo con Invisorb Spin Soil DNA Kit-QIAGEN (QIAGEN N.V., Venlo, Holanda) y se ejecutó la qPCR empleando los cebadores descritos por Pascuali et al. (2007) y adaptando las condiciones de PCR propuestas por Cabral et al. (2018).

#### Índice de nodulación y cuantificación de huevos en raíz

El índice de nodulación se valoró en función de la escala de Bridge y Page (1980) (0: raíz sana; 10: agallamiento muy severo) siguiendo el mismo procedimiento que en los Capítulos 5 y 6. Estas mismas raíces (32/tratamiento) se emplearon para la extracción de huevos de *M. incognita* de acuerdo al procedimiento explicado en el Capítulo 6 (Hussey y Barker, 1973). Ambas técnicas se detallan en el Capítulo 3 de Procedimientos Generales (apartado 4.2.1.2).

#### Cuantificación de *M. incognita* y estudio de nematofauna

Como en ensayos anteriores (Capítulos 5 y 6), la cuantificación de *M. incognita* se realizó de la misma forma que para la evaluación de la nematofauna, mediante la técnica de embudo de Baermann (Barker, 1985) que consigue extraer en agua los nematodos presentes en 200g de suelo (peso fresco). El resultado de la extracción se visualizó al microscopio para la identificación y cuantificación de los diferentes individuos por sus características

morfológicas. Este procedimiento viene descrito en capítulos anteriores (Capítulos 6 y 7) y detallado en el Capítulo 3 de Procedimientos Generales (apartado 4.2.1.1).

#### Producción y concentración de nitratos y aminoácidos en hoja

Una vez finalizado el cultivo de lechuga siguiente a la biodesinfección (T3), se evaluó el porcentaje de producción por parcela mediante una estimación visual del número de plantas con correcto desarrollo y de tamaño comercial. Además, en este ensayo se midió el contenido de nitratos y aminoácidos en hoja de este último muestreo, tras la aplicación de los tratamientos. La concentración de nitratos en hoja se determinó siguiendo una adaptación de los procedimientos de Muro et al. (1998) y Valdés (2015). Para ello, se tomaron varios trozos de hoja de cada muestra conservada a  $-80^{\circ}\text{C}$  que fueron machacadas aun sin descongelar e introducidas en un tarro de vidrio hermético, tomando registro del peso de la muestra. A los tarros se les agregó agua destilada a razón de 5/30 p/v y se autoclavaron (20 minutos a  $121^{\circ}\text{C}$ ). Una vez atemperados, se volvió a tomar el peso de la muestra y se procedió a batir el contenido del tarro hasta su homogeneización. El batido se filtró empleando una jeringa y filtros de fibra de vidrio de  $1\mu\text{m}$  hasta obtener al menos 1ml de extracto que se mezcló en 24ml de agua destilada y 0,5ml de una disolución de  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ . Una vez calibrado el equipo, se midió el contenido de  $\text{NO}_3^-$  con una sonda específica (LZW9662.97.0002 SENSION + Electrodo ISE de Nitrato. HACH S.L.U, Colorado, EEUU) manteniendo la muestra en agitación durante la medición.

El contenido en aminoácidos se determinó de acuerdo al procedimiento descrito por Chen et al. (2009). Una muestra representativa de 15g de las hojas recogidas en fresco se batieron en 30ml de metanol al 80% (relación 1/3 p/v) y el puré resultante se conservó hasta su análisis a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para ello, se descongeló la muestra y se pesaron 1,5ml a los que se añadió 4,5ml de agua destilada. Esta solución se incubó en estufa durante 1h a  $100^{\circ}\text{C}$  y, una vez atemperada, se filtró por  $0,1\mu\text{m}$  con filtros CHROMAFIL Xtra GF-100/13. Tras la limpieza de la muestra con etil acetato y posterior centrifugación, se descartó el sobrenadante y se añadió 1ml de  $\text{NaHCO}_3$  (0,2M) y 1ml de DNFB (1%). La muestra resultante se incubó en calentador de bloques durante 40 minutos a  $60^{\circ}\text{C}$  y tras la incubación se detuvo la reacción añadiendo 0,5ml de HCl (1M) a cada muestra. Finalmente, se tomaron 0,75ml de cada tubo a los que se añadieron 2,5ml de etil acetato que, tras su centrifugación y reposo, se tomó la fase superior para ser medida en el espectrofotómetro (Shimadzu UV-1800, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón) a 420nm. Los detalles de estas técnicas, no incluidas en los anteriores ensayos, se describen de manera más detallada en el apartado 4.8.2 del Capítulo 3 de Procedimientos Generales.

#### Variables biológicas

En este ensayo se analizaron las variables biológicas evaluadas y descritas en los capítulos anteriores (Capítulos 6, 7 y 8), y detalladas en el Capítulo 3 de Procedimientos Generales

(apartado 4.9). Para este ensayo, junto con los datos de comunidades microbianas, se analizó el siguiente conjunto de variables biológicas:

- Tasa de respiración del suelo
- Carbono de la biomasa microbiana (CBM)
- Carbono orgánico soluble (COS)
- Nitrógeno potencialmente mineralizable (NPM)
- Actividades enzimáticas: arilsulfatasa (ARYL), glucosidasa (GLU), galactosidasa (GAL), fosfatasa ácida (PAC) y alcalina (PAK), ureasa (URE)

#### Perfil fisiológico a nivel de comunidad (Biolog EcoPlates™)

En este ensayo también se incluyó la evaluación del perfil fisiológico a nivel de comunidad de bacterias heterótrofas mediante las placas Biolog EcoPlates™. Esta técnica ya se empleó en ensayos previos (Capítulos 5 y 6) y, en resumen, se basa en la medición del consumo de sustratos específicos por las bacterias presentes en las muestras de suelo. Las microplacas se incubaron a 30°C en oscuridad durante una semana midiendo la absorbancia a 590nm cada 12h en un lector (Synergy HTX Multimode Reader, Agilent Technologies, California, EEUU). Con los datos obtenidos se calculó el número de sustratos empleados (NUS), la absorbancia media del pocillo (AWCD) y la evolución del consumo de sustratos durante el tiempo de incubación. Los 31 sustratos presentes en cada placa pueden agruparse en seis grupos principales: (1) aminas-amidas, (2) aminoácidos, (3) carbohidratos, (4) ácidos carboxílicos, (5) miscelánea y (6) polímeros. La actividad de degradación de cada uno de estos grupos también fue calculada para cada tratamiento a cada tiempo.

#### Comunidades de bacterias y hongos

Dada la relevancia de la microbiota del suelo en este tipo de tratamientos, junto con la nematofauna, también se evaluaron las comunidades de bacterias y hongos en tres de las cuatro parcelas experimentales de cada tratamiento. El procedimiento fue el mismo que el realizado en los Capítulos 6 y 7 y viene detallado en el Capítulo 3 de Procedimientos Generales (apartado 4.9.8). En resumen, se extrajo el ADN de 0,3g de suelo de la muestra de cada parcela evaluada para la posterior amplificación de regiones específicas de los genes 16S para bacterias e ITS para hongos mediante PCR. Las lecturas se realizaron en la plataforma Illumina MiSeq v3 (2x300bp) (Comeau et al. 2017) y se procesaron con QIIME2 versión 19.10 (Bolyen et al., 2018). Con las bases de datos SILVA 132 (bacterias) y UNITE 7 (hongos) se obtuvieron las unidades taxonómicas operativas (OTUs) de los ASV de los cuales solo se trabajó con aquellas con representación  $\geq 0,1\%$  del conjunto de la población.

#### Análisis de datos

Los datos se analizaron con el software RStudio de la misma forma que en los ensayos anteriores (Capítulos 5, 6 y 7). En síntesis, para los análisis univariantes se evaluó la

normalidad de los residuos con el test Shapiro–Wilks. Para los datos con distribución no paramétrica se ejecutó el test de Kruskal-Wallis ( $P \leq 0,05$ ) junto con el post-hoc de Mann-Whitney ( $P \leq 0,05$ ). En el caso de distribución paramétrica se aplicó el análisis de la varianza ANOVA ( $P \leq 0,05$ ) complementado con el test Tukey-HSD ( $P \leq 0,05$ ). Para todos los casos se evaluó el factor tiempo individualmente, el factor tratamiento a cada tiempo y la combinación de ambos como único factor (análisis de varianza de un factor). Estos datos se representaron mediante gráficas de cajas y bigotes, que representan los valores por cuartiles. Para los datos multivariantes como los de las poblaciones microbianas (nematodos, bacterias y hongos) se ejecutó el test Adonis con su PERMANOVA ( $P \leq 0,05$ ) y se representaron en gráfico de barras. Las diferencias estadísticas entre tiempos se representaron con letras mayúsculas en las gráficas y en minúsculas las diferencias entre tiempo y tratamiento como factor combinado. El grado de significación entre tratamientos a cada tiempo se indicó según el número de asteriscos: "\*" ( $P \leq 0,05$ ), "\*\*\*" ( $P \leq 0,01$ ) y "\*\*\*\*" ( $P \leq 0,001$ ). En los casos en los que se dieron diferencias significativas entre tratamientos a un tiempo concreto, se indicaron mediante letras minúsculas en negrita.

Para los datos de comunidades se incluyeron análisis de escalamiento multidimensional no métricos (NMDS) a fin de observar la distribución visual de las muestras en función de la distancia Bray-Curtis. En el caso de los datos del perfil fisiológico a nivel de comunidad, se ejecutó un análisis de componentes principales (PCA) con las absorbancias máximas de cada sustrato. Además, también se calcularon los índices de diversidad de Shannon y riqueza de Chao para cada comunidad. En este caso, algunas variables biológicas del suelo se analizaron de manera conjunta mediante un PCA.

### 8.3. Resultados y discusión

Tras la aplicación de la biodesinfección en esta explotación comercial de lechuga, se obtuvieron resultados positivos en el control de FOLac y, especialmente, de *M. incognita* en las parcelas biodesinfectadas. En este caso, se pudo comprobar en condiciones de campo que las altas temperaturas no son imprescindibles para la obtención de buenos resultados contra FOLac con esta técnica. A pesar de haberse ejecutado en los meses más calurosos de la región (julio-agosto), como los ensayos anteriores en campo, estos meses fueron especialmente nubosos en 2021. La escasa radiación solar recibida se pudo comprobar con los datos de temperatura máxima dentro del invernadero que se mantuvieron por debajo de 51°C. A diferencia de los ensayos previos realizados en campo (Capítulos 5 y 6) en los que se registraron temperaturas máximas cercanas a 57°C dentro del invernadero. En consecuencia, la temperatura de los suelos biodesinfectados no superó los 40°C pero, a pesar de estar por debajo de los valores habituales, se produjo una acumulación de 225h  $\geq 35^\circ\text{C}$  (Tabla 8.2). Este efecto por acumulación pudo ser suficiente para debilitar a los patógenos como se propuso en los capítulos anteriores (Capítulos 5, 6 y 7).

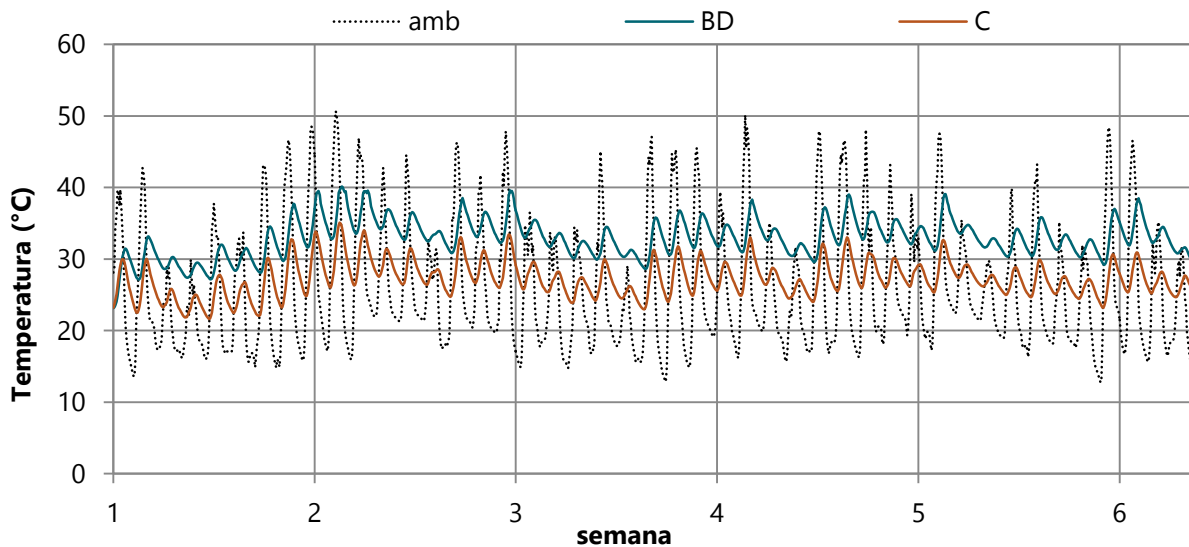
°C	amb	C	BD
25	29	158	2
26	25	191	5
27	27	179	33
28	33	123	54
29	30	95	63
30	36	64	112
31	29	43	147
32	31	26	169
33	21	16	163
34	19	4	127
35	16	-	80
36	16	-	72
37	15	-	29
38	-	-	19
39	27	-	23
40	14	-	2
41≥50	338	-	-
<b>media (°C)</b>	25.9	27.2	32.8
<b>min. (°C)</b>	12.8	21.6	23.1
<b>máx. (°C)</b>	50.7	35.1	40.1

**Tabla 8.2** | Número de horas acumuladas a diferentes temperaturas (°C) durante la biodesinfección. Valores medios de las parcelas biodesinfectadas (BD) y de los controles sin tratar (C). Se incluyen los valores registrados dentro del invernadero (amb). Al final de la tabla se indican los valores de temperatura media, máxima y mínima para cada caso.

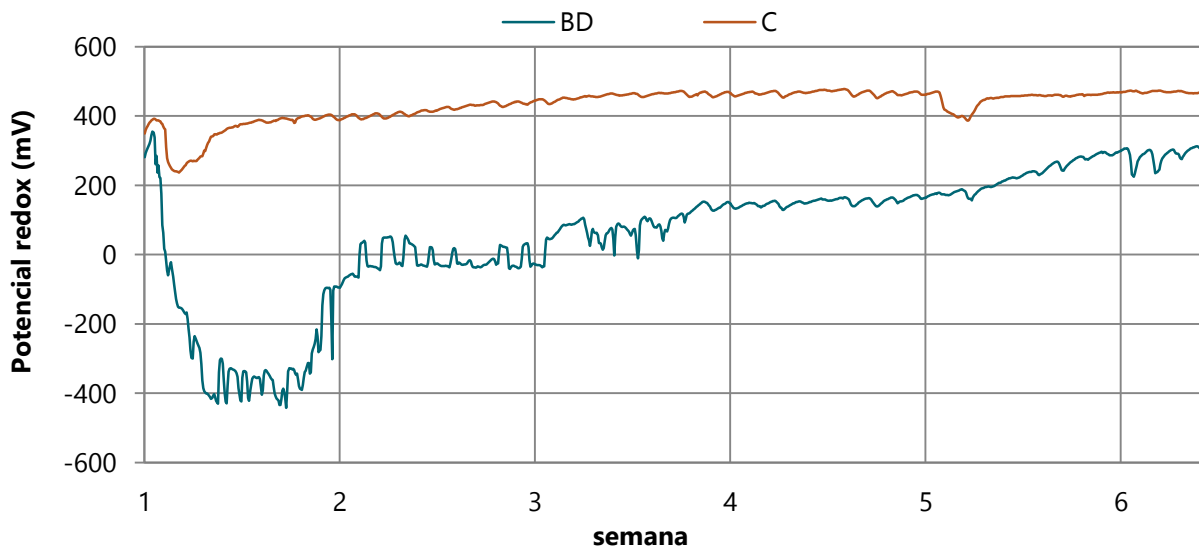
En los suelos no tratados la temperatura apenas superó los 35°C y se mantuvo unos cinco grados por debajo de los suelos biodesinfectados durante las seis semanas de biodesinfección (Figura 8.2). Al evaluar el desarrollo de la temperatura durante ese periodo, se pudo observar que la sonda de temperatura ambiental dentro del invernadero registró temperaturas <40°C casi la mitad del tiempo y, sin embargo, las temperaturas del suelo apenas acusaron la bajada de temperatura mostrando un efecto amortiguador. Por un lado, estos resultados pusieron de manifiesto que no existe garantía de efecto térmico a pesar de realizarse la biodesinfección en los meses estivales. Por otro lado, este mismo hecho reveló la posibilidad de realizar esta práctica en los meses de otoño o primavera pudiendo adaptarse al manejo y ciclos de cada explotación. Además, de acuerdo a estos resultados, parece que una acumulación mínima de 225h  $\geq 35^\circ\text{C}$ , menor que la registrada en los ensayos anteriores en campo (Capítulos 5 y 6), pudiera ser suficiente para debilitar a los patógenos haciéndolos más susceptibles al resto de efectos generados por la biodesinfección.

La medición del potencial redox en este ensayo permitió corroborar la generación de condiciones reductoras deducidas en los ensayos anteriores (Capítulos 5 y 6) por el aumento de Fe y Mn en los suelos tratados. Al igual que en otros trabajos, en los que estudiaron la evolución del potencial redox durante la BD, se pudo comprobar cómo las mayores condiciones reductoras, o anaerobias, se dieron durante la primera semana con valores por debajo de -200mV (Figura 8.3). Este primer impacto se atribuyó, principalmente, a la saturación del suelo al comienzo de la biodesinfección y que se fue recuperando progresivamente según drenaba a capas más profundas. A partir de la segunda semana estos

valores comienzan a subir aunque se mantuvieron por debajo de 100mV durante casi dos semanas, aún bajo condiciones anaerobias, probablemente debido al oxígeno consumido por la elevada actividad microbiana. No fue hasta la cuarta semana cuando comienzan a recuperarse las condiciones aerobias, en este caso >145mV, de acuerdo al cálculo realizado que estableció el CEh en 145 considerando un pH 7,5. A partir de la quinta semana los valores se recuperaron a valores tendiendo a igualarse con el control (>200mV). Con los resultados del cálculo del CEh se determinó el redox acumulado durante la biodesinfección a 15cm de profundidad. En los suelos biodesinfectados se obtuvo una media de 108.218mVh, el doble del mínimo requerido (50.000mVh) para que la anaerobiosis tenga efecto contra el patógeno (Shennan et al., 2018).



**Figura 8.2** | Temperaturas medias registradas durante las seis semanas (10/07/2021 – 23/08/2021) de biodesinfección dentro del invernadero (amb) y en los suelos tratados (BD) y controles (C) a 15cm de profundidad.



**Figura 8.3** | Valores medios del potencial redox (mV) registrado durante las seis semanas (10/07/2021 – 23/08/2021) de biodesinfección en los suelos tratados (BD) y controles (C) a 15cm de profundidad.

**Tabla 8.3** | Caracterización fisicoquímica de los suelos biodesinfectados (BD y BDC) y controles no tratados (C y CC) antes de la biodesinfección (T1), al finalizar la biodesinfección y tras la incorporación del compost (T2) en los tratamientos BDC y CC y tras cosechar el siguiente cultivo (T3). Valores medios expresados sobre el peso seco. Algunos valores expresados en complejo cambio (meq/100g) y extracto soluble (meq/l). (CE: conductividad eléctrica)

TIEMPO	T1				T2				T3			
	BD	BDC	C	CC	BD	BDC	C	CC	BD	BDC	C	CC
Arena (%)	32.7	25	31.1	29.1	33.5	36.8	36.4	31.5	21	26	43.4	21
Limo (%)	30.1	40.2	35.1	36.9	29.2	30.8	29.9	31.9	50.3	42.3	44.3	42.4
Arcilla (%)	37.2	34.8	33.8	34.0	37.3	32.4	34.9	36.5	28.7	31.7	12.3	36.6
Materia seca (%)	80.1	78.0	79.0	80.8	77.7	76.3	78.6	79.0	78.1	75.8	75.8	76.6
pH (1:5)	7.5	7.5	7.5	7.6	7.7	7.7	7.5	7.6				
CE (dS/m)	0.72	0.78	0.98	0.94	1.30	1.68	1.47	1.67				
Materia orgánica (%)	5.23	5.70	5.10	6.17	5.57	5.65	5.93	6.51	6.63	7.86	6.27	7.16
N total kjedahl (%)	0.26	0.27	0.32	0.29	0.24	0.33	0.31	0.32	0.29	0.34	0.25	0.33
NO <sub>3</sub> (mg/kg)	60	38	102	56	250	262	320	219	90	135	241	90
NO <sub>3</sub> (meq/L)	<0.01	<0.01	<0.01	0.05	0.47	0.14	0.45	0.04				
C orgánico (%)	3.03	3.31	3.92	3.58	3.23	3.75	3.72	3.95	3.84	4.56	3.64	4.16
C/N	11.43	12.01	11.98	12.03	12.43	11.47	11.84	12.25	13.04	13.24	14.6	12.29
K (meq/100g)	0.25	0.25	0.32	0.28	0.55	0.88	0.32	0.58				
K (meq/L)	0.07	0.08	0.11	0.08	0.24	0.71	0.17	0.35				
Ca (meq/100g)	22.73	22.63	26.98	25.19	24.33	25.25	27.56	25.95				
Ca (meq/l)	6.14	6.65	8.97	8.85	11.16	13.54	14.38	16.44				
Mg (meq/100g)	1.85	2.10	2.49	2.17	2.14	2.48	2.40	2.35				
Mg (meq/L)	0.8	0.96	1.39	1.03	1.68	2.40	2.20	2.22				
Na (meq/100g)	0.31	0.36	0.4	0.36	0.48	0.63	0.48	0.54				
Na (meq/L)	1.26	1.46	2.07	0.79	2.55	4.38	2.74	3.46				
SO <sub>3</sub> (meq/L)	2.44	3.04	5.68	5.65	2.69	4.65	8.23	7.93				
P asim. (mg/kg)	219	242	326	282	197	200	260	222	242	226	226	233
Fe asim. (mg/kg)	45.5	49.9	61.2	49.1	38.2	54.8	41.0	32.4	51.4	70.3	31.0	41.3
Mn asim. (mg/kg)	12.89	13.06	13.29	13.04	13.04	15.31	11.54	12.68	8.41	8.13	6.51	6.64
Cu asim. (mg/kg)	2.41	2.74	3.13	2.75	2.34	2.73	2.65	2.15	2.56	2.66	1.89	2.04
Zn asim. (mg/kg)	6.84	7.58	9.85	8.52	7.19	8.05	9.67	7.89	9.44	8.89	6.56	7.72
B asim. (mg/kg)	1.46	1.75	2.10	2.30	1.59	1.82	2.01	1.97	1.40	1.37	1.36	1.58
Cd (mg/kg)	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
Pb (mg/kg)	23.06	24.02	26.03	25.13	29.73	29.93	30.93	31.61	27.22	27.97	28.34	20.74
Hg (mg/kg)	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4
Cr (mg/kg)	21.56	29.02	25.72	24.08	25.75	26.82	25.36	25.84	10.64	11.78	713.2	12.41
Ni (mg/kg)	21.19	21.24	20.68	19.94	21.18	19.96	19.67	19.57	16.73	18.35	17.79	18.05

Contrariamente a lo esperado de acuerdo a los datos del potencial redox, en este caso no se dio el aumento en las concentraciones de Fe y Mn en el suelo tras la biodesinfección. Este incremento que es considerado indicador de condiciones reductoras sí se observó en los anteriores ensayos (Capítulos 5 y 6). En esta ocasión, al finalizar la biodesinfección solo aumentó ligeramente el Mn en los suelos biodesinfectados respecto a

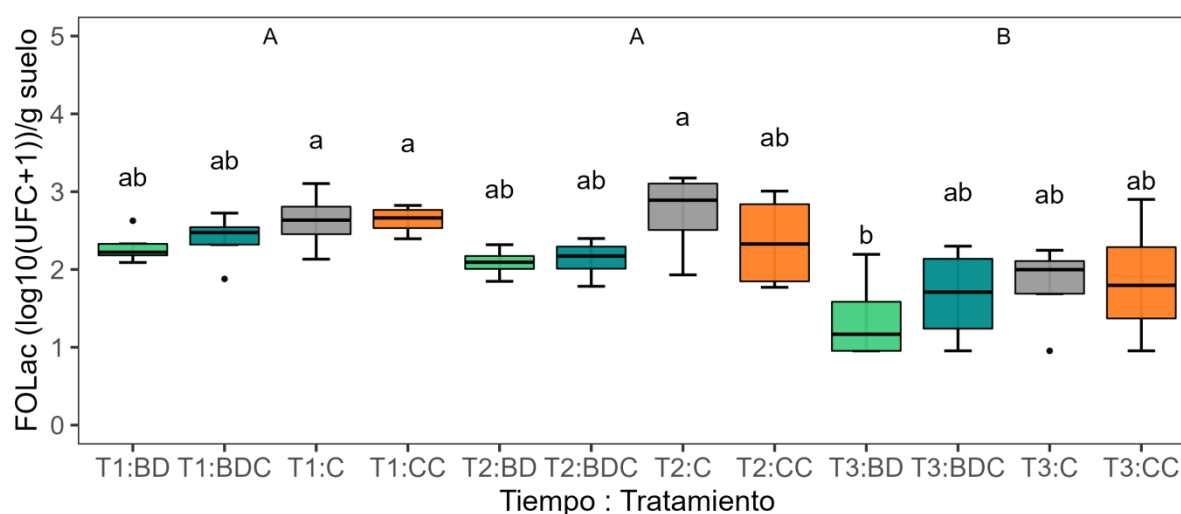


los controles y al comienzo del ensayo. En general, los datos fisicoquímicos de los suelos antes y después de los tratamientos no son tan coherentes como en los anteriores ensayos presentados en este trabajo. Muchas de las variables relativas a macro y micronutrientes aumentan en todos los tratamientos después de la biodesinfección, incluido el control (Tabla 8.3). Entre estos valores resultó llamativo el aumento de la concentración de materia orgánica junto con la de  $\text{NO}_3^-$  en las parcelas control sin haber incorporado ninguna enmienda. Lo mismo sucedió con el contenido en  $\text{SO}_3^-$  y otros macro y micronutrientes en el extracto soluble, siendo estas parcelas control las que presentaron los valores más altos después de la biodesinfección y del aporte de COM. Este hecho resultó difícil de explicar aunque pudo ser debido a la inclusión en esta muestra de suelo de algún resto de estiércol aplicado anteriormente en estas parcelas o a alguna práctica de manejo diferente al resto. Otra posible explicación pudo ser el efecto del laboreo en los suelos control que facilita la mineralización de nutrientes del suelo y los contenidos en la microbiota afectada por la acción mecánica del laboreo.

A diferencia de las variables fisicoquímicas, las biológicas y las relacionadas con los patógenos fueron más esclarecedoras. Respecto a las poblaciones de los patógenos evaluados, los procesos generados durante esta biodesinfección redujeron ambas poblaciones aunque fueron más eficaces contra *M. incognita* que contra la población de FOLac. Los resultados de la qPCR para FOLac al inicio del ensayo, antes de los tratamientos, revelaron concentraciones en torno a 320 UFC/g de suelo ( $2,5\log_{10}(\text{UFC}+1)/\text{g}$ ) en todas las parcelas (Figura 8.4). Una vez finalizada la biodesinfección y tras la aplicación de COM, las parcelas biodesinfectadas (BD y BDC) mostraron una ligera disminución de la población de FOLac a 130 UFC/g ( $2,1\log_{10}(\text{UFC}+1)/\text{g}$ ). Por el contrario, en las parcelas control (C y CC) la población se mantuvo cercana a los valores iniciales con un ligero aumento en el control sin COM (500 UFC/g o  $2,7\log_{10}(\text{UFC}+1)/\text{g}$ ). A pesar de que no se dieron diferencias significativas entre tratamientos en este muestreo, los valores de los tratamientos BD y C fueron los que mayor diferencia mostraron ( $P=0,23$ ). A pesar de que la concentración de inóculo en las parcelas biodesinfectadas no bajó mucho respecto al comienzo del ensayo, sí lo hizo en comparación con los controles sin biodesinfectar. Lo que implicaría cierto control en la población del FOLac tras la biodesinfección pero sin llegar a eliminarlo. Estos resultados coinciden con los presentados por Shrestha et al. (2021a), que obtuvieron concentraciones similares de inóculo tras la aplicación de ASD con melaza seca en condiciones de campo.

Una vez cosechado el cultivo siguiente a la biodesinfección, la población de FOLac se redujo en todos los tratamientos de forma muy significativa ( $P<0,001$ ) respecto a los muestreos anteriores. Tras el cultivo, hubiera sido de esperar un aumento en la densidad de la población FOLac, al menos en los controles, dada la presencia del hospedador. Sin embargo, la disminución en todas las parcelas unida a la elevada variabilidad dada entre las muestras de cada tratamiento llevó a pensar que la técnica de qPCR no fue muy precisa en este caso. Así y todo, considerando los datos obtenidos, parece que las parcelas que menor densidad mostraron fueron las solo biodesinfectadas (25 UFC/g o  $1,4\log_{10}(\text{UFC}+1)/\text{g}$ ), mientras que en las que se añadió COM, los resultados se equipararon a los controles (50-80

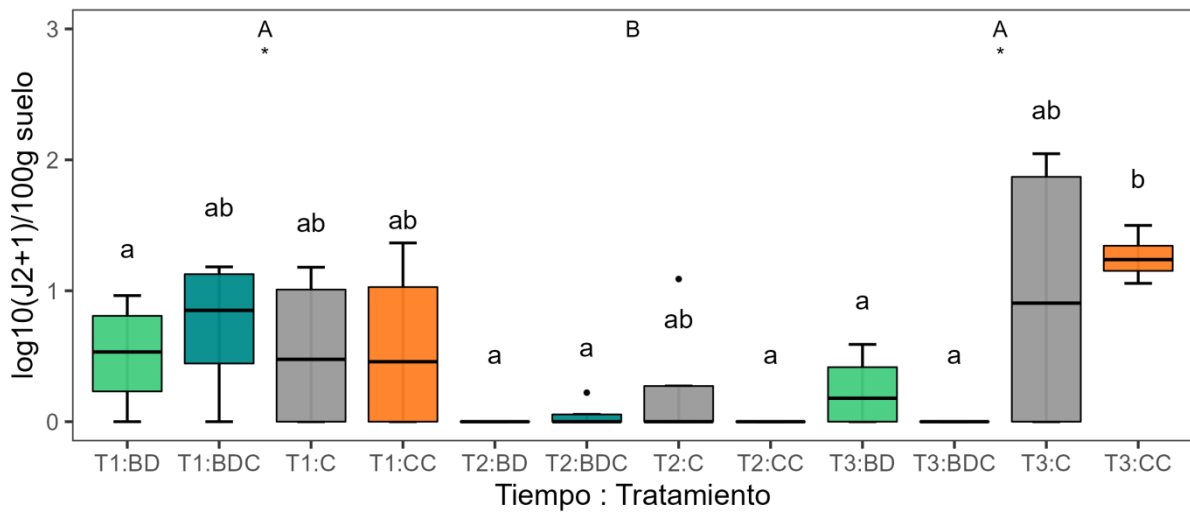
UFC/g o  $1,7-1,9 \log_{10}(\text{UFC}+1)/\text{g}$ ). Se podría considerar que la aplicación de COM generó cierto efecto conducente para este patógeno al aumentar su población en las parcelas que recibieron COM (BDC y CC) respecto a sus homologas en tratamiento pero sin esta enmienda (BD y C). Este fenómeno se ha observado en algunos patógenos edáficos en condiciones de enriquecimiento, como sería el caso. Sin embargo, existe gran variabilidad al respecto y las conclusiones aun no son claras y es que una misma enmienda, como el COM, puede resultar supresora para unos patógenos pero conducente para otros. En el caso del COM esta variabilidad podría venir dada por su heterogeneidad en función del material de partida (Bonanomi et al., 2010).



**Figura 8.4** | UFC de FOLac ( $\log_{10}$ ) antes de la biodesinfección (T1), al finalizar la biodesinfección y tras la incorporación del compost (T2) en los tratamientos BDC y CC y tras cosechar el siguiente cultivo (T3). Las letras minúsculas indican las diferencias entre la combinación de tiempo y tratamiento y las mayúsculas las diferencias entre tiempos.

Este hecho se pudo confirmar a la inversa con los datos de la población de *M. incognita*, en la que la aplicación de COM sí pareció generar un efecto supresor, mejorando los resultados de la biodesinfección y reduciendo la población en los controles con COM. Este patógeno ya resultó ser sensible a los tratamientos de biodesinfección en los ensayos anteriores (Capítulos 5 y 6). En este caso, a pesar de la presencia de *M. incognita* en el suelo, éste no suponía un problema para el agricultor pero su presencia puede favorecer la infección de FOLac (Manzanilla-López y Starr, 2009). Al comienzo del ensayo se detectaron densidades promedio entre 3-5 J2/100g de suelo ( $0,5-0,7 \log_{10} (J2+1)/100\text{g}$ ) con elevada variabilidad entre parcelas (Figura 8.5). Aunque no fueron valores elevados, en estos casos, si no se aplican medidas para su control, la población podría aumentar en condiciones favorables. Esto se pudo comprobar con los valores obtenidos al final del ensayo tras dos meses de cultivo de lechuga en los suelos sin biodesinfectar, en los que la población aumentó respecto al comienzo. El efecto de los tratamientos frente a *M. incognita* resultan más evidentes una vez cosechado el siguiente cultivo a la biodesinfección y no tanto justo al finalizar el tratamiento. Este efecto también se dio en los ensayos precedentes de este trabajo (Capítulos 5 y 6) y está atribuido a la complejidad de los nematodos, más sensibles a

las perturbaciones y con tasas de reproducción más lentas que hongos y bacterias y dependientes, a su vez, de estas poblaciones.

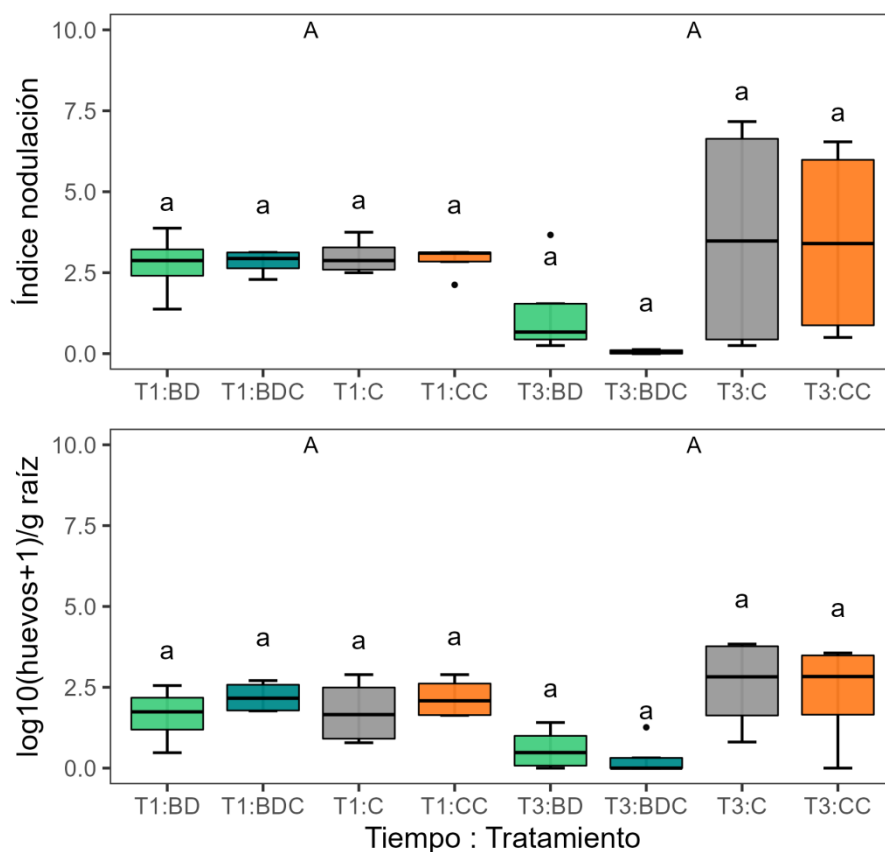


**Figura 8.5** | Número de juveniles ( $J_2$ ) de *M. incognita* ( $\log_{10}+1$ ) cuantificados en los suelos biodesinfectados (BD y BDC) y controles no tratados (C y CC) antes de la biodesinfección (T1), al finalizar la biodesinfección y tras la incorporación del compost (T2) en los tratamientos BDC y CC y tras cosechar el siguiente cultivo (T3). Las letras minúsculas indican las diferencias entre la combinación de tiempo y tratamiento y las mayúsculas las diferencias entre tiempos. Los asteriscos representan el grado de significación entre tratamientos a cada tiempo (\*\*\*)  $P \leq 0,05$ .

Finalizada la biodesinfección y aplicado el COM, la abundancia de  $J_2$  disminuyó en todos los tratamientos aunque en el control se dio en menor medida. La merma en todos los tratamientos hizo suponer que el laboreo previo al trasplante y al muestreo pudo afectar a la población influenciando los resultados. Una vez pasado el cultivo, que duró poco más de dos meses, la población se recuperó en los suelos no biodesinfectados con valores promedio por encima de  $10 J_2/100g$  ( $>1\log_{10}(J_2+1)/100g$ ). Por el contrario, en los suelos tratados los valores se mantuvieron por debajo de  $3 J_2/100g$  ( $<0,5\log_{10}(J_2+1)/100g$ ) (Figura 8.5). De hecho, se dieron diferencias estadísticas entre los valores de BDC y CC ( $P=0,02$ ). Las condiciones ambientales generadas durante esta biodesinfección fueron similares a las mínimas propuestas en el Capítulo 6 para reducir considerablemente la población de *M. incognita* ( $>250h$  por encima de  $35^\circ C$ ). En este ensayo las temperaturas máximas alcanzadas en los suelos biodesinfectados fueron más bajas pero consiguieron acumular  $225h$  por encima de  $35^\circ C$ . Esto, además de reducir el tiempo mínimo de exposición necesario para reducir la población, subraya la relevancia de la anaerobiosis y los procesos biológicos originados por la BD para el control de *M. incognita*. Además, como se comentaba previamente, frente a este patógeno la aplicación de COM sí tuvo un efecto favorable.

Esto también se vio reflejado en las variables de enfermedad por este nematodo como son el grado de nodulación y el número de huevos en raíz. Al comienzo del ensayo, las muestras de todas las parcelas mostraron valores medios de nodulación cercanos a 3 (Figura 8.6). Estos valores relativamente bajos de agallamiento concuerdan con las bajas densidades de  $J_2$  detectadas en los suelos. Sin embargo, en el cultivo posterior al tratamiento las muestras de las parcelas que no fueron biodesinfectadas, el grado de agallamiento aumentó

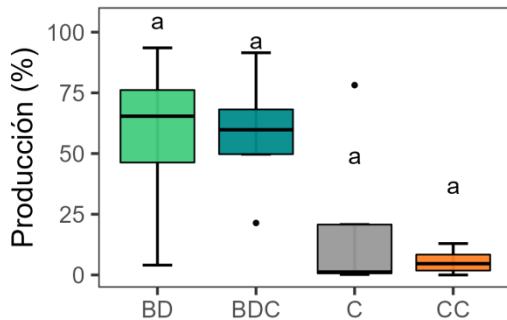
ligeramente con índices de 3,6 y 3,5 en C y CC, respectivamente. Por el contrario, en las parcelas biodesinfectadas estos valores disminuyeron a 1,3 y 0,5 en BD y BDC, respectivamente. A pesar de las diferencias en el grado de agallamiento, no se observó significación entre tratamientos ( $P \geq 0,05$ ). Los resultados del número de huevos fueron muy similares a la nodulación, pudiendo estar ambas variables correlacionadas. Para esta variable tampoco se dieron diferencias significativas entre tratamientos al final del ensayo pero el BDC presentó los valores más bajos y, también con mayor significación respecto a los dos controles sin biodesinfectar, C ( $P=0,08$ ) y CC ( $P=0,18$ ) (Figura 8.6).



**Figura 8.6** | Arriba, índice de nodulación de Bridge y Page (1980). Debajo, número de huevos en raíz. Valores de las plantas de lechuga cultivadas en los suelos biodesinfectados (BD y BDC) y controles no tratados (C y CC) antes a la biodesinfección (T1) y tras cosechar el siguiente cultivo una vez realizada la biodesinfección y previo aporte de compost en BDC y CC (T3). Las letras minúsculas indican las diferencias entre la combinación de tiempo y tratamiento y las mayúsculas entre tiempos.

Los resultados de producción del cultivo de lechuga posterior al tratamiento evidenciaron los beneficios de la biodesinfección en el desarrollo del cultivo. Las parcelas biodesinfectadas presentaron una producción media cercana al 60%, mientras que los controles no biodesinfectados no superaron el 25% (Figura 8.7). A pesar de la falta de diferencias estadísticas entre tratamientos, los valores de producción de BDC y BD estuvieron cerca de la significación frente a CC ( $P=0,14$  y  $0,13$ , respectivamente). Mientras que el beneficio de la biodesinfección en la salud del cultivo fue claro, la aplicación de COM resultó muy diferente aplicado solo o tras la biodesinfección. Su incorporación en las parcelas control (CC) pareció empeorar la enfermedad en el cultivo. Sin embargo, en las parcelas que

fueron previamente biodesinfectadas (BDC) la producción fue ligeramente superior y menos variable que en sus homólogas sin COM (BD). Esto indicaría que las condiciones de enriquecimiento no generaron suelos conducentes sino, más bien supresores cuando la aplicación de COM fue precedida de la biodesinfección. De hecho, esta afirmación se pone de manifiesto al comparar los datos de producción con la población de FOLac al finalizar el ensayo. Mientras que en BDC la densidad detectada de FOLac fue similar a los controles sin biodesinfectar, los datos de producción en este tratamiento fueron equiparables o superiores a los obtenidos en BD.

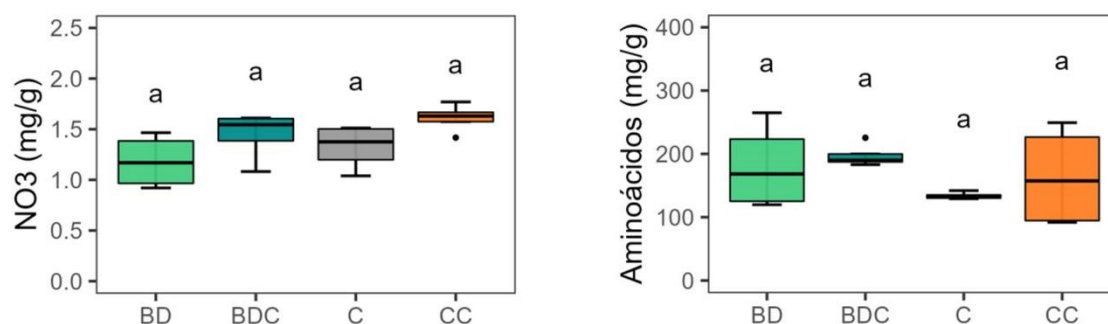


**Figura 8.7** | Datos de producción (%) del cultivo de lechuga posterior a la biodesinfección, y previo aporte de compost en BDC y CC, (T3) de los suelos biodesinfectados (BD y BDC) y controles no tratados (C y CC).

En este ensayo los datos de producción fueron complementados con el contenido de aminoácidos totales como variable nutritiva en las hojas de lechuga procedentes del último muestreo, así como el contenido en nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) como elemento tóxico a concentraciones elevadas. El  $\text{NO}_3^-$  se encuentra de forma natural en las plantas, acumulándose en las hojas principalmente, y su concentración puede verse influenciada por muchos factores agrícolas y ambientales como la temperatura, el tipo de suelo, la fertilización, etc. Los  $\text{NO}_3^-$  de por sí no presentan toxicidad pero ante una ingesta elevada, parte tiende a transformarse a sus metabolitos secundarios (nitritos o nitrosaminas) que sí son perjudiciales (Ekart et al., 2013). Por esta razón, se considera que el contenido en hoja de las verduras no debe superar los 5mg/g (Reglamento (CE) 1881/2006). Considerando el elevado aporte de N en estos tratamientos, además de medir el N en el suelo, en este ensayo también se evaluó el efecto sobre el cultivo mediante el contenido de  $\text{NO}_3^-$  en hoja. Especialmente relevante en este caso, dado que la aplicación de COM en parte de las parcelas biodesinfectadas incluían un aporte extra de N (837kg/ha) que, sumado a lo aportado para la biodesinfección (496kg/ha), supuso un aporte total de 1.333kg/ha. Sin embargo, todos los valores de concentración de  $\text{NO}_3^-$  estuvieron por debajo de los niveles de toxicidad (<2mg/g) (Figura 8.8). La concentración de  $\text{NO}_3^-$  fue mayor en los tratamientos que incluían COM pero fue más elevada en CC que BDC, a pesar de que este último fue en el que se aportó mayor cantidad de N (1.333kg/ha). Al contrario de lo esperado, el tratamiento BD mostró los valores medios más bajos (1,38mg/g), incluso inferiores a los controles. Es más, el valor en BD casi llegó a la significación estadística con CC ( $P=0,06$ ) que presentó la concentración más elevada (1,67mg/g) habiendo aportado en CC mayor contenido de N al suelo que en BD. Todo esto implicaría cierta regulación en la toma de nutrientes en los cultivos de los suelos de las parcelas biodesinfectadas, probablemente derivado de la componente biológica. Además, cabe señalar que la gran parte de la proporción aportada de

N se realizó en formas orgánicas, por lo que la dinámica de mineralización no se podría equiparar a su aporte en forma mineral como en el caso de los fertilizantes sintéticos.

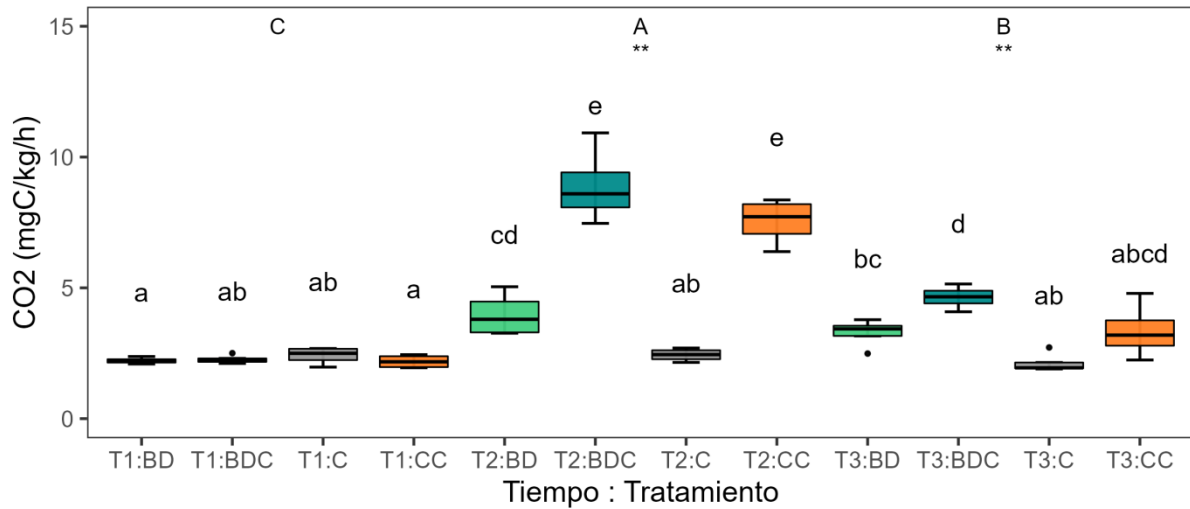
Por otro lado, los aminoácidos son compuestos esenciales para el desarrollo de la planta y cuya concentración en hoja también puede verse alterada por prácticas agrícolas. De acuerdo a los resultados de su concentración en hoja, tanto la biodesinfección como el aporte de COM generaron un aumento en comparación al control. Mientras que las parcelas sin ningún tratamiento presentaron el valor promedio más bajo (135mg/g), en BDC se obtuvieron los valores más altos (197mg/g) aunque sin diferencia significativa (Figura 8.8). El tratamiento BD mostró valores superiores a CC (180 y 164mg/g, respectivamente) a pesar de que el aporte de N fue menor (496 y 837kg/ha, respectivamente). En este caso, parece que la biodesinfección generó un efecto favorecedor en la síntesis de aminoácidos. Por lo tanto, considerando los resultados de ambas variables, se podría deducir que la biodesinfección generó un efecto regulador en la transformación y toma del N por el cultivo y por la microbiota del suelo.



**Figura 8.8** | Valores del contenido de nitratos (NO<sub>3</sub>) (izquierda) y aminoácidos (derecha) totales cuantificados en hojas de lechuga cultivo posterior a la biodesinfección (T3), y previo aporte de compost en BDC y CC, en los suelos biodesinfectados (BD y BDC) y controles (C y CC).

Dada la relevancia del componente biológico en el control de enfermedad y desarrollo del cultivo, resulta imprescindible analizar variables microbiológicas para la correcta evaluación de los tratamientos. Entre estas variables, la tasa de respiración del suelo es una prueba sencilla que aporta información muy valiosa en relación a la biomasa y actividad microbiana y, por ello, una de las más empleadas. En este ensayo los cambios en esta variable fueron claros. Al comienzo del ensayo los suelos en todas las parcelas mostraron valores muy similares de la tasa de respiración con valores entorno a los 2,3mgCO<sub>2</sub>/kg/h (Figura 8.9). Una vez aplicada la biodesinfección y realizada la aplicación de COM, la respiración se incrementó de forma significativa (P=0,03) en los tratamientos que recibieron COM respecto a los que no. El tratamiento BDC fue en el que se alcanzaron los valores más altos (8,9 mgCO<sub>2</sub>/kg/h) seguido de CC (7,5mgCO<sub>2</sub>/kg/h) y BD (4mgCO<sub>2</sub>/kg/h). Todos estos tratamientos mostraron valores promedio significativamente más altos que el control, que se mantuvo estable respecto al inicio (2,4 mgCO<sub>2</sub>/kg/h). En este caso, la incorporación de COM generó un aumento mayor de la tasa de respiración que la biodesinfección, lo que podría indicar que la cantidad de materia orgánica aportada fue el factor que más influyó. Los valores obtenidos en las parcelas biodesinfectadas concuerdan

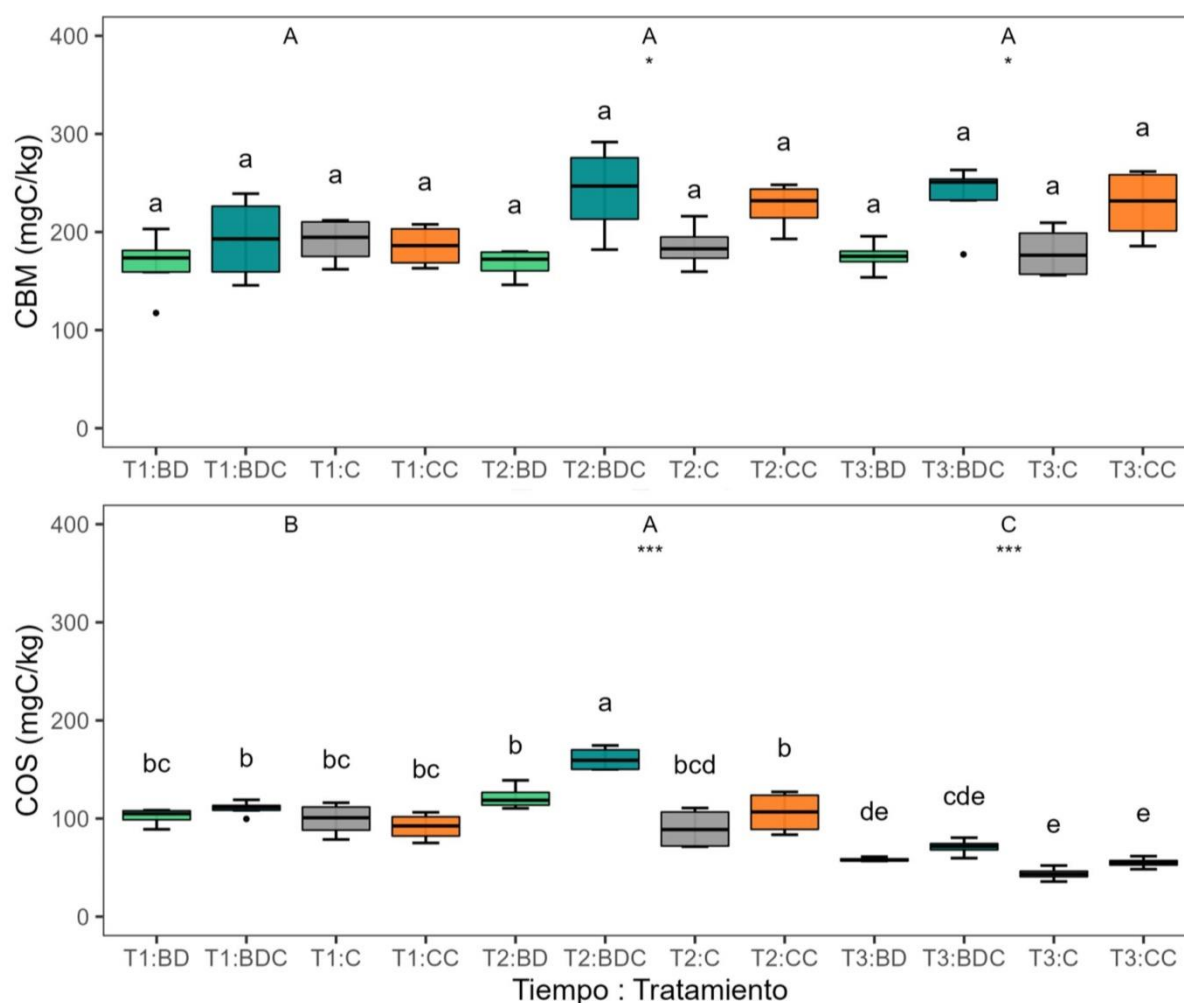
con los resultados de los ensayos anteriores en campo (Capítulos 5 y 6) con valores muy similares de respiración tras la biodesinfección ( $4 > 5 \text{ mgCO}_2/\text{kg/h}$ ).



**Figura 8.9** | Tasa de respiración del suelo en las parcelas biodesinfectadas (BD y BDC) y controles no tratados (C y CC) antes de la biodesinfección (T1), al finalizar la biodesinfección y tras la incorporación del compost (T2) en los tratamientos BDC y CC y tras cosechar el siguiente cultivo (T3). Las letras minúsculas indican las diferencias entre la combinación de tiempo y tratamiento y las mayúsculas las diferencias entre tiempos. Los asteriscos representan el grado de significación entre tratamientos a cada tiempo (\*\*\*  $P \leq 0,01$ ).

En el último muestreo, tras cosechar el cultivo posterior, en los tratamientos BDC y CC fueron en los que más disminuyó la tasa de respiración ( $4,6$  y  $3,3 \text{ mgCO}_2/\text{kg/h}$ , respectivamente) respecto al muestreo anterior, precisamente en los que más se incrementó inicialmente (Figura 8.9). Por el contrario, en BD y C este valor no bajó de manera significativa respecto al muestreo previo ( $3,3$ - $2,1 \text{ mg CO}_2/\text{kg/h}$ , respectivamente) aunque los valores continuaron siendo significativamente más bajos que en BDC ( $P=0,03$ ). Así y todo, en el tratamiento BD el valor promedio continuó siendo más elevado que en el control y cerca de la significación estadística ( $P=0,06$ ). La tasa de respiración en las parcelas BD tras el cultivo también coincide con la obtenida en los suelos biodesinfectados de los ensayos mencionados (Capítulos 5 y 6). Esto indicaría la similitud del efecto de la biodesinfección sobre la tasa de respiración del suelo en todos los ensayos en campo de este trabajo. En este caso, se pudo observar que la aplicación de COM consiguió elevar la tasa de respiración del suelo de forma muy significativa pero que este incremento resultó menos estable que cuando se realizó una biodesinfección previamente. Parece que en los suelos biodesinfectados la respiración del suelo se mantuvo más estable en el tiempo, incluso podría mantenerse hasta pasado un año como pudo comprobarse en el Capítulo 5.



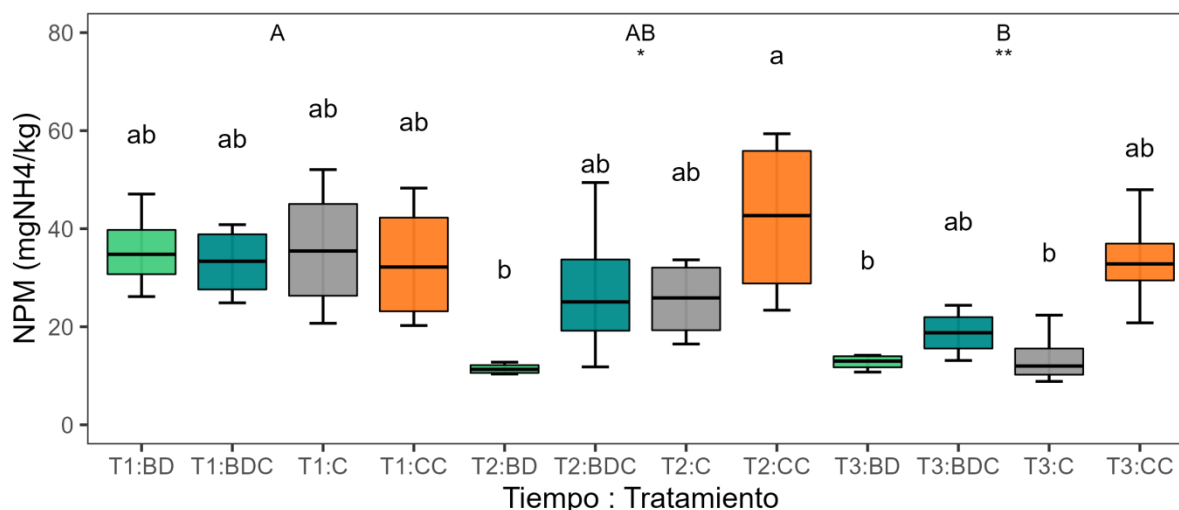


**Figura 8.10** | Carbono orgánico soluble (COS) y de la biomasa microbiana (CBM) medido en los suelos biodesinfectados (BD y BDC) y controles no tratados (C y CC) antes de la biodesinfección (T1), al finalizar la biodesinfección y tras la incorporación del compost (T2) en los tratamientos BDC y CC y tras cosechar el siguiente cultivo (T3). Las letras minúsculas indican las diferencias entre la combinación de tiempo y tratamiento y las mayúsculas las diferencias entre tiempos. Los asteriscos representan el grado de significación entre tratamientos a cada tiempo ("\*"  $P \leq 0,05$ ; "\*"  $P \leq 0,001$ ).

Siendo la tasa de respiración del suelo un indicador de biomasa y actividad microbiana, los resultados del CBM y COS contribuyen en la diferenciación de ambas. En cuanto a la biomasa, los valores promedio iniciales del CBM fueron similares entre tratamientos (167-193mgC/kg) (Figura 8.10) y no aumentó en BD, que se mantuvo estable y con valores similares al control (168 y 185mgC/kg, respectivamente). Por el contrario, en los tratamientos con COM los valores aumentaron y de forma significativa ( $P=0,02$ ) entre los tratamientos BDC y BD. Por lo tanto, parece que el aporte de materia orgánica incrementó la biomasa del suelo pero no la biodesinfección. Esta inercia se mantuvo hasta el final del ensayo, una vez cosechado el cultivo. La falta de incremento de la población microbiana en BD a pesar del aporte de materia orgánica también se observó en condiciones similares en el Capítulo 6. De igual manera en ambos ensayos, al contrastar los valores del CBM con la tasa de respiración, se pudo comprobar que con las biodesinfecciones se produjo un aumento de actividad pero atribuido a la parte de la población microbiana que toleró estas condiciones.

Esto se pudo confirmar con los datos obtenidos para el COS, que reflejan la actividad degradadora de la microbiota que sí aumentó en los suelos biodesinfectados respecto a los controles. Todos los tratamientos partieron con valores similares, en torno a 100mgC/kg de suelo (Figura 8.10). Al finalizar la biodesinfección e incorporar el COM los valores aumentaron de forma significativa ( $P < 0,05$ ) en BDC (161mgC/kg) respecto al resto de tratamientos. En los tratamientos BD y CC se obtuvieron valores cercanos (122 y 106mgC/kg, respectivamente) pero solo el de BD estuvo cerca de la significación respecto al control ( $P = 0,1$ ). Una vez cosechado el cultivo siguiente, se dio una disminución muy significativa ( $P < 0,001$ ) en todos los tratamientos respecto a los muestreos anteriores, al contrario que en el ensayo anterior en campo (Capítulo 6). Los controles sin biodesinfectar mostraron los valores medios más bajos ( $C = 44\text{mgC/kg}$  y  $CC = 55\text{mgC/kg}$ ) y estadísticamente significativos ( $P < 0,02$ ) respecto a BDC (71mgC/kg). También en el caso de BD (58mgC/kg) los valores fueron significativamente más altos ( $P = 0,03$ ) respecto al control. Con esto se concluyó que el aporte de materia orgánica contribuyó en el aumento de la actividad degradadora aunque en mayor medida aplicando la biodesinfección.

En cuanto a los datos obtenidos del NPM, todos los tratamientos partieron de unos valores promedio similares ( $33 > 36\text{mgNH}_4/\text{kg}$ ) al comienzo del ensayo (Figura 8.11). Tras la biodesinfección y aplicación de COM, las concentraciones fueron parecidas en los tratamientos BDC y C (28 y 25mgNH<sub>4</sub>/kg, respectivamente) y cercanas a los valores iniciales. Por el contrario, los valores en CC aumentaron hasta un promedio de 42mgNH<sub>4</sub>/kg mostrando diferencia estadística ( $P = 0,02$ ) con los datos obtenidos en BD que fueron más bajos que al comienzo (11mgNH<sub>4</sub>/kg). Estos resultados contrastan con los obtenidos en el capítulo anterior (Capítulo 7) en el que el NPM aumentó en todos los tratamientos salvo en el control y especialmente en las mezclas que incluyeron EFV en vez de COM como enmienda principal. En este caso, la disminución de la concentración del NPM en las parcelas BD respecto al control sin enmiendas resulta confusa dado que era de esperar cierto aumento en las parcelas BD por la simple aplicación de EFV. Al comparar estos valores con los datos fisicoquímicos, se detectó cierta similitud con los valores del N total Kjeldahl, que mayoritariamente comprende el N orgánico y el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pero no el NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Sin embargo, no fue así para los NO<sub>3</sub><sup>-</sup> totales ni en el extracto soluble. Mientras que los NO<sub>3</sub><sup>-</sup> totales aumentaron en todos los tratamientos, el contenido en el extracto soluble fue menor en los suelos en los que se añadió COM (Tabla 8.3). Esto coincidió con el aumento del NPM en BDC y CC respecto a sus tratamientos homólogos sin COM. Por todo ello, se podría concluir que el COM contribuyó a mejorar el complejo húmico-arcillosos del suelo favoreciendo la capacidad de retención del NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y de la humedad del suelo reduciendo su pérdida por lixiviación en forma de nitratos. La cantidad de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> que puede ser lixiviado en un suelo depende de varios factores entre los que se encuentra la dosis de riego, la capacidad de retención de humedad del suelo, el estado vegetativo del cultivo, y las características de su sistema radicular.



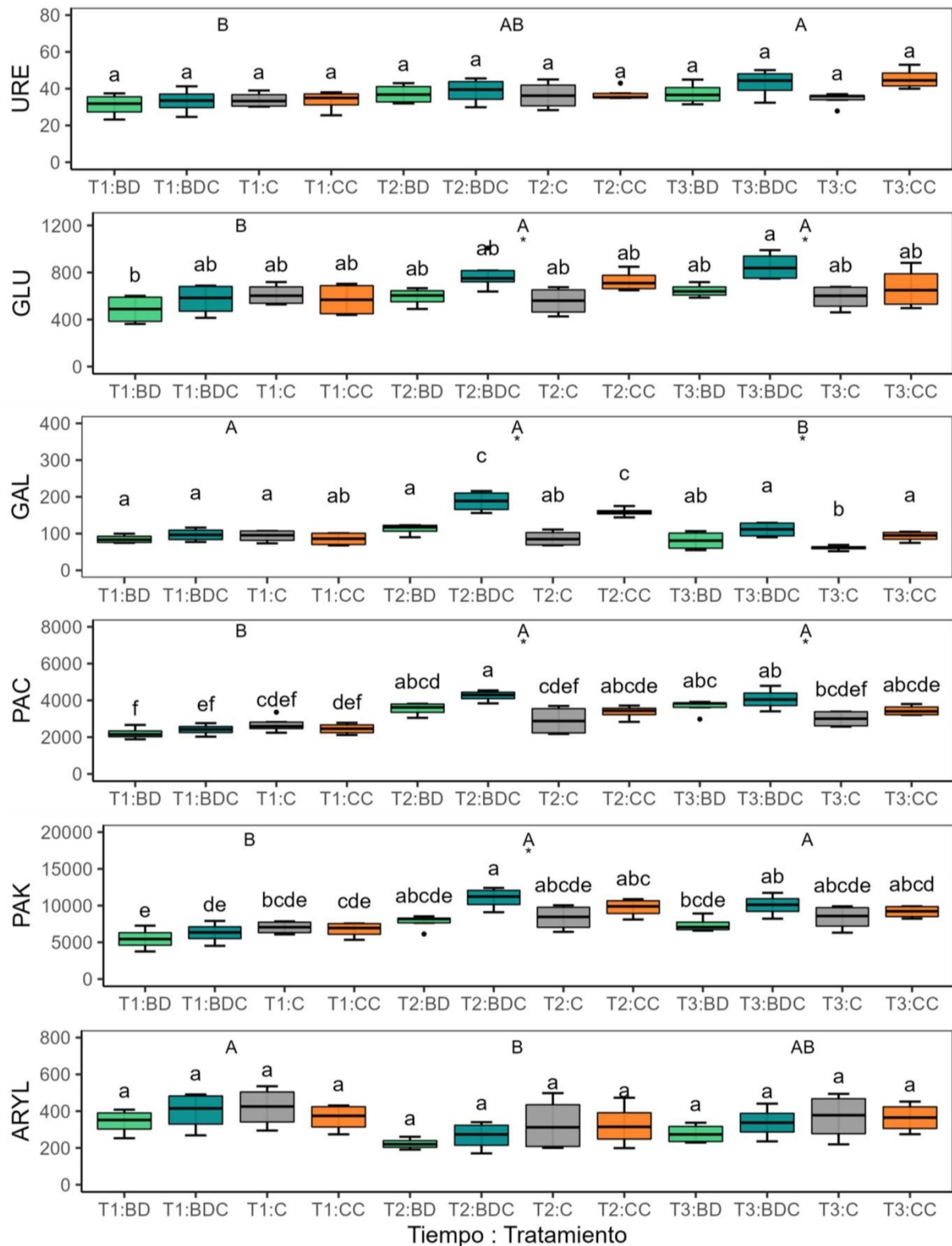
**Figura 8.11** | Nitrógeno potencialmente mineralizable (NPM) medido en los suelos biodesinfectados (BD y BDC) y controles no tratados (C y CC) antes de la biodesinfección (T1), al finalizar la biodesinfección y tras la incorporación del compost (T2) en los tratamientos BDC y CC y tras cosechar el siguiente cultivo (T3). Las letras minúsculas indican las diferencias entre la combinación de tiempo y tratamiento y las mayúsculas las diferencias entre tiempos. Los asteriscos representan el grado de significación entre tratamientos a cada tiempo ("\*"  $P \leq 0,05$ ; "\*\*\*"  $P \leq 0,01$ ).

Una vez cosechado el cultivo siguiente, los valores del NPM disminuyeron en todos los tratamientos, salvo en BD (13mgNH<sub>4</sub>/kg) que apenas experimentó cambios respecto al muestreo anterior (Figura 8.11). La disminución en el resto de tratamientos pudo estar atribuida a los procesos de nitrificación una vez aireado el suelo junto con la toma del NO<sub>3</sub><sup>-</sup> resultante por el cultivo (Subbarao et al., 2006). El tratamiento CC mostró los valores más altos en este muestreo (37mgNH<sub>4</sub>/kg) y estadísticamente diferentes al resto ( $P < 0,04$ ), especialmente a BD y C ( $P < 0,01$ ) (14 y 13mgNH<sub>4</sub>/kg, respectivamente). De acuerdo a estos resultados, el COM resultó una fuente de N de mineralización progresiva que consiguió mantener los niveles una vez soportada la demanda del cultivo. Mientras que en las parcelas sometidas a la biodesinfección las poblaciones microbianas llevaron a cabo otra serie de procesos.

Estos resultados fueron contrastados con los obtenidos para la actividad enzimática URE, relacionada también con el ciclo del N al transformar la urea (CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>) en NH<sub>3</sub> y CO<sub>2</sub> mediante hidrólisis (Adetunji et al., 2017). Al comienzo del ensayo, los suelos de todas las parcelas mostraron valores promedio similares (31 < 34mmloNH<sub>4</sub>Cl/g/min) (Figura 8.12). Una vez realizados los tratamientos, al contrario que el NPM, la actividad URE aumentó ligeramente respecto al comienzo en todos los suelos al finalizar los tratamientos. Entre éstos, BDC y BD aumentaron más que los controles respecto al comienzo y presentaron los valores más altos en este tiempo (39 y 37mmloNH<sub>4</sub>Cl/g/min, respectivamente) pero sin diferencias estadísticas ( $P = 0,97$ ). Al finalizar el ensayo, tras la cosecha del siguiente cultivo, esta actividad se mantuvo estable en BD y C (37 y 34mmloNH<sub>4</sub>Cl/g/min, respectivamente) respecto al muestreo anterior pero aumentó en los tratamientos BDC y CC (43 y 45mmloNH<sub>4</sub>Cl/g/min, respectivamente) quedando cerca de la significación estadística respecto al control ( $P = 0,08$ ). Los resultados de este último muestreo guardaron cierto

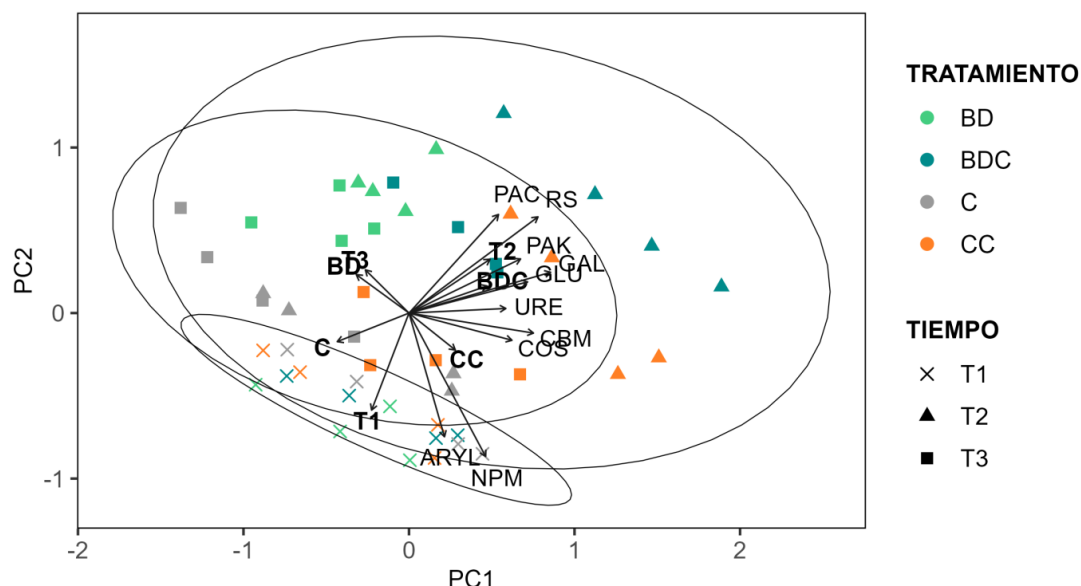
paralelismo con los obtenidos para el NPM, siendo los tratamientos con COM los que dieron valores más altos en ambas variables. Estos resultados contrastan con los obtenidos en el ensayo en condiciones controladas (Capítulo 7) en el que se probaron el EFV y el COM como enmiendas principales, siendo los tratamientos con EFV los que más aumentaron en estos casos. Al parecer, la aplicación de COM en campo resultó más eficaz en la mineralización del N que la biodesinfección. A pesar de ello, en el tratamiento BD también aumentó la actividad URE al finalizar la biodesinfección y se mantuvo constante una vez soportado el cultivo siguiente, a diferencia del control que mantuvo valores muy similares en todos los muestreos ( $34 < 36 \text{ mmol NH}_4\text{Cl/g/min}$ ). Por lo tanto, pudo ser que se acelerasen los procesos del ciclo del N en los suelos biodesinfectados y que parte se perdiera por lixiviación o en forma de gases.

En relación a la dinámica del C, los resultados de las actividades GLU y GAL mostraron una evolución muy similar entre ellas y paralela a los resultados obtenidos para el COS, que podría considerarse una variable consecuente de estas actividades. En el caso de la GLU, los valores aumentaron en todos los tratamientos después de la biodesinfección y del aporte de COM, salvo en el control que fue significativamente menor ( $P=0,05$ ) que en BDC ( $556$  y  $854 \text{ mmol PNP/g/min}$ , respectivamente) (Figura 8.12). Los tratamientos BD y CC mostraron valores promedio cercanos una vez aplicados los tratamientos ( $591$  y  $679 \text{ mmol PNP/g/min}$ , respectivamente) y que se mantuvieron una vez cosechado el cultivo siguiente ( $646$  y  $670 \text{ mmol PNP/g/min}$ , respectivamente). Al final del ensayo, el tratamiento BDC mostró valores aún más altos ( $940 \text{ mmol PNP/g/min}$ ) que en el muestreo anterior y significativamente mayores que el control ( $P=0,04$ ). La GAL mostró resultados similares pero con mayores diferencias en el muestreo intermedio, posterior a los tratamientos. En este tiempo, en BDC la actividad GAL aumentó ( $210 \text{ mmol PNP/g/min}$ ) de forma muy significativa ( $P \leq 0,001$ ) frente al control y BD ( $87$  y  $112 \text{ mmol PNP/g/min}$ , respectivamente), al igual que en CC ( $162 \text{ mmol PNP/g/min}$ ) aunque en menor medida ( $P < 0,03$ ). Una vez cosechado el cultivo siguiente, la actividad GAL disminuyó en todos los tratamientos, excepto en el control que se mantuvo sin variaciones en los tres muestreos. Así y todo, los valores obtenidos en BDC continuaron siendo significativamente más elevados ( $P=0,01$ ) que en el control ( $128$  y  $64 \text{ mmol PNP/g/min}$ , respectivamente). De acuerdo a estos resultados, la incorporación de mayor cantidad de materia orgánica aportada tuvo un efecto favorable sobre estas actividades, atribuidas al incremento de fuentes de C como es el caso de BDC. De hecho, los tratamientos BD y CC, ambos con una dosis de enmienda similar pero de diferente naturaleza, mostraron valores similares en ambas actividades. Curiosamente, el tratamiento CC mostró valores algo más altos que BD a pesar de que la dosis de enmienda fue menor en CC. Esto pudiera estar ligado a la naturaleza del COM que, al incluir microorganismos propios y favorecer a los endémicos, pudiera haber facilitado y promovido la actividad de degradación.



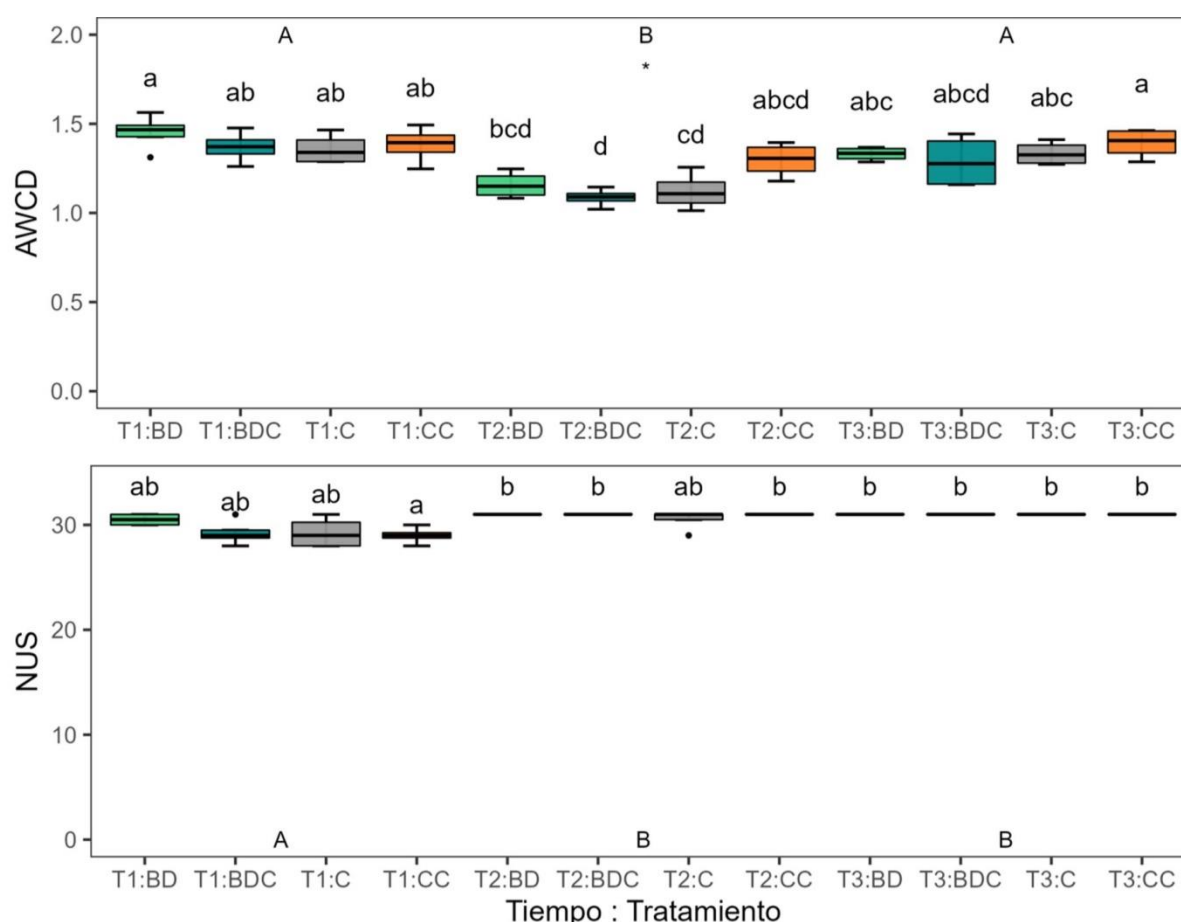
**Figura 8.12** | Actividades enzimáticas (GLU: glucosidasa; GAL: galactosidasa; PAC: fosfatasa ácida; PAK: fosfatasa alcalina; ARYL: arilsulfatasa) en los suelos biodesinfectados (BD y BDC) y controles no tratados (C y CC) antes de la biodesinfección (T1), al finalizar la biodesinfección y tras incorporar compost (T2) en los tratamientos BDC y CC y al finalizar el siguiente cultivo (T3). Valores expresados en mmolPNP/g/min (PNP: para-nitrofenol) excepto la URE (mmolNH<sub>4</sub>Cl/g/min). Las letras minúsculas indican las diferencias entre la combinación de tiempo y tratamiento, las mayúsculas entre tiempos y los asteriscos representan el grado de significación entre tratamientos a cada tiempo ("\*" P ≤ 0,05).

En cuanto a las fosfatasas, ambas evolucionaron de manera similar a lo largo de este ensayo aunque se dieron más diferencias significativas entre tratamientos en el caso de PAC. Los valores de la PAC aumentaron en todos los suelos después de la biodesinfección y del aporte de COM pero lo hizo especialmente en BDC, significativamente mayor ( $P=0,01$ ) que en el control (4.243 y 2.906mmolPNP/g/min, respectivamente) (Figura 8.12). Una vez cosechado el cultivo, los valores de PAC apenas variaron y en BDC esta actividad continuó siendo significativamente mayor ( $P=0,03$ ) que en el control (4.398 y 2.992mmolPNP/g/min). Por otro lado, los resultados en BD y CC fueron muy similares entre ellos después de los tratamientos (3.527 y 3.556mmolPNP/g/min, respectivamente) y al finalizar el cultivo (3.643 y 3.454mmolPNP/g/min, respectivamente). La PAK aumentó en todos los tratamientos una vez aplicados, incluido el control. También fue el BDC el tratamiento en el que más aumentó (10.987mmolPNP/g/min) pero, en este caso, siendo estadísticamente mayor ( $P=0,03$ ) que en BD (7.759mmolPNP/g/min). Finalizado el ensayo tras cosechar el cultivo siguiente, los valores apenas disminuyeron y la tendencia se mantuvo siendo BDC el tratamiento con valores más elevados. De nuevo, la dosis de materia orgánica favoreció la actividad fosfatasa, mientras que la biodesinfección pareció tener cierto efecto amortiguador. Los organismos encargados de estos procesos, en principio, producen fosfatasa ante la escasez de P. De acuerdo a los resultados fisicoquímicos, la concentración de P asimilable era mayor al comienzo del ensayo que tras los tratamientos (Tabla 8.3). Por tanto, el aumento en BDC pudo deberse al importante aporte de materia orgánica que propició su degradación y, con ello, la producción de enzimas. Por último, la ARYL disminuyó en todos los tratamientos una vez aplicados y se mantuvo con valores similares a la finalización del cultivo siguiente (Figura 8.12). En este caso, no se detectaron diferencias estadísticas entre tratamientos.



**Figura 8.13** | Análisis de componentes principales (PCA: *principal component analysis*) del conjunto de variables biológicas medidas en las muestras de los suelos biodesinfectados (BD y BDC) y controles no tratados (C y CC) antes de la biodesinfección (T1), al finalizar la biodesinfección y tras la incorporación del compost en BDC y CC (T2) y tras cosechar el siguiente cultivo (T3). Las elipses indican la agrupación por tiempos para un intervalo de confianza del 95%.

A fin de obtener una visión global de la evolución de las variables biológicas, se ejecutó un PCA con el conjunto de estos datos transformados (log). A través de este análisis se puede observar cómo los tratamientos se distribuyeron de manera diferente en ambos ejes o PC (componentes principales) que presentaron una varianza acumulada del 75% (Figura 8.13). Los suelos sin biodesinfectar (C y CC) se localizaron en los valores negativos del PC2 (29%), mientras que BD y BDC se agruparon en los valores positivos. Los tratamientos con COM (BDC y CC) se ubicaron en los valores positivos del PC1 (46%) y viceversa. En cuanto a los tiempos de muestreo, el centroide de las muestras tomadas después de los tratamientos se localizó junto al centroide de las muestras de BDC en los valores positivos de ambos ejes. También junto a estos centroides se localizan la mayoría de las variables biológicas incluidas, lo que denotó mayor actividad biológica en BDC y al finalizar los tratamientos.

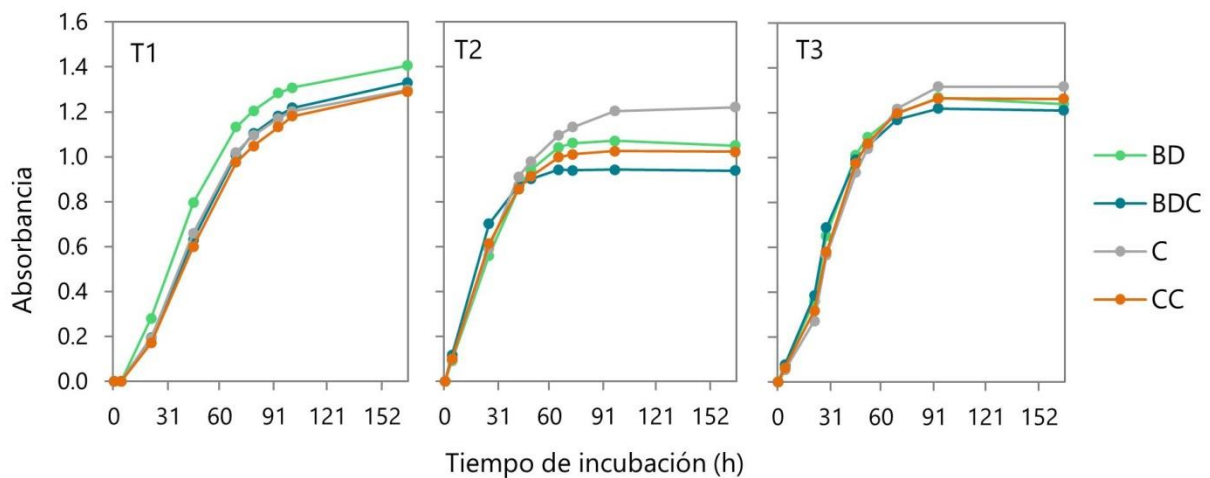


**Figura 8.14** | Resultados de placas Biolog EcoPlates™ del desarrollo medio de color por pocillo (AWCD) y del número de sustratos usados (NUS). Datos de los suelos biodesinfectados (BD y BDC) y controles no tratados (C y CC) antes de la biodesinfección (T1), al finalizar la biodesinfección y tras la incorporación del compost (T2) en los tratamientos BDC y CC y tras cosechar el siguiente cultivo (T3). Las letras minúsculas indican las diferencias entre la combinación de tiempo y tratamiento y las mayúsculas las diferencias entre tiempos. Los asteriscos representan el grado de significación entre tratamientos a cada tiempo ("\*"  $P \leq 0,05$ ).

Además de las variables fisicoquímicas y biológicas, también las comunidades microbianas sufrieron cambios durante este ensayo. Mediante el análisis del perfil fisiológico

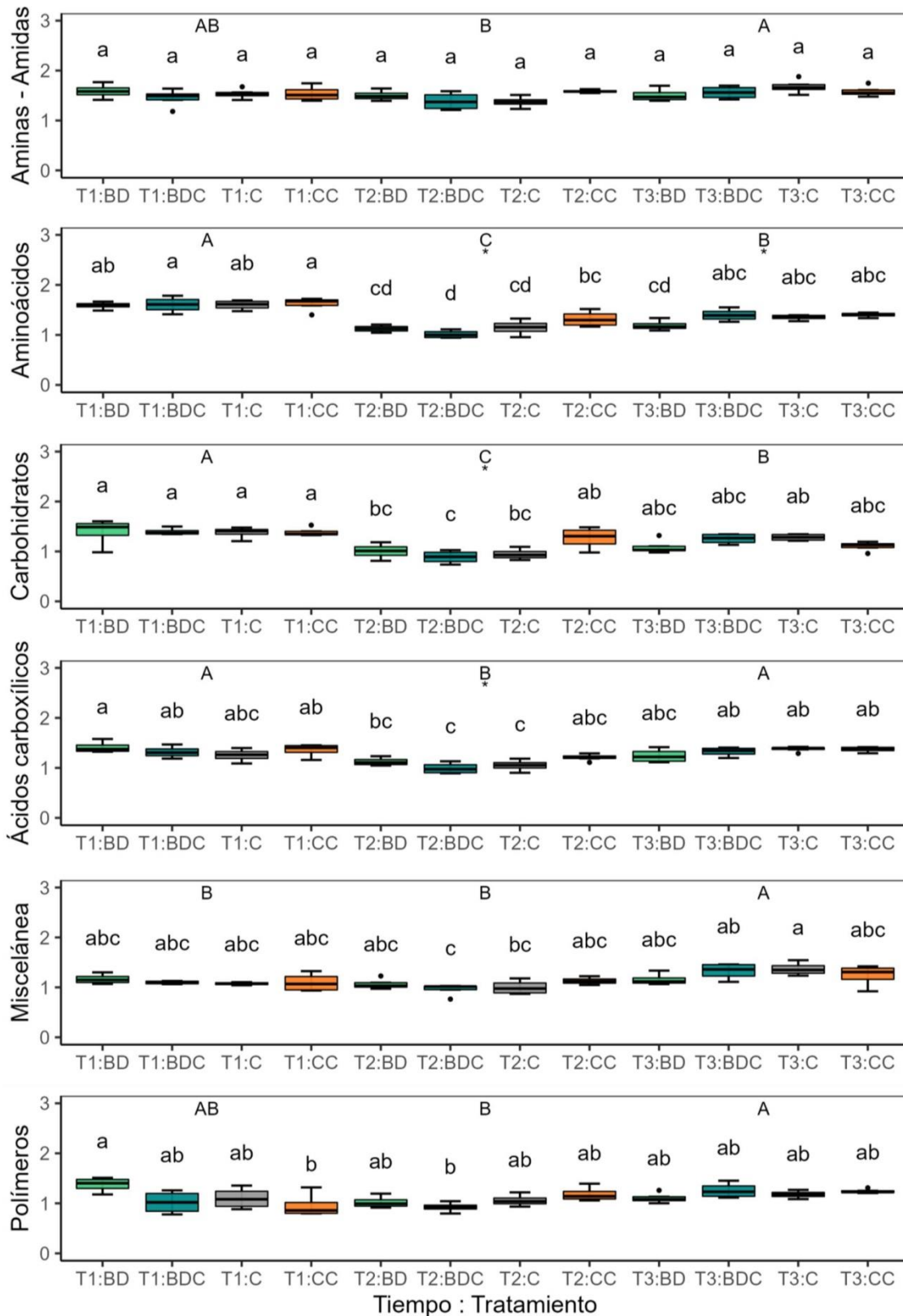


a nivel de comunidad, empleando las placas Biolog EcoPlates™, se pudieron evaluar cambios en la composición y actividad de parte de la población de bacterias. Los valores de AWCD disminuyeron de forma muy significativa ( $P < 0,001$ ) en todos los tratamientos respecto al inicio, aunque en menor medida en CC que resultó significativamente mayor que BDC ( $P = 0,02$ ). Al finalizar el ensayo los suelos recuperaron los valores iniciales de AWCD en todos los tratamientos. Considerando estos datos junto con los obtenidos para el NUS se pudo comprobar que la actividad disminuyó después de los tratamientos pero no así la diversidad dado que el NUS aumentó hasta los 31 en todos los casos. Algo similar se pudo observar en el primer ensayo en campo realizado para este trabajo (Capítulo 5) y supondría que la composición no se vio tan afectada como la densidad de población.



**Figura 8.15 |** Desarrollo de absorbancia (592nm) media del conjunto de sustratos durante el tiempo de incubación de las placas Biolog EcoPlates™ de muestras de suelos biodesinfectados (BD y BDC) y controles no tratados (C y CC) antes de la biodesinfección (T1), al finalizar la biodesinfección y tras la incorporación del compost (T2) en los tratamientos BDC y CC y tras cosechar el siguiente cultivo (T3).

A través del análisis del desarrollo de la degradación de los sustratos durante el tiempo de incubación de esta técnica, se pudo observar que la actividad fue menor después de los tratamientos en los suelos tratados mientras que el control se mantuvo estable (Figura 8.15). A la finalización del ensayo, los valores se recuperaron y la actividad comenzó ligeramente antes en los suelos tratados que en el control. A fin de profundizar en este análisis se evaluó el efecto de los tratamientos sobre cada grupo de sustratos. La actividad en todos los grupos disminuyó después de los tratamientos en la mayoría de ellos, salvo en miscelánea, pero los valores se recuperaron al finalizar el ensayo. Entre los grupos que más se vieron afectados destacan el de aminoácidos, carbohidratos y ácidos carboxílicos (Figura 8.16). Además, en los tres grupos se dieron diferencias estadísticas entre tratamientos. Las bacterias degradadoras de aminoácidos se vieron significativamente más afectadas en BDC respecto a CC ( $P = 0,02$ ), aunque en el último muestreo las poblaciones se recuperaron en BDC igualándose a los controles y de manera significativa respecto a BD ( $P = 0,03$ ). Las poblaciones en BD apenas se recuperaron una vez soportado el cultivo a diferencia del resto, mostrando diferencias significativas respecto a BDC y CC ( $P = 0,03$ ). Por lo tanto, la aplicación de COM pareció ejercer un efecto beneficioso sobre esta comunidad.



**Figura 8.16** | Absorbancia media de los grupos de sustratos en las placas Biolog EcoPlates™ de los suelos biodesinfectados (BD y BDC) y controles no tratados (C y CC) antes de la biodesinfección (T1), al finalizar la biodesinfección y tras la incorporación del compost (T2) en los tratamientos BDC y CC y tras cosechar el siguiente cultivo (T3). Las letras minúsculas indican las diferencias entre la combinación de tiempo y tratamiento y las mayúsculas las diferencias entre tiempos. Los asteriscos representan el grado de significación entre tratamientos a cada tiempo (\*\*\*)  $P \leq 0,05$ .

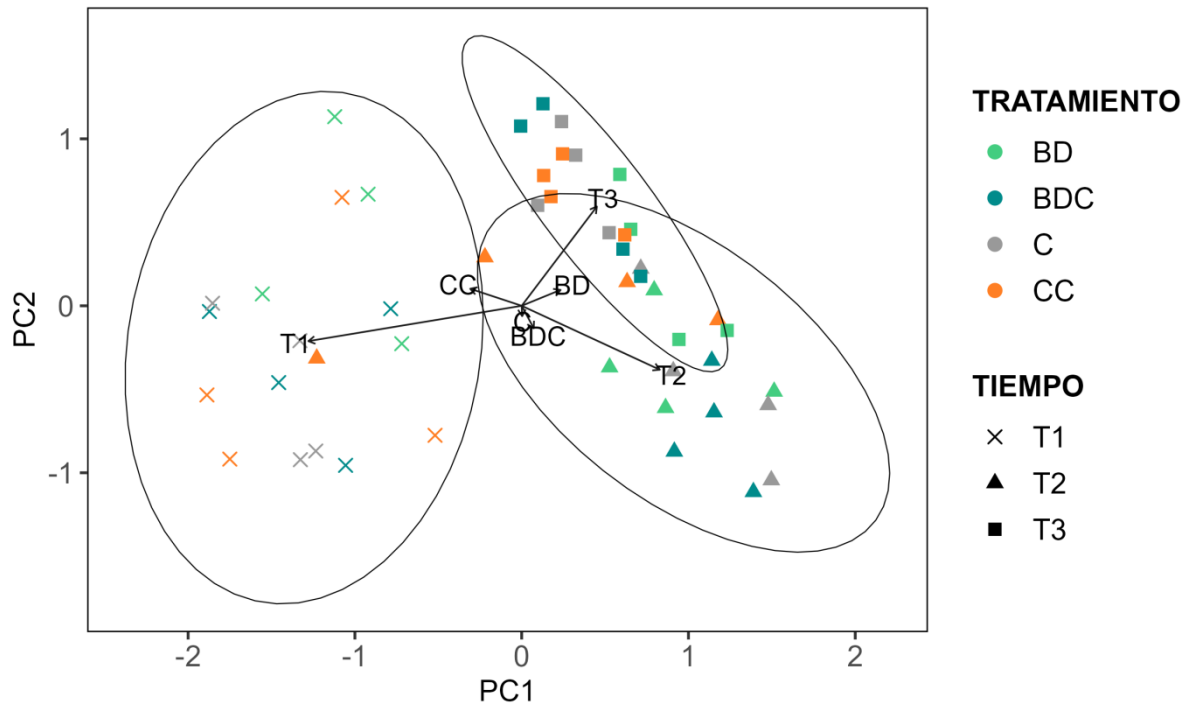
Las poblaciones degradadoras de carbohidratos y ácidos carboxílicos evolucionaron de forma similar en este ensayo. La actividad degradadora descendió en ambos casos una vez aplicados los tratamientos, siendo CC en el que menos disminuyó y BDC en el que más se redujo. Entre ambos tratamientos se dieron diferencias significativas en los dos grupos de sustratos, carbohidratos ( $P=0,03$ ) y ácidos carboxílicos ( $P=0,04$ ) (Figura 8.16). Finalizado el ensayo una vez cosechado el siguiente cultivo, los valores se recuperaron en todos los tratamientos, especialmente las poblaciones degradadoras de ácidos carboxílicos. La actividad en los grupos de polímeros presentó un patrón similar al de estos grupos con menor afección en CC al finalizar los tratamientos pero mejor recuperación en BDC al final del ensayo. La actividad degradadora en miscelánea no se vio afectada por ninguno de los tratamientos incluso aumentó en todos ellos al finalizar el ensayo, especialmente en BDC.

**Tabla 8.4** | Índices de diversidad (Shannon) y riqueza (Chao) de la población de bacterias heterótrofas de las placas Biolog EcoPlates tomando los datos de absorbancias máximas de los 31 sustratos. Valores medios y error estándar (EE) de los suelos biodesinfectados (BD y BDC) y controles no tratados (C y CC) antes de la biodesinfección (T1), al finalizar la biodesinfección y tras la incorporación del compost (T2) en los tratamientos BDC y CC y tras cosechar el siguiente cultivo (T3). Las letras minúsculas indican las diferencias entre la combinación de tiempo y tratamiento y las mayúsculas las diferencias entre tiempos.

Tiempo	Tratamiento	DIVERSIDAD			RIQUEZA		
		media	ES		media	ES	
T1	BD	3.38	0.01	a	31.00	0.00	a
	BDC	3.35	0.01	a	31.00	0.00	a
	C	3.34	0.01	a	31.00	0.00	a
	CC	3.35	0.02	a	31.00	0.00	a
T2	BD	3.41	0.00	a	31.00	0.00	a
	BDC	3.41	0.00	a	31.00	0.00	a
	C	3.42	0.00	a	31.00	0.00	a
	CC	3.40	0.01	a	31.00	0.00	a
T3	BD	3.42	0.00	a	31.00	0.00	a
	BDC	3.42	0.00	a	31.00	0.00	a
	C	3.42	0.00	a	31.00	0.00	a
	CC	3.41	0.00	a	31.00	0.00	a

Al contrastar estos resultados con los valores en los índices de diversidad y riqueza se pudo comprobar que la riqueza se mantuvo constante en todos los tratamientos y que los cambios se dieron en la diversidad. Al finalizar los tratamientos los índices de diversidad aumentaron significativamente en todos los tratamientos respecto al inicio ( $P=0,003$ ), incluido el control, y los valores aun aumentaron más al finalizar el ensayo. Sin embargo, no se dieron diferencias estadísticas entre tratamientos en ninguno de los muestreos. La estabilidad en los valores de riqueza denotó la tolerancia de estas poblaciones de bacterias a las perturbaciones derivadas de los tratamientos. A diferencia de los ensayos anteriores en campo (Capítulos 5 y 6), el aumento en los índices de diversidad en estas comunidades sugirió una mejora en el equilibrio de las comunidades. Sin embargo este hecho también se

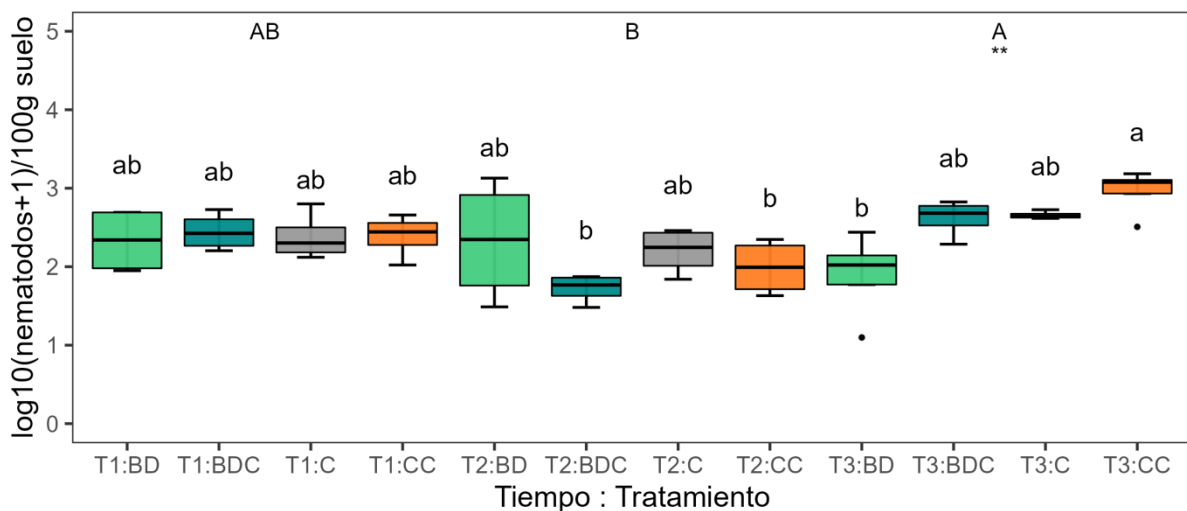
dio en los controles lo que llevó a pensar que no fue necesariamente fruto de los tratamientos y que pudo deberse a otra serie de factores como el laboreo o el cultivo.



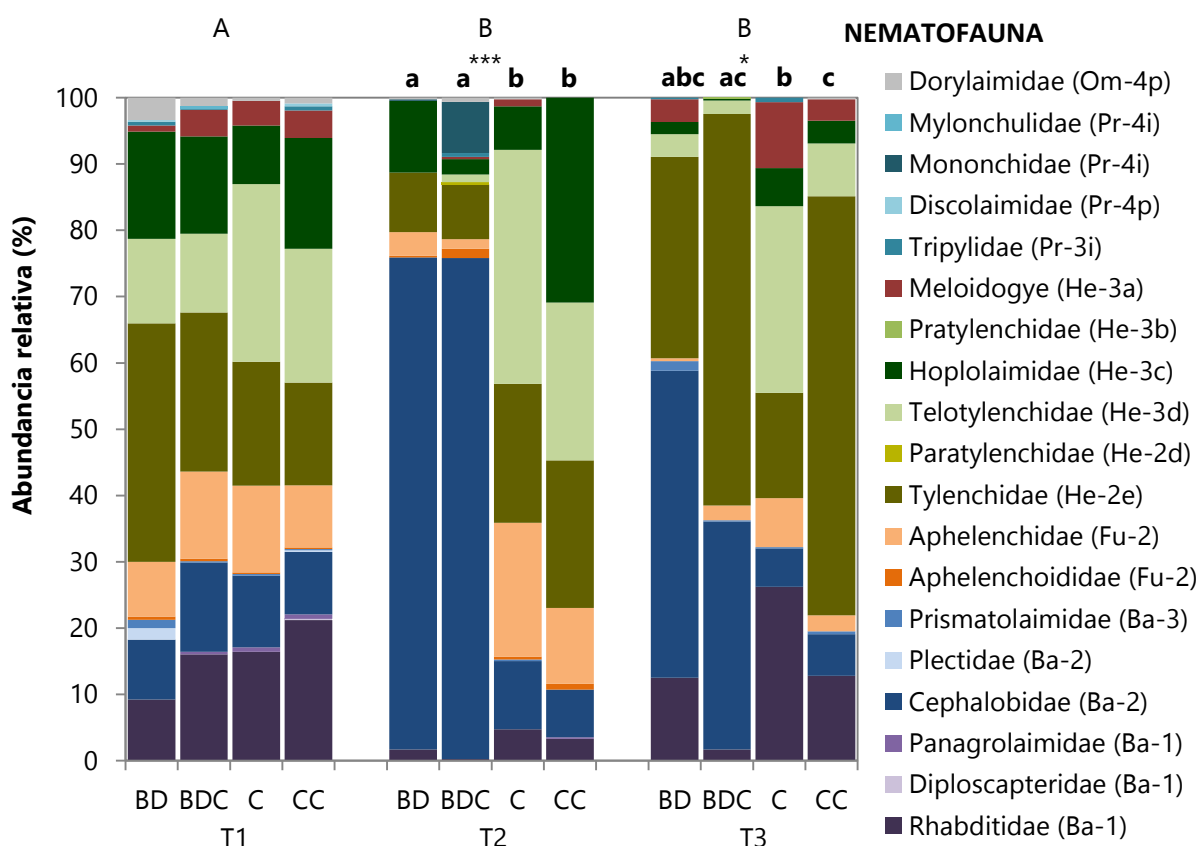
**Figura 8.17** | Análisis de componentes principales (PCA: *principal component analysis*) de las absorbancias máximas medidas de los 31 sustratos de las placas Biolog EcoPlates de las muestras de los suelos biodesinfectados (BD y BDC) y controles no tratados (C y CC) antes de la biodesinfección (T1), al finalizar la biodesinfección y tras la incorporación del compost (T2) en los tratamientos BDC y CC y tras cosechar el siguiente cultivo (T3). Las elipses indican la agrupación por tiempos para un intervalo de confianza del 95%.

En el análisis PCA ejecutado con los datos de absorbancia máxima en los 31 sustratos de las placas Biolog™ las muestras se agruparon muy bien por tiempos, posiblemente reflejo de los resultados de diversidad. Las muestras analizadas al comienzo del ensayo quedaron agrupadas en los valores negativos del PC1, mientras que los dos muestreos siguientes a los tratamientos se localizaron en los valores positivos de este eje que explicó el 47% de la variabilidad (Figura 8.17). Las muestras al final del ensayo quedaron ubicadas en los valores positivos del PC2 (18%) mostrando menor dispersión que las muestras tomadas a la finalización de los tratamientos que se distribuyeron en los valores negativos de este eje. En cuanto a los tratamientos, los centroides de las muestras CC y BD se localizaron contrapuestos en el PC1 quedando el centroide de BD más cercano a los centroides de los muestreos posteriores a los tratamientos. De acuerdo a estos resultados, las poblaciones de estas bacterias en los suelos sin tratar evolucionaron de forma similar a las presentes en los suelos a los que se les aplicaron los tratamientos de biodesinfección y/o aplicación de COM. Por lo tanto, para este ensayo, los resultados de este análisis no aportaron información relevante en la interpretación de la disminución de los patógenos en los suelos biodesinfectados.

A diferencia de las placas Biolog™, el análisis de la nematofauna sí mostró diferencias claras entre tratamientos en la estructura y composición de esta comunidad. La sensibilidad de estos organismos se hizo patente en los ensayos anteriores en campo (Capítulos 5 y 6). En este caso, todas las parcelas partieron con densidades similares al comienzo del ensayo ( $200 < 250$  nematodos/100g o  $2,3 < 2,4 \log_{10}(\text{nematodos}+1)/100\text{g}$ ) sin diferencias estadísticas entre tratamientos ( $P=0,96$ ) (Figura 8.18). Una vez aplicados los tratamientos, la abundancia de nematodos se mantuvo estable en las parcelas control y BD (160 y 200 nematodos/100g o 2,2 y  $2,3 \log_{10}(\text{nematodos}+1)/100\text{g}$ , respectivamente). Por el contrario, la abundancia en los tratamientos con COM disminuyó después de los tratamientos, especialmente en BDC (50 nematodos/100g o  $1,7 \log_{10}(\text{nematodos}+1)/100\text{g}$ ). Sin embargo, a la finalización del ensayo, tras dos meses en presencia del cultivo, fueron precisamente BDC y CC los tratamientos en los que se obtuvieron mayores valores promedio (630 y 1.300 nematodos/100g o 2,8 y  $3,1 \log_{10}(\text{nematodos}+1)/100\text{g}$ , respectivamente), sobrepasando los valores del comienzo y los del control en este tiempo (400 J2/100g o  $2,6 \log_{10}(\text{nematodos}+1)/100\text{g}$ ). En cambio, en el tratamiento BD la densidad de población no se recuperó (130 J2/100g o  $2,1 \log_{10}(\text{nematodos}+1)/100\text{g}$ ) siendo significativamente menor al del resto de tratamientos ( $P \leq 0,05$ ), especialmente respecto a CC ( $P=0,004$ ). De acuerdo a estos resultados, inicialmente la aplicación de COM supuso una perturbación mayor que la biodesinfección aunque una vez finalizadas las perturbaciones (tratamientos y laboreo) y tras la presencia de un cultivo la abundancia de nematodos se vio favorecida en los tratamientos con COM.



**Figura 8.18** | Número de nematodos ( $\log_{10}+1$ ) en 100g de suelo (peso seco) en los suelos biodesinfectados (BD y BDC) y controles no tratados (C y CC) antes de la biodesinfección (T1), al finalizar la biodesinfección y tras la incorporación del compost (T2) en los tratamientos BDC y CC y tras cosechar el siguiente cultivo (T3). Las letras minúsculas indican las diferencias entre la combinación de tiempo y tratamiento y las mayúsculas las diferencias entre tiempos. Los asteriscos representan el grado de significación entre tratamientos a cada tiempo (\*\*\*\*  $P \leq 0,01$ ).



**Figura 8.19** | Abundancia relativa de las familias de nematodos identificados y el grupo trófico al que pertenecen (He: herbívoros, en verdes; Fu: fungívoros, en naranjas; Ba: bacteriófagos, en azules y morados). Se incluye el valor cp para cada familia y la subcategoría para los He descrita en el Capítulo 3 de Procedimientos Generales) en los suelos biodesinfectados (BD y BDC) y controles no tratados (C y CC) antes de la biodesinfección (T1), al finalizar la biodesinfección y tras la incorporación del compost en los tratamientos BDC y CC (T2) y tras cosechar el siguiente cultivo (T3). Se diferencia la proporción del patógeno *Meloidogyne* en rojo intenso. Las letras mayúsculas indican las diferencias entre tiempos; los asteriscos el grado de significación entre tratamientos a cada tiempo ("\*"  $P \leq 0,05$ ; "\*\*\*\*"  $P \leq 0,001$ ) junto con las letras minúsculas en negrita indicando las diferencias entre tratamientos en cada tiempo.

En cuanto a la composición de la nematofauna, todas las parcelas presentaron cierta similitud al comienzo del ensayo, sin diferencias estadísticas entre los tratamientos ( $P=0,3$ ) (Figura 8.19). En estos suelos, previo a los tratamientos, el grupo de herbívoros fue el más abundante ( $55 < 60\%$ ), representado por Tylenchidae, Telotylenchidae y Hoplolaimidae sin predominancia de ninguna familia en particular. Los bacteriófagos fueron los siguientes más abundantes ( $21-32\%$ ) seguidos de los fungívoros ( $9 < 13\%$ ), estos últimos tan solo representados mayoritariamente por la familia Aphelenchidae. Los predadores apenas estuvieron representados ( $< 1\%$ ), al igual que los omnívoros ( $< 3\%$ ). Una vez aplicados los tratamientos, en los controles sin biodesinfectar la nematofauna se mantuvo sin grandes alteraciones, mientras que en los suelos biodesinfectados se produjeron cambios claros en la composición siendo estadísticamente diferentes a los controles ( $P < 0,04$ ). La perturbación generada por la biodesinfección favoreció a los bacteriófagos frente al resto y en particular a la familia de bacteriófagos Cephalobidae, que llegó a representar entorno al 75% del conjunto de la población en BD y BDC. El incremento de bacteriófagos resulta común tras los

aportes de materia orgánica al suelo debido al enriquecimiento que se genera de lo que es su fuente de alimento por el aumento de la población bacteriana, beneficiada por la materia orgánica.

Sin embargo, en este caso, en los suelos con COM pero sin biodesinfectar no se produjo este aumento. Por lo tanto, este cambio tuvo que deberse a las propias condiciones de la biodesinfección y no al simple enriquecimiento por el aporte de materia orgánica. También resultó llamativo que fuera la familia Cephalobidae (cp-2) dominante frente a Rhabditidae, como sucedió en los capítulos anteriores (Capítulos 5 y 6), que presenta un carácter más colonizador (cp-1). Además, en BDC el grupo de predadores aumentó hasta representar el 8% del conjunto de la población. Este resultado resulta curioso dado el carácter persistente de este grupo, aunque bajo determinadas condiciones los juveniles de algunas de estas familias pueden alimentarse de cadáveres de otros nematodos e incluso de bacterias (Khan y Kim, 2007). Estas fuentes de alimento podrían estar justificadas por el efecto de la biodesinfección y, en el caso de BDC, la presencia de predadores resaltaría de nuevo el efecto beneficioso del aporte de COM sobre la nematofauna al favorecer una comunidad mejor estructurada.

Transcurridos dos meses, una vez soportado el siguiente cultivo, en los suelos sin biodesinfección ni aporte de COM la composición de la nematofauna fue muy similar a la inicial. En cambio, en el resto de tratamientos se produjeron cambios originados por la biodesinfección y/o el aporte de COM. En los suelos que fueron biodesinfectados los herbívoros aumentaron en detrimento de los bacteriófagos, especialmente en BDC (Figura 8.19). Sin embargo, este cambio fue debido a la proliferación de Tylenchidae que también aumentó en los controles con COM respecto al resto de familias. Existe cierta controversia en la clasificación de Tylenchidae dada la diversidad de especies y fuentes de alimentación. Unas se alimentan del tejido radicular muerto sin generar daños en el cultivo, pero otras se alimentan de musgo, algas e incluso de hongos en función de las condiciones (Bongers y Bongers, 1998; Qing y Bert, 2019). Dado que el aporte de COM tiende a favorecer la proliferación de hongos, probablemente el crecimiento de la población de esta familia en BDC (59%) y CC (63%) se debió a la proliferación de especies fungívoras dentro de Tylenchidae. Además, esta familia también estuvo ampliamente representada en BD (30%) y es que su cutícula impermeable los hace tolerantes a condiciones adversas que, sumado a su perfil colonizador, los convierte en organismos resistentes a muchos tipos de perturbación (Bongers, 1999). Entre los suelos biodesinfectados, esto fue especialmente llamativo en BDC y no tanto en BD, en los que el grupo de bacteriófagos aun fue dominante representando un 60% del total de la población. Por lo tanto, el aporte de COM pareció beneficiar especialmente a la familia Tylenchidae, dominantes en BDC y CC (59 y 66%, respectivamente). Además, fueron precisamente estos tratamientos los que mostraron diferencias significativas en la composición de la nematofauna respecto al control a la finalización del ensayo ( $P=0,02$ ).

En los índices de diversidad y riqueza de la nematofauna también se pudo observar el efecto que generaron los diferentes tratamientos en la composición una vez aplicados. La biodesinfección provocó la disminución de ambos índices, especialmente del de diversidad.



A pesar de que no se observaron diferencias estadísticas entre tratamientos en ninguno de los índices, BD y BDC estuvieron cerca de la significación respecto CC ( $P=0,06$ ) en el índice de diversidad tras la aplicación de los tratamientos (Tabla 8.5). Este resultado pudo provenir del dominio de bacteriófagos en estos suelos frente al resto de grupos. Una vez cosechado el cultivo, ambos índices tendieron a la recuperación en BD pero no así en BDC que mostró valores más bajos y cercanos a la significación estadística respecto al control en la diversidad ( $P=0,06$ ) y respecto a CC en la riqueza ( $P=0,06$ ). Esto pudo resultar del efecto conjunto o doble perturbación de ambas acciones, la biodesinfección y la incorporación de COM.

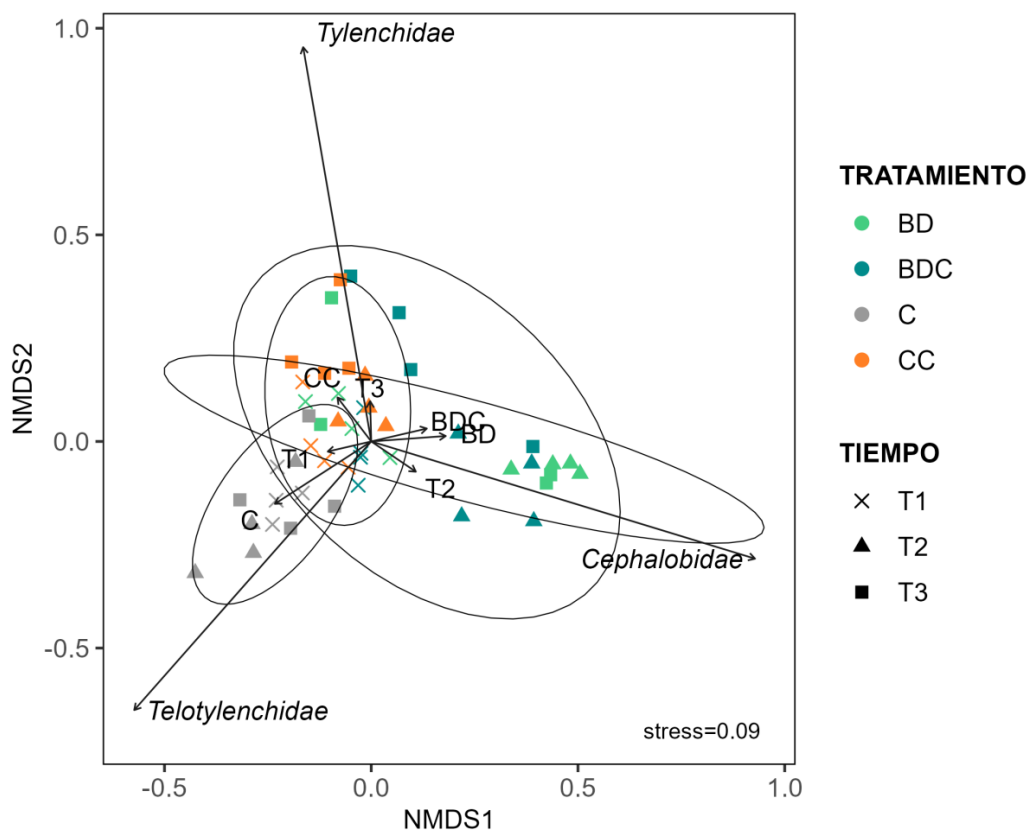
**Tabla 8.5** | Índices de diversidad (Shannon) y riqueza (Chao) de la población de nematodos considerando los datos de abundancia relativa. Valores medios y error estándar (EE) de los suelos biodesinfectados (BD y BDC) y controles no tratados (C y CC) antes de la biodesinfección (T1), al finalizar la biodesinfección y tras la incorporación del compost (T2) en los tratamientos BDC y CC y tras cosechar el siguiente cultivo (T3). Las letras minúsculas indican las diferencias entre la combinación de tiempo y tratamiento y las mayúsculas las diferencias entre tiempos.

Tiempo	Tratamiento	DIVERSIDAD			RIQUEZA		
		media	ES		media	ES	
T1	BD	1.76	0.06	ab	9.50	0.29	a
	BDC	1.86	0.03	a	9.25	0.95	ab
	C	1.66	0.13	abcd	7.75	0.85	abc
	CC	1.81	0.08	abc	9.75	1.03	ab
T2	BD	0.69	0.30	def	4.75	1.25	bc
	BDC	0.83	0.12	e	6.25	0.48	c
	C	1.41	0.27	bcdef	6.50	0.96	bc
	CC	1.38	0.10	def	6.25	0.48	c
T3	BD	0.88	0.25	cdef	6.00	0.71	c
	BDC	0.68	0.18	ef	4.50	0.87	c
	C	1.54	0.16	abcdf	7.00	0.71	bc
	CC	1.15	0.21	def	7.50	0.29	bc

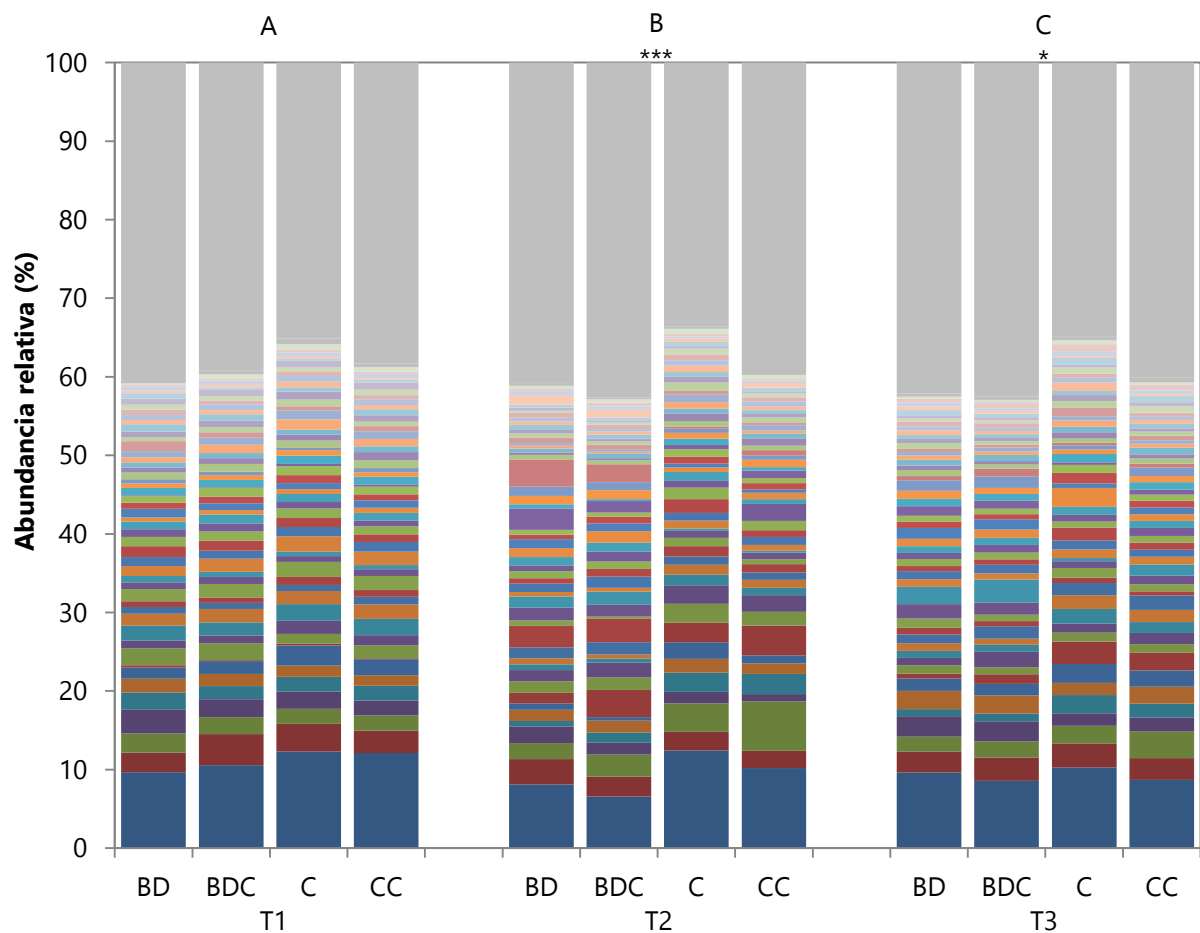
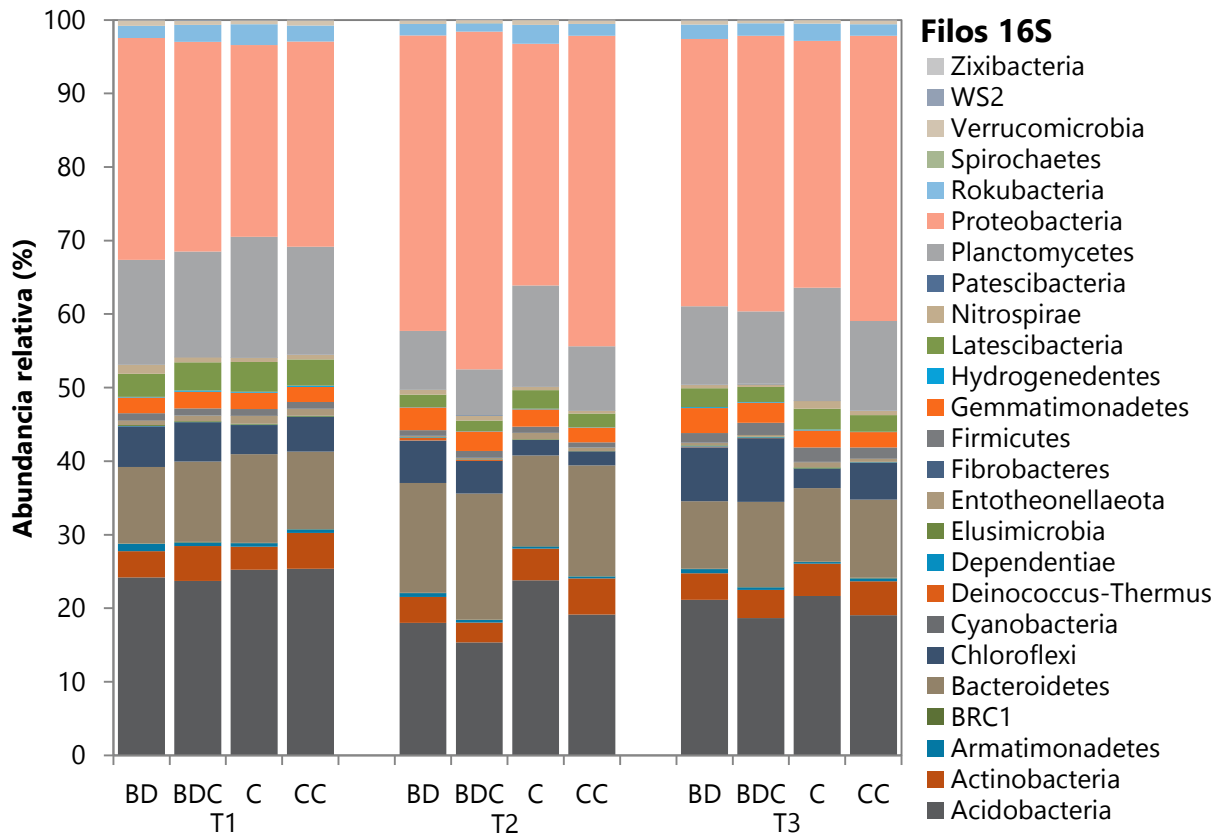
El análisis NMDS con los datos de abundancia de la nematofauna completó la interpretación de estos resultados. En él se pudo observar una clara agrupación por tiempos ( $\text{estrés} < 0,1$ ) y ciertas tendencias en los tratamientos (Figura 8.20). Las muestras de los controles se agrupan en los valores negativos del NMDS1 al igual que las muestras pertenecientes al primer muestreo, antes de los tratamientos, los que refleja la similitud en la composición al inicio del ensayo. Por el contrario, una vez aplicados los tratamientos, las muestras de los suelos tratados se localizaron, principalmente, en los valores positivos del mismo eje. En concreto, las muestras de los tratamientos de biodesinfección, BD y BDC, quedaron ubicadas en contraposición a las del control y del comienzo del ensayo. Esto denotó la diferencia en la composición entre estos tratamientos y de la composición inicial.

A través de este análisis también se pudo comprobar cómo las familias Telotylenchidae, Tylenchidae y Cephalobidae tuvieron fuerte influencia en la distribución de muestras (Figura 8.20). Las especies pertenecientes a Telotylenchidae (*Tylenchorhynchus*) son ectoparásitos pero solo algunas de ellas están descritas como fitoparásitas con relevancia económica. También se conocen como nematodos atrofiantes porque su ataque impide el

desarrollo radicular dando lugar a plantas raquílicas (Netscher y Sikora, 1990). Esta familia aparece fuertemente relacionada con las muestras del control, en las que su población se mantiene constante durante todo el ensayo (Figura 8.19). En el caso de los tratamientos con COM, especialmente en CC, la familia Tylenchidae fue la mayoritaria al final del ensayo en los suelos que incluían COM, como reflejó este análisis. Como se ha mencionado anteriormente, la presencia de estos nematodos puede incluso favorecer el desarrollo del cultivo al promover la regeneración epitelial radicular (Bongers 1999; Ferris et al., 2001). De la misma forma, el aumento de la población de Cephalobidae fue determinante en la diferenciación entre las poblaciones de los suelos biodesinfectados y sin biodesinfectar. Considerando el conjunto de resultados relativos a la nematofauna, se pudo observar un claro efecto en el cambio de la composición de la comunidad derivado de la biodesinfección. Este tratamiento favoreció el crecimiento de bacteriófagos, en concreto de la familia Cephalobidae, en detrimento de los herbívoros que redujeron considerablemente su población tras la biodesinfección, reflejo de un aumento de la población de bacterias. Por otro lado, la incorporación de COM pareció influir fuertemente en la población de herbívoros en beneficio de especies no dañinas para el cultivo y en detrimento las especies fitoparásitas. El efecto conjunto de la biodesinfección y la aplicación de estiércol sí tuvo un gran efecto en la reducción del patógeno *M. incognita* y fue el tratamiento que más cambios provocó en la composición de la nematofauna respecto a los controles.



**Figura 8.20** | Análisis NMDS (*non-metric multidimensional scaling*) de la nematofauna presente en los suelos biodesinfectados (BD y BDC) y controles (C y CC) antes de la biodesinfección (T1), al finalizar la biodesinfección y tras la incorporación del compost (T2) en BDC y CC y tras cosechar el siguiente cultivo (T3). Las elipses indican la agrupación por tiempos para un intervalo de confianza del 95%.



**OTUs 16S**

- Otros (<0.5%)
- Proteobacteria\_D2.Deltaproteobacteria
- Firmicutes\_D2.Bacilli\_D3.Bacillales\_D4.Bacillaceae\_D5.Bacillus
- Proteobacteria\_D2.Deltaproteobacteria\_D3.Desulfarculales\_D4.Desulfarculaceae\_D5.uncultured
- Bacteroidetes\_D2.Bacteroidia\_D3.Chitinophagales\_D4.Chitinophagaceae\_D5.Flavisolibacter
- Proteobacteria\_D2.Alphaproteobacteria\_D3.Sphingomonadales\_D4.Sphingomonadaceae\_D5.Sphingomonas
- Proteobacteria\_D2.Alphaproteobacteria\_D3.Rhizobiales\_D4.Xanthobacteraceae\_D5.uncultured
- Proteobacteria\_D2.Alphaproteobacteria\_D3.Rhizobiales\_D4.Hyphomicrobiaceae\_D5.Pedomicrobium
- Planctomycetes\_D2.Phycisphaerae\_D3.Tepidisphaerales\_D4.WD2101soilgroup\_D5.uncultured planctomycete
- Planctomycetes\_D2.Phycisphaerae\_D3.Tepidisphaerales\_D4.WD2101soilgroup\_D5.uncultured bacterium
- Gemmatimonadetes\_D2.AKAU4049\_Ambiguoustaxa
- Acidobacteria\_D2.Blastocatellia(Subgroup4)\_D3.Pyrinomonadales\_D4.Pyrinomonadaceae\_D5.RB41
- Acidobacteria\_D2.Subgroup22
- Rokubacteria\_D2.NC10\_D3.Rokubacteriales
- Nitrospirae\_D2.Nitrospira\_D3.Nitrospirales\_D4.Nitrospiraceae\_D5.Nitrospira
- Acidobacteria\_D2.Subgroup6\_D3.unidentified\_D4.unidentified\_D5.unidentified
- Rokubacteria\_D2.NC10\_D3.Rokubacteriales\_D4.metagenome\_D5.metagenome
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.PLTA13
- Acidobacteria\_D2.Subgroup6\_D3.uncultured microorganism
- Acidobacteria\_D2.Subgroup5
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.Xanthomonadales\_D4.Xanthomonadaceae\_D5.Pseudoxanthomonas
- Proteobacteria\_D2.Alphaproteobacteria\_D3.Dongiiales\_D4.Dongiaceae\_D5.Dongia
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.Betaproteobacteriales\_D4.SC-I-84
- Planctomycetes\_D2.Planctomycetacia\_D3.Pirellulales\_D4.Pirellulaceae\_D5.uncultured
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.Xanthomonadales\_D4.Xanthomonadaceae
- Latescibacteria
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.Steroidobacteriales\_D4.Steroidobacteraceae\_D5.uncultured
- Chloroflexi\_D2.Anaerolineae\_D3.Anaerolineales\_D4.Anaerolineaceae\_D5.UTCFX1
- Proteobacteria\_D2.Alphaproteobacteria\_D3.uncultured
- Proteobacteria\_D2.Deltaproteobacteria\_D3.NB1-j
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.Betaproteobacteriales\_D4.Burkholderiaceae
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.CCD24
- Planctomycetes\_D2.OM190\_D3.uncultured bacterium
- Acidobacteria\_D2.Acidobacteriia\_D3.Solibacterales\_D4.Solibacteraceae(Subgroup3)\_D5.Bryobacter
- Latescibacteria\_D2.uncultured soilbacterium
- Chloroflexi\_D2.Anaerolineae\_D3.SBR1031\_D4.A4b
- Gemmatimonadetes\_D2.Gemmatimonadetes\_D3.Gemmatimonadales\_D4.Gemmatimonadaceae\_D5.uncultured
- Planctomycetes\_D2.Planctomycetacia\_D3.Gemmatales\_D4.Gemmataceae\_D5.uncultured
- Bacteroidetes\_D2.Bacteroidia\_D3.Chitinophagales\_D4.Chitinophagaceae
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.Steroidobacteriales\_D4.Steroidobacteraceae\_D5.Steroidobacter
- Acidobacteria\_D2.Subgroup17
- Planctomycetes\_D2.Planctomycetacia\_D3.Pirellulales\_D4.Pirellulaceae\_D5.Pirellula
- Bacteroidetes\_D2.Bacteroidia\_D3.Cytophagales\_D4.Microscillaceae\_D5.uncultured
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.Betaproteobacteriales\_D4.Nitrosomonadaceae\_D5.MND1
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.Pseudomonadales\_D4.Pseudomonadaceae\_D5.Pseudomonas
- Planctomycetes\_D2.Planctomycetacia\_D3.Pirellulales\_D4.Pirellulaceae\_D5.Pir4lineage
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.GammaproteobacteriaincertaeSedis\_D4.UnknownFamily\_D5.Acidibacter
- Bacteroidetes\_D2.Bacteroidia\_D3.Cytophagales\_D4.Microscillaceae
- Acidobacteria\_D2.Thermoanaerobaculia\_D3.Thermoanaerobaculales\_D4.Thermoanaerobaculaceae\_D5.Subgroup10
- Proteobacteria\_D2.Gammaproteobacteria\_D3.Xanthomonadales\_D4.Xanthomonadaceae\_D5.Lysobacter
- Bacteroidetes\_D2.Bacteroidia\_D3.Chitinophagales\_D4.Chitinophagaceae\_D5.Terrimonas
- Acidobacteria\_D2.Subgroup6

**Figura 8.21** | Abundancia relativa (%) de filos (arriba) y OTUs (abajo) 16S para bacterias, detectados en los suelos biodesinfectados (BD y BDC) y controles no tratados (C y CC) antes de la biodesinfección (T1), al finalizar la biodesinfección y tras la incorporación del compost en los tratamientos BDC y CC (T2) y tras cosechar el siguiente cultivo (T3). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tiempos, considerando los datos de las OTUs.

Dado el incremento de la población de bacteriófagos en la comunidad de nematodos tras la biodesinfección, se supuso un aumento en la población bacteriana en los suelos biodesinfectados una vez aplicado el tratamiento. Los análisis de secuenciación no permiten estimar la biomasa presente pero pueden aportar información relativa a la composición. En este ensayo, todos los suelos parten de una composición poblacional similar que fue alterada tras la aplicación de los diferentes tratamientos mostrando diferencias significativas respecto al inicio y entre tratamientos. Entre las poblaciones afectadas destacan los filos Acidobacteria y Planctomycetes que mermaron tras la aplicación de los tratamientos. Por el contrario, los filos Proteobacteria y Bacteroidetes aumentaron sus poblaciones en todos los tratamientos excepto en el control (Figura 8.21). Estos resultados guardaron cierta similitud con los obtenidos en el anterior ensayo en campo (Capítulo 6), en el que los cuatro tratamientos de biodesinfección evaluados provocaron la disminución de Acidobacteria y el aumento de Bacteroidetes. En este caso el análisis Adonis resultó significativo entre tratamientos una vez aplicados, sin embargo, su prueba post-hoc no llegó a la significación y tampoco lo hizo para las muestras del último tiempo analizado aunque en ambos muestreos la diferencia fue mayor entre biodesinfectados y no biodesinfectados.

Dentro del filo Bacteroidetes, la familia Chitinophagaceae fue la más favorecida por la biodesinfección aumentando su población tras los tratamientos en BD y BDC (2,7 y 2,9%, respectivamente). Estas bacterias están consideradas fuertes degradadoras de C orgánico, por lo que se ven beneficiadas por los aportes de materia orgánica que durante su descomposición generan ácidos orgánicos capaces de inhibir el crecimiento de muchos patógenos fúngicos. Además, este grupo está especializado en la descomposición de la quitina, componente esencial de las paredes celulares de los hongos, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (Randall et al., 2020; Gao et al., 2021). Sin embargo, el aumento de su población se observó en BD y BDC y no así en CC (1,1%), por lo que la familia Chitinophagaceae pareció responder mejor bajo las condiciones de biodesinfección que con la simple aplicación de COM. El incremento de Chitinophagaceae junto con *Clostridium* (Firmicutes), *UC-Ruminococcaceae* (Firmicutes), *Pseudoxanthomonas* (Proteobacteria) y *Flavisolibacter* (Bacteroidetes) también fue observado por Liu et al. (2016) tras la aplicación de una biodesinfección empleando residuos vegetales. Entre las pertenecientes al filo Proteobacteria, la familia Xanthomonadaceae fue la más favorecida siendo las especies del género *Pseudoxanthomonas* unas de las que más proliferaron en los suelos biodesinfectados. Este género presentó una abundancia de 3,5 y 2,3% en BD y BDC, respectivamente, frente a menos del 1% presente en los suelos sin biodesinfectar. En este ensayo, algunos géneros de las familias Chitinophagaceae y Xanthomonadaceae se vieron más beneficiadas por las condiciones dadas durante la biodesinfección que por la simple aportación de materia orgánica, demostrando tolerancia a condiciones de alta temperatura y anaerobiosis temporal. Por otro lado, la población de *Pseudomonas* spp. incrementó en todos los suelos tras los tratamientos aunque en aquellos con COM el aumento fue mayor. También el género *Lysobacter* se vio favorecido por el aporte de COM y no por la biodesinfección, con un notable incremento en CC (6,3%) respecto al resto (2<3,6%). Este género está reconocido

como parte de las poblaciones supresoras frente a determinados patógenos (Wang et al., 2017; Lin et al., 2023).

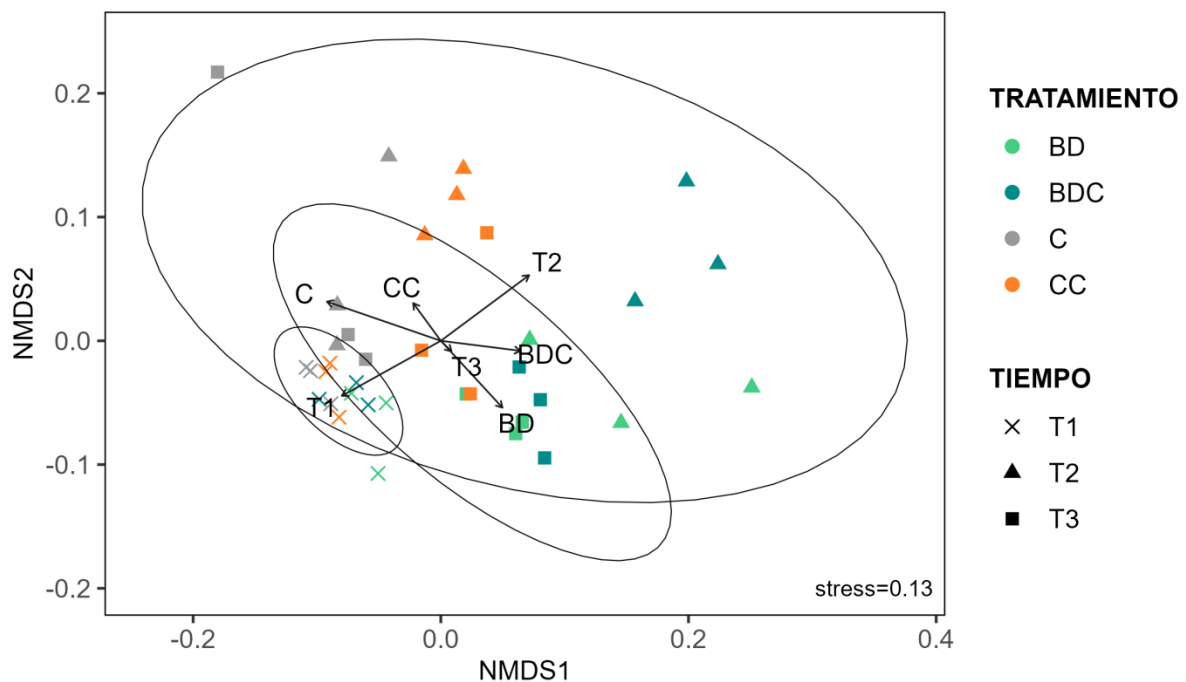
Una vez cosechado el cultivo siguiente a los tratamientos, la comunidad bacteriana tendió a un mayor equilibrio mostrando menor diferencia estadística entre tratamientos ( $P=0,01$ ). Algunas de las poblaciones experimentaron cambios respecto al muestreo anterior, aunque pudo ser debida a la presencia del cultivo en este último muestreo. Este fue el caso de algunas poblaciones del filo Chloroflexi que aumentaron especialmente en los suelos biodesinfectados. Entre éstas se encontraron algunas pertenecientes a la clase Anaerolineae que se encuentran asociadas a suelos supresores, al igual que el subgrupo 10 de la familia Thermoanaerobaculaceae que también tuvo mayor representación en BD y BDC después del cultivo (2,6%) frente a C y CC (1,6 y 1,8%, respectivamente) (Lin et al., 2023). Por lo tanto, habiendo aplicado dosis de enmienda similares mediante la biodesinfección y la aplicación de compost (3,1kg/m<sup>2</sup> y 2,7kg/m<sup>2</sup> en peso seco, respectivamente), la proliferación de bacterias asociadas a la supresividad del suelo pudo estar ligada a la mezcla de enmiendas de distinta naturaleza y/o a las condiciones generadas durante la biodesinfección.

**Tabla 8.6** | Índices de diversidad (Shannon) y riqueza (Chao) de la población de bacterias considerando los datos de abundancia relativa de OTUs. Valores medios y error estándar (EE) de los suelos biodesinfectados (BD y BDC) y controles no tratados (C y CC) antes de la biodesinfección (T1), al finalizar la biodesinfección y tras la incorporación del compost (T2) en los tratamientos BDC y CC y tras cosechar el siguiente cultivo (T3). Las letras minúsculas indican las diferencias entre la combinación de tiempo y tratamiento y las mayúsculas las diferencias entre tiempos.

Tiempo	Tratamiento	DIVERSIDAD			RIQUEZA		
		media	ES		media	ES	
T1	BD	4.49	0.02	a	173.0	3.2	a
	BDC	4.45	0.02	a	178.3	0.3	a
	C	4.37	0.01	a	176.3	0.9	a
	CC	4.42	0.02	a	176.7	0.9	a
T2	BD	4.44	0.04	a	182.7	1.8	a
	BDC	4.42	0.02	a	184.3	0.9	a
	C	4.31	0.04	a	168.0	4.5	a
	CC	4.34	0.02	a	181.0	2.0	a
T3	BD	4.53	0.04	a	184.7	0.3	a
	BDC	4.56	0.01	a	184.3	0.7	a
	C	4.32	0.14	a	147.3	27.7	a
	CC	4.53	0.05	a	179.7	4.8	a

Este efecto se reflejó en los valores de diversidad y riqueza de la población de bacterias. A pesar de no darse diferencias significativas entre tratamientos, sí se dio entre los diferentes tiempos. Al inicio del ensayo todos los tratamientos mostraron valores promedio cercanos en el índice de diversidad (4,4<4,5) que disminuyeron ligeramente en todos los casos tras la aplicación de los tratamientos (4,3<4,4) (Tabla 8.6). Una vez cosechado el cultivo siguiente a los tratamientos, la diversidad aumentó en todos los suelos (4,5<4,6) salvo en el control sin tratar que se mantuvo con un valor promedio más bajo (4,3) y cercano al inicial.

Este incremento fue mayor en BDC quedando cerca de la significación estadística respecto a C y CC ( $P=0,06$ ). Una evolución muy similar se observó para el índice de riqueza a lo largo del ensayo. Todos los suelos partieron con valores promedio similares ( $173 < 178$ ) que fueron disminuyendo progresivamente en el control en los muestreos siguientes (168 en T2 y 147 en T3) (Tabla 8.6). Al contrario que los suelos tratados que experimentaron un aumento en la riqueza de la comunidad bacteriana después de aplicar los tratamientos (181 < 185) y que se mantuvo estable tras soportar el siguiente cultivo de lechuga (180 < 185). Cabe mencionar que el índice de riqueza fue ligeramente mayor en los suelos biodesinfectados respecto al control con COM con valores cercanos a la significación estadística ( $P < 0,1$ ). Por lo tanto, aunque la aportación de COM también ejerció un efecto positivo en la comunidad bacteriana favoreciendo a las poblaciones beneficiosas y aumentando los índices de diversidad y riqueza, en el caso de los suelos biodesinfectados este efecto fue más llamativo, destacando la relevancia de las condiciones abióticas generadas durante la biodesinfección.



**Figura 8.22** | Análisis NMDS (*non-metric multidimensional scaling*) de las poblaciones de bacterias presentes en los suelos biodesinfectados (BD y BDC) y controles no tratados (C y CC) antes de la biodesinfección (T1), al finalizar la biodesinfección y tras la incorporación del compost (T2) en los tratamientos BDC y CC y tras cosechar el siguiente cultivo (T3). Las elipses indican la agrupación por tiempos para un intervalo de confianza del 95%.

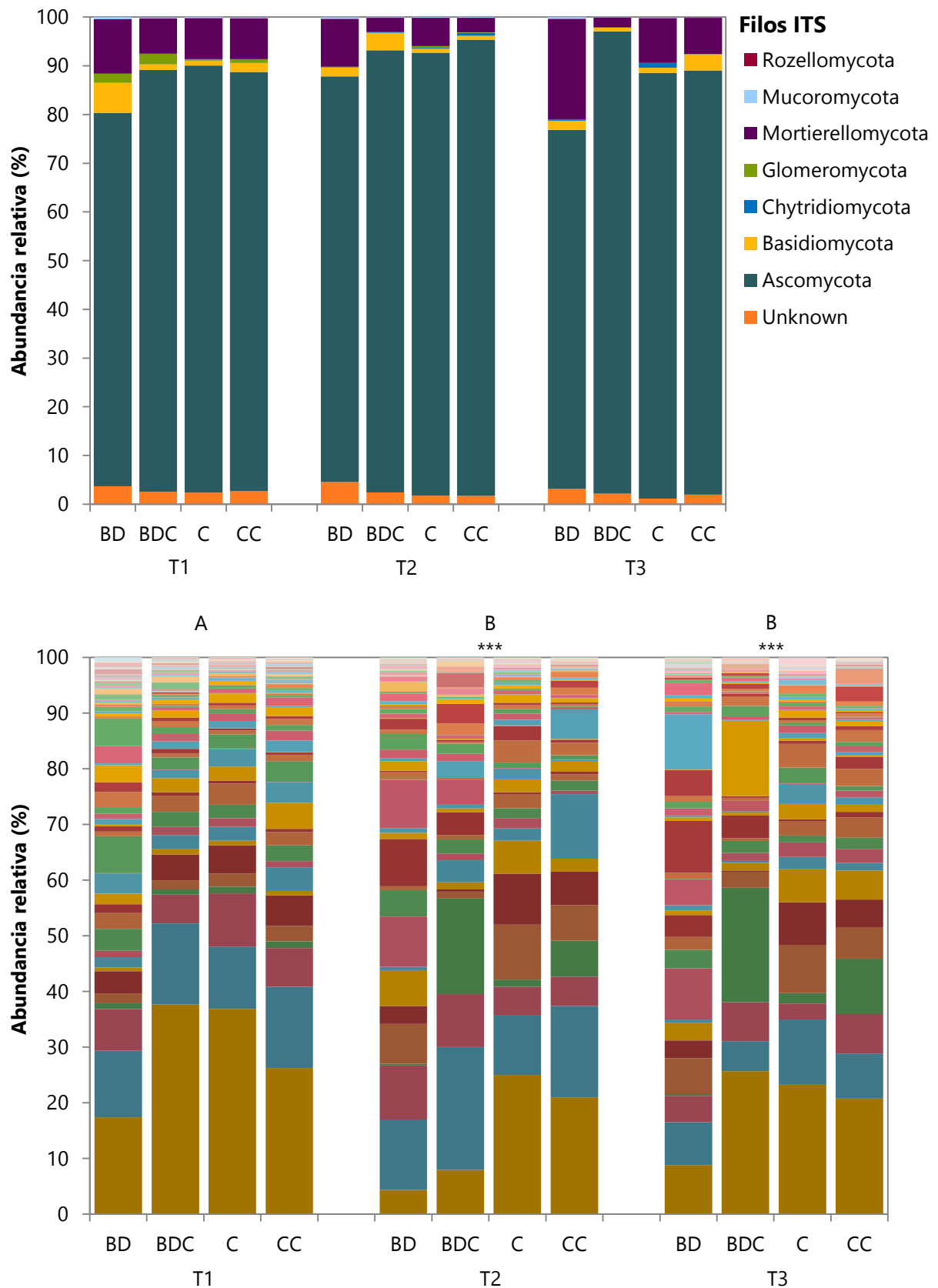
En el análisis NMDS de la comunidad de bacterias se pudo ver claramente las observaciones realizadas hasta este punto. La agrupación se rigió principalmente por los tiempos de muestreo y en menor medida por los tratamientos, emitiendo un buen valor de estrés (0,1) (Figura 8.22). Todas las muestras se concentraron en los valores negativos de ambos ejes al comienzo del ensayo y la mayoría de las muestras de los controles se mantuvieron en estos valores, a diferencia de los suelos tratados. Las muestras de los suelos biodesinfectados se distribuyeron, principalmente, por los valores positivos de NMDS1 tras la



aplicación de los tratamientos y una vez cosechado el siguiente cultivo. Las muestras de los controles sin biodesinfectar pero con COM, una vez incorporado, se localizaron en los valores positivos del NMDS2. También se pudo comprobar como las muestras de los suelos tratados nada más finalizar los tratamientos mostraron mayor dispersión y distanciamiento respecto a las condiciones de partida. Sin embargo, al final del ensayo las muestras se agruparon más cercanas mostrando tendencia a la estabilidad aunque aún distantes a la muestras del inicio revelando el cambio en la estructura de la población.

La evaluación de la comunidad fúngica completó el análisis de la microbiota del suelo de este ensayo. Al igual que sucedió en el análisis estadístico de la composición bacteriana, el análisis Adonis de la comunidad fúngica devolvió valores significativos entre tratamientos una vez aplicados y al final del ensayo pero no fue así para los respectivos análisis post-hoc, aunque en ambos tiempos estuvieron cerca de la significación ( $P=0,1$ ). Al comienzo del ensayo la composición de la comunidad de hongos fue parecida en todos los suelos, salvo algún matiz como la mayor abundancia del filo Basidiomycota en las parcelas adjudicadas a BD (6,2%) respecto al resto ( $<2\%$ ) (Figura 8.23). El filo Ascomycota predominó en todas las parcelas desde el comienzo (77-88%) hasta el final del ensayo (74-95%) con algunas variaciones en función del tratamiento. También dentro del filo Mortierellomycota, segundo más abundante, se dieron alteraciones entre los tratamientos en los diferentes muestreos tras la aplicación de los mismos.

En ambos filios, algunas poblaciones se vieron favorecidas por ciertos tratamientos de la misma forma que en otras tuvieron un impacto negativo. Entre los grupos de hongos beneficiados por el tratamientos de biodesinfección destacan la especie *Mycothermus thermophilus* (Ascomycota) y *Mortierella capitata* (Mortierellomycota). Ambas especies proliferaron en los suelos BD (8,7 y 9,1%, respectivamente) tras la biodesinfección y se mantuvieron más altas que en el resto de tratamientos hasta el final del ensayo (4,7 y 9,2%, respectivamente) (Figura 8.23). Mientras que *M. capitata* solo aumentó en BD, *M. thermophilus* también lo hizo en BDC (4,5%) respecto a los controles sin biodesinfectar ( $<0,1\%$ ) una vez realizados los tratamientos. La proliferación del género *Mycothermus* en los suelos biodesinfectados también se pudo observar en el ensayo anterior en campo (Capítulo 6). Éstos son hongos termófilos que se habrían visto favorecidos por las altas temperaturas mantenidas durante las casi seis semanas de biodesinfección. Además, es a altas temperaturas cuando más eficientemente pueden degradar la celulosa y hemicelulosa contenida en el material vegetal aportado en las mezclas para la biodesinfección (Wang et al., 2017). A la finalización del ensayo las abundancias de *M. thermophilus* se mantuvieron más altas en los suelos biodesinfectados (4,7% en BD y 1,8% en BDC) que el control sin COM (0,1%), aunque en este muestreo se produjo un ligero incremento en el control con COM (1,2%). Esto pudo ser indicativo de que el aporte de COM también benefició, en cierta medida, a esta población.



**Figura 8.23** | Abundancia relativa (%) de filamentos y OTUs ITS, para hongos, detectados en los suelos biodesinfectados (BD y BDC) y controles no tratados (C y CC) antes de la biodesinfección (T1), al finalizar la biodesinfección y tras la incorporación del compost (T2) en los tratamientos BDC y CC y tras cosechar el siguiente cultivo (T3). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tiempos, considerando los datos de las OTUs.

## OTUs ITS

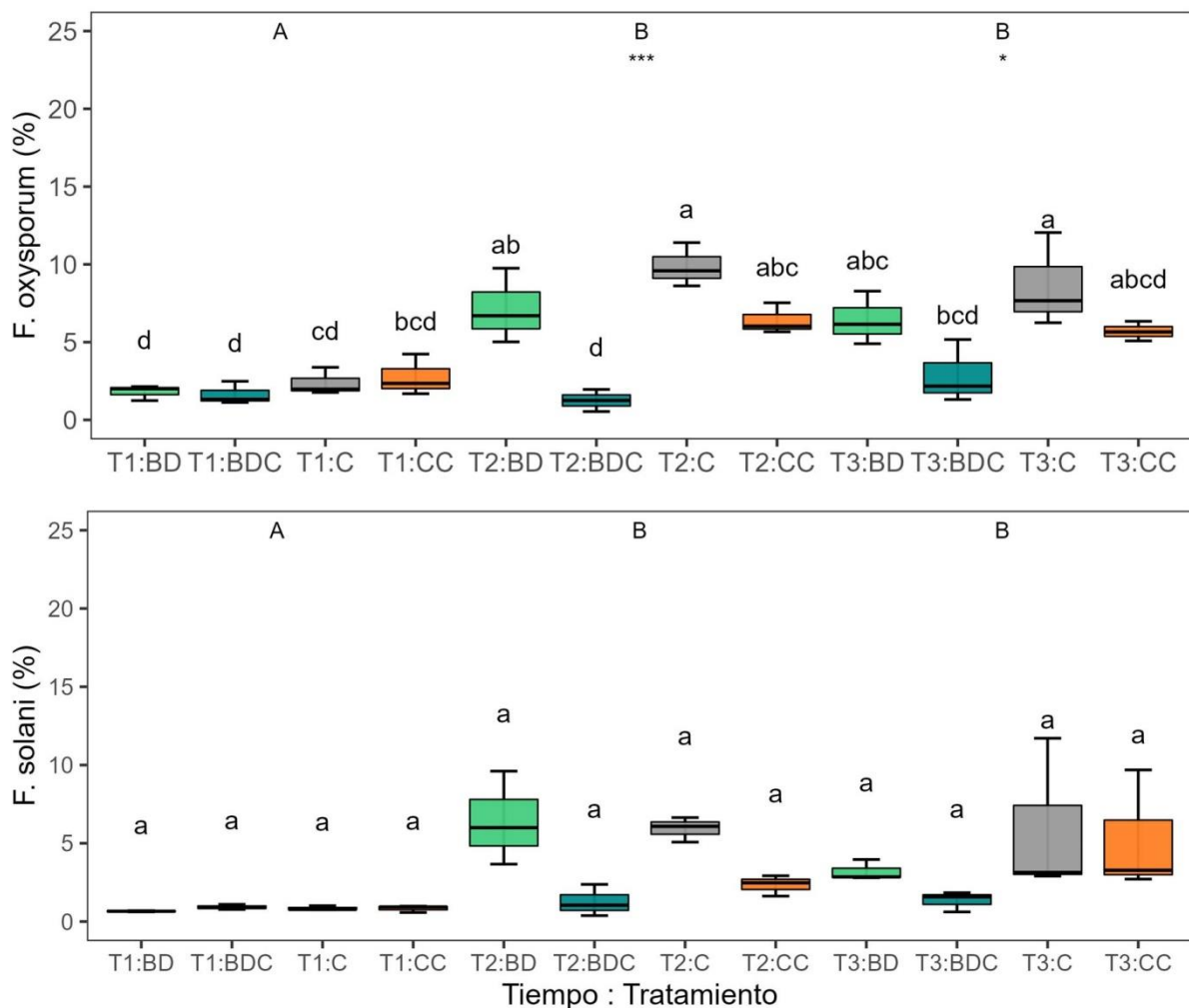
- Ascomycota\_c.Dothideomycetes\_o.Pleosporales\_f.Pleosporaceae\_g.Alternaria
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Hypocreales\_f.Bionectriaceae\_g.Bionectria\_s.Bionectria\_rossmaniae
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Microascales\_f.Microascaceae\_g.Microascus\_s.Microascus\_brevicaulis
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Sordariales\_f.Sordariales\_fam\_Incertae\_sedis\_g.Staphylotrichum\_s.Staphylotrichum\_boninense
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Branch06\_f.unidentified\_g.unidentified\_s.unidentified
- Basidiomycota\_c.Agaricomycetes\_o.Agaricales\_f.Agaricaceae\_g.Coprinus\_s.Coprinus\_annuloporus
- Ascomycota\_c.Dothideomycetes\_o.Capnodiales\_f.Cladosporiaceae\_g.Cladosporium\_s.Cladosporium\_sphaerospermum
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Hypocreales\_f.Nectriaceae\_g.Fusarium\_s.Fusarium\_delphinoides
- Ascomycota\_c.Dothideomycetes\_o.Pleosporales\_f.Didymellaceae
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Microascales\_f.Microascaceae\_g.Microascus\_s.Microascus\_verrucosus
- Basidiomycota\_c.Agaricomycetes
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Hypocreales\_f.Ophiocordycipitaceae\_g.Purpureocillium
- Mucoromycota\_c.Mucoromycotina\_cls\_Incertae\_sedis\_o.Mucoromycotina\_ord\_Incertae\_sedis\_f.Mucoromycotina\_fam\_Incertae\_sedis\_g.Bifiguratus
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Hypocreales\_f.Nectriaceae\_g.Paracremonium\_s.unidentified
- Ascomycota\_c.Eurotiomycetes\_o.Onygenales\_f.Onygenales\_fam\_Incertae\_sedis\_g.Chrysosporium\_s.unidentified
- Mortierellomycota\_c.Mortierellomycetes\_o.Mortierellales\_f.Mortierellaceae\_g.Mortierella\_s.Mortierella\_ambigua
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Sordariales\_f.Lasiochaetaceae\_g.Cercophora\_s.unidentified
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Sordariales\_f.Sordariaceae
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Coniochaetales\_f.Coniochaetaceae
- Ascomycota\_c.Pezizomycetes\_o.Pezizales\_f.Ascodesmidaceae\_g.Cephalophora\_s.unidentified
- Mortierellomycota\_c.Mortierellomycetes\_o.Mortierellales\_f.Mortierellaceae\_g.Mortierella\_s.Mortierella\_gamsii
- Glomeromycota\_c.Glomeromycetes\_o.Glomerales\_f.Claroideoglomeraceae\_g.Claroideoglomus\_s.Claroideoglomus\_etunicatum
- Basidiomycota\_c.Agaricomycetes\_o.Agaricales\_f.Bolbitiaceae\_g.Panaeolus\_s.Panaeolus\_subbalteatus
- Basidiomycota\_c.Agaricomycetes\_o.Agaricales\_f.Agaricaceae\_g.Coprinus\_s.Coprinus\_cordisporus
- Glomeromycota\_c.Glomeromycetes\_o.Glomerales\_f.Claroideoglomeraceae\_g.Claroideoglomus
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Microascales\_f.Microascaceae\_g.Scedosporium
- Mortierellomycota\_c.Mortierellomycetes\_o.Mortierellales\_f.Mortierellaceae\_g.Mortierella\_s.Mortierella\_exigua
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Hypocreales\_f.Stachybotryaceae\_g.Stachybotrys\_s.Stachybotrys\_chartarum
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Sordariales\_f.Chaetomiaceae\_g.Chaetomium
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Sordariales\_f.Lasiochaetaceae\_g.Cladorrhinum\_s.Cladorrhinum\_bulbillosum
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Sordariales\_f.Chaetomiaceae\_g.Zopfiella\_s.unidentified
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Glomerellales\_f.Plectosphaerellaceae\_g.Gibellulopsis\_s.Gibellulopsis\_piscis
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Sordariales\_f.Lasiochaetaceae\_g.Cercophora\_s.Cercophora\_samala
- Ascomycota\_c.Eurotiomycetes\_o.Eurotiales\_f.Trichocomaceae\_g.Thermomycetes
- Ascomycota\_c.Pezizomycetes\_o.Pezizales\_f.Ascobolaceae\_g.Ascobolus\_s.unidentified
- Basidiomycota\_c.Agaricomycetes\_o.Agaricales\_f.Psathyrellaceae\_g.Coprinopsis\_s.Coprinopsis\_narcotica
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Microascales\_f.Microascaceae\_g.Kernia\_s.Kernia\_nitida
- Mortierellomycota\_c.Mortierellomycetes\_o.Mortierellales\_f.Mortierellaceae\_g.Mortierella\_s.Mortierella\_alpina
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Sordariales\_f.Lasiochaetaceae
- Ascomycota\_c.Pezizomycetes\_o.Pezizales\_f.Pyronemataceae\_g.Scutellinia\_s.Scutellinia\_scutellata
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Sordariales\_f.Lasiochaetaceae\_g.Cladorrhinum\_s.Cladorrhinum\_phialophoroides
- Ascomycota\_c.Pezizomycetes\_o.Pezizales\_f.Pyronemataceae\_g.unidentified\_s.unidentified
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Sordariales\_f.Sordariales\_fam\_Incertae\_sedis\_g.Remersonia\_s.Remersonia\_thermophila
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Microascales\_f.Microascaceae
- Ascomycota\_c.Dothideomycetes\_o.Capnodiales\_f.Cladosporiaceae\_g.Cladosporium\_s.Cladosporium\_tenuissimum
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Glomerellales\_f.Plectosphaerellaceae\_g.Plectosphaerella\_s.Plectosphaerella\_cucumerina
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Hypocreales\_f.Nectriaceae\_g.Fusarium
- Mortierellomycota\_c.Mortierellomycetes\_o.Mortierellales\_f.Mortierellaceae\_g.Mortierella\_s.Mortierella\_minutissima
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Sordariales\_f.Chaetomiaceae\_g.Mycothermus\_s.Mycothermus\_thermophilus
- Ascomycota\_c.Pezizomycetes\_o.Pezizales\_f.Pyronemataceae\_g.Pseudaleuria\_s.unidentified
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Microascales\_f.Microascaceae\_g.Lophotrichus\_s.Lophotrichus\_fimeti
- Ascomycota
- Mortierellomycota\_c.Mortierellomycetes\_o.Mortierellales\_f.Mortierellaceae\_g.Mortierella\_s.Mortierella\_elongata
- k.Fungi
- Mortierellomycota\_c.Mortierellomycetes\_o.Mortierellales\_f.Mortierellaceae\_g.Mortierella\_s.Mortierella\_capitata
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Sordariales\_f.Chaetomiaceae\_g.Botryotrichum\_s.Botryotrichum\_spirotrichum
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Hypocreales\_f.Nectriaceae\_g.Fusarium\_s.Fusarium\_solani
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Hypocreales\_f.Nectriaceae
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Hypocreales\_f.Nectriaceae\_g.Fusarium\_s.Fusarium\_oxysporum
- Ascomycota\_c.Pezizomycetes\_o.Pezizales\_f.Pyronemataceae\_g.Heydenia\_s.Heydenia\_alpina
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Sordariales
- Ascomycota\_c.Sordariomycetes\_o.Sordariales\_f.Chaetomiaceae
- Ascomycota\_c.Pezizomycetes\_o.Pezizales\_f.Pyronemataceae\_g.Trichophaeopsis\_s.unidentified

El aporte de COM pareció tener mayor efecto en la población fúngica que en la bacteriana. En este sentido, fue especialmente llamativo el aumento de *Heidenya alpina* (Ascomycota) en BDC y CC (17,1 y 6,5%, respectivamente) respecto a los suelos en los que no se incorporó COM (0,3% en BD y 1,3% en C) (Figura 8.23). Esta tendencia se mantuvo en el tiempo hasta el último muestreo en el que incluso aumentó ligeramente su población en BDC (20,1%) y CC (10%). Las especies de *Heydenia* se encuentran en condiciones extremas, como hábitats alpinos o antárticos y se pueden reproducir en restos de plantas y musgo (Pfister y Healy, 2021; Yang et al., 2020a). Aunque resulta curioso, esta población ya estaba presente en los suelos al comienzo del ensayo, por lo tanto pudo verse especialmente favorecida por el aporte de COM y la biodesinfección. Dentro del filo Ascomycota, también la familia Chaetomiaceae, que partió con abundancias similares en todos los suelos (11,2<14,6%), proliferó en BDC (22,1%) una vez aplicados los tratamientos pero no de igual manera en CC (16,4%). Sin embargo, a la finalización del ensayo estas poblaciones volvieron a acercarse a los valores iniciales en todos los suelos que fueron tratados (5,4<8,1%). Dentro la familia Chaetomiaceae, el género *Chaetomium* se relaciona a poblaciones fúngicas de suelos sanos, ausentes de enfermedad (Wang et al., 2017). Sin embargo en este caso se desconoce el género de Chaetomiaceae que proliferó en BDC.

Algunas poblaciones de hongos aumentaron su población en los suelos biodesinfectados una vez soportado el siguiente cultivo a los tratamientos. La especie *Cladosporium tenuissimum* (Ascomycota) se multiplicó en BDC hasta representar el 13,5% y el 1,7% en BD, a diferencia del resto de tratamientos en los que ni siquiera llegó al 0,2%. Los hongos del género *Cladosporium* son especies endófitas asociadas a la raíz (Emami-Karvani y Chitsaz-Esfahani, 2021). Esta especie, en concreto, aumentó en BDC pero no tanto en BD y de forma similar pero a la inversa sucedió con *Mortierella alpina* (Mortierellomycota) que llegó a representar el 10% de la población en BD, mientras que en el resto de tratamientos ni siquiera alcanzó el 1% en ninguno de los tiempos muestreados. Los organismos del subgénero *Mortierella* son saprofitos y se encuentran entre los hongos del suelo más comunes. Son especies oleaginosas y destacan por producir ácidos grasos poliinsaturados, concretamente en algunas cepas de *Mortierella alpina* el contenido de ácido araquidónico llega hasta el 54% de los ácidos grasos lipídicos totales (Batrakov et al., 2002). Algunos estudios emplearon diferentes cepas de esta especie con efectos positivos en la inhibición de *Fusarium oxysporum* (Wang et al., 2022a) y *Meloidogyne javanica* (AL-Shammari et al., 2013). De hecho, Wang et al. (2022a) pusieron de manifiesto el papel de *M. alpina* como agente de biocontrol y promotor del crecimiento de la planta. De acuerdo a los resultados de la qPCR para FOLac, la proliferación de *M. alpina* en BD al finalizar el ensayo coincidió con la mayor reducción en la densidad de este patógeno detectada en este ensayo.

Por otro lado, algunas poblaciones de hongos se vieron afectadas negativamente por los tratamientos. Entre ellos destacan las especies del género *Trichophaeopsis*, el mayor representante del filo Ascomycota al comienzo del ensayo (17,4<37,7%), cuya población mermó en los suelos biodesinfectados una vez aplicados los tratamientos (4,3% en BD y 7,9% en BDC) respecto a los controles sin biodesinfectar en los que se mantuvieron estables (25%

en C y 21% en CC) (Figura 8.23). Una vez cosechado el cultivo siguiente, al finalizar el ensayo, esta población se recuperó en BDC (25,7%) igualándose a la de los controles sin biodesinfectar (23 y 21% en C y CC, respectivamente), pero no fue así en BD (8,8%). La disminución de abundancia de este género también fue observado por Díaz-López et al., (2021) tras un tratamiento de solarización. Además de estos hongos, el género *Fusarium* también fue afectado negativamente por la biodesinfección y la aplicación de COM. Algunas de las especies de este género mostraron menor abundancia en BD y BDC (1,4 y 0,3%, respectivamente) que en los controles (4,2% en C y 3% en CC), con mayor reducción en cada caso en el que se aplicó COM.



**Figura 8.24** | Abundancia relativa de OTUs de *Fusarium oxysporum* (arriba) y *F. solani* antes de la biodesinfección (T1), al finalizar la biodesinfección y tras la incorporación del compost en los tratamientos BDC y CC (T2) y tras cosechar el siguiente cultivo (T3). Las letras minúsculas indican las diferencias entre las combinaciones de tiempo y tratamiento y las mayúsculas las diferencias entre tiempos.

Concretamente, en estos resultados de secuenciación, dentro del género *Fusarium* se llegaron a identificar *F. oxysporum* y *F. solani*, entre las que se incluyen algunas de las formas patógenas más relevantes, incluida FOLac. Sin embargo, algunos estudios revelaron que las formas no patógenas de estas especies contribuyen en la supresión de las patógenas

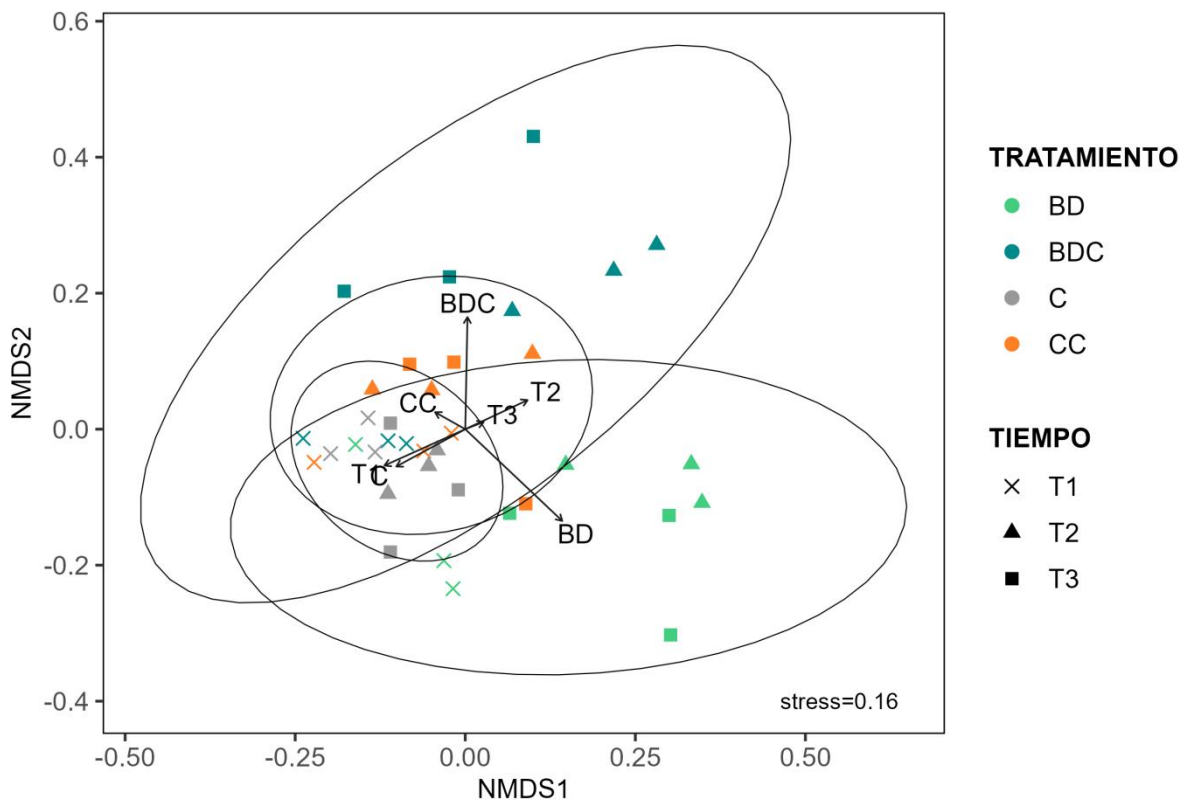
(Yuan et al., 2020; Alabouvette, 1986). Por este motivo y dado que se detectaron estas OTUs en las muestras, se consideró el análisis individual del desarrollo ambas poblaciones durante el ensayo. En ambos casos, una vez aplicados los tratamientos, los suelos con COM, tanto biodesinfectados como controles, mostraron menores abundancias respecto a sus tratamientos homólogos sin COM (Figura 8.24). En estas especies fue especialmente llamativa la reducción en BDC respecto al resto de tratamientos en los dos muestreos realizados tras su aplicación. De hecho, para *F. oxysporum* el tratamiento BDC fue el que más se diferenció estadísticamente del control después de su aplicación ( $P < 0,001$ ) y al finalizar el ensayo ( $P = 0,3$ ). Esto puso de manifiesto el fuerte impacto que generó el tratamiento combinado BDC sobre estas poblaciones, a diferencia de la simple biodesinfección en la que el efecto estuvo más amortiguado. El problema es que, en este caso, se desconoce la naturaleza patogénica de estas especies por lo que tan solo se pudo describir el efecto de los tratamientos sobre estas poblaciones. En el caso de que se tratasen en su mayoría de especies patógenas, BDC provocó su disminución que se mantuvo una vez implantado el cultivo.

**Tabla 8.7** | Índices de diversidad (Shannon) y riqueza (Chao) de la población de hongos considerando los datos de abundancia relativa de OTUs. Valores medios y error estándar (EE) de los suelos biodesinfectados (BD y BDC) y controles no tratados (C y CC) antes de la biodesinfección (T1), al finalizar la biodesinfección y tras la incorporación del compost (T2) en los tratamientos BDC y CC y tras cosechar el siguiente cultivo (T3). Las letras minúsculas simples indican las diferencias entre la combinación de tiempo y tratamiento, y las minúsculas en negrita entre tratamientos a cada tiempo en el caso de significación estadística. Las mayúsculas indican las diferencias entre tiempos.

Tiempo	Tratamiento	DIVERSIDAD			RIQUEZA		
		media	ES		media	ES	
T1	BD	3.08	0.20	a	58.33	1.45	a
	BDC	2.56	0.11	ab	58.33	1.20	a
	C	2.48	0.13	ab	56.67	1.86	a
	CC	2.78	0.08	ab	58.67	0.88	a
T2	BD	2.94	0.06	a	56.67	2.33	a
	BDC	2.60	0.17	ab	54.67	1.45	a
	C	2.77	0.06	ab	58.00	1.15	a
	CC	2.64	0.02	ab	58.67	0.33	a
T3	BD	2.90 <b>a</b>	0.07	a	53.33 <b>b</b>	1.33	a
	BDC	2.26 <b>b</b>	0.11	b	54.67 <b>ab</b>	0.33	a
	C	2.80 <b>a</b>	0.16	ab	56.00 <b>ab</b>	0.58	a
	CC	2.84 <b>ab</b>	0.13	ab	58.67 <b>a</b>	1.45	a

Al evaluar los índices de diversidad y riqueza del conjunto la población fúngica se pudo detectar mayor efecto de los tratamientos en los valores riqueza. Por el contrario, los valores del índice de diversidad se mantuvieron cercanos en todos los tratamientos hasta el final del ensayo, en el que BDC mostró valores significativamente más bajos que el resto de tratamiento, especialmente respecto a BD ( $P = 0,02$ ) y C ( $P = 0,04$ ). En relación a la riqueza, los valores disminuyeron en BD y BDC una vez aplicados los tratamientos, especialmente en

BDC, aunque no lo hicieron de manera significativa. En cambio, a la finalización del ensayo, los valores en BD disminuyeron aún más y mostrando diferencias significativas respecto a CC ( $P=0,03$ ) que fue el tratamiento que finalizó con valores más altos de riqueza, mientras que en BDC se mantuvo estable. Esta disminución en riqueza pero no en diversidad en BD reveló el impacto negativo producido en unas poblaciones concretas, mientras que de las que toleraron las condiciones de BD ninguna pareció verse especialmente favorecida. Por otro lado, la aplicación de COM en los suelos biodesinfectados, además de provocar la merma de algunas poblaciones, sí pareció favorecer a determinadas especies dada la disminución en los valores de diversidad a la finalización del ensayo.



**Figura 8.25** | Análisis NMDS (*non-metric multidimensional scaling*) de las poblaciones de hongos presentes en los suelos biodesinfectados (BD y BDC) y controles no tratados (C y CC) antes de la biodesinfección (T1), al finalizar la biodesinfección y tras la incorporación del compost en los tratamientos BDC y CC (T2) y tras cosechar el siguiente cultivo (T3). Las elipses indican la agrupación por tratamientos para un intervalo de confianza del 95%.

A través del análisis NMDS de la población fúngica, se pudo comprobar cómo las muestras correspondientes a BD se agruparon distanciadas del resto una vez aplicados los tratamientos. En este caso, los tratamientos tuvieron mayor efecto en la distribución de muestras que los tiempos, con un valor de estrés aceptable ( $<0,2$ ), por lo que las elipses reflejan su agrupación por tratamientos con un intervalo de confianza del 95% (Figura 8.25). Las muestras del control para todos los tiempos muestreados se mantuvieron concentradas en los valores negativos de ambos ejes y próximas al centroide del primer muestreo, relevando la ausencia de perturbación en estos suelos. Cercanas a las muestras del control se localizaron las correspondientes a CC aunque algo más dispersas y ubicadas, principalmente,



en los valores positivos del NMDS2, lo que denotó cierta perturbación por la adición de COM. Las muestras de los suelos biodesinfectados fueron las que mayor dispersión mostraron, BDC en los valores positivos del NMDS2 y BD en los negativos, pero ambos en los valores positivos del NMDS1, especialmente BD. De nuevo, a través de este análisis se pudo comprobar cómo la adición de COM tras la biodesinfección generó un efecto aditivo en BDC mostrando diferencias en la estructura de la comunidad fúngica respecto a BD y CC.

De acuerdo a este ensayo, la adición de COM a la finalización de la biodesinfección como tratamiento complementario resultó en un efecto conjunto sobre las variables biológicas, incluida la población de ambos patógenos. Mientras que para *M. incognita* el tratamiento BDC mostró mayor efecto supresor después del tratamiento y tras soportar un cultivo de lechuga, FOLac recuperó parte de su población tras el cultivo hospedador en este tratamiento. También en los suelos CC la población de FOLac en algunas parcelas fue incluso mayor que en las que no se aplicaron tratamientos. Estos resultados contrastan con los obtenidos para la población de otras especies de *Fusarium* como *F. oxysporum* y *F. solani* que sí se vieron más reducidas en BDC. Valorando los datos de producción y considerando la Fusariosis como enfermedad responsable de las pérdidas, los suelos tratados con BDC mostraron valores promedio de producción similares a BD pero con menor variabilidad entre parcelas. Todo ello llevó a considerar que la drástica disminución de *M. incognita* en BDC pudo contribuir en la reducción del desarrollo de Fusariosis como se comentó al inicio del capítulo. También pudo estar atribuido a un mayor efecto supresor de BDC traducido en un menor desarrollo de enfermedad a pesar de una densidad de población de FOLac cercana al control.

La mayor parte de variables biológicas analizadas relativas a la biomasa y la actividad microbiana (tasa de respiración, COS, CBM y la mayoría de actividades enzimáticas) mostraron valores promedio mayores en los suelos BDC respecto a BD y CC. Con esto, la idea de un mayor efecto supresor tomó especial relevancia. Además, considerando las alteraciones en la composición microbiana de las comunidades evaluadas, esta idea se sostiene a través del incremento de algunas poblaciones asociadas a suelos supresores. Dentro de la nematofauna destacó el incremento de Tylenchidae y Cephalobidae tras el cultivo siguiente a los tratamientos, ambas familias recogen especies con mecanismos antagonistas frente a diversos patógenos. Entre las bacterias se dio mayor presencia de la familia Chitinophagaceae en BDC aunque otras poblaciones como *Pseudoxanthomonas* spp y Xanthomonadaceae lo hicieron en mayor medida en BD. En la población de hongos los cambios fueron más claros y probablemente debidos al aporte de COM que tiende a favorecer a esta comunidad. En este caso, en todos los suelos biodesinfectados aumentaron algunas poblaciones consideradas beneficiosas. Entre éstas, algunas especies del género *Mortierella* mostraron un mayor aumento en BD, mientras que algunas del género *Cladosporium* lo hicieron en BDC en mayor medida.

En conclusión, a pesar de que el aporte de COM pudo favorecer el efecto supresor, los mecanismos de la biodesinfección fueron los principales promotores de este resultado. Además, considerando el efecto en las poblaciones de los patógenos analizados, el

tratamiento complementario de COM podría ser eficiente para algunos como *M. incognita* y algunas especies de *Fusarium* o, por el contrario, contribuir en el mantenimiento de la población como pudo suceder en este caso con FOLac. Esta variabilidad de resultados en función del patógeno con el empleo de COM se viene observando en estudios anteriores y se atribuye, en gran medida, a la heterogeneidad de la naturaleza de esta enmienda pero también a las particularidades de cada patógeno (Bonanomi et al., 2010). Es por todo esto que se requiere profundizar en este tipo de tratamientos aplicándolos frente a diferentes patógenos, en diferentes tipos de suelo y clima, al mismo tiempo que se evalúan diferentes dosis y tipos de enmienda orgánica. Así y todo, a pesar del camino por recorrer para perfeccionar la técnica de biodesinfección, actualmente supone la alternativa más eficiente y económica que pueden aplicar los agricultores ante el nuevo escenario dirigido hacia una agricultura sostenible y comprometida con la salud humana y el medio ambiente.



**Figura 8.26** | Fotografías del cultivo de lechuga siguiente a los tratamientos (04/10/2021). A la izquierda, cultivo en suelo control sin biodesinfectar (cuerpo 2). A la derecha, cultivo en suelo biodesinfectado (cuerpo 3).



# CAPÍTULO 9



---

## Discusión General







## 9. Discusión General

---

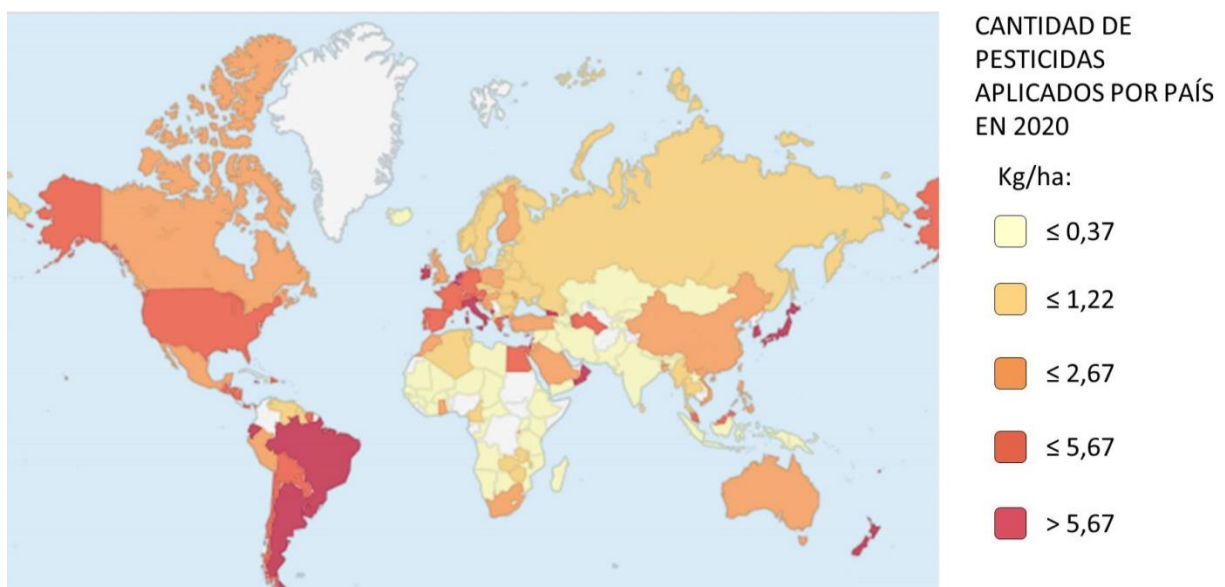
Actualmente, los suelos agrícolas se encuentran fuertemente degradados a nivel global como resultado de las prácticas surgidas con la Revolución Verde, basada en el aumento del rendimiento y dependiente del uso de insumos (combustibles y agroquímicos). El modelo de producción derivado de estas prácticas implica la intensificación agrícola mediante un manejo agresivo del suelo con prácticas como el monocultivo, el laboreo profundo, la fertilización mineral y la aplicación de fitosanitarios sintéticos. A este modelo se le denomina agricultura convencional y continúa siendo el más extendido y practicado a día de hoy. Sin embargo, este tipo de manejo trae consigo un aumento de la presión sobre el suelo con el consecuente agotamiento del mismo. Tras varias décadas soportando continuas perturbaciones, muchos suelos agrícolas han perdido productividad y el modelo convencional ya no resulta rentable. Esta disminución en el rendimiento viene provocada, en gran medida, por el aumento de enfermedades en los cultivos, principalmente de patógenos de suelo que proliferan fácilmente en estos suelos degradados. Esto hace que cada año se apliquen grandes cantidades de pesticidas (Figura 9.1) que acaban en el suelo y el agua contaminando los ecosistemas, planteando una amenaza para salud humana, y contribuyendo en la degradación de los suelos (Gupta et al., 2022). Por estas razones, cada vez son más los pesticidas prohibidos o con uso restringido. Además, la aplicación masiva y continuada de este tipo de sustancias durante décadas ha provocado la selección de organismos patógenos resistentes contra los que resulta más difícil combatir.

Un suelo sano posee una capacidad natural amortiguadora para contener la proliferación de patógenos y que se encuentra estrechamente vinculada al estado de su microbiota, sensible a las perturbaciones. Es por esto, que el nuevo paradigma de una agricultura sostenible en el largo plazo y comprometida con la salud humana y el medio ambiente toma como eje central la microbiota edáfica. Los avances científicos y tecnológicos desarrollados durante las últimas décadas pusieron de manifiesto el papel crucial e indispensable que juegan los microorganismos en el mantenimiento de la vida en el suelo. Estos organismos se encuentran presentes en todos los medios (suelo, agua, aire, plantas y animales) y se encargan de llevar a cabo procesos fundamentales para la continuidad de la vida. En el caso particular de los suelos, los microorganismos son los responsables de la transformación de la materia orgánica y la dinámica de nutrientes, entre otras funciones esenciales. Además, tienen la capacidad de dotar de estructura al suelo mejorando la aireación y la movilización de agua y nutrientes.

Las plantas también cuentan con su propia microbiota, parte de la cual proviene del suelo, que es determinante para su estado de salud y su capacidad para resistir las perturbaciones o los momentos de estrés. Por ejemplo, se ha comprobado que frente a la infección de un patógeno, una planta tiene la capacidad de remodelar la microbiota asociada

a la raíz a través de los exudados para combatir el ataque. Para ello, es indispensable que la planta se desarrolle en un suelo sano que albergue una comunidad microbiana estable, diversa y equilibrada (Liu et al., 2021).

El manejo convencional empleado durante décadas externaliza estos mecanismos naturales sustituyéndolos por procesos artificiales y reduccionistas que perturban los ciclos biogeoquímicos incidiendo negativamente en la microbiota edáfica. Estos desequilibrios están poniendo en jaque la producción agrícola hasta tal punto que en los últimos años se incluyen en acuerdos internacionales diferentes medidas para promover la salud de los suelos, especialmente los agrícolas. Este es el caso de la estrategia "De la granja a la mesa" (*From Farm to Fork*), incluida en el Pacto Verde Europeo, que tiene como objetivos para el año 2030: (1) producción orgánica de al menos el 25% de la agricultura en Europa; (2) reducción en un 50% de la utilización de fitosanitarios de síntesis; (3) reducción en un 50% de la utilización de los plaguicidas más peligrosos; (4) reducción en un 20% del uso de fertilizantes; y (5) reducción de las pérdidas de nutrientes del suelo en al menos un 50% (European Commission, 2020). Por lo tanto, parece que el futuro de la agricultura podría basarse en técnicas agronómicas más respetuosas con la salud del suelo, asegurando el beneficio para el agricultor y la sostenibilidad de la propia explotación.



**Figura 9.1** | Mapa mundial de la cantidad de pesticidas (kg/ha) aplicados en 2020 por país de acuerdo a la FAO. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/EP/visualize>

En este contexto, la biodesinfección del suelo se presenta como una alternativa que cumple con las condiciones descritas para el nuevo escenario. Además, una de las particularidades de esta práctica es la doble función que ejerce en el suelo al contribuir tanto en el control de los patógenos edáficos, como en la mejora la fertilidad del suelo. Es más, el éxito de estos tratamientos podría derivar en la restitución de la salud del suelo, incluyendo la capacidad supresora. La consecución de este objetivo depende de los factores bióticos y abióticos resultantes de los tratamientos de biodesinfección. En cuanto a los factores abióticos, el aumento de temperatura en el suelo, al depender del clima, queda fuera del

control humano. Por esta razón, hasta hace poco, esta técnica era más habitual en regiones con climas cálidos como el mediterráneo o tropical y durante los meses estivales. Sin embargo, otro factor abiótico como la anaerobiosis, que surgió como alternativa a la falta de radiación solar para las regiones más templadas (ASD), sí es un factor manipulable. La anaerobiosis o condiciones reductoras del suelo pueden darse por saturación mediante riego abundante pero también, y con una eficacia considerablemente mayor, mediante una elevada actividad biológica a través de la incorporación de materia orgánica lábil. En ambos casos, la cubierta plástica favorece las condiciones anaerobias al impedir la difusión de aire. Por otro lado, los factores bióticos como la actividad y composición de la microbiota del suelo dependen de los factores abióticos mencionados pero también de la materia orgánica aportada para la biodesinfección. En este sentido, la dosis y características de la enmienda orgánica resultan determinantes en la reestructuración de la población microbiana y también en los resultados del tratamiento (Cohen et al., 2005; Gandariasbeitia et al., 2021; Shea et al., 2022). Esta conclusión pone de manifiesto el papel que juegan los microorganismos y la relevancia de la materia orgánica empleada como enmienda para la biodesinfección.

Dentro del gran abanico de sustratos orgánicos susceptibles de ser empleados en estos tratamientos, los estiércoles frescos son los más utilizados por su demostrada eficacia. El estiércol animal se emplea de manera tradicional en la agricultura para enriquecer el suelo con nutrientes esenciales para las plantas, siendo algunos de ellos difíciles de encontrar en otras fuentes. Sin embargo, también puede contener patógenos biológicos (*E. coli*, *Salmonella* spp, etc.) y servir de medio en la difusión de otros contaminantes como hormonas y genes de resistencia a los antibióticos. La aplicación continuada de estiércol con este tipo de compuestos puede provocar su acumulación en el suelo y pasar a las plantas que acaban siendo consumidas (Stanley et al., 2022). Sin embargo, a través de la biodesinfección se puede lograr reducir la carga de patógenos, incluso reducir la carga de genes de resistencia a antibióticos, al igual que mediante procesos de compostaje (Yanlong et al., 2021). De todas formas, complementar el estiércol con otras materias orgánicas de características específicas, puede contribuir en la mejora de los resultados y en la disminución de la cantidad de estiércol a aportar. Entre las posibles alternativas destacan los subproductos procedentes de la industria agroalimentaria, cada vez más creciente. Además, el empleo de este tipo de materias contribuye en la transición hacia una agricultura más sostenible y en sintonía con los nuevos marcos legislativos. El manejo convencional se basa en un modelo de producción lineal (recurso – producto – residuo) insostenible a largo plazo. La incorporación de subproductos agroindustriales en los suelos agrícolas, bien como fertilizantes o como enmiendas para la biodesinfección, supone un cambio a un modelo circular en el que los residuos se minimizan y toman valor, al mismo tiempo que se reduce la explotación de recursos (De Corato 2021).

En este trabajo, se evaluó el efecto de determinados subproductos agroalimentarios para la biodesinfección de suelos en una región de clima templado (CAPV), al norte de la Península Ibérica, que no reúne las condiciones climáticas más apropiadas para este tipo de tratamientos, pero que tras incluir determinados enfoques como la ASD, consiguen



resultados positivos. Con este fin, se incorporaron combinaciones de subproductos de diferente naturaleza junto con el estiércol fresco vacuno, y el compost en uno de los ensayos, y se generaron mezclas de enmiendas variando el C/N y la dosis (Tabla 9.1). Los subproductos empleados con mayor concentración de N fueron la TC (3,8%) y el BC (3,1%), seguidos por el ST (2,4%). Estas enmiendas, además del elevado contenido en N que activa la degradación microbiana, también presentan el C en formas lábiles como azúcares y celulosa fácilmente degradables por los microorganismos que facilita su proliferación. Por el contrario, la CPG presenta un carácter más recalcitrante por la elevada concentración de lignina, que requiere de mecanismos más complejos para su descomposición llevada a cabo, principalmente, por hongos. También el BC y el ST pueden contener lignina pero en menor concentración. A pesar de que el COM no es estrictamente un subproducto, porque los residuos orgánicos deben ser procesados para la obtención del COM, también se empleó en dos de los ensayos (Capítulos 7 y 8) por considerarse una enmienda beneficiosa para la salud del suelo. Aunque en cada caso se aplicó de diferente forma, bien como enmienda para la biodesinfección o como tratamiento complementario a la biodesinfección. Todos los suelos empleados en estos ensayos presentaban una textura similar (franco-limoso, franco-arcilloso y franco) por lo que en todos los casos se consideró una densidad aparente de  $1,45\text{g/cm}^3$  y una profundidad de 20cm para el diseño de las dosis de enmiendas.

El aspecto más reseñable de este trabajo es que la mayoría de los ensayos se pudieron ejecutar en condiciones reales de campo, dentro de explotaciones comerciales de lechuga de la CAPV. Esto fue debido a las graves pérdidas económicas que sufrían muchas de ellas debido al desarrollo de enfermedades edáficas en el cultivo durante los meses de primavera y verano. Tras más de 20 años de monocultivo de lechuga con manejo convencional, los suelos presentaban una fuerte presión por el nematodo agallador *M. incognita* y del hongo FOLac. Ante la falta de actuaciones efectivas, estas poblaciones crecían anualmente con el consecuente incremento de pérdidas en el cultivo, en muchos casos hasta el 100% de la producción. La desesperación por las crecientes pérdidas económicas y la falta de soluciones llevó a algunos agricultores a recurrir a la biodesinfección de suelo. Cabe señalar que, realmente, estas personas se vieron forzadas por su situación, dado que el mayor inconveniente que veían era la pérdida de uno de los ciclos de cultivo que implica la biodesinfección, un mínimo de cuatro semanas más una de aireación antes del trasplante.

Este escenario permitió la realización de tres ensayos en dos explotaciones comerciales (Capítulos 5, 6 y 8) con suelos infectados de forma natural en los que se pudo evaluar el efecto de la biodesinfección con diferentes mezclas de enmiendas sobre ambos patógenos en condiciones reales. En mayor o menor medida, todos los tratamientos de biodesinfección aplicados en estas explotaciones tuvieron efectos positivos en la reducción de ambos patógenos, aunque *M. incognita* mostró mayor vulnerabilidad que FOLac. Además, junto con la evaluación del efecto sobre la población del patógeno y del desarrollo de las respectivas enfermedades, también se analizaron variables fisicoquímicas y biológicas del suelo para estudiar el efecto de estos tratamientos y conocer el estado del suelo en términos de salud y fertilidad una vez aplicada la biodesinfección. Otro aspecto a destacar de estos

ensayos fue la evaluación realizada de las poblaciones de bacterias y hongos pero, especialmente de la nematofauna. Los nematodos son organismos sensibles a las perturbaciones y la composición de su población puede ser reflejo del estado de una parte importante de la red trófica del suelo (Yeast et al., 1993; Bongers y Ferris, 1999; Ferris, 2010; Cesarz et al., 2015), sin embargo rara vez se evalúa en este tipo de tratamientos.

**Tabla 9.1** | Tabla resumen de las características principales (valores en peso seco) y coste (2019-2021) de todas las mezclas de enmiendas orgánicas evaluadas en este trabajo (EFV: estiércol fresco vacuno; TC: torta de colza; BC: bagazo de cerveza; ST: salvado de trigo; CPG: cáscara de pipa de girasol; COM: compost; BF: Biofence®) (el EFV y el BC fueron sin coste). Las letras como subíndices en los tratamientos hacen referencia a mezclas similares de enmiendas pero aplicada en diferentes ensayos.

Condiciones	Ensayo	Tratamiento	Precio (€/m <sup>2</sup> )	Enmienda	kg/m <sup>2</sup>	C/N	mgC/g suelo	kgN/ha
Reales en campo	Capítulo 5	BD <sub>a</sub>	0.16	EFV	3.0	22	4	733
				TC	0.5			
				BC	0.4			
	Capítulo 6	M1 <sub>a</sub>	0.16	EFV	3.0	23	6	808
				TC	0.5			
				BC	0.5			
		M2 <sub>b</sub>	0.23	EFV	3.0	29	6	648
				ST	0.6			
				CPG	0.4			
		M3	0.17	EFV	3.0	31	6	610
				BC	0.2			
				CPG	0.8			
		M4	0.21	EFV	3.0	34	6	555
				CPG	1.0			
Capítulo 8	BD <sub>b</sub>	0.21	EFV	2.2	30	5	496	
			ST	0.5				
			CPG	0.4				
Controladas en laboratorio	Capítulo 7	CA	0.29	COM	2.2	17	5	850
				ST	0.6			
				CPG	0.4			
		CB	3.45	COM	2.2	16	5	917
				BF	0.3			
				CPG	0.7			
		MA <sub>b</sub>	0.23	EFV	2.2	29	5	510
				ST	0.6			
				CPG	0.4			
MB	3.39	EVF	2.2	25	5	578		
		BF	0.3					
		CPG	0.7					

Los dos primeros ensayos en campo se realizaron en la misma explotación, afectada por *M. incognita*, pero en diferentes años (2018 y 2019). En 2018 (Capítulo 5) se probó la biodesinfección en uno de los cuerpos de invernadero empleando EFV+TC+ST a una dosis total de 3,9kg/m<sup>2</sup>. Esta mezcla presentó un C/N de 22 y cumplía con el aporte mínimo de 4mgC/g de suelo (peso seco) (Tabla 9.1) por ser la dosis recomendada para favorecer la anaerobiosis (Butler et al., 2012a y 2014). Este fue el único ensayo en el que se pudo estudiar el efecto del tratamiento un año después. En 2019 (Capítulo 6), se evaluaron cuatro mezclas diferentes, aunque una de ellas (M1) se asemejó a la aplicada el año anterior para tomarla como referencia ante la falta de controles dada en este ensayo. En ambos casos se aplicaron dosis similares (3,9kg/m<sup>2</sup> en 2018 y 4kg/m<sup>2</sup> en 2019, peso seco) y se realizaron biodesinfecciones de siete semanas durante los meses de verano, para mayor garantía del efecto térmico. En el último ensayo realizado en campo pero en otra explotación (Capítulo 8) también se pudo evaluar el efecto de la biodesinfección contra *M. incognita*, a pesar de que el principal problema en ese caso fue la Fusariosis. En ese caso, el tratamiento de biodesinfección fue de seis semanas, también en verano, y se aplicó una dosis menor de enmienda (3,1kg/m<sup>2</sup>, peso seco) que los ensayos anteriores reduciendo la dosis de estiércol. Considerando las temperaturas alcanzadas en el suelo a 15cm de profundidad durante las tres biodesinfecciones y el efecto sobre la población de *M. incognita*, se pudo concluir que con temperaturas máximas de 40°C y más de 225h  $\geq 35^{\circ}\text{C}$  pueden ser condiciones térmicas suficientes para debilitar al patógeno haciéndolo sensible a otros mecanismos vinculados a la biodesinfección.

En cuanto a FOLac, la biodesinfección aplicada no consiguió reducir la población tanto como la de *M. incognita* pero sí logró generar cierto efecto supresor que logró mejorar la productividad de los suelos biodesinfectados. Esto mismo también se observó en el primer ensayo en campo (Capítulo 6) en el que se pudieron evaluar los efectos pasado un año del tratamiento y se vio que, a pesar de la presencia de nódulos en las raíces, la producción continuó siendo mayor que en el control e incluso aumentó un año después respecto al cultivo realizado al finalizar el tratamiento. Estos resultados evidenciaron los efectos beneficiosos y prolongados de la biodesinfección que vienen asociados al aporte de materia orgánica bajo las condiciones abióticas generadas durante el tratamiento (temperatura, humedad, anaerobiosis). Esto generó cambios fisicoquímicos y biológicos en los suelos tratados que logró la recuperación de gran parte de la producción en todos los ensayos realizados en campo, pudiendo considerarse la promoción de cierto efecto supresor.

Aunque los ensayos realizados en condiciones reales fueron los más valiosos a la hora de sacar conclusiones, el ensayo ejecutado en condiciones controladas también fue de utilidad en tanto en cuanto permitió evaluar el COM (CA y CB, Capítulo 7) como posible alternativa al EFV (MA y MB), al igual que el producto comercial para biodesinfecciones Biofence™ (CB y MB) frente a los subproductos seleccionados (CA y MA), sin poner en riesgo la producción de ninguna explotación comercial. En este ensayo se pudo comprobar que las mezclas a base de EFV generaron mayor actividad biológica que las de COM a la misma dosis. Así y todo, se debe tener en cuenta que las relaciones C/N de las mezclas con COM (16

y 17) fueron menores que en las de EFV (25 y 29) lo que pudo influenciar en la actividad microbiana. Por lo tanto, quizás reduciendo la cantidad de COM en la mezcla para aumentar su C/N podría darse mayor actividad al mismo tiempo que se minimizaría la cantidad de enmiendas a aportar. En este ensayo (Capítulo 7) la mezcla que incluía ST (MA) fue la que mostró mayores valores promedio en variables vinculadas a la actividad degradadora y la dinámica de nutrientes como el NPM, COS, URE y GAL. Además, este tratamiento (MA) y su homólogo con COM (CA) fueron los que menor desarrollo de Fusariosis mostraron en el bioensayo posterior a la biodesinfección. Por todo ello, se optó por la mezcla a base de EFV+ST+CPG (MA) para su aplicación en condiciones reales de campo contra FOLac y *M. incognita*. Esta mezcla resulta interesante por combinar una enmienda de carácter lábil como el ST junto con una más recalcitrante como la CPG, además del EFV. Esta combinación de enmiendas ajustadas a un C/N entre 25 y 30 puede resultar muy eficaz para favorecer la microbiota endémica y fomentar mecanismos antagonistas. De hecho, en este ensayo, en los suelos tratados con la mezcla que incluía ST y CPG (MA) se detectó la proliferación de especies consideradas beneficiosas y relacionadas con los suelos supresores como *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. (bacterias) y *Mortierella* spp. (hongo) después de la biodesinfección. Además, esta mezcla de enmiendas aplicada en las dos explotaciones (Capítulos 6 y 8), aunque variando ligeramente las proporciones, también mostró resultados positivos en condiciones de campo.

Los ensayos en condiciones reales de campo fueron una gran ventaja para este trabajo, pero con el consecuente inconveniente de dejar fuera de control muchos factores. Además, este tipo de ensayos, a mayor escala que la de laboratorio o de pequeñas parcelas, también amplían el rango de error. Todo esto suele traducirse en mayor variabilidad de resultados, asociada al manejo de cada cuerpo de invernadero, como se pudo ver en el Capítulo 6, y relativamente habitual en este tipo de estudios. Entre los ensayos realizados en campo se dieron varias diferencias, siendo las más llamativas los resultados de las variables fisicoquímicas de los suelos. Por ejemplo, el incremento de macro y micronutrientes en los Capítulos 5 y 6 pero en menor medida en el Capítulo 8. Estas diferencias resultaron difíciles de explicar pero pudo ser que el exceso de riego en este ensayo (80L/m<sup>2</sup>) antes de la colocación del plástico. Así y todo, también resultaron llamativas las diferencias en el incremento de algunas variables como el NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, y P asimilable entre los tratamientos de los Capítulos 5 y 6 habiéndose ejecutado en la misma explotación, en condiciones similares y con uno de los tratamientos en común. Por ello, es importante destacar que los valores presentados de la caracterización de las mezclas de enmiendas son teóricos (Tabla 9.1) porque pudo existir cierta variabilidad en la aportación de enmiendas, especialmente en el caso del estiércol que fue ejecutada por los agricultores en todos los casos. Esto reduce la garantía de que la cantidad de estiércol incorporada fuese ajustada y que se repartiera de manera homogénea en todos los cuerpos. De igual manera, también resulta conveniente mencionar los posibles errores derivados de los procedimientos analíticos y/o de la baja representatividad de la muestra empleada para muchas de las variables.

A pesar de todo esto, sí se pudieron observar algunas tendencias comunes en las biodesinfecciones ejecutadas en campo, especialmente entre las variables biológicas. El aumento de la actividad microbiana fue evidente en todos los casos, reflejado con el aumento en los valores de la tasa de respiración del suelo y del COS en todos los suelos tratados. Esto se traduce en un aumento en tasa de degradación con la consiguiente movilización de nutrientes, dejándolos disponibles y favoreciendo el desarrollo del cultivo siguiente a la biodesinfección, como fue el caso. En todos los suelos tratados en condiciones reales se produjo un incremento del rendimiento en el cultivo siguiente a la biodesinfección. A pesar de que este resultado fue fruto, principalmente, de la reducción de la población de los patógenos, también la movilización de nutrientes pudo contribuir en el mejor desarrollo del cultivo. Prueba de ello fue que el ciclo de lechuga siguiente a la biodesinfección pudo ser cosechado antes de lo habitual en la mayoría de los suelos tratados.

Como se ha mencionado al inicio, tanto el control de los patógenos edáficos como el incremento de nutrientes disponibles en el suelo vienen fuertemente determinados por la microbiota edáfica que, a su vez, se ve influenciada por los factores ambientales (humedad, temperatura, pH, materia orgánica, etc.). En esencia, la salud del suelo está estrechamente vinculada a su microbiota como demuestran diferentes estudios (Moebius-Clune et al., 2016; Bonanomi et al., 2018; Hewavitharana et al., 2019; Boroujeni et al., 2021; Guo, 2021; Raghu et al., 2021; Mencil et al., 2022). Es por ello que para este trabajo se tuvieron en consideración las comunidades de bacterias, hongos y nematodos, cuya composición fue evaluada para conocer el efecto de la biodesinfección sobre sus poblaciones. Valorando los resultados del conjunto de ensayos, el efecto de los tratamientos sobre estas comunidades fue evidente. En general, hubo una disminución en la diversidad y riqueza de las poblaciones microbianas tras la aplicación de los tratamientos, aunque se pudo observar cierta tendencia a la recuperación con el tiempo. Tanto las condiciones de anegación o anaerobiosis como el aporte de materia orgánica provocan una alteración en estas comunidades (Gupta et al., 2022; Adhikari y Hartemink, 2016). En el caso de la biodesinfección, varios estudios pudieron comprobar que tras la aplicación de este tipo de tratamientos la composición microbiana se veía alterada tendiendo a generar comunidades con cierto efecto supresor que impedían la proliferación de patógenos (Randall et al., 2020; Zhao et al., 2020; Shea et al., 2022; Yan et al. 2022). En este trabajo, a pesar de que se dieron algunas diferencias entre los ensayos ejecutados, también se observó la reestructuración de estas comunidades, favoreciendo ciertas poblaciones consideradas antagonistas de patógenos edáficos y componentes de suelos supresores.

La evaluación de la comunidad bacteriana se realizó mediante el análisis del perfil fisiológico a nivel de comunidad (Biolog EcoPlates™) y las abundancias relativas de OTU 16S (secuenciación). El perfil fisiológico de bacterias heterótrofas mostró una disminución de las poblaciones en todos los ensayos, así como en su diversidad y riqueza, pero con tendencia a la recuperación. Entre los grupos más afectados destacaron las degradadoras de aminos y amidas y de ácidos carboxílicos, mientras que las degradadoras de polímeros (Tween 40, Tween 80, ciclodextrina y glucógeno) fueron las que mejor se recuperaron con el tiempo. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Núñez-Zofío et al. (2013) que, tras la

biodesinfección con vinaza de remolacha y estiércol fresco de oveja en el sureste de España, observaron un aumento de la diversidad funcional bacteriana y mayor actividad degradadora de aminoácidos, ácidos carboxílicos, misceláneos y polímeros.

En cuanto a la composición de la población total de bacterias, en la mayoría de tratamientos se produjo una disminución de la diversidad pero aumento de la riqueza. Esto se traduce en el favorecimiento de ciertas poblaciones frente a otras, resultado derivado de la biodesinfección y de la naturaleza de la materia orgánica aportada. Este aumento en las poblaciones de bacterias también se observó en otros trabajos y suele ir ligado a la mejora del estado de salud del suelo (Liu et al., 2016; Yuan et al., 2020). De hecho, una publicación reciente señala que la abundancia de grupos saprofitos podría ser más determinante en el desarrollo de supresividad que el aumento en diversidad (Shea et al., 2022). En este caso, tras la aplicación de los tratamientos, aumentaron las poblaciones de los filos Firmicutes, Bacteroidetes y Proteobacteria, mientras que Acidobacteria se vio afectado negativamente de manera generalizada, en concordancia con otros estudios similares (Achmon et al., 2020; Li et al., 2021; Shea et al., 2022). Los aportes de materia orgánica incluidos en la biodesinfección repercutieron negativamente en los organismos oligótrofos, como es el caso de la mayoría de especies del Filo Acidobacteria. Sin embargo, algunas especies de bacterias reconocidas como PGPM se vieron beneficiadas por las condiciones derivadas de la biodesinfección. Entre éstas, destacó la proliferación de los géneros *Bacillus* (Firmicutes), *Streptomyces* (Actinobacteria), *Pseudomonas* y *Pseudoxanthomonas* (Proteobacteria) y, en menor medida, algunos de la familia Chitinophagaceae (Bacteroidetes).

Varios estudios reconocen a estas poblaciones de bacterias como parte representante de la microbiota de los suelos sanos y con capacidad supresora (Yuan et al., 2020; Alabouvette, 1986). En este tipo de tratamientos, especialmente en la ASD, suele darse el incremento de Firmicutes por su capacidad de degradar polisacáridos bajo condiciones anaerobias. Además, durante estos procesos de degradación, liberan AGV con características biocidas para determinados patógenos (Simmons et al., 2016; Fernández-Bayo et al., 2019). Las poblaciones de Actinobacteria se relacionan con la degradación de estructuras fácilmente degradables. Entre ellas, destacan algunas especies del género *Streptomyces* que están reconocidas como fuertes formadoras de humus, vitaminas, antibióticos y biocidas (Tiwari et al., 2021; Shea et al., 2022) y que aumentaron en muchos de los tratamientos del presente trabajo. De manera complementaria, gran parte de la población de Bacteroidetes tiene la capacidad de descomponer estructuras más complejas o recalcitrantes como celulosa, lignina y quitina (Eilers et al., 2010; Treseder et al., 2011). Esta descomposición conjunta resulta esencial en los procesos biogeoquímicos modulando la microbiota y la movilización de nutrientes (Hewavitharana et al., 2019).

Algunas especies de bacterias pertenecientes a los géneros que se vieron favorecidos, además de relacionarse a suelos sanos, están consideradas como PGPM por su carácter bioestimulante para las plantas y con capacidad para protegerlas frente al ataque de patógenos pudiendo ejercer mecanismos antagonistas. De hecho, algunas cepas de *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces* se comercializan como inoculantes para tales fines. Entre las

capacidades más estudiadas de estos organismos están la solubilización de macro y micronutrientes esenciales dejándolos biodisponibles para las plantas (Rawat et al., 2021). Uno de los ejemplos más estudiados es el del Fe, que es un elemento vital para todos los organismos y que en el suelo se encuentra mayoritariamente presente en formas insolubles (hidróxidos y oxidróxidos de Fe). Algunas de las bacterias mencionadas producen compuestos quelantes del Fe (sideróforos) transformándolo en formas solubles y asimilables. La transformación eficiente de nutrientes por parte de estos microorganismos les favorece frente a los patógenos que no presentan la misma eficiencia, lo que genera un efecto antagonista de competencia que contribuye a frenar la proliferación del patógeno en el suelo (Beneduzi et al., 2012). Además de esto, algunas especies de *Bacillus* y *Pseudomonas* pueden producir compuestos biocidas como cianuro de hidrógeno (HCN) y antibióticos que pueden actuar de forma sinérgica contra los patógenos sin generar toxicidad en las plantas. También a algunas especies de *Pseudomonas* y *Streptomyces* se les atribuye la formación de compuestos de S que pueden producir toxicidad en los patógenos (Hewavitharana et al., 2021; Salimi y Hamed, 2021).

Las alteraciones en la comunidad fúngica por la acción de la biodeinfección resultó más variable que la bacteriana entre los tratamientos evaluados, probablemente, debido a su mayor complejidad biológica. Aunque en algunos tratamientos la diversidad y/o riqueza aumentó una vez realizada la biodesinfección, por lo general, estas variables tendieron a disminuir. A pesar de la variabilidad entre tratamientos, se pudieron detectar algunas tendencias en las biodesinfecciones realizadas en este trabajo. La más destacable fue la proliferación del filo Mortierellomycota en detrimento de Ascomycota que se vio desplazado en la mayoría de tratamientos tras la biodesinfección. Las especies del género *Mortierella* (Mortierellomycota) fueron las más favorecidas por las biodesinfecciones, viéndose beneficiadas por el aporte de materia orgánica como organismos copiotrofos que son, y degradadores primarios de los sustratos más recalcitrantes (Wu et al., 2021; Li et al., 2022). Aunque la mayoría de poblaciones de Ascomycota se vieron desplazadas, otras como el género *Aspergillus* y la familia Chaetomiaceae proliferaron en varios de los tratamientos de biodesinfección y se relacionan con suelos sanos y supresivos frente al desarrollo de Fusariosis (Alabouvette, 1986; Yuan et al., 2020). Dentro del género *Fusarium* existe una gran diversidad de especies y solo algunas están reconocidas como patógenas, la gran mayoría se encuentran de forma natural en el suelo sin generar daño en el cultivo. Es más, algunas de estas especies son endófitas, formando parte de la microbiota de la planta, y otras se emplean como bioestimulantes por su capacidad para solubilizar el P y otros nutrientes (Rai et al., 2021; Rajkumar y Kurinjimalar, 2021; Salimi y Hamed, 2021). En este trabajo, la población de *Fusarium* se redujo en el primer ensayo en campo (Capítulo 5) pero aumentó tras las biodesinfecciones de los Capítulos 7 y 8. Mientras que algunos estudios relacionan la densidad de *Fusarium* con la fatiga del suelo, que favorece el desarrollo de Fusariosis en el cultivo (Martínez et al., 2009 y 2011), otros atribuyen capacidad supresora a las especies no patógenas de *Fusarium* (Alabouvette, 1986; Yuan et al., 2020).



En un metaanálisis publicado por Yuan et al. (2020), con datos de 63 estudios diferentes, relacionaron la abundancia y composición de las comunidades microbianas presentes en suelos sanos y enfermos por Fusariosis generada por diferentes patotipos. En ese estudio determinaron que los suelos sanos presentaban mayor diversidad y abundancia relativa de otras especies de *Fusarium*. Sin embargo, también destacaron que si bien las características específicas de la comunidad microbiana del suelo sano pueden ser difíciles de distinguir, la elevada población de *F. oxysporum* fue la característica principal y común de la microbiota de los suelos enfermos. Así y todo, apuntaron que no se podría considerar únicamente las abundancias relativas de poblaciones específicas como *F. oxysporum* para identificar si un suelo alberga el potencial de causar Fusariosis. Además de esto, también observaron que *Fusarium keratoplasticum*, *Mycothermus thermophilus* y el filo Gemmatimonadetes se relacionaron con los suelos enfermos, mientras que *Aspergillus fumigatus*, *Mortierella camargensis*, *Neurospora terricola* y la familia Chaetomiaceae se asociaron con los suelos sanos. Sin embargo, también hacen mención a la elevada variabilidad de la composición microbiana de los suelos estudiados y que la mayoría de las OTUs eran específicas de cada estudio, con solo un 15% de OTUs en común entre todos los evaluados. En este trabajo, solo se detectó la OTU para *F. oxysporum* en el último ensayo (Capítulo 8) y se pudo observar su disminución en los suelos biodesinfectados respecto a los controles pero especialmente en los que se incorporó compost una vez finalizada la biodesinfección. También el aporte de compost en el suelo sin biodesinfectar mostró menor densidad de población de *F. oxysporum* que el control sin compost aunque mayor que en el solo biodesinfectado. Esto puso de manifiesto la contribución del compost en el desarrollo de supresividad aunque en menor medida que la biodesinfección.

Aunque el estudio de las comunidades de bacterias y hongos del suelo mediante técnicas ómicas (metagenómica, proteómica, metabolómica, etc.) resulta uno de los enfoques más empleados actualmente, es importante remarcar que la gran mayoría de estas especies no se encuentran descritas. Por lo tanto, en este caso, los análisis de secuenciación metagenómicos tan solo aportan información de una parte muy pequeña de las comunidades de bacterias y hongos (Urrea Ibáñez de Sendadiano, 2020). A esto se ha de sumar la variabilidad recién mencionada entre estudios, todo ello pone de manifiesto la complejidad que entraña el sistema vivo del suelo y la dificultad para establecer similitudes entre tratamientos en diferentes suelos o ensayos. Por otro lado, la técnica empleada para el estudio de la composición de la nematofauna puede aportar información algo más completa si se logra identificar de forma correcta todos los individuos presentes en las muestras de suelo. Aunque, de igual modo, conviene resaltar que se considera que también dentro de este grupo aún existen especies por describir (Quing y Bert, 2019). El estudio de la nematofauna puede abordarse de diferentes formas en función del nivel de identificación. La clasificación por grupos tróficos, en función de la morfología del aparato bucal, resulta un método sencillo que aporta información suficiente para conocer el estado de la red trófica del suelo. Los nematodos son organismos complejos, que ocupan varios niveles dentro de esta red, y son sensibles a cambios y perturbaciones del entorno. Es por ello, que el estudio

de su composición puede aportar información relevante de la composición microbiana edáfica y del estado del suelo (Yeast et al., 1993; Bongers y Ferris, 1999; Ferris, 2010; Cesarz et al., 2015). En este trabajo, la identificación se realizó a nivel de familia, lo que permitió profundizar más en los cambios de la estructura de la nematofauna derivados de las biodesinfecciones.

En los tres ensayos ejecutados en condiciones reales de campo se produjo una disminución de la diversidad y riqueza de la nematofauna en los suelos biodesinfectados, aunque ambas variables tendieron a recuperar los valores iniciales una vez cosechado el cultivo siguiente a los tratamientos, aunque con diferente composición. En mayor o menor medida, la población de bacteriófagos aumentó en todos los suelos biodesinfectados llegando a ser el más abundante. Esto fue reflejo del aumento en la población de bacterias por la incorporación de materia orgánica en condiciones de biodesinfección. Dentro de este grupo, las familias más favorecidas fueron las de mayor carácter colonizador como Rhabditidae (Ba-1) y Cephalobidae (Ba-2). Por el contrario, los fungívoros y, en mayor medida, los herbívoros se vieron afectados al mermar sus poblaciones. Una vez pasado el tiempo del cultivo posterior al tratamiento, cerca de dos meses, ambas poblaciones tendieron a recuperarse favoreciendo el equilibrio de la comunidad pero manteniéndose la predominancia de bacteriófagos. Es importante tener en cuenta que solo una pequeña parte de los herbívoros son patógenos de algunos cultivos, el resto pueden alimentarse de algas y musgo o de tejido epitelial radicular sin generar daños graves a la planta. Por ello, también los herbívoros son una parte importante de la comunidad que consigue recuperarse pasadas las condiciones de biodesinfección, al igual que los fungívoros.

Entre los nematodos herbívoros, las familias Tylenchidae (He-2e) y Telotylenchidae (He-3d) fueron las que mejor soportaron las biodesinfecciones. Tylenchidae es una de las familias de nematodos más importantes que habitan en el suelo, con una diversidad de especies que a menudo representan cerca del 30% de la nematofauna de cualquier muestra de suelo (Quing y Bert, 2019), como pudo comprobarse en muchas muestras de este trabajo. La asignación de los hábitos alimentarios en Tylenchidae actualmente continúa siendo motivo de debate entre las personas expertas en nematología. Por lo general, se considera que se alimentan de tejido epitelial radicular, sin causar daños importantes en la planta, pero también pueden alimentarse de algas, musgo y hongos. Dado este perfil, se considera muy probable que estas especies tengan las características de invasores exitosos al incluir amplitud ecológica y diversidad genética (Bongers y Bongers 1998; Ferris y Bongers, 2006). Esta pudo ser la razón por la que Tylenchidae fue una de las familias que mejor recuperó su población tras las biodesinfecciones. Este incremento pudo contribuir al desplazamiento de *M. incognita* al igual que la presencia de Telotylenchidae, un ectoparásito que ha demostrado ejercer competencia directa con *M. incognita* (Mateille et al., 2020).

Los nematodos fungívoros, a pesar de verse algo afectados en un primer momento por los efectos de la biodesinfección, acabaron formando parte de la restructuración de la comunidad. Además, este grupo se vio especialmente favorecido con el aporte de compost como se observó en el Capítulo 8 en el que, probablemente, la mayoría de especies

identificadas como Tylenchidae en ese ensayo fueran fungívoras. La composición de la nematofauna tras los tratamientos reveló una relación de grupos tróficos más favorable para los suelos agrícolas que la inicial o los controles no tratados en los que predominaron los herbívoros frente al resto. Tras las biodesinfecciones, la elevada densidad de bacteriófagos y la baja presencia de fungívoros y herbívoros revelaron una red trófica más equilibrada y eficiente para los suelos con cultivos herbáceos. En los suelos hortícolas, que sostienen cultivos herbáceos, la predominancia de bacterias dentro de la comunidad microbiana resulta más efectiva en el desarrollo de estos cultivos. El aumento de la población de bacteriófagos fue un indicador de la proliferación de bacterias, reflejado también a través de otras variables biológicas como la respiración el CBM o el COS.

Los resultados de los análisis de las distintas comunidades microbianas estudiadas en los ensayos en campo revelaron una reestructuración generalizada hacia una composición más favorable para el desarrollo de las plantas y que pudo ejercer presión sobre los patógenos controlando la enfermedad. Esto, junto con el incremento de la disponibilidad de muchos nutrientes en el suelo, resultó en el aumento de la producción a través de su doble acción fertilizante y fitosanitaria. Mientras que la acción fertilizante vino derivada del aporte de materia orgánica y su consiguiente degradación microbiana, el control del patógeno fue atribuido al efecto antagonista de la comunidad microbiana reestructurada por la biodesinfección. Los mecanismos antagonistas directos pueden darse de tres formas: hiperparasitismo, competencia y antibiosis. El hiperparasitismo implica la muerte del organismo o propágulo parasitado, como es el caso de varias especies de *Trichoderma* que se emplean como fitosanitarios. La competencia se da por los recursos esenciales (espacio, agua y nutrientes) que son aprovechados más eficientemente por los organismos no patógenos, que en densidades de población suficientes pueden desplazar o impedir la proliferación de las especies patógenas. La antibiosis se refiere a la inhibición del crecimiento o de la germinación de esporas por la liberación de metabolitos biocidas (Sooriyaarachchi et al., 2021). A través de la biodesinfección, estos mecanismos antagonistas pudieron verse reforzados por las condiciones de temperaturas elevadas y condiciones anaerobias temporales que pudieron debilitar a los patógenos haciéndolos más vulnerables.

En este sentido, de acuerdo a los resultados recogidos en este trabajo se concluyó que no fue necesario alcanzar altas temperaturas en el suelo (>45°C) para reducir las poblaciones de los patógenos. Es más, la acumulación de suficientes horas a temperaturas subletales resultó suficiente para debilitarlos al mismo tiempo que pudieron favorecer el resto de mecanismos de la biodesinfección. Así y todo, alcanzar temperaturas superiores a 35°C durante las biodesinfecciones proporciona un control superior de los patógenos al favorecer la generación de condiciones anaerobias. Esto, en parte, es debido al aumento de la actividad microbiana a estas temperaturas que resulta en una mayor tasa de agotamiento del oxígeno, como se pudo comprobar a través de las elevadas tasas de respiración a la finalización de los tratamientos. Como resultado de esta mayor actividad, también pudo verse incrementada la producción de metabolitos antimicrobianos como los AGVs, HCN y

compuestos derivados del S, entre otros, favoreciendo el efecto antagonista (Shreshta et al., 2016; Hewavitharana et al., 2021).

Además de la temperatura, la fuente de C aportada por las enmiendas orgánicas para la biodesinfección y su dosis resultan determinantes en la generación de condiciones anaerobias. Estos son factores condicionantes de la microbiota del suelo y, con ello, de los mecanismos antagonistas. La capacidad de los microorganismos para descomponer la materia orgánica depende de su capacidad para producir las enzimas necesarias para la degradación del sustrato. Cuanto más complejo y diverso sea el sustrato, más extenso y completo es el sistema enzimático requerido, por tanto, la composición microbiana. Esto ligado a las condiciones anaerobias transitorias favorecen acciones sinérgicas entre los microorganismos, como la sintropía (del griego *syn* que significa juntos, *trophe* que significa alimento). Este término hace referencia a la degradación de compuestos orgánicos complejos por organismos especializados que, a su vez, proporcionan otros compuestos requeridos para el metabolismo de otros organismos (Tuomela et al., 2000; Hewavitharana et al., 2021). Entre estos subproductos derivados de la degradación también se encuentran los compuestos biocidas para los patógenos (AGVs, HCN,  $\text{NH}_3^-$ , etc.). Por lo tanto, el aporte de diferentes tipos de sustratos de distinta naturaleza, como fue el caso de estas biodesinfecciones, unido a las condiciones anaerobias fueron determinantes para los cambios en la microbiota edáfica, considerada concluyente en el control de enfermedad. A pesar de que en este trabajo no se pudieron determinar los mecanismos antagonistas específicos, la composición de la microbiota junto con el incremento de su actividad llevaron a pensar que la competencia y la antibiosis pudieron ser los mecanismos más probables en frenar el desarrollo de las enfermedades evaluadas.

Junto con la reducción de las enfermedades edáficas, una de las apreciaciones generalizadas extraída de los ensayos realizados en campo fue el mejor desarrollo del cultivo y su temprana cosecha, que redujo el tiempo del ciclo. Este efecto pudo derivar de la proliferación de organismos reconocidos como PGPM y del aumento de la concentración de nutrientes disponibles en el suelo. En los ensayos de campo varios de los macro y micronutrientes medidos aumentaron tras la biodesinfección. El caso más llamativo fue el incremento de la concentración de  $\text{NO}_3^-$  que fue notable en todos los tratamientos, también el K asimilable incrementó en todos los casos pero no sucedió de igual manera con el P. A pesar de que el aumento de la concentración de P asimilable no fue un resultado generalizado, sí aumentó la actividad fosfatasa en la mayoría de tratamientos, así como la abundancia de algunos microorganismos reconocidos como solubilizadores de P (*Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp.). Además del incremento de estos macronutrientes, las condiciones anaerobias podrían favorecer la liberación de otros elementos esenciales a través de la reducción de  $\text{SO}_4$ ,  $\text{MnO}_2$  y  $\text{Fe}_3$  (Roskopf et al., 2014). El incremento de estos compuestos en sus formas solubles también se pudo observar en algunos de los tratamientos.

En la mayoría de ensayos se produce un incremento de la producción tras la biodesinfección pero el rendimiento puede variar en función de la naturaleza y tasa de

aplicación de las enmiendas (Shrestha et al., 2016 y 2021b). El notable aumento de  $\text{NO}_3^-$  junto con el mayor desarrollo del cultivo fue descrito por Shrestha et al. (2021b), quienes concluyeron que la mayor parte del N inorgánico medido en el suelo al finalizar la ASD se encontraba como  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ , formas asimilables que favorecen el desarrollo de la planta. Sin embargo, esto implica que elevados aportes de N en los tratamientos de biodesinfección en suelos drenados podría conducir a la lixiviación de  $\text{NO}_3^-$  perdiéndose para el cultivo y favoreciendo procesos de eutrofización de aguas subterráneas. En el Capítulo 8, en el que el riego fue muy abundante, se pudo comprobar que la concentración de  $\text{NO}_3^-$  en el extracto soluble fue menor que en el Capítulo 6. También se observó que el COM pudo favorecer la retención del N en forma de  $\text{NH}_4^+$  reduciendo la pérdida por lavado en forma de nitratos. De todas formas, el Código de buenas prácticas establece para el cultivo de lechuga una aplicación máxima de 100kgN/ha/ciclo, pero sin especificar si es en forma orgánica o mineral siendo esto determinante para en la tasa de mineralización. Así y todo, teniendo en cuenta que en esta región se cosechan una media de 5 a 6 ciclos anuales, se podrían aceptar aplicaciones de entre 500 y 600kgN/ha, siempre y cuando no apliquen otros fertilizantes.

Si bien ajustar el riego para no sobresaturar el suelo podría reducir la lixiviación, la naturaleza de las enmiendas empleadas puede jugar un papel determinante en la dinámica de nutrientes. Los sustratos altamente recalcitrantes no suelen ser empleados en este tipo de tratamientos por su lenta y compleja descomposición y, por lo tanto, baja producción de metabolitos. Sin embargo, pueden resultar interesantes combinados con otras enmiendas más lábiles para ajustar los ratios C/N, como se hizo en este caso con la CPG que contiene altas proporciones de lignina y hemicelulosa. Este tipo de mezclas no se mineralizan de manera puramente aditiva con el resto sino que, como se ha mencionado previamente, su descomposición es más lenta y requiere de mecanismos de degradación más complejos y con efecto antagónico (Shrestha et al., 2021b). Además, la relación C/N influye fuertemente en los procesos de descomposición. Los microorganismos necesitan asimilar 5 partes de C y 1 parte de N para formar las células de su cuerpo, pero para asimilar 1 parte de C deben consumir 4 partes de C orgánico. Es por esto que se considera el ratio de C/N 25 como el más adecuado para el crecimiento microbiano y los procesos de humificación y mineralización de nutrientes, y también resulta el más eficiente en la degradación de la lignocelulosa (Yang et al., 2021).

Por lo tanto, aportar mezclas de enmiendas con C/N cercano a 25, además de favorecer la proliferación de microorganismos, facilitaría la acción degradadora con la consecuente liberación de metabolitos secundarios de interés. En este trabajo, a pesar de no evaluarse de forma específica el efecto del ratio C/N con una misma composición de enmiendas, se pudo determinar que el tratamiento que mejores resultados aportó a largo plazo fue el aplicado en el Capítulo 5. Mientras que en el resto de los ensayos de campo los efectos de la biodesinfección apenas fueron visibles pasado un año (comprobación en campo, sin toma de datos), en el suelo tratado en el ensayo del Capítulo 5 el rendimiento se mantuvo durante todos esos ciclos. La mezcla de enmiendas aportada en esa ocasión presentó un C/N de 23 a una dosis de C de 4mgC/g de suelo (peso seco) a fin de cumplir con

las cualidades para favorecer las condiciones anaerobias de acuerdo a diferentes estudios (Butler et al., 2014 y 2012a; Shrestha et al., 2021a y b). Desafortunadamente, este ensayo (Capítulo 5) careció del análisis de las poblaciones bacteriana y fúngica para conocer mejor los efectos del tratamiento en su composición, aunque el estudio de la nematofauna sirvió para comprobar que la población de bacterias se mantuvo prolífica durante al menos un año tras la biodesinfección.

Los resultados recogidos en este trabajo pusieron de manifiesto la mejora generalizada de las propiedades de estos suelos hortícolas a través de la biodesinfección con EFV complementado con subproductos de la industria agroalimentaria a dosis totales entre 3-4kg/m<sup>2</sup> (peso seco). La cantidad de enmiendas necesaria para lograr cambios útiles en la microbiota del suelo suelen exceder las 0,5kg/m<sup>2</sup> (Akhtar y Malik, 2000). En este trabajo a la dosis mínima aplicada, que fue 3,1kg/m<sup>2</sup>, tuvo efectos positivos, por lo que sería conveniente conocer hasta cuanto se podría reducir la dosis de enmiendas manteniendo aun los beneficios de la biodesinfección. Además de reducir el gasto del tratamiento, este ajuste resulta especialmente relevante para tratar patógenos de naturaleza compleja como la del género *Fusarium*. Hewavitharana et al. (2021) apuntaron que la eficacia de los tratamientos de ASD para el control de *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* puede vincularse a una disponibilidad limitada de sustrato al final de la fase anaeróbica, y que la aportación de enmienda debería contener el sustrato lábil suficiente para generar condiciones anaerobias sin que quede un exceso de sustratos al finalizar la anaerobiosis que pueda inducir la actividad saprofita del patógeno. Sin embargo, como se ha comentado previamente, los procesos de degradación vienen determinados por varios factores y no solo la dosis de enmienda es importante sino que también la naturaleza de la materia orgánica y el ratio C/N.

En cuanto a la dosis, varios estudios establecieron la dosis mínima efectiva a partir del 1% de materia orgánica en relación al peso seco (Roskopf et al., 2020). Así y todo, dada la complejidad de los mecanismos biológicos, resulta conveniente estudiar las técnicas de biodesinfección para cada patógeno en cada región climática y en diferentes tipos de suelo. En la región de la CAPV, Núñez-Zofío M. (2012) demostró en su Tesis la efectividad de la biodesinfección contra *Phytophthora capsici* en el cultivo de pimiento aplicando dosis de 3,8>5,1kg/m<sup>2</sup> (peso seco), al igual que el incremento del rendimiento y la mejora de las propiedades del suelo. Además, la autora concluyó que la reiteración de esta práctica permite la disminución paulatina de la dosis de enmienda manteniendo el efecto beneficioso. En este caso, la reducción de parte de la dosis de estiércol por incorporación de subproductos agroindustriales también demostró efectividad contra *M. incognita* y FOLac en el cultivo de lechuga. Incluso, a pesar de no contar con datos empíricos, la combinación con subproductos de diferente naturaleza pudiera aportar mayor beneficio que la aplicación de una sola enmienda. En el Capítulo 8 se pudo comprobar que la incorporación de la mezcla de enmiendas bajo condiciones de biodesinfección fue más efectiva que la sola aplicación de COM a dosis similares en la promoción de microorganismos asociados a suelos sanos y supresores.

A diferencia de la Tesis citada, este trabajo se realizó principalmente en explotaciones comerciales de la CAPV naturalmente infectadas y con grandes pérdidas económicas causadas por los patógenos mencionados. En los tres ensayos realizados en explotaciones comerciales el incremento del rendimiento del cultivo en los suelos biodesinfectados fue notable. Sin embargo, salvo en el primer ensayo en el que el efecto se prolongó hasta un año, el beneficio del resto de tratamientos no fue tan prolongado. Esto pudo ser debido a diferentes cuestiones. Por un lado, el patógeno *M. incognita* resultó más susceptible a estos tratamientos que FOLac, y en los años consecutivos al primer ensayo el agricultor de la primera explotación también detectó síntomas de Fusariosis, poniendo de manifiesto la continua degradación de estos suelos por el manejo convencional. Por otro lado, la presión de uno o ambos patógenos en los suelos tratados resultó tan elevada que para su control prolongado se deberían haber reiterado el tratamiento durante al menos tres años consecutivos en el mismo suelo.

El mayor inconveniente que encuentran los agricultores en esta práctica es la pérdida de un ciclo de cultivo, como se ha mencionado anteriormente, y especialmente en periodo estival que es cuando más rentable resulta la producción de lechuga en esta área geográfica. Sin embargo, un estudio reciente no detectó diferencias entre periodos de biodesinfección de 3 y 6 semanas en la eficacia del tratamiento (Hewavitharana et al., 2021). Así y todo, resulta imprescindible un mínimo de una semana de aireación previo trasplante del cultivo para evitar posible fitotoxicidad. Dado que el periodo de esta práctica influye fuertemente en la adopción de la misma, esto podría suponer la disminución del tiempo sin cultivo obteniendo el mismo beneficio. Además, de acuerdo al presente trabajo y en consonancia con otros relacionados, no resulta imprescindible alcanzar temperaturas elevadas en el suelo para obtener resultados positivos. Esto sumado a la disminución del periodo de biodesinfección permitiría una mejor implementación en los tiempos y manejos de cada explotación pudiendo incluirse como práctica fitosanitaria y fertilizante. De todas formas, cabe señalar que si se aplicaran este tipo de tratamientos ante los primeros síntomas de enfermedad, probablemente, los resultados serían más efectivos y prolongados permitiendo una aplicación intermitente en el tiempo.

Desafortunadamente, el escenario actual presenta suelos altamente degradados con elevadas densidades de patógenos, por lo que en estos casos se requeriría una reiteración de la biodesinfección durante varios años consecutivos para acabar con la enfermedad. Aunque los agricultores que probaron esta técnica no la repitieron en los mismos suelos, como se les recomendó, sí la aplicaron por cuenta propia en otros suelos afectados de cada finca. Tras conversaciones con las personas propietarias de las explotaciones que participaron en este trabajo, se extrajo el reconocimiento de un mejor rendimiento del cultivo tras las biodesinfecciones pero que, especialmente en las explotaciones afectadas por FOLac, se estaba optando por las variedades resistentes a fin de no perder un cultivo anual. En algunos casos, se estaba probando la acción combinada de la biodesinfección con variedades resistentes obteniendo resultados positivos. Aunque la acción combinada de diferentes prácticas apunta a ser el camino más adecuado y eficiente, el empleo de variedades



resistentes podría llegar a ser perjudicial a largo plazo. La elevada tasa de reproducción de los microorganismos les confiere una rápida adaptación ante las perturbaciones o cambios en las condiciones ambientales ya que por cada nueva generación pueden aparecer individuos capaces de sobrevivir ante nuevos escenarios. Es por ello que la reiteración de cultivo de variedades resistentes ejerce una presión selectiva aumentando la probabilidad de que aparezcan individuos resistentes y la población del patógeno acabe remontando la resistencia (Antignus et al., 2008). Por esta razón, a largo plazo resulta más recomendable combinarlo con rotación de cultivos, lucha biológica y laboreo poco agresivo.

Sin lugar a dudas, la combinación de prácticas que contribuyan a mejorar la salud del suelo resulta más eficiente en la lucha contra cualquier tipo de enfermedad. Así y todo, la biodesinfección por sí sola demuestra ser una herramienta potente para mejorar la salud de los suelos agrícolas. En el caso de los cultivos bajo invernadero, además de ejercer esa doble acción fitosanitaria y fertilizante, también contribuye a generar condiciones anaerobias temporales en el suelo que de otra forma no suelen darse en este tipo de cultivos. Los cultivos en exterior están expuestos a las precipitaciones y, por lo general, pasan periodos transitorios anegados durante fuertes lluvias. Estos ciclos variables de condiciones aerobias y anaerobias son naturales en los suelos y necesarias para completar todos los procesos biogeoquímicos que se pueden dar. Sin embargo, estos ciclos no se dan de igual manera en los suelos bajo invernadero y en muchas ocasiones ciertos procesos pueden quedar bloqueados. Especialmente en estos casos, la biodesinfección, al incluir el aporte de materia orgánica y agua junto con una anaerobiosis transitoria, podría incorporarse al manejo de estos sistemas productivos como herramienta mejoradora de estos suelos en particular.

A pesar de la reticencia por parte de los agricultores a perder uno de los cultivos por la biodesinfección, la aplicación clásica de fumigantes sintéticos de suelo como el metam sodio también incluía una cubierta plástica y un tiempo de actuación mínimo de dos semanas y otra más de aireación antes del trasplante. Por lo que la biodesinfección no resultaría una alternativa tan alejada del método convencional en términos de coste (suelo sin cultivo, mano de obra, insumos, etc.). Teniendo en cuenta únicamente el gasto del producto, se estima que entre 2019 y 2021 la aplicación de metam sodio podía suponer un coste de 1,33€/m<sup>2</sup> y el dazomet entre 1,97 y 4,25€/m<sup>2</sup>. El coste que suponen los productos comerciales se hizo también evidente en este trabajo. Mientras que el precio de las mezclas a base de enmiendas no superó los 0,3€/m<sup>2</sup>, el de aquellas que incluyeron Biofence™ incrementó hasta 3,4€/m<sup>2</sup> (Tabla 9.1). Además, la aplicación de compuestos sintéticos frente a subproductos no solo supone un mayor gasto, sino que para su producción se requiere un importante consumo de recursos y energía, sin entrar a valorar el daño ambiental. Aunque el coste de la mano de obra de la biodesinfección podría incrementar en función del número de enmiendas a emplear en la mezcla, los subproductos empleados suelen ser económicos o incluso no suponer ningún coste más que el del transporte como fue el caso del EFV y el BC. Además, el gasto económico por la biodesinfección no solo sería como tratamiento fitosanitario sino que también incluiría el gasto de la fertilización anual. Así y todo, lo más importante es la mejora de las propiedades fisicoquímicas y biológicas del suelo derivada de

su reiteración, al contrario de lo que sucede con los plaguicidas sintéticos y las variedades resistentes.

La garantía de una producción de alimentos de calidad de manera sostenible recae en un buen estado de salud del suelo. Un suelo sano, determinado en gran medida por el estado de su microbiota, tiene la capacidad de producir alimento de calidad y en ausencia de enfermedad a largo plazo. Esta idea ya formaba parte del conocimiento popular hace más de dos siglos y quedó patente en un poema de Lithica (400 A.C) con el siguiente verso traducido, "Todas las plagas que de la Tierra brotan, la misma Tierra el antídoto aporta" ("*All the pests that out of Earth arise, the Earth itself the antidote supplies*") (Dayan et al., 2009). Por desgracia, gran parte de esa sabiduría se perdió hace décadas en pos de una agricultura productivista desligada de los procesos naturales sin considerar el suelo como un sistema vivo. Sin embargo, vistas las consecuencias negativas de esas prácticas y tomando como base la capacidad de la naturaleza para autorregularse, en los últimos años, el uso de organismos vivos en la agricultura está tomando mayor protagonismo. Los primeros pasos se dieron con la introducción de determinados insectos para favorecer la polinización y para la lucha de plagas como agentes de biocontrol, en ambos casos con resultados positivos. Gracias al desarrollo tecnológico, que contribuye en la generación de conocimiento, actualmente se considera a los microorganismos agentes esenciales en el mantenimiento de la vida en la Tierra. Por ello, el uso de microorganismos está tomando mayor relevancia en áreas de conocimiento ligadas a la salud y no solo en la agricultura.

El enfoque de la biodesinfección toma la microbiota del suelo como elemento protagonista. De la misma forma que sucede con la microbiota humana, que tanta relevancia está tomando en los últimos años, el estado de la microbiota del suelo resulta determinante para su salud y está directamente ligada a la microbiota del cultivo (Pepper, 2013; Kemper y Lal, 2017). Por ello, en los últimos años están tomando mayor interés las prácticas agrarias que favorecen una microbiota sana y estable como son el mínimo laboreo, la diversidad de cultivos y la reducción de aplicación de plaguicidas y fertilizantes minerales. La biodesinfección incluyendo subproductos agroindustriales como enmiendas orgánicas se presenta como una alternativa efectiva, sostenible, rentable y comprometida con la salud del suelo y del medio ambiente y en consecuencia, con la salud humana. Además, ésta práctica cumple con los principios de producción ecológica al mismo tiempo que contribuye en la revalorización de los residuos agroindustriales fomentando de esta manera un modelo de economía circular acuciante en un sistema de consumo tan acelerado como el actual.

El desarrollo tecnológico acelerado del siglo XXI promete una agricultura de alta tecnificación (*high-tech*) en ausencia de enfermedades y con mejoras de rendimiento, en muchos casos desligándose de la naturaleza. Sin embargo, estos sistemas productivos resultan altamente dependientes energéticamente e implican un gasto importante de recursos. Además, en muchas ocasiones, requieren de grandes inversiones y actualización continua de los sistemas tecnológicos. En cambio, la agricultura vinculada al suelo, llevando prácticas que contribuyan en el buen estado de salud del mismo, es capaz de producir la cantidad de alimento necesaria y de calidad sin apenas depender de recursos externos y

capaz de sostenerse en el largo plazo (Guo et al., 2021). Además, la consideración actual del suelo como sistema vivo capaz de autorregularse en condiciones de buena salud hace replantearse el manejo del mismo para la producción agrícola. Por todo esto, la biodesinfección del suelo empleando subproductos agroalimentarios resulta una práctica que contribuye en mejorar la fertilidad y la salud del suelo reduciendo la generación de residuos y el gasto de recursos, al mismo tiempo que resulta favorable para la salud humana y el medio ambiente.



# CAPÍTULO 10



---

## Conclusiones y Tesis





## 10. Conclusiones y Tesis

---

### Conclusiones

1. La incorporación de subproductos agroindustriales combinados con estiércol fresco vacuno para la biodesinfección de suelos consiguió reducir la Fusariosis y la enfermedad por *Meloidogyne incognita* en los cultivos de lechuga posteriores a los tratamientos.
2. En algunos casos los resultados positivos de la biodesinfección, como la disponibilidad de nutrientes, la reestructuración de la nematofauna y la producción, pudieron mantenerse hasta un año después del tratamiento mostrando un efecto supresor.
3. El nematodo fitopatógeno *M. incognita* mostró mayor susceptibilidad frente a la biodesinfección que *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (FOLac). En ambos casos, hubo presencia de inóculo tras la biodesinfección pero con una reducción en el desarrollo de enfermedad, lo que evidenció el efecto supresor.
4. La cáscara de pipa de girasol, no empleada previamente en tratamientos de biodesinfección, demostró ser un subproducto con potencial para ser aplicado como enmienda más recalcitrante a combinar con una más lábil.
5. El bagazo de cerveza es un subproducto muy poco empleado en biodesinfecciones que resulta interesante como enmienda lábil en las mezclas y que, actualmente, gran parte es gestionado como residuo y en menor medida como recurso forrajero.
6. La aplicación de compost tras la biodesinfección puede favorecer el efecto supresivo de la biodesinfección y reducir la lixiviación de nutrientes al mejorar el complejo húmico-arcilloso del suelo.
7. La acumulación de 225h por encima de 35°C en el suelo durante la biodesinfección y sin superar los 41°C de máxima fueron condiciones térmicas suficientes para obtener un efecto positivo tras la biodesinfección en el control de enfermedades permitiendo su implementación en regiones templadas con baja radiación solar.
8. Los cultivos posteriores a la biodesinfección mostraron mayor rendimiento en los suelos tratados, pudiendo ser cosechados algo antes de lo habitual acortándose el ciclo del cultivo.
9. La disponibilidad de la mayoría de macro y micronutrientes medidos en el suelo aumentó en los suelos biodesinfectados, al igual que la densidad y actividad microbiana, favoreciendo la fertilidad del suelo y, en consecuencia, el desarrollo de la planta.

10. La riqueza de la población de bacterias aumentó en la mayoría de suelos tratados después de la biodesinfección, incluyendo poblaciones reconocidas como beneficiosas para el cultivo como *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp.
11. La diversidad y la riqueza fúngica edáfica se redujo tras las biodesinfecciones pero algunas especies consideradas beneficiosas como las incluidas en el filo Mortierellomycota y la familia Chaetomiaceae se vieron favorecidas por los tratamientos.
12. La nematofauna se vio fuertemente afectada tras las biodesinfecciones con un aumento en la abundancia de bacteriófagos en detrimento de los herbívoros, desplazando la presencia de fitoparásitos y reequilibrando la red trófica, como proceso previo para alcanzar una estructura más adecuada para suelos que sostengan cultivos hortícolas.
13. Los costes económicos de la biodesinfección mediante el empleo de subproductos agroalimentarios son equiparables, incluso inferiores, a los tratamientos convencionales con fitosanitarios de síntesis y los beneficios ambientales y para la salud son mucho mayores.
14. El empleo de subproductos queda sujeto a la disponibilidad en el tiempo y en el espacio pudiendo no coincidir con las necesidades de la explotación que en cada región puede imponer el ciclo de cultivo.
15. A pesar de la pérdida de uno de los ciclos, la biodesinfección puede considerarse una práctica agronómica con un doble efecto, fitosanitario y fertilizante, que mejora la microbiota edáfica, posibilitando la continuidad del cultivo en suelos sobreexplotados y desequilibrados por un manejo intensivo sin pérdida de productividad.

## Tesis

La biodesinfección del suelo incorporando subproductos agroalimentarios en la mezcla de enmiendas junto con estiércol fresco vacuno demuestra ser una práctica efectiva en la reducción de las enfermedades causadas por *Meloidogyne incognita* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (FOLac) en el cultivo de lechuga bajo invernadero en regiones climáticas donde la radiación solar resulta limitante. Esta práctica mejora las propiedades fisicoquímicas y biológicas del suelo pudiendo alcanzar la supresividad a través de una reestructuración de la microbiota edáfica y logrando la mejora del rendimiento del cultivo posterior al tratamiento. Además, la biodesinfección permite el empleo de subproductos agroalimentarios revalorizándolos y fomentando la implantación de una economía circular en la producción agraria.







---

## Referencias

---

- Abdelaziz, A. M., Hashem, A. H., El-Sayyad, G. S., El-Wakil, D. A., Selim, S., Alkalifah, D. H. M., Attia, M. (2023). Biocontrol of soil borne diseases by plant growth promoting rhizobacteria. *Tropical Plant Pathology*, 1-23.
- Achmon, Y., Claypool, J. T., Fernández-Bayo, J. D., Hernandez, K., McCurry, D. G., Harrold, D. R., et al. (2020). Structural changes in bacterial and fungal soil microbiome components during biosolarization as related to volatile fatty acid accumulation. *Applied Soil Ecology*, 153, 103602.
- Adetunji, A. T., Lewu, F. B., Mulidzi, R., Ncube, B. (2017). The biological activities of  $\beta$ -glucosidase, phosphatase and urease as soil quality indicators: a review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 17(3), 794-807.
- Adhikari, K. y Hartemink A. E., (2016). Linking soils to ecosystem services—A global review. *Geoderma*, 262, 101-111.
- AEMET (2023). Agencia Estatal de Meteorología. Datos climatológicos de España. <https://www.aemet.es/es/serviciosclimaticos/datosclimatologicos/valoresclimatologicos> (visualizado en noviembre de 2022).
- Akhtar, M., y Malik, A. (2000). Roles of organic soil amendments and soil organisms in the biological control of plant-parasitic nematodes: a review. *Bioresource Technology*, 74(1), 35-47.
- AL-Shammari, T. A., Bahkali, A. H., Elgorban, A. M., El-Kahky, M. T., Al-Sum, B. A. (2013). The use of *Trichoderma longibrachiatum* and *Mortierella alpina* against root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* on tomato. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 7, 199-207.
- Alabouvette, C. (1986). Fusarium-wilt suppressive soils from the Châteaurenard region: review of a 10-year study. *Agronomie*, 6 (3), 273-284.
- Alabouvette, C., Hoepfer, H., Lemanceau, P., Steinberg, C. (1996). Soil suppressiveness to diseases induced by soilborne plant pathogens. *Soil Biochemistry*, 9, 371-413.
- Alimentarias, O. S. N. (1999). "Comisión del Codex alimentarius". Organización Mundial para la Salud (OMS), Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) (2da ed.), Roma.
- Antignus, Y., Lachman, O., Pearlsman, M., Maslenin, L., Rosner, A. (2008). A new pathotype of

- Pepper mild mottle virus (PMMoV) overcomes the L 4 resistance genotype of pepper cultivars. *Plant Disease*, 92(7), 1033-1037.
- Avato, P., D'Addabbo, T., Leonetti, P., Argentieri, M. P. (2013). Nematicidal potential of Brassicaceae. *Phytochemistry Reviews*, 12, 791-802.
- Avis, T. J., Gravel, V., Antoun, H., Tweddell, R. J. (2008). Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(7), 1733-1740.
- Bailey, K. L., y Lazarovits, G. (2003). Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments. *Soil and Tillage Research*, 72(2), 169-180.
- Baker, K. F. y Cook, R. J. (1974). *Biological Control of Plant Pathogens*. American Phytopathology Society, 433.
- Barker, K. R. (1985). Nematode extraction and bioassays. En Barker, K.R., Carter, C.C., Sasser, J.N. (Eds.), *An Advanced Treatise on Meloidogyne: Methodology*, Vol. 2 (pp. 19–35). Raleigh NC, North Carolina State University Graphics, Raleigh.
- Batrakov, S. G., Konova, I. V., Sheichenko, V. I., Esipov, S. E., Galanina, L. A., Istratova, L. N. (2002). Unusual fatty acid composition of cerebrosides from the filamentous soil fungus *Mortierella alpina*. *Chemistry and Physics of Lipids*, 117(1-2), 45-51.
- Baveye, P. C., Baveye, J., Gowdy, J. (2016). Soil "ecosystem" services and natural capital: critical appraisal of research on uncertain ground. *Frontiers in Environmental Science*, 4, 41.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., Passaglia, L. M. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, 35, 1044-1051.
- Berkeley, M. J. (1855). *Vibrio* forming cysts on the roots of cucumbers. *Gardener's Chronicle and Agricultural Gazette*, 14, 220.
- Blok, W. J., Lamers, J. G., Termorshuizen, A. J., Bollen, G. J. (2000). Control of soilborne plant pathogens by incorporating fresh organic amendments followed by tarping. *Phytopathology*, 90(3), 253-259.
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet C., et al. (2018). QIIME 2: reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science. *Peer Journal Preprints*, 6, e27295v2.
- Bonamoni, G., Antignani, V., Capodilupo, M., Scala, F. (2010). Identifying the characteristics of organic soil amendments that suppress soil-borne plant diseases. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 136-144.
- Bonanomi, G., Lorito, M., Vinale, F., Woo, S. L. (2018). Organic amendments, beneficial microbes, and soil microbiota: toward a unified framework for disease suppression. *Annual Review of Phytopathology*, 56, 1-20.
- Bongers, T. (1990). The maturity index: an ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition. *Oecologia* 83, 14-19.

- Bongers, T. (1999). The maturity index, the evolution of nematode life history traits, adaptive radiation and cp-scaling. *Plant and Soil*, 212, 13-22.
- Bongers, T. y Bongers, M. (1998). Functional diversity of nematodes. *Applied Soil Ecology*, 10, 239-251.
- Bongers, T. y Ferris, H. (1999). Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring. *Trends in Ecology and Evolution*, 14, 224-228.
- Boroujeni, Y. K., Boroujeni, V. N., Rastegari, A. A., Yadav, N., Yadav, A. N. (2021). Soil microbes with multifarious plant growth promoting attributes for enhanced production of food crops. En Yadav, A. N. (Ed.), *Soil Microbiome for Sustainable Agriculture. Functional Annotation* (pp. 55-83). Springer, Cham.
- Brennan, R. J. B., Glaze-Corcoran, S., Wick, R., Hashemi, M. (2020) Biofumigation: An alternative strategy for the control of plant parasitic nematodes. *Journal of Integrative Agriculture*, 19, 1680-1690.
- Bridge, J., y Page, S. L. J. (1980). Estimation of root-knot nematode infestation levels on roots using a rating chart. *Tropical Pest Management*, 26, 296-298.
- Briones, R., Serrano, L., Labidi, J. (2012). Valorization of some lignocellulosic agro-industrial residues to obtain biopolyols. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 87(2), 244-249.
- Bünemann, E. K., Bongiorno, G., Bai, Z., Creamer, R. E., De Deyn, G., et al. (2018). Soil quality—A critical review. *Soil Biology and Biochemistry*, 120, 105-125.
- Burns R. G. (1978). Enzyme activity in soil: some theoretical and practical considerations. En Burns R.G. (Ed.), *Soil Enzyme* (pp. 295-340). Academic Press, Londres.
- Butler, D. M., Kokalis-Burelle, N., Muramoto, J., Shennan, C., McCollum, T. G., Roskopf, E. N. (2012a). Impact of anaerobic soil disinfestation combined with soil solarization on plant-parasitic nematodes and introduced inoculum of soilborne plant pathogens in raised-bed vegetable production. *Crop Protection*, 39, 33-40.
- Butler, D. M., Roskopf, E. N., Kokalis-Burelle, N., Albano, J. P., Muramoto, J., Shennan, C. (2012b). Exploring warm-season cover crops as carbon sources for anaerobic soil disinfestation (ASD). *Plant and Soil*, 355, 149-165.
- Butler, D. M., Ownley, B. H., Dee, M. E., Eichler Inwood, S.E., McCarty, D. G., Shrestha, U., Kokalis-Burelle, N., Roskopf, E. N. (2014). Low carbon amendment rates during anaerobic soil disinfestation (ASD) at moderate soil temperatures do not decrease viability of sclerotinia sclerotiorum sclerotia or fusarium root rot of common bean. *Acta Horticulturae*, 1044, 203-208.
- Cabral, C. S., Fonseca, M. E. N., Brunelli, K. R., Rossato, M., Costa, H., et al. (2018). Relationships among Brazilian and worldwide isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 1 inferred from ribosomal intergenic spacer (IGS-rDNA) region and EF-1 $\alpha$  gene sequences. *European Journal of Plant Pathology*, 152(1), 81-94.

- Canali, S., y Benedetti, A. (2006). Soil Nitrogen Mineralization. En Bloem, j., Hopkins, D. W., Benedetti, A. (Eds.), *Methods for assessing soil quality*. Vol. 79 (pp.127-135). CABI, Oxfordshire.
- Cardoso, E. J. B. N., Vasconcellos, R. L. F., Bini, D., Miyauchi, M. Y. H., Santos, C. A. D., Alves, P. R. L., et al. (2013). Soil health: looking for suitable indicators. What should be considered to assess the effects of use and management on soil health?. *Scientia Agricola*, 70, 274-289.
- Carrascosa, M., Sánchez-Moreno, S., Alonso-Prados, J. L. (2014). Relationships between nematode diversity, plant biomass, nutrient cycling and soil suppressiveness in fumigated soils. *European Journal of Soil Biology*, 62, 49-59.
- Carson, R. (2000). *Silent Spring*. Penguin Classics, Londres.
- Cesarz, S., Reich, P. B., Scheu, S., Ruess, L., Schaefer, M., Eisenhauer, N. (2015). Nematode functional guilds, not trophic groups, reflect shifts in soil food webs and processes in response to interacting global change factors. *Pedobiologia* 58, 23-32.
- Chandrajith, R. y Dissanayake, C. B. (2009). Phosphate mineral fertilizers, trace metals and human health. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 37(3), 153–165.
- Chao A. (1984). Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal Statistics*, 11, 265-270.
- Chen, Y., Camps-Arbestain, M., Shen, Q., Singh, B., Cayuela, M. L. (2018). The long-term role of organic amendments in building soil nutrient fertility: a meta-analysis and review. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 111, 103-125.
- Chen, L., Chen, Q., Zhang, Z., Wan, X. (2009). A novel colorimetric determination of free amino acids content in tea infusions with 2, 4-dinitrofluorobenzene. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(2), 137-141.
- Chettri, D., Sharma, B., Kumar, Verma, A. K. Verma, A. K. (2021). Significance of microbial enzyme activities in agriculture. En Soni R., Suyal, D. C., Bhargava, P., Goel, R. (Eds.), *Microbiological Activity in Soil and Plant Health* (pp. 351-373). Springer, Gateway East.
- Chitwood, B. G. (1949). Root-knot nematodes – Part 1. A revision of the genus *Meloidogyne* Goeldi, 1887. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 16, 90-104.
- Clarke, K. R. (1993). Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology*, 18(1), 117-143.
- Cohen, M. F., Yamasaki, H., Mazzola, M. (2005). *Brassica napus* seed meal soil amendment modifies microbial community structure, nitric oxide production and incidence of *Rhizoctonia* root rot. *Soil Biology and Biochemistry*, 37, 1215-1227.
- Comeau, A. M., Douglas, G. M., Langille, M. G. (2017). Microbiome Helper: a custom and streamlined workflow for microbiome research. *MSystems*, 2(1), e00127-16.
- Contiliani, D. F., de Araújo Ribeiro, Y., de Moraes, V. N., Pereira, T. C. (2020). *Panagrolaimus superbus* tolerates hypoxia within Gallium metal cage: implications for the

- understanding of the phenomenon of anhydrobiosis. *Journal of Nematology*, 52, 1-6.
- Correia, É. C. S. da S., da Silva, N., Costa, M. G. S., Wilcken, S. R. S. (2019). Response of lettuce cultivars to *Meloidogyne javanica* and *Meloidogyne incognita* race 1 and 2. *Revista Ciência Agronômica*. 50, 100-106.
- Cortada, L., Sorribas, F. J., Ornat, C., Andrés, M. F., Verdejo-Lucas, S. (2009). Response of tomato rootstocks carrying the Mi-resistance gene to populations of *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* and *M. javanica*. *European Journal of Plant Pathology*, 124, 337-343.
- Cortet, J., Gomot-De Vaufleury, A., Poinso-Balaguer, N., Gomot, L., Texier, C., Cluzeau, D. (1999). The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. *European Journal of Soil Biology*, 35(3), 115-134.
- Curtis, R. H. C., Robinson, A. F., Perry, R. N. (2009). Hatch and host location. En Perry, R. N. y Moens, M., Starr, J. L. (Eds.), *Root-Knot Nematodes* (pp. 139-162). CAB International, Wallingford, Oxfordshire.
- Danchin, E. G., y Perfus-Barbeoch, L. (2009). The Genome Sequence of *Meloidogyne incognita* Unveils Mechanisms of Adaptation to Plant-Parasitism in Metazoa. En Pontarotti, P. (Ed.). *Evolutionary Biology: Concept, Modeling, and Application* (pp. 287-302). Springer, Heidelberg.
- Dayan, F. E., Cantrell, C. L., Duke, S. O. (2009). Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(12), 4022-4034.
- De Corato, U. (2021). Effect of value-added organic co-products from four industrial chains on functioning of plant disease suppressive soil and their potentiality to enhance soil quality: A review from the perspective of a circular economy. *Applied Soil Ecology*, 168, 104221.
- De Corato, U. (2019). Use of omic approaches for characterizing microbiota from suppressive compost to control soil-borne plant pathogens. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 52(7-8), 757-775.
- De Corato, U., Salimbeni, R., De Pretis, A. (2018). Suppression of soil-borne pathogens in container media amended with on-farm composted agro-bioenergy wastes and residues under glasshouse condition. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 125, 213-226.
- Diamond, J. (2002). Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature*, 418(6898), 700-707.
- Díaz-López, M., Nicolas, E., López-Mondéjar, R., Galera, L., Garrido, I., Fenoll, J., Bastida, F. (2021). Combined ozonation and solarization for the removal of pesticides from soil: Effects on soil microbial communities. *Science of the Total Environment*, 758, 143950.
- Directiva 91/414/CEE del Consejo, de 15 de julio de 1991, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios.
- Dutta, T. K., Khan, M. R., Phani, V. (2019). Plant-parasitic nematode management via



- biofumigation using brassica and non-brassica plants: current status and future prospects. *Current Plant Biology*, 17, 17-32.
- Eilers, K. G., Lauber, C. L., Knight, R., Fierer, N. (2010). Shifts in bacterial community structure associated with inputs of low molecular weight carbon compounds to soil. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 896–903.
- Eisenback, J. D., Hirschmann, H., Triantaphyllou, A. C. (1980). Morphological comparisons of *Meloidogyne* female head structures, perineal patterns, and stylets. *Journal of Nematology*, 12, 300-313.
- Ekart, K., Hmelak Gorenjal, A., Madorran, E., Lapajne, S., Langerholc, T. (2013). Study on the influence of food processing on nitrate levels in vegetables. EFSA Supporting Publications, 10(12), 514E.
- Emami-Karvani Z. y Chitsaz-Esfahani Z. (2021). Phosphorus Solubilization: Mechanisms, Recent Advancement and Future Challenge. En Yadav, A. N. (Ed.), *Soil Microbiomes for Sustainable Agriculture: Functional Annotation* (pp. 85-131). Springer, Cham.
- Epelde, L., Hernández-Allica, J. J., Becerril, M., Blanco, F., Garbisu, C. (2008). Effects of chelates on plants and soil microbial community: Comparison of EDTA and EDDS for lead phytoextraction. *Science of the Total Environment*, 401, 21–28.
- European Commission (2020). From Farm to Fork. Disponible on-line. [https://food.ec.europa.eu/system/files/2020-05/f2f\\_action-plan\\_2020\\_strategy-info\\_en.pdf](https://food.ec.europa.eu/system/files/2020-05/f2f_action-plan_2020_strategy-info_en.pdf) (visualizado en mayo de 2023).
- EUSTAT (2023). Euskal Estatistika Erakundea - Instituto Vasco de Estadística. [https://www.eustat.eus/bankupx/pxweb/es/DB/-/PX\\_102124\\_fesp\\_agr01.px](https://www.eustat.eus/bankupx/pxweb/es/DB/-/PX_102124_fesp_agr01.px) (visualizado en enero de 2023).
- Evans, A. A. F. y Perry, R. N. (2009). Survival mechanisms. En Perry, R. N., Moens, M. Starr J. L. (Eds.), *Root-knot nematodes* (pp. 201-222). CABI.
- FAO, 2015. Food and Agriculture Organization of the United Nations - Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Suelos y biodiversidad. <http://www.fao.org/resources/infographics/infographics-details/es/c/285729/> (visualizado en abril de 2023).
- FAO, 2021. Food and Agriculture Organization of the United Nations - Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. FAOstat. Cultivos y productos de ganadería. <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL> (visualizado en noviembre de 2022).
- Fennimore, S. A., Martin, F. N., Miller, T. C., Broome, J. C., Dorn, N., Greene, I. (2014). Evaluation of a mobile steam applicator for soil disinfestation in California strawberry. *HortScience*, 49(12), 1542-1549.
- Fernández-Bayo, J. D., Hestmark, K. V., Claypool, J. T., Harrold, D. R., Randall, T. E., Achmon, Y., et al. (2019). The initial soil microbiota impacts the potential for lignocellulose degradation during soil solarization. *Journal of Applied Microbiology*, 126, 1729–1741.

- Fernández-Bayo, J. D., Randall, T. E., Harrold, D. R., Achmon, Y., Hestmark, K. V., Su, J. (2018). Effect of management of organic wastes on inactivation of *Brassica nigra* and *Fusarium oxysporum* f.sp *lactucae* using soil biosolarization. *Pest Management Science*, 74(8), 1892-1902.
- Fernández-Bayo, J. D., Shea, E. A., Parr, A. E., Achmon, Y., Stapleton, J. J., VanderGheynst, J. S., Hodson, A. K., Simmons, C. W. (2020). Almond processing residues as a source of organic acid biopesticides during biosolarization. *Waste Management*, 101, 74-82.
- Ferris, H. (2010). Form and function: Metabolic footprints of nematodes in the soil food web. *European Journal of Soil Biology*, 46, 97-104.
- Ferris, H., Bongers, T., De Goede, R. G. M. (2001). A framework for soil food web diagnostics: Extension of the nematode faunal analysis concept. *Applied Soil Ecology*, 18, 13-29.
- Fourie, H., Ahuja, P., Lammers, J., Daneel, M. (2016). Brassicacea-based management strategies as an alternative to combat nematode pests: A synopsis. *Crop Protection*, 80, 21-41.
- Fourie, G., Steenkamp, E. T., Ploetz, R. C., Gordon, T. R., Viljoen, A. (2011). Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* formae specialis  *cubense* within the *Fusarium oxysporum* complex. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(3), 533-542.
- Gaind, S., y Pandey, A. K. (2005). Biodegradation study of crop residues as affected by exogenous inorganic nitrogen and fungal inoculants. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, 45(4), 301-311.
- Gálvez, L., Brizuela, A. M., Garcés, I., Cainarca, J. S., Palmero, D. (2023). First Report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* Race 4 Causing Lettuce Wilt in Spain. *Plant Disease*, (*in press*).
- Gandariasbeitia, M., López-Pérez, J. A., Juaristi, B., Abaunza, L., Larregla, S. (2021). Biodisinfestation with agricultural by-products developed long-term suppressive soils against *Meloidogyne incognita* in lettuce crop. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 663248.
- Gandariasbeitia, M., López-Pérez, J. A., Juaristi, B., Larregla Del Palacio, S. (2022). Sunflower seed husk as promising by-product for soil biodisinfestation treatments and fertility improvement in protected lettuce crop. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6, 901654.
- Gamliel, A., Austeraweil, M., Kritzman, M. (2000). Non-chemical approach to soilborne pest management - organic amendments. *Crop Protection*, 19, 847-853.
- Gamliel, A. y Stapleton, J. J. (2012). Combining soil solarization with organic amendments. En Gamliel, A. y Katan, J. (Eds.), *Soil Solarization: Theory and Practice* (pp. 109–120). APS Press, St Paul, Minnesota.
- Gao, W., Gao, K., Guo, Z., Liu, Y., Jiang, L., Liu, et al. (2021). Different responses of soil bacterial and fungal communities to 3 years of biochar amendment in an alkaline soybean soil. *Frontiers in Microbiology*, 12, 630418.

- Garbeva, P., Hol, W. G., Termorshuizen, A. J., Kowalchuk, G. A., De Boer, W. (2011). Fungistasis and general soil biostasis—a new synthesis. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(3), 469-477.
- Gareau, B. J. (2010). A Critical Review of the Successful CFC Phase-Out Versus the Delayed Methyl Bromide Phase-Out in the Montreal Protocol. *International Environmental Agreements*, 10 (3), 209-231.
- Garland, J. L. (1997). Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 24(4), 289-300.
- Garland, J. L. y Mills, A. L. (1991). Classification and characterisation of heterotrophic microbial communities on the basis of pattern of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 2351-2359
- Gil-Sotres, F., Trasar-Cepeda, C., Leirós, M. C., Seoane, S. (2005). Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(5), 877-887.
- Gilardi, G., Cucu, M.A., Pugliese, M., Gullino, M.L. Garibaldi, A. (2020). Effect of different organic amendments on lettuce Fusarium wilt and on soilborne microorganisms. *Acta Horticulturae*, 1270, 117-126.
- Gilardi, G., Franco Ortega, S., Van Rijswijk, P. C. J., Ortu, G., Gullino, M. L., Garibaldi, A. (2017). A new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* of lettuce. *Plant Pathology*, 66(4), 677-688.
- Gilardi, G., Garibaldi, A., Matic, S., Senatore, M. T., Pipponzi, S., Prodi, A., Gullino, M. L. (2019). First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 4 on lettuce in Italy. *Plant Disease*, 103(10), 2680-2680.
- Gilardi, G., Pugliese, M., Gullino, M. L., Garibaldi, A. (2016). Effect of different organic amendments on lettuce fusarium wilt and on selected soilborne microorganisms. *Plant Pathology*, 65(5), 704-712.
- Göldi, E.A. (1892) Relatoria sôbre a molestia do cafeiro na provincial da Rio de Janeiro. *Arquivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro* 8, 1–112.
- Gordon, T. R. (2017). *Fusarium oxysporum* and the Fusarium wilt syndrome. *Annual review of phytopathology*, 55, 23-39.
- Gordon, T. R., y Koike, S. T. (2015). Management of Fusarium wilt of lettuce. *Crop Protection*, 73, 45-49.
- Guerrero-Díaz, M. M., Lacasa-Martínez, C. M., Hernández, A., Martínez, V., Martínez, M. C., Fernández-Molina, P., Lacasa, A. (2014). Biosolarization with agroindustrial by-product for the control of soilborne pathogens in protected pepper crops in southeast Spain. *Acta Horticulturae*, 1044, 157-161.
- Guerrero, M. M., Lacasa, C. M., Martínez, V., Martínez-Lluch, M. C., Larregla, S., Lacasa, A. (2019). Soil biosolarization for *Verticillium dahliae* and *Rhizoctonia solani* control in artichoke crops in southeastern Spain. *Spanish Journal of Agricultural Research* 17(1), 1-

11.

- Guerrero, M. M., Martínez, M. C., León, M., Armengol, J., Monserrat, A. (2020). First report of *Fusarium* wilt of lettuce caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 1 in Spain. *Plant Disease*, 104(6), 1858-1858.
- Günther, S., Grunert, M., Müller, S. (2018). Overview of recent advances in phosphorus recovery for fertilizer production. *Engineering in Life Science*, 18(7), 434-439.
- Guo, M. (2021). Soil health assessment and management: recent development in science and practices. *Soil Systems*, 5(4), 61.
- Guo, X. X., Liu, H. T., Wu, S. B. (2019). Humic substances developed during organic waste composting: Formation mechanisms, structural properties, and agronomic functions. *Science of the total environment*, 662, 501-510.
- Gupta, A., Singh, U. B., Sahu, P. K., Paul, S., Kumar, A., Malviya, D., et al. (2022). Linking soil microbial diversity to modern agriculture practices: A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(5), 3141.
- Gupta, V. V. S. R. y Yeast G. W. (1997). En Pankhurst, C., Doube, B. M., Gupta, V. V. S. R. (Eds.). *Biological indicators of soil health. Soil Microfauna as Bioindicators of Soil Health* (pp. 201-233). Wallingford: CAB International, Eastbourne.
- Haghighi, B. J., Alizadeh, O., Firoozabadi, A. H. (2011). The role of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in sustainable agriculture. *Advances in Environmental Biology*, 5(10), 3079-3083.
- Hanschen, F. S., y Winkelmann, T. (2020). Biofumigation for fighting replant disease-A Review. *Agronomy*, 10(3), 425.
- Hartman, K.M. y Sasser, J.N. (1985). Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. En Barker, K. R., Carter, C. C., Sasser, J. N. (Eds.), *An Advanced Treatise on Meloidogyne. Volume II: Methodology* (pp. 69-77). A cooperative publication of the Department of Plant Pathology and the United States Agency for International Development. North Carolina State University Graphics, Raleigh, North Carolina.
- Hassan, M. A., Pham, T. H., Shi, H., Zheng, J. (2013). Nematodes threats to global food security. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B–Soil & Plant Science*, 63(5), 420-425.
- Hewavitharana, S. S., Klarer, E., Muramoto, J., Shennan, C., Mazzola, M. (2021). Analysis of environmental variables and carbon input on soil microbiome, metabolome and disease control efficacy in strawberry attributable to anaerobic soil disinfestation. *Microorganisms*, 9(8), 1638.
- Hewavitharana, S. S., Klarer, E., Reed, A. J., Leisso, R., Poirier, B., Honaas, L., et al. (2019). Temporal dynamics of the soil metabolome and microbiome during simulated anaerobic soil disinfestation. *Frontiers in microbiology*, 10, 2365.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role

- in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, 60, 579-598.
- Heydari, A., y Pessaraki, M. (2010). A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *Journal of Biological Sciences*, 10(4), 273-290.
- Hodson, A., y Lewis, E. (2016). Managing for soil health can suppress pests. *California Agriculture*, 70(3), 137-141.
- Hoitink, H. A. J. y Boehm, M. J. (1999). Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. *Annual Review of Phytopathology*, 37, 427-446.
- Huang, X., Liu, L., Wen, T., Zhu, R., Zhang, J., Cai, Z. (2015). Illumina MiSeq investigations on the changes of microbial community in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* infected soil during and after reductive soil disinfestation. *Microbiological Research*, 181, 33-42.
- Hunt, D. J. y Handoo, Z. A. (2009). En Perry, R. N. y Moens, M. (Eds), *Root-knot nematodes. Taxonomy, identification and principal species* (pp. 55-97). CABI Publishing, Wallingford.
- Hussey, R. S., y Barker, K. R. (1973). Comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant disease reporter*.
- Ijohay, M. O., y Koutatouka, M. (2009). Effect of soil solarization using plastic mulch in controlling root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) infestation and yield of lettuce at Anse Boileau, Seychelles. *African Journal of Biotechnology*, 8, 6787-6790.
- Insam, H. (1997). A new set of substrates proposed for community characterization in environmental samples. En Insam, H. y Rangger A. (Eds.), *Microbial Communities. Functional versus structural approaches* (pp. 260-261). Springer, Heidelberg.
- Ishida, T., Suzuki, R., Nakagami, S. Kuroha, T., Sakamoto, S., Nakata, M. T., et al. (2020). Root-knot nematodes modulate cell walls during root-knot formation in Arabidopsis roots. *Journal of Plant Research*, 133, 419-428.
- ISO 6579:2017. Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección, enumeración y serotipado de *Salmonella*. Parte 1: Detección de *Salmonella* spp. Modificación 1: Ampliación del rango de temperaturas de incubación, modificación del estado del Anexo D y corrección de la composición de los medios MSRV y SC. (ISO 6579-1:2017/Amd 1:2020).
- ISO 7251:2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive *Escherichia coli* - Most probable number technique.
- ISO 16072:2002. Soil quality — Laboratory methods for determination of microbial soil respiration.
- ISO 20130:2018. Soil quality. Measurement of enzyme activity patterns in soil samples using colorimetric substrates in micro-well plates
- Janvier, C., Villeneuve, F., Alabouvette, C., Edel-Hermann, V., Mateille, T., Steinberg, C. (2007). Soil health through soil disease suppression: which strategy from descriptors to

- indicators?. *Soil Biology and Biochemistry*, 39, 1-23.
- Jahiruddin, M. (2020). Soil health and human well-being: a review. *Fundamental and Applied Agriculture*, 5(4), 443-452.
- Jaraba, J. D., Lozano, Z. E., Padrón, I. E. S. (2003). *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White, 1919) Chitwood 1949 y *Meloidogyne arenaria* (Neal 1889) Chitwood 1949: Nematodos de las nudosidades radiculares en guayaba (*Psidium guajava* L.) CV Manzana en montería, cordoba. *Temas agrarios*, 8(2), 15-21.
- Jayaraman, S., Naorem, A. K., Lal, R., Dalal, R. C., Sinha, N. K., Patra, A. K., Chaudhari, S. K. (2021). Disease-suppressive soils—beyond food production: a critical review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 21, 1437-1465.
- Jepson, S. B., (1987). Identification of Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* species) (pp. 265). CAB International, Wallingford, UK.
- Jobert, C. (1978) Sur un maladie du cafeier observée au Bresil. *Compte Rendue Hebdomadaire des Séances del'Académie des Sciences, Paris* 87, 941–943.
- Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G. J., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G. K., et al. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 14, 946-961.
- Joshi, P., Saini, A., Banerjee, S., Bose, R., Bhandari, Pandey, A., Pandey, S. (2021). Agriculturally Important Microbes: Challenges and Opportunities. En Soni, R., Suyal, D.C, Bhargava, P., Goel, R. (Eds.). *Microbiological Activity for Soil and Plant Health Management* (pp. 1-34). Springer, Singapur.
- Kaşkavalci, G. (2007). Effect of soil solarization and organic amendment treatments for controlling *Meloidogyne incognita* in tomato cultivars in Western Anatolia. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 31, 159-167.
- Katan J., Greenberger A., Alon H., Ginstein A. (1976). Solar heating by polyethylene mulching for the control of diseases caused by soilborne pathogens. *Phytopathology*, 66, 683-689.
- Katan, J. (2014). Soil solarization: the idea, the research and its development. *Phytoparasitica*, 43, 1-4.
- Katan, J. (2017). Diseases caused by soilborne pathogens: Biology, management and challenges. *Journal of Plant Pathology* 99, 305-315.
- Katan, J., y Gamliel, A. (2014). Plant Health Management: Soil Solarization. *Encycl. Agriculture and Food Systems*, 4, 460-471.
- Katan, J. (2000). Physical and cultural methods for the management of soil-borne pathogens. *Crop Protection*, 19(8-10), 725-731.
- Kemper, K. J., y Lal, R. (2017). Pay dirt! human health depends on soil health. *Complementary Therapies in Medicine*, 32, A1-A2.
- Khan, Z., y Kim, Y. H. (2007). A review on the role of predatory soil nematodes in the

- biological control of plant parasitic nematodes. *Applied Soil Ecology*, 35(2), 370-379.
- Khan, I., Fahad, S., Wu, L., Zhou, W., Xu, P., Sun, Z., et al. (2019) Labile organic matter intensifies phosphorous mobilization in paddy soils by microbial iron (III) reduction. *Geoderma*, 352, 185–196.
- Kim, M. J., Moon, Y., Tou, J. C., Mou, B., Waterland, N. L. (2016). Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 49, 19-34.
- Kirkegaard, J. A., Gardner, P. A., Desmarchelier, J. M. Angus, J. F. (1993). Biofumigation: using *Brassica* species to control pests and diseases in horticulture and agriculture. En Wratten, N. y Mailer, R. J. (Eds.) 9th Australian Research Assembly on Brassicas (pp. 77-82). Agricultural Research Institute, Wagga Wagga.
- Kirkegaard J. A., y Matthiessen, J. N. (2004). Developing and refining the biofumigation concept. *Agroindustria*, 3, 233–239.
- Klein, E., Katan, J., Gamliel, A. (2012). Soil suppressiveness to *Meloidogyne javanica* as induced by organic amendments and solarization in greenhouse crops. *Crop Protection* 39, 26-32.
- Koenning, S. R., Overstreet, C., Noling, J. W., Donald, P. A., Becker, J. O., Fortnum, B. A. (1999). Survey of crop losses in response to phytoparasitic nematodes in the United States for 1994. *Journal of Nematology*, 31, 587-618.
- Kofoed, C. A. y White, W. A. (1919). A new nematode infection of man. *Journal of the American Medical Association*, 72, 567-569.
- Kokalis-Burelle, N., Butler, D. M., Roskopf, E. N. (2013). Evaluation of cover crops with potential for use in anaerobic soil disinfestation (ASD) for susceptibility to three species of *Meloidogyne*. *Journal of Nematology*, 45(4), 272.
- Komada, H. (1975). Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Review of Plant Protection Research*, 8, 114-124.
- Kruskal, J.B. y Wish, M. (1978), *Multidimensional Scaling*, Murray Hill, N.J. Bell Laboratories.
- Lacasa, A.; Lacasa, C. M.; Torres, J.; Martinez, V.; Ros, C.; Guerrero, M. D.; et al. (2022). Agroindustrial byproducts used in biosolarization reduce the soilborne pathogens incidence in green-house pepper crops. *ITEA-Informacion Tecnica Economica Agraria* 118, 181-197.
- Lamers, J. G.; Runia, W. T.; Molendijk, L. P. G.; Bleeker, P. O. (2010). Perspectives of Anaerobic Soil Disinfestation. *Acta Horticulturae*. 883, 277–283.
- Lahoz, E., Caiazzo, R., Morra, L., Carella, A., Martín-Gil, J. (2009). Suppression of lettuce drop caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in the field using municipal solid waste compost and fungistatic effect of water extract. *Dynamic Soil, Dynamic Plant*, 3(1), 99-102.



- Lazarovits, G., Tenuta, M., Conn, K. L. (2001). Organic amendments as a disease control strategy for soilborne diseases of high-value agricultural crops. *Australasian Plant Pathology*, 30, 111-117.
- Legendre, P. y Legendre, L. (1998). *Numerical Ecology* (pp. 853). ELSEVIER, Amsterdam.
- Lehmann, J., Bossio, D. A., Kögel-Knabner, I., Rillig, M. C. (2020). The concept and future prospects of soil health. *Nature Reviews Earth & Environment*, 1(10), 544-553.
- Ley 7/2022, de 8 de abril, de residuos y suelos contaminados para una economía circular. Jefatura del Estado «BOE» núm. 85, de 09 de abril de 2022. Referencia: BOE-A-2022-5809.
- Li, X., Lu, Q., Li, D., Wang, D., Ren, X., Yan, J., Ahmed, T., Li, B. (2022). Effects of Two Kinds of Commercial Organic Fertilizers on Growth and Rhizosphere Soil Properties of Corn on New Reclamation Land. *Plants*, 11(19), 2553.
- Li, Y., Xie, Z., Yu, Z., Wang, Y., Liu, C., Wang, G., et al. (2021). Impact of surface soil manuring on particulate carbon fractions in relevant to nutrient stoichiometry in a Mollisol profile. *Soil and Tillage Research*, 207, 104859.
- Lin, M., Zhou, Y., Xu, R., Du, C., Wang, R., Lu, W., et al. (2023). Contrasting Key Bacteria and Fungi Related to Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) with Different Resistances to Beet Rot under Two Farming Modes. *Agronomy*, 13(3), 825.
- Liu, L., Kong, J., Cui, H., Zhang, J., Wang, F., Cai, Z., Huang, X. (2016). Relationships of decomposability and C/N ratio in different types of organic matter with suppression of *Fusarium oxysporum* and microbial communities during reductive soil disinfestation. *Biological Control*, 101, 103-113.
- Liu, L., Yan, Y., Ding, H., Zhao, J., Cai, Z., Dai, C., Huang, X. (2021). The fungal community outperforms the bacterial community in predicting plant health status. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(16-17), 6499-6513.
- López-Pérez, J. A., Sánchez-Moreno, S. (2022). Soil response to root-knot nematode management with wine vinasse in a solarised horticultural soil under glasshouse conditions. *Nematology*, 24, 431-451.
- Lu, Q., Liu, T., Wang, N., Dou, Z., Wang, K., Zuo, Y. (2020). A review of soil nematodes as biological indicators for the assessment of soil health. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering*, 7, 275-281.
- Ma, L. J., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Trail, F., et al. (2013). *Fusarium* pathogenomics. *Annual review of microbiology*, 67, 399-416.
- Mahmood, I., Imadi, S. R., Shazadi, K., Gul, A., Hakeem, K. R. (2016). Effects of pesticides on environment. En Hakeem, K. R., Akhtar, M. S., Abdullah, S. N. A. (Eds.), *Plant, Soil and Microbes Plant, Soil and Microbes: Volume 1: Implications in Crop Science* (pp. 253-269). Springer, Cham, Suiza.
- Manzanilla-López, R. H. y Starr, J. L. (2009). Interactions with other pathogens. En Perry, R. N.,

- Moens, M., Starr, J. L. (Eds.). *Root-Knot Nematodes* (pp. 223–245). Wallingford, Oxfordshire, CAB International.
- Manzoor, A., Dippold, M. A., Loeppmann, S., Blagodatskaya, E. (2022). Two-phase conceptual framework of phosphatase activity and phosphorus bioavailability. *Frontiers in Plant Science*, 13, 935829.
- MAPA (1994). *Métodos Oficiales de Análisis. Tomo III. Ed. Secretaría General Técnica. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Madrid) pp 662.*
- MAPA (2022). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. [https://www.mapa.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/fichas/excel/AUTORIZACIONES\\_EXCEPCIONALES\\_EN\\_VIGOR.xls](https://www.mapa.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/fichas/excel/AUTORIZACIONES_EXCEPCIONALES_EN_VIGOR.xls)
- Martin, T., y Sprunger, C. D. (2022). Soil food web structure and function in annual row-crop systems: How can nematode communities infer soil health?. *Applied Soil Ecology*, 178, 104553.
- Martínez, M. A., Lacasa, A., Tello, J., (2009). Ecología de la microbiota fúngica de los suelos de los invernaderos de pimiento y su interés agronómico (pp. 377). Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino, Madrid.
- Martínez, M. A., Martínez, M. C., Bielza, P., Tello, J., Lacasa, A., (2011). Effect of biofumigation with manure amendments and repeated biosolarization on *Fusarium* density in pepper crops. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38, 3-11.
- Mateille, T., Tavoillot, J., Goillon, C., Pares, L., Lefèvre, A., Védie, H., et al. (2020). Competitive interactions in plant-parasitic nematode communities affecting organic vegetable cropping systems. *Crop protection*, 135, 105206.
- Matthiessen, J., y Kirkegaard, J. (2006). Biofumigation and enhanced biodegradation: Opportunity and challenge in soilborne pest and disease management. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25, 235-265.
- Matuo, T. y Motohashi, S., (1967). On *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* n.f. causing root rot of lettuce. *T. myco. Soc. Jpn.* 32, 13e15.
- Maurya, S., Abraham, J. S., Somasundaram, S., Toteja, R., Gupta, R., Makhija, S. (2020). Indicators for assessment of soil quality: a mini-review. *Environmental Monitoring and Assessment*, 192, 1-22.
- Mazzola, M., y Freilich, S. (2017). Prospects for biological soilborne disease control: application of indigenous versus synthetic microbiomes. *Phytopathology*, 107(3), 256-263.
- Mazzola, M., Granatstein, D.M., Elfving, D.C., Mullinix, K. (2001). The suppression of specific apple root pathogens by *Brassica napus* seed meal amendment regardless of glucosinolate content. *Phytopathology*, 91, 673–679.
- MBTOC (Methyl Bromide Technical Options Committee), 1995. 1994 Report of the Methyl Bromide Technical Options Committee. En 1995 Assessment Report. Montreal Protocol

- on Substances that Deplete the Ozone Layer (pp. 309). UNEP,Nairobi.
- MBTOC (Methyl Bromide Technical Options Committee), 1998. Report of the Methyl Bromide Technical Options Committee. En 1998 Assessment. Montreal Protocol on Substances that Deplete the Ozone Layer (pp. 455). UNEP,Nairobi.
- MBTOC (Methyl Bromide Technical Options Committee), 2010. Report of the Methyl Bromide Technical Options Committee, En 2010 Assessment (pp. 387). United Nations Environment Programme, Nairobi.
- Melakeberhan, H., Bonito, G., Kravchenko, A. N. (2021). Application of nematode community analyses-based models towards identifying sustainable soil health management Outcomes: a review of the concepts. *Soil Systems*, 5(2), 32.
- Mencel, J., Mocek-Płóćiniak, A., Kryszak, A. (2022). Soil Microbial Community and Enzymatic Activity of Grasslands under Different Use Practices: A Review. *Agronomy*, 12(5), 1136.
- Meyer, S. L., Zasada, I. A., Rupprecht, S. M., VanGessel, M. J., Hooks, C. R., Morra, M. J., Everts, K. L. (2015). Mustard seed meal for management of root-knot nematode and weeds in tomato production. *HortTechnology*, 25(2), 192-202.
- Mitkowski, N. A., y Abawi, G. S. (2003). Root-knot nematodes. *The Plant Health Instructor*.
- Mkandawire, T. T., Grecis, R. K., Berriman, M., Duque-Correa, M. A. (2022). Hatching of parasitic nematode eggs: a crucial step determining infection. *Trends in Parasitology*, 38(2), 174-187.
- Mocali, S., Landi, S., Curto, G., Dallavalle, E., Infantino, A., Colzi, C., et al. (2015). Resilience of soil microbial and nematode communities after biofumigant treatment with defatted seed meals. *Industrial Crops and Products*, 75, 79-90.
- Moebius-Clune, B. N., Moebius-Clune, D. J., Gugino, B. K., Idowu, O., Schindelbeck, R., Rostow, A. et al. (2016). Comprehensive Assessment of Soil Health. *The Cornell Framework Manual* (3ra Ed.) (pp. 123). Cornell University, Nueva York.
- Molina, P. F. (2017). Efectos de la biosolarización a partir de diferentes enmiendas orgánicas sobre las propiedades físicas y químicas de suelos en invernaderos de pimienta del Campo de Cartagena. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Cartagena. 352pp.
- Momma, N. (2008). Biological soil disinfestation (BSD) of soilborne pathogens and its possible mechanisms. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 42(1), 7-12.
- Momma, N., Kobara, Y., Momma, M. (2011). Fe<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup>, potential agents to induce suppression of *Fusarium oxysporum* for biological soil disinfestation. *Journal of General Plant Pathology*, 77, 331-335.
- Momma, N., Kobara, Y., Uematsu, S., Kita, N., Shinmura, A. (2013). Development of biological soil disinfestations in Japan. *Applied microbiology and biotechnology*, 97, 3801-3809.
- Moosavi, M. R. (2020). Efficacy of Microbial Biocontrol Agents in Integration with Other Managing Methods against Phytoparasitic Nematodes. En Ansari, R., Rizvi, R., Mahmood, I. (Eds.). *Management of Phytonematodes: Recent Advances and Future Challenges*

- (229-258). Springer, Singapore.
- Mukherjee, A., Bhowmick, S., Yadav, S., Rashid, M. M., Chouhan, G. K., Vaishya, J. K., Verma, J. P. (2021). Re-vitalizing of endophytic microbes for soil health management and plant protection. *3 Biotech*, 11, 1-17.
- Muro, J., Irigoyen, I. Lamsfus, C. (1998). Acumulación de nitratos en hortalizas de hojas. *Avances En: Vega, J. M., Aparicio, P.J., Castillo, F., Maldonado, J. M. (Eds). Avances en el metabolismo del nitrógeno: de la fisiología a la biología molecular (pp. 453-464). IV Reunión Nacional, Marbella, 1997. Univ. Sevilla, Secretariado de publicaciones.*
- Mussatto, S. I., Dragone, G., Roberto, I. C. (2006). Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. *Journal of cereal science*, 43(1), 1-14.
- Nakkeeran, S., Rajamanickam, S., Saravanan, R., Vanthana, M., Soorianathasundaram, K. (2021). Bacterial endophytome-mediated resistance in banana for the management of Fusarium wilt. *Biotechnology*, 11(6), 267.
- Netscher, C., y Sikora, R. A. (1990). Nematode parasites of vegetables. En Luc, M., Sikora, R. A. Bridge J. (Eds.). *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture* (pp. 237-283). CABI Publishing, Wallingford,
- Ney, L., Franklin, D., Mahmud, K., Cabrera, M., Hancock, D., Habteselassie, M., et al. (2019). Rebuilding soil ecosystems for improved productivity in biosolarized soils. *International Journal of Agronomy*, 2019, 1-10.
- NRCS-USDA (2019). Soil Health. Natural Resources Conservation Service, U.S. Department of Agriculture. Washington, DC, EEUU. Disponible on-line: <https://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/main/soils/health/> (acceso en abril de 2023).
- NRCS-USDA (2021). Soil Health Management. Natural Resources Conservation Service, U.S. Department of Agriculture: Washington, DC, EEUU. Disponible on-line: <https://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/main/soils/health/mgmt/> (acceso en abril de 2023).
- Ntalli, N., Adamski, Z., Doula, M., Monokrousos, N. (2020). Nematicidal amendments and soil remediation. *Plants*, 9, 1-20.
- Núñez-Zofío, M., 2012. Evaluación de la biodesinfección para el control de *Phytophthora capsici* en el cultivo de pimiento de invernadero. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea. 332pp.
- Núñez-Zofío, M., Larregla, S., Garbisu, C. (2011). Application of organic amendments followed by soil plastic mulching reduces the incidence of *Phytophthora capsici* in pepper crops under temperate climate. *Crop Protection*, 30, 1563-1572.
- Núñez-Zofío, M., Larregla, S., Garbisu, C., Guerrero, M. M., Lacasa, C. M., Lacasa, A. (2013). Application of sugar beet vinasse followed by solarization reduces the incidence of *Meloidogyne incognita* in pepper crops while improving soil quality. *Phytoparasitica*, 41, 181-191.

- Oerke, E. C. (2006). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144(1), 31-43.
- Ojinaga, M., Gandariasbeitia, M., Orbegozo, E., Ortíz, A., Guerrero, M. M., Lacasa, C. M. et al. (2020). Biodisinfestation for *Meloidogyne* and *Verticillium* control in commercial protected crops in the Basque Country Atlantic area (Northern Spain). *Acta Horticulturae*, 1270, 327-336.
- Oka, Y. (2010). Mechanisms of nematode suppression by organic soil amendments-A review. *Applied Soil Ecology*, 44, 101-115.
- Oka, Y., Shapira, N., Fine, P. (2007). Control of root-knot nematodes in organic farming systems by organic amendments and soil solarization. *Crop Protection*, 26, 1556-1565.
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'hara, R. B., et al. (2013). Package 'vegan'. *Community ecology package*, version, 2(9), 1-295.
- Osman, N. S., Sapawe, N., Sapuan, M. A. U., Fozi, M. F. M., Azman, M. H. I. F., Fazry, A. H. Z. et al. (2018). Sunflower shell waste as an alternative animal feed. *Materials Today: Proceedings*, 5(10), 21905-21910.
- Özçimen, D., y Karaosmanoğlu, F. (2004). Production and characterization of bio-oil and biochar from rapeseed cake. *Renewable energy*, 29(5), 779-787.
- Pankhurst, C., Doube, B. M., Gupta, V. V. S. R. (1997). En Pankhurst, C., Doube, B. M., Gupta, V. V. S. R. (Eds.). *Biological indicators of soil health. Biological indicators of soil health: Synthesis* (pp. 419-435). Wallingford: CAB International, Eastbourne.
- Panth, M., Hassler, S. C., Baysal-Gurel, F. (2020). Methods for management of soilborne diseases in crop production. *Agriculture*, 10(1), 16.
- Pasquali, M., Dematheis, F., Gullino, M. L., Garibaldi, A. (2007). Identification of race 1 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* on lettuce by inter-retrotransposon sequence-characterized amplified region technique. *Phytopathology*, 97(8), 987-996.
- Pastrana, A. M., Shea, E. A., Fernandez-Bayo, J. D., Allison, B., Watson, D. C., Toniato, J., et al. (2022). Impact of biosolarization with almond hull and shell amendments for the control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* in a lettuce/tomato cropping system. *Crop Protection*, 156, 105925.
- Pepper, I. L. (2013). The soil health-human health nexus. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43(24), 2617-2652.
- Perea-Moreno, M. A., Manzano-Agugliaro, F., Perea-Moreno, A. J. (2018). Sustainable energy based on sunflower seed husk boiler for residential buildings. *Sustainability*, 10(10), 3407.
- Pfister, D. H., y Healy, R. (2021). Pezizomycetes. *Encyclopedia of Mycology*, 1.
- Pires, D., Vicente, C. S., Menéndez, E., Faria, J. M., Rusinque, L., Camacho, M. J., Inácio, M. L. (2022). The fight against plant-parasitic nematodes: Current status of bacterial and fungal biocontrol agents. *Pathogens*, 11(10), 1178.

- Qing, X., y Bert, W. (2019). Family Tylenchidae (Nematoda): an overview and perspectives. *Organisms Diversity & Evolution*, 19(3), 391-408.
- Rabenhorst, M. C. y Castenson, K. L. (2005). Temperature effects on iron reduction in a hydric soil. *Soil Science*, 170(9), 734-742.
- Raghu, S., Baite, M. S., Yadav, M. K., Prabhukarthikeyan, S. R., Keerthana, U., Pati, P. (2021). Biotic Stress Management by Microbial Interactions in Soils. En Soni, R., Suyal, D.C, Bhargava, P., Goel, R. (Eds.). *Microbiological Activity for Soil and Plant Health Management* (pp. 315-329). Springer, Singapur.
- Rai, A. K., Sunar, K., Sharma, H. (2021). Agriculturally Important Microorganism: Understanding the Functionality and Mechanisms for Sustainable Farming. En Soni, R., Suyal, D.C, Bhargava, P., Goel, R. (Eds.). *Microbiological Activity for Soil and Plant Health Management* (pp. 35-64). Springer, Singapur.
- Rajkumar, R. y Kurinjimalar, C. (2021). Microbes and plant mineral nutrition. *Microbiological Activity for Soil and Plant Health Management*, 111-132.
- Ramette, A. (2007). Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62, 142–160.
- Rana, A., Sahgal, M., Johri, B. N. (2017). *Fusarium oxysporum*. genomics, diversity and plant–host interaction. En Satyanarayana, T., Deshmukh, S. K., Johri, B. N., *Developments in fungal biology and applied mycology* (pp. 159-199). Springer, Singapore.
- Randall, T. E., Fernandez-Bayo, J. D., Harrold, D. R., Achmon, Y., Hestmark, K. V., Gordon, T. R., et al., (2020). Changes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* levels and soil microbial community during soil biosolarization using chitin as soil amendment. *PloS one*, 15(5), e0232662.
- Rawat, P., Das, S., Shankhdhar, D., Shankhdhar, S. C. (2021). Phosphate-solubilizing microorganisms: mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 21, 49-68.
- Real Decreto (RD) 1201/2002, de 20 de noviembre, por el que se regula la producción integrada de productos agrícolas.
- Reddy, K. R. y DeLaune, R. D. (2008). *Biogeochemistry of Wetlands: Science and Applications*; CRC Press: Boca Raton, Florida.
- Reeve, J. R., Hoagland, L. A., Villalba, J. J., Carr, P. M., Atucha, A., Cambardella, C., et al. (2016). Organic farming, soil health, and food quality: considering possible links. *Advances in Agronomy*, 137, 319-367.
- Reglamento (CE) N° 208/2006 de la Comisión, de 7 de febrero de 2006, por el que se modifican los anexos VI y VIII del Reglamento (CE) n° 1774/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, en lo que se refiere a las normas de transformación para las plantas de biogás y compostaje y las condiciones aplicables al estiércol.
- Reglamento (CE) N° 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de

- 2009, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios y por el que se derogan las Directivas 79/117/CEE y 91/414/CEE del Consejo.
- Reglamento (CE) N° 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios y sus posteriores modificaciones
- Reglamento (UE) N° 2018/848 del Parlamento Europeo y del Consejo de 30 de mayo de 2018 sobre producción ecológica y etiquetado de los productos ecológicos y por el que se deroga el Reglamento (CE) N° 834/2007 del Consejo.
- Reglamento (CE) N° 2092/91 del Consejo de 24 de junio de 1991 sobre la producción agrícola ecológica y su indicación en los productos agrarios y alimenticios.
- Reglamento (UE) 2021/2115 del Parlamento Europeo y del Consejo de 2 de diciembre de 2021 por el que se establecen normas en relación con la ayuda a los planes estratégicos que deben elaborar los Estados miembros en el marco de la política agrícola común (planes estratégicos de la PAC), financiada con cargo al Fondo Europeo Agrícola de Garantía (FEAGA) y al Fondo Europeo Agrícola de Desarrollo Rural (Feader), y por el que se derogan los Reglamentos (UE) N° 1305/2013 y (UE) N°1307/2013.
- Reglamento de Ejecución (UE) 2021/1165 de la Comisión de 15 de julio de 2021 por el que se autorizan determinados productos y sustancias para su uso en la producción ecológica y se establecen sus listas.
- Robertello, A., Angelini, L., Conte, L., Sciaraffia, F., Genevini, P. L., Pialorsi, S. (1984). Sunflower hulls as a component of feeds. *Agricultural Wastes*, 10(4), 257-266.
- Roskopf, E. N., Burelle, N., Hong, J., Butler, D.M., Noling, J. W., He, Z., Booker, B. Sances, F. (2014). Comparison of anaerobic soil disinfestation and drip-applied organic acids for raised-bed specialty crop production in Florida. *Acta Horticulturae*. 1044, 221-228
- Roskopf, E., Di Gioia, F., Hong, J.C., Pisani, C., Kokalis-Burelle, N. (2020). Organic amendments for pathogen and nematode control. *Annual Reviews in Phytopathology*, 58, 277-311.
- Ruiz-Altisent, M. y Gil Sierra, J. (2000). La maquinaria agrícola en el siglo XX. *Phytoma España*, 121, 49-53.
- Saavedra, G. (2017), Manual de producción de lechuga. Boletín INIA N° 09. Instituto de Desarrollo Agropecuario - Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Santiago, Chile. 150pp.
- Salimi F. y Hamed J. (2021). Biofertilizers: Microbes for Agricultural Productivity. En Yadav, A. N. (Ed.). *Soil Microbiomes for Sustainable Agriculture*, (pp407-470). Springer, Cham.
- Sasser, J.N. (1980). Root-knot nematodes: a global menace to crop production. *Plant Disease*, 64, 36- 41.
- Sayara, T., Basheer-Salimia, R., Hawamde, F., Sánchez, A. (2020). Recycling of organic wastes through composting: Process performance and compost application in agriculture. *Agronomy*, 10(11), 1838.

- Scaglia, B., y Adani, F. (2009). Biodegradability of soil water soluble organic carbon extracted from seven different soils. *Journal of Environmental Sciences*, 21(5), 641-646.
- Schlöter, M., Dilly, O., Munch, J. C. (2003). Indicators for evaluating soil quality. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 98(1-3), 255-262.
- Scortichini, M. (2022). Sustainable management of diseases in horticulture: Conventional and new options. *Horticulturae*, 8(6), 517.
- Scott, J. C., Gordon, T. R., Shaw, D. V., Koike, S. T. (2010a). Effect of temperature on severity of Fusarium wilt of lettuce caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. *Plant Disease*, 94, 13-17.
- Scott, J. C., Kirkpatrick, S. C., Gordon, T. R. (2010b). Variation in susceptibility of lettuce cultivars to Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. *Plant Pathology*, 59, 139-146.
- Scotti, R., Bonanomi, G., Scelza, R., Zoina, A., Rao, M. A. (2015). Organic amendments as sustainable tool to recovery fertility in intensive agricultural systems. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 15(2), 333-352.
- Seesao, Y., Gay, M., Merlin, S., Viscogliosi, E., Aliouat-Denis, C. M., Audebert, C. (2017). A review of methods for nematode identification. *Journal of Microbiological Methods*, 138, 37-49.
- Shaukat, R. A., Saqib, Q. M., Khan, M. U., Chougale, M. Y., Bae, J. (2021). Bio-waste sunflower husks powder based recycled triboelectric nanogenerator for energy harvesting. *Energy Reports*, 7, 724-731.
- Shea, E. A., Fernández-Bayo, J. D., Hodson, A. K., Parr, A. E., Lopez, E., Achmon, Y., et al. (2022). Biosolarization restructures soil bacterial communities and decreases parasitic nematode populations. *Applied Soil Ecology*, 172, 104343.
- Shennan, C., Muramoto, J., Bolda, M., Koike, S. T., Daugovish, O., et al. (2007). Optimizing anaerobic soil disinfestation: an alternative to soil fumigation. *En Proc. 2007 Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reduction* (pp. 40-1).
- Shennan, C., Muramoto, J., Koike, S., Baird, G., Fennimore, S., Samtani, J., et al. (2018). Anaerobic soil disinfestation is an alternative to soil fumigation for control of some soilborne pathogens in strawberry production. *Plant Pathology*, 67, 51-66.
- Shi, C., He, J., Yu, J., Yu, B., Huang, Z., et al. (2015). Solid state fermentation of rapeseed cake with *Aspergillus niger* for degrading glucosinolates and upgrading nutritional value. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6, 1-7.
- Shrestha, U., Ownley, B. H., Bruce, A., Roskopf, E. N., Butler, D. M. (2021a). Anaerobic soil disinfestation efficacy against *Fusarium oxysporum* is affected by soil temperature, amendment type, rate, and C:N ratio. *Phytopathology*, 111(8), 1380-1392.
- Shrestha, U., Swilling, K. J., Butler, D. M. (2021b). Amendment properties affect crop



- performance, leaf tissue nitrogen, and soil nitrogen availability following soil treatment by anaerobic soil disinfestation. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 694820.
- Shurtleff, M. y Averre, C. (2000). *Diagnostic plant diseases causes by nematodes*. St Paul, American Phytopathological Society APS PRESS.
- Siegel-Hertz, K., Edel-Hermann, V., Chapelle, E., Terrat, S., Raaijmakers, J. M., Steinberg, C. (2018) Comparative Microbiome Analysis of a Fusarium Wilt Suppressive Soil and a Fusarium Wilt Conducive Soil From the Châteaurenard Region. *Frontiers in Microbiology*, 9, 568.
- Sieriebriennikov, B., Ferris, H., de Goede, R.G.M., (2014). NINJA: an automated calculation system for nematode-based biological monitoring. *European Journal of Soil Biology*, 61, 90-93.
- Simmons, C. W., Higgins, B., Staley, S., Joh, L. D., Simmons, B. A., (2016). The role of organic matter amendment level on soil heating, organic acid accumulation, and development of bacterial communities in solarized soil. *Applied Soil Ecology*, 106, 37-46.
- Smelt, J. H., y Leistra, M. 1974. Conversion of metham-sodium to methyl isothiocyanate and basic data on the behaviour of methyl isothiocyanate in soil. *Pesticide Science* 5, 401–407.
- Sommermann L, Geistlinger J, Wibberg D, Deubel A, Zwanzig J, et al. (2018). Fungal community profiles in agricultural soils of a long-term field trial under different tillage, fertilization and crop rotation conditions analyzed by high-throughput ITS-amplicon sequencing. *PLoS ONE*, 13, e0195345.
- Sooriyaarachchi, N. D., Zakeel, M. C. M., Safeena, M. I. S., Abhayapala, K. M. R. D. (2021). Role of rhizosphere and endophytic microbes in alleviation of biotic and abiotic stress in plants. En Soni, R., Suyal, D.C, Bhargava, P., Goel, R. (Eds.). *Microbiological Activity for Soil and Plant Health Management* (pp. 195-236). Springer, Singapur.
- Stanley, D., Batacan Jr, R., Bajagai, Y. S. (2022). Rapid growth of antimicrobial resistance: the role of agriculture in the problem and the solutions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(21), 6953-6962.
- Stapleton, J. J. (2000). Soil solarization in various agricultural production systems. *Crop Protection*, 19, 837-841.
- Stirling, G. R., Nicol, J., Reay, F. (1999) Advisory services for nematode pests: operational guidelines. Rural Industries Research & Development Corporation, ACT, Australia. Disponible en: <http://nem atologists.org.au/aan-rirdc.pdf>.
- Stockdale, E. A., y Watson, C. A. (2009). Biological indicators of soil quality in organic farming systems. *Renewable agriculture and food systems*, 24(4), 308-318.
- Subbarao, G. V., Ito, O., Sahrawat, K. L., Berry, W. L., Nakahara, K., Ishikawa, T., et al. (2006). Scope and strategies for regulation of nitrification in agricultural systems—challenges and opportunities. *Critical reviews in plant sciences*, 25(4), 303-335.

- Suman, A., Govindasamy, V., Ramakrishnan, B., Aswini, K., SaiPrasad, J., Sharma, P., et al. (2022). Microbial Community and Function-Based Synthetic Bioinoculants: A Perspective for Sustainable Agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 12, 805498.
- Tagele, S. B., Kim, R. H., Shin, J. H. (2021). Interactions between Brassica biofumigants and soil microbiota: Causes and impacts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(39), 11538-11553.
- Talavera, M., Miranda, L., Gómez-Mora, J.A., Vela, M.D., Verdejo-Lucas, S. (2019). Nematode Management in the Strawberry Fields of Southern Spain. *Agronomy*, 9(5), 252.
- Taylor A. y Sasser, J. (1987). *Biología, Identificación y Control de los Nematodos de Nódulo de Raíz (especies de Meloidogyne),* Proyecto Internacional de *Meloidogyne* (111pp). State University Press, Carolina del Norte.
- Tiwari P., Bose S. K., Bae H. (2021) Plant growth-promoting soil microbiomes: beneficial attributes and potential applications. En Yadav, A. N. (Ed.). *Soil microbiomes for sustainable agriculture: functional annotation* (pp. 1-30). Springer, Cham.
- Tuomela M, Vikman M, Hatakka, A, Itävaara, M. (2000). Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology*, 72,169-183.
- Treonis, M., Austin, E. E., Buyer, J. S., Maul, J. E., Spicera, L., Zasada, I. A. (2010). Effects of organic amendment and tillage on soil microorganisms and microfauna. *Applied Soil Ecology*, 46, 103-110.
- Treseder, K. K., Kivlin, S. N., Hawkes, C. V. (2011). Evolutionary trade-offs among decomposers determine responses to nitrogen enrichment. *Ecology Letters*, 14, 933-938.
- Tzortzakakis, E. A. (2010). The correlation of root galling with eggs in root and juveniles in soil of root knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) infecting greenhouse vegetables. *Nematologia Mediterranea*. 38, 99-101.
- Ueki, A., Kaku, N., Ueki, K. (2018). Role of anaerobic bacteria in biological soil disinfestation for elimination of soil-borne plant pathogens in agriculture. *Applied microbiology and biotechnology*, 102, 6309-6318.
- Urra Ibáñez de Sendadiano, J. (2020). Beneficios y riesgos de la aplicación de enmiendas orgánicas sobre la salud de suelos agrícolas. Tesis Doctoral. Euskal Herriko Unibertsitatea/Universidad del País Vasco, 343pp.
- USEPA (2007). United States Environmental Protection Agency. Framework for Metals Risk Assessment. Office of the Science Advisor: Washington, DC, EPA 120/R-07/001.
- Uysal, G., Söğüt, M. A., Elekçioğlu, I. H. (2017). Identification and distribution of root-knot nematode species (*Meloidogyne* spp.) in vegetable growing areas of Lakes Region in Turkey. *Turkish Journal of Entomology*, 41(1), 105-122.
- Valdés, A. (2015). Contenido de nitratos en lechuga (*Lactuca sativa* L.) cultivada en la 3ª Zona de Riego del Río Mendoza. Tesis doctoral. Mendoza: Universidad Nacional de Cuyo. Facultad de Ciencias Agrarias.

- Van Bruggen, A. H. y Semenov, A. M. (2000). In search of biological indicators for soil health and disease suppression. *Applied Soil Ecology*, 15(1), 13-24.
- Vance, E. D., Brookes, P. C., Jenkinson, D. S. (1987). An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil biology and Biochemistry*, 19(6), 703-707.
- Waisen, P., Cheng, Z., Sipes, B. S., DeFrank, J., Marahatta, S. P., Wang, K. H. (2020). Effects of biofumigant crop termination methods on suppression of plant-parasitic nematodes. *Applied Soil Ecology*, 154, 103595.
- Walker, B. A., Powell, S. M., Tegg, R. S., Doyle, R. B., Hunt, I. G., Wilson, C. R. (2022). Soil microbial community dynamics during ryegrass green manuring and brassica biofumigation. *Applied Soil Ecology*, 179, 104600.
- Walters, W., Hyde, E.R., Berg-Lyons, D., Ackermann, G., Humphrey, G., (2015). Improved Bacterial 16S rRNA Gene (V4 and V4-5) and Fungal Internal Transcribed Spacer Marker Gene Primers for Microbial Community Surveys. *mSystems*, 1, e00009–e00015.
- Wang, K.H. y McSorley, R. (2008). Exposure time to lethal temperatures for *Meloidogyne incognita* suppression and its implication for soil solarisation. *Journal of Nematology*. 40(1): 7-12.
- Wang, Y., Wang, L., Suo, M., Qiu, Z., Wu, H., Zhao, M., Yang, H. (2022a). Regulating root fungal community using *Mortierella alpina* for *Fusarium oxysporum* resistance in *Panax ginseng*. *Frontiers in Microbiology*, 13.
- Wang, F., Wang, F., Zhang, H., Qin, F., Xiang, et al. (2022b). Deciphering differences in microbial community composition and multifunctionality between healthy and *Alternaria solani*-infected potato rhizosphere soils. *Plant and Soil*, 1-16.
- Wang, R., Zhang, H., Sun, L., Qi, G., Chen, S., Zhao, X. (2017). Microbial community composition is related to soil biological and chemical properties and bacterial wilt outbreak. *Scientific Reports*, 7(1), 1-10.
- Wei, G., Tingxing, H., Jingyan, W., Yuanbo, G., Hua, R. (2008). Soil carbon pool and fertility under natural evergreen broadleaved forest and its artificial regeneration forests in southern Sichuan Province, China. *Acta Ecologica Sinica* 28, 2536-2545
- Wu, X., Liu, P., Wegner, C. E., Luo, Y., Xiao, K. Q., Cui, Z., et al. (2021). Deciphering microbial mechanisms underlying soil organic carbon storage in a wheat-maize rotation system. *Science of The Total Environment*, 788, 147798.
- Yan, Y., Wu, R., Li, S., Su, Z., Shao, Q., et al. (2022). Reductive Soil Disinfestation Enhances Microbial Network Complexity and Function in Intensively Cropped Greenhouse Soil. *Horticulturae*, 8, 476.
- Yang, X., Jin, H., Xu, L., Cui, H., Xin, A., Liu, H., Qin, B. (2020a). Diversity and functions of endophytic fungi associated with roots and leaves of *Stipa purpurea* in an alpine steppe at qinghai-Tibet plateau. *Journal of Microbiology and Biotechnoloy*, 30(7), 1027-1036.
- Yang, T., Siddique, K. H., Liu, K. (2020b). Cropping systems in agriculture and their impact on

soil health-A review. *Global Ecology and Conservation*, 23, e01118.

- Yang, H., Zhang, H., Qiu, H., Anning, D. K., Li, M., Wang, Y., Zhang, C. (2021). Effects of C/N Ratio on Lignocellulose Degradation and Enzyme Activities in Aerobic Composting. *Horticulturae*, 7(11), 482.
- Yang, X., Gil, M. I., Yang, Q., Tomás-Barberán, F. A. (2022). Bioactive compounds in lettuce: Highlighting the benefits to human health and impacts of preharvest and postharvest practices. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(1), 4-45.
- Yanlong, C., Kejian, Y., Yin, Y., Yuhan, Z., Huizi, M., Cui, L., et al. (2021). Reductive soil disinfestation attenuates antibiotic resistance genes in greenhouse vegetable soils. *Journal of Hazardous Materials*, 420, 126632.
- Yeates, G. W., Bongers, T., De Goede, R. G. M., Freckman, D. W., Georgieva, S.S. (1993). Feeding Habits in Soil Nematode Families and Genera-An Outline for Soil Ecologists. *Journal of Nematology* 25, 315-331.
- Yuan, J., Wen, T., Zhang, H., Zhao, M., Penton, C. R., Thomashow, L. S., Shen, Q. (2020). Predicting disease occurrence with high accuracy based on soil macroecological patterns of Fusarium wilt. *The ISME Journal*, 14(12), 2936-2950.
- Zhang, J., Gu, T., Zhou, Y., He, J., Zheng, L. Q., et al. (2012). *Terrimonas rubra* sp. nov., isolated from a polluted farmland soil and emended description of the genus *Terrimonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(11), 2593-2597.
- Zhao, J., Liu, S., Zhou, X., Xia, Q., Liu, X., et al. (2020). Reductive soil disinfestation incorporated with organic residue combination significantly improves soil microbial activity and functional diversity than sole residue incorporation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 7573-7588.



# Anexos

## Anexo 1.1. Abundancia relativa de nematodos

**Tabla A.2** | Datos promedio de abundancia de nematodos del Capítulo 5.

TIEMPO TRATAMIENTO	T1 C	T1 BD	T2 C	T2 BD	T3 C	T3 BD	T4 C	T4 BD
Rhabditidae (Ba-1)	6.91	3.95	8.73	19.69	20.96	66.94	25.85	48.15
Panagrolaimidae (Ba-1)	0.34	1.12	15.48	15.69	0.00	0.00	3.56	3.13
Monhysteridae (Ba-2)	0.00	0.00	1.22	0.00	0.00	0.00	0.00	13.82
Cephalobidae (Ba-2)	11.45	17.59	22.63	35.75	18.33	31.57	29.76	22.85
Plectidae (Ba-2)	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.79	0.00
Prismatolaimidae (Ba-3)	0.00	0.43	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Aphelenchoididae (Fu-2)	0.35	0.12	0.00	0.00	4.03	0.00	9.59	6.25
Aphelenchidae (Fu-2)	15.99	9.11	20.25	5.99	9.36	1.16	1.40	3.43
Tylenchidae (He-2e)	15.19	14.45	10.07	6.99	22.18	0.33	14.97	0.82
Pratylenchidae (He-3b)	0.26	0.26	0.00	0.00	6.62	0.00	3.12	1.56
Telotylenchidae (He-3d)	0.18	0.00	0.00	0.54	4.67	0.00	5.38	0.00
Meloidogyne (He-3a)	49.26	52.88	21.61	15.34	13.32	0.00	5.57	0.00
Tripylidae (Pr-3i)	0.00	0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Mononchidae (Pr-4i)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.55	0.00	0.00	0.00

**Tabla A.3** | Datos promedio de abundancia de nematodos del Capítulo 6.

TIEMPO TRATAMIENTO	T1 M1	T1 M2	T1 M3	T1 M4	T2 M1	T2 M2	T2 M3	T2 M4	T3 M1	T3 M2	T3 M3	T3 M4
Rhabditidae (Ba-1)	15.76	10.17	27.16	14.86	30.16	70.93	67.49	28.85	2.90	8.90	5.70	4.54
Panagrolaimidae (Ba-1)	1.03	2.55	1.27	2.91	4.28	6.72	0.00	6.80	56.36	56.42	50.79	36.81
Cephalobidae (Ba-2)	16.64	22.98	26.47	22.35	21.70	11.29	16.15	17.80	21.28	25.24	20.21	20.47
Plectidae (Ba-2)	0.00	0.00	1.69	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Aphelenchoididae (Fu-2)	0.00	0.00	1.21	3.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.43	2.96	0.00
Aphelenchidae (Fu-2)	16.10	9.83	7.61	11.90	36.09	7.86	10.98	28.95	5.76	6.66	17.51	30.81
Tylenchidae (He-2e)	10.68	3.67	3.66	4.65	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Paratylenchidae (He-2d)	1.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Telotylenchidae (He-3d)	8.60	5.66	6.02	7.03	5.21	3.20	5.38	5.04	0.00	0.00	1.12	2.95
Hoplolaimidae (He-3c)	22.19	38.40	15.22	27.68	2.57	0.00	0.00	5.15	0.00	0.00	1.71	2.95
Pratylenchidae (He-3b)	3.77	3.46	3.02	1.57	0.00	0.00	0.00	4.86	13.71	1.35	0.00	1.47
Meloidogyne (He-3a)	4.20	3.29	6.68	3.71	0.00	0.00	0.00	2.55	0.00	0.00	0.00	0.00

**Tabla A.4 |** Datos promedio de abundancia de nematodos del Capítulo 8.

TIEMPO TRATAMIENTO	T1 BD	T1 BDC	T1 C	T1 CC	T2 BD	T2 BDC	T2 C	T2 CC	T3 BD	T3 BDC	T3 C	T3 CC
Rhabditidae (Ba-1)	9.26	16.06	16.45	21.20	1.71	0.24	4.73	3.32	12.53	1.70	26.24	12.82
Diploscapteridae (Ba-1)	0.00	0.00	0.00	0.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Panagrolaimidae (Ba-1)	0.00	0.37	0.65	0.65	0.00	0.00	0.00	0.23	0.00	0.00	0.00	0.00
Cephalobidae (Ba-2)	9.01	13.47	10.84	9.43	74.22	75.59	10.32	7.20	46.31	34.37	5.78	6.29
Plectidae (Ba-2)	1.76	0.00	0.00	0.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Prismatolaimidae (Ba-3)	1.25	0.19	0.22	0.22	0.00	0.00	0.21	0.00	1.41	0.22	0.22	0.43
Aphelenchoididae (Fu-2)	0.46	0.41	0.22	0.22	0.23	1.38	0.47	0.84	0.00	0.00	0.00	0.00
Aphelenchidae (Fu-2)	8.28	13.12	13.10	9.40	3.55	1.44	20.16	11.43	0.45	2.22	7.38	2.41
Tylenchidae (He-2e)	35.95	24.00	18.68	15.49	8.99	8.24	20.97	22.28	30.36	59.05	15.90	63.19
Paratylenchidae (He-2d)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.36	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Telotylenchidae (He-3d)	12.75	11.86	26.78	20.15	0.00	1.16	35.27	23.77	3.45	2.01	28.14	7.94
Hoplolaimidae (He-3c)	16.15	14.71	8.84	16.71	10.83	2.29	6.57	30.91	1.83	0.22	5.72	3.45
Pratylenchidae (He-3b)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.22	0.00	0.00
Meloidogye (He-3a)	0.95	3.97	3.75	4.16	0.00	0.36	1.07	0.00	3.44	0.00	9.95	3.22
Tripylidae (Pr-3i)	0.53	0.19	0.00	0.64	0.00	0.58	0.00	0.00	0.23	0.00	0.68	0.00
Discolaimidae (Pr-4p)	0.26	0.00	0.00	0.45	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Mononchidae (Pr-4i)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.23	7.73	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Mylonchulidae (Pr-4i)	0.00	0.42	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Dorylaimidae (Om-4p)	3.39	1.24	0.46	0.87	0.23	0.62	0.23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.23

## Anexo 1.2. Abundancia relativa de bacterias

**Tabla A.5** | Datos promedio de abundancia de OTU 16S (bacterias) del Capítulo 6.

TIEMPO TRATAMIENTO	T1 M1	T1 M2	T1 M3	T1 M4	T2 M1	T2 M2	T2 M3	T2 M4
Acidobacteria_D2.Acidobacteriia_D3.Solibacterales_D4.Solibacteraceae(Subgroup3)	0.01	0.01	0.00	0.00	0.11	0.20	0.06	0.03
Acidobacteria_D2.Acidobacteriia_D3.Solibacterales_D4.Solibacteraceae(Subgroup3)_D5.Bryobacter	1.79	1.65	1.94	2.26	1.79	1.35	1.45	1.14
Acidobacteria_D2.Acidobacteriia_D3.Solibacterales_D4.Solibacteraceae(Subgroup3)_D5.Candidatus Solibacter	0.24	0.19	0.24	0.24	0.36	0.30	0.33	0.24
Acidobacteria_D2.Acidobacteriia_D3.Solibacterales_D4.Solibacteraceae(Subgroup3)_D5.PAUC26f	0.28	0.31	0.33	0.35	0.08	0.05	0.08	0.06
Acidobacteria_D2.Blastocatellia(Subgroup4)_D3.Blastocatellales_D4.Blastocatellaceae	0.05	0.08	0.10	0.07	0.05	0.06	0.04	0.05
Acidobacteria_D2.Blastocatellia(Subgroup4)_D3.Blastocatellales_D4.Blastocatellaceae_D5.Stenotrophobacter	0.28	0.20	0.23	0.25	0.26	0.24	0.21	0.25
Acidobacteria_D2.Blastocatellia(Subgroup4)_D3.Blastocatellales_D4.Blastocatellaceae_D5.uncultured	0.79	0.63	0.73	0.74	0.46	0.44	0.40	0.41
Acidobacteria_D2.Blastocatellia(Subgroup4)_D3.Pyrinomonadales_D4.Pyrinomonadaceae_D5.RB41	0.90	1.30	1.27	1.24	0.16	0.39	0.28	0.29
Acidobacteria_D2.Holophagae_D3.Subgroup7.	1.02	1.48	1.85	1.86	0.80	0.78	0.94	1.05
Acidobacteria_D2.Subgroup11.	0.10	0.12	0.09	0.11	0.01	0.02	0.02	0.02
Acidobacteria_D2.Subgroup17.	0.17	0.22	0.21	0.26	0.04	0.02	0.05	0.05
Acidobacteria_D2.Subgroup22.	0.31	0.32	0.34	0.40	0.14	0.10	0.17	0.15
Acidobacteria_D2.Subgroup25_D3.uncultured bacterium	0.09	0.08	0.10	0.09	0.02	0.01	0.03	0.02
Acidobacteria_D2.Subgroup5.	0.96	1.11	1.19	1.12	0.38	0.33	0.43	0.30
Acidobacteria_D2.Subgroup6	11.95	12.54	10.08	13.49	6.28	5.41	5.04	4.82
Acidobacteria_D2.Subgroup6_D3.metagenome_D4.metagenome_D5.metagenome	0.19	0.12	0.12	0.23	0.07	0.06	0.04	0.07
Acidobacteria_D2.Subgroup6_D3.uncultured microorganism	0.79	1.12	0.93	0.77	0.36	0.40	0.38	0.29
Acidobacteria_D2.Subgroup6_D3.uncultured Saccharibacillus sp.	0.70	0.59	0.54	0.61	0.26	0.18	0.12	0.18
Acidobacteria_D2.Subgroup6_D3.unidentified	0.52	0.58	0.48	0.77	0.17	0.19	0.16	0.21
Acidobacteria_D2.Subgroup6_D3.Unknown Order_D4.Unknown Family_D5.Luteitalea	0.04	0.07	0.05	0.03	0.10	0.11	0.09	0.11
Acidobacteria_D2.Subgroup6_D3.Unknown Order_D4.Unknown Family_D5.Vicinamibacter	0.14	0.13	0.14	0.14	0.07	0.20	0.11	0.12
Acidobacteria_D2.Subgroup9.	0.23	0.30	0.26	0.28	0.03	0.04	0.08	0.04
Acidobacteria_D2.Thermoanaerobaculia_D3.Thermoanaerobaculales_D4.Thermoanaerobaculaceae_D5.Subgroup10	0.99	1.41	1.60	1.31	0.91	0.49	1.22	0.44
Actinobacteria_D2.Acidimicrobiia_D3.Actinomarinales_D4.uncultured	0.27	0.19	0.19	0.25	0.13	0.12	0.13	0.16
Actinobacteria_D2.Actinobacteria_D3.Corynebacteriales_D4.Nocardiaceae_D5.Rhodococcus	0.11	0.10	0.09	0.06	0.50	1.45	0.21	1.25
Actinobacteria_D2.Actinobacteria_D3.Micrococcales_D4.Intrasporangiaceae	0.19	0.15	0.19	0.15	0.19	0.14	0.16	0.18
Actinobacteria_D2.Actinobacteria_D3.Micrococcales_D4.Intrasporangiaceae_D5.Intrasporangium	0.06	0.04	0.04	0.04	0.12	0.07	0.09	0.14
Actinobacteria_D2.Actinobacteria_D3.Micrococcales_D4.Microbacteriaceae_D5.Agromyces	0.21	0.17	0.16	0.17	0.23	0.17	0.26	0.30
Actinobacteria_D2.Actinobacteria_D3.Micrococcales_D4.Micrococcaceae	0.83	0.68	1.37	0.56	0.80	0.39	0.28	1.27
Actinobacteria_D2.Actinobacteria_D3.Micrococcales_D4.Micrococcaceae_D5.Paenarthrobacter	0.21	0.18	0.31	0.17	0.08	0.04	0.04	0.19
Actinobacteria_D2.Actinobacteria_D3.Micromonosporales_D4.Micromonosporaceae	0.02	0.02	0.01	0.02	0.46	0.10	0.90	0.99



TIEMPO TRATAMIENTO	T1 M1	T1 M2	T1 M3	T1 M4	T2 M1	T2 M2	T2 M3	T2 M4
Actinobacteria_D2.Actinobacteria_D3.Micromonosporales_D4.Micromonosporaceae_D5.Micromonospora	0.01	0.01	0.01	0.01	0.13	0.01	0.19	0.24
Actinobacteria_D2.Actinobacteria_D3.Micromonosporales_D4.Micromonosporaceae_D5.uncultured	0.04	0.02	0.03	0.03	0.09	0.07	0.07	0.06
Actinobacteria_D2.Actinobacteria_D3.Propionibacteriales_D4.Nocardiodaceae_D5.Kribbella	0.09	0.07	0.05	0.09	0.03	0.03	0.02	0.04
Actinobacteria_D2.Actinobacteria_D3.Propionibacteriales_D4.Nocardiodaceae_D5.Marmoricola	0.27	0.31	0.35	0.27	0.49	0.25	0.45	0.63
Actinobacteria_D2.Actinobacteria_D3.Propionibacteriales_D4.Nocardiodaceae_D5.Nocardioides	0.38	0.34	0.28	0.36	0.14	0.13	0.12	0.69
Actinobacteria_D2.Actinobacteria_D3.Streptomycetales_D4.Streptomycetaceae_D5.Streptomyces	0.26	0.28	0.23	0.15	2.07	2.72	2.43	4.94
Actinobacteria_D2.Actinobacteria_D3.Streptosporangiales_D4.Thermomonosporaceae_D5.Actinomadura	0.01	0.01	0.00	0.01	0.12	0.11	0.11	0.11
Actinobacteria_D2.MB-A2-108_Ambiguoustaxa_Ambiguoustaxa_Ambiguoustaxa	0.17	0.11	0.12	0.13	0.10	0.07	0.09	0.09
Actinobacteria_D2.Thermoleophilia_D3.Gaiellales_D4.Gaiellaceae_D5.Gaiella	0.25	0.24	0.22	0.24	0.14	0.13	0.13	0.17
Actinobacteria_D2.Thermoleophilia_D3.Gaiellales_D4.uncultured	0.15	0.12	0.13	0.13	0.08	0.08	0.07	0.08
Actinobacteria_D2.Thermoleophilia_D3.Solirubrobacterales_D4.67-14	0.11	0.07	0.08	0.08	0.06	0.03	0.06	0.06
Armatimonadetes_D2.Chthonomonadetes_D3.Chthonomonadales_D4.Chthonomonadaceae_D5.Chthonomonas	0.06	0.11	0.09	0.10	0.05	0.08	0.05	0.04
Armatimonadetes_D2.Chthonomonadetes_D3.Chthonomonadales_D4.uncultured bacterium	0.10	0.36	0.18	0.27	0.00	0.02	0.01	0.02
Armatimonadetes_D2.uncultured_Ambiguoustaxa_Ambiguoustaxa_Ambiguoustaxa	0.11	0.07	0.06	0.13	0.02	0.04	0.01	0.02
Armatimonadetes_D2.uncultured_D3.uncultured bacterium_	0.27	0.26	0.26	0.31	0.22	0.22	0.19	0.12
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Bacteroidales_D4.BacteroidetesvadinHA17	0.00	0.00	0.00	0.00	2.45	0.89	3.79	2.10
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Bacteroidales_D4.Dysgonomonadaceae_D5.Fermentimonas	0.00	0.00	0.00	0.00	0.83	0.13	0.93	0.76
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Bacteroidales_D4.Dysgonomonadaceae_D5.Petrimonas	0.00	0.00	0.00	0.00	0.77	0.12	1.20	0.68
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Bacteroidales_D4.Dysgonomonadaceae_D5.Proteiniphilum	0.00	0.00	0.00	0.00	0.31	0.08	0.55	0.65
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Bacteroidales_D4.Marinilabiliaceae_D5.Ruminofilibacter	0.00	0.00	0.00	0.00	1.06	0.24	2.33	1.46
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Bacteroidales_D4.SB-5_D5.uncultured bacterium	0.00	0.00	0.00	0.00	1.94	0.49	2.26	1.07
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Chitinophagales_D4.Chitinophagaceae	0.78	0.90	1.20	0.98	0.24	0.44	0.28	0.31
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Chitinophagales_D4.Chitinophagaceae_D5.Chitinophaga	0.05	0.03	0.04	0.04	0.03	0.18	0.00	0.04
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Chitinophagales_D4.Chitinophagaceae_D5.Flavihumibacter	0.10	0.16	0.13	0.09	0.12	0.14	0.17	0.10
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Chitinophagales_D4.Chitinophagaceae_D5.Flavisolibacter	0.19	0.26	0.28	0.13	2.10	0.92	1.72	0.96
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Chitinophagales_D4.Chitinophagaceae_D5.Flavitalea	0.12	0.10	0.11	0.12	0.65	0.72	0.32	0.39
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Chitinophagales_D4.Chitinophagaceae_D5.Niastella	0.40	0.33	0.43	0.46	1.13	1.97	0.88	0.95
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Chitinophagales_D4.Chitinophagaceae_D5.Parasegetibacter	0.00	0.00	0.01	0.00	0.22	0.10	0.08	0.17
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Chitinophagales_D4.Chitinophagaceae_D5.Terrimonas	1.26	1.44	2.10	1.49	0.91	1.72	1.44	1.46
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Chitinophagales_D4.Chitinophagaceae_D5.uncultured	0.79	0.80	0.87	0.77	0.54	0.96	1.04	0.47
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Chitinophagales_D4.Saprosiraceae_D5.uncultured	0.48	0.65	0.76	0.82	0.16	0.11	0.14	0.19
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Cytophagales_D4.Cyclobacteriaceae_D5.Imperialibacter	0.00	0.00	0.00	0.00	0.31	0.12	0.21	0.11
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Cytophagales_D4.Hymenobacteraceae_D5.Adhaeribacter	0.24	0.13	0.14	0.19	0.09	0.05	0.09	0.07
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Cytophagales_D4.Microscillaceae	1.22	1.00	0.89	1.31	0.37	0.21	0.19	0.23
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Cytophagales_D4.Microscillaceae_D5.Chryseolinea	0.25	0.12	0.16	0.29	1.07	2.35	0.89	0.83
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Cytophagales_D4.Microscillaceae_D5.Ohtaekwangia	0.05	0.04	0.04	0.10	0.12	0.35	0.13	0.23

TIEMPO TRATAMIENTO	T1 M1	T1 M2	T1 M3	T1 M4	T2 M1	T2 M2	T2 M3	T2 M4
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Cytophagales_D4.Microscillaceae_D5.uncultured	1.51	1.19	1.14	1.30	1.33	2.20	1.07	1.38
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Flavobacteriales_D4.Flavobacteriaceae_D5.Flavobacterium	0.60	0.21	0.52	0.55	0.02	0.02	0.03	0.01
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Sphingobacteriales_D4.AKYH767_D5.uncultured bacterium	0.11	0.15	0.29	0.18	0.03	0.03	0.04	0.03
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Sphingobacteriales_D4.Sphingobacteriaceae_D5.Solitalea	0.20	0.08	0.07	0.07	0.01	0.01	0.00	0.00
Bacteroidetes_D2.Ignavibacteria_D3.SJA-28_D4.uncultured bacterium	0.32	0.48	0.47	0.61	0.05	0.10	0.14	0.14
Bacteroidetes_D2.Rhodothermia_D3.Rhodothermales_D4.Rhodothermaceae_D5.uncultured	0.00	0.01	0.01	0.00	4.91	1.42	2.23	1.35
Chloroflexi_D2.Anaerolineae_D3.Anaerolineales_D4.Anaerolineaceae	0.11	0.12	0.09	0.16	0.56	0.39	0.55	0.43
Chloroflexi_D2.Anaerolineae_D3.Anaerolineales_D4.Anaerolineaceae_D5.Anaerolinea	0.00	0.00	0.00	0.00	0.99	0.41	0.81	0.66
Chloroflexi_D2.Anaerolineae_D3.Anaerolineales_D4.Anaerolineaceae_D5.uncultured	0.10	0.12	0.15	0.15	2.47	2.08	2.07	1.50
Chloroflexi_D2.Anaerolineae_D3.Anaerolineales_D4.Anaerolineaceae_D5.UTCFX1	1.67	1.59	1.92	1.99	1.59	1.83	1.78	1.82
Chloroflexi_D2.Anaerolineae_D3.Ardenticatenales_D4.uncultured	0.04	0.01	0.06	0.04	0.03	0.11	0.06	0.07
Chloroflexi_D2.Anaerolineae_D3.Ardenticatenales_D4.uncultured_D5.uncultured bacterium	0.13	0.14	0.19	0.15	0.07	0.09	0.09	0.12
Chloroflexi_D2.Anaerolineae_D3.Ardenticatenales_D4.uncultured_D5.uncultured Litorilinea sp.	0.10	0.18	0.20	0.16	0.04	0.12	0.06	0.10
Chloroflexi_D2.Anaerolineae_D3.Caldilineales_D4.Caldilineaceae_D5.Litorilinea	0.10	0.11	0.12	0.06	0.03	0.06	0.05	0.04
Chloroflexi_D2.Anaerolineae_D3.Caldilineales_D4.Caldilineaceae_D5.uncultured	0.05	0.02	0.03	0.05	0.07	0.06	0.06	0.07
Chloroflexi_D2.Anaerolineae_D3.RBG-13-54-9_D4.uncultured bacterium	0.08	0.07	0.07	0.08	0.04	0.02	0.03	0.03
Chloroflexi_D2.Anaerolineae_D3.SBR1031.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.37	0.36	0.57	0.52
Chloroflexi_D2.Anaerolineae_D3.SBR1031_Ambiguoustaxa_Ambiguoustaxa	0.00	0.01	0.01	0.01	1.57	1.18	1.19	0.91
Chloroflexi_D2.Anaerolineae_D3.SBR1031_D4.A4b	0.11	0.17	0.24	0.20	0.21	0.58	0.40	0.55
Chloroflexi_D2.Anaerolineae_D3.SBR1031_D4.A4b_D5.uncultured bacterium	1.11	1.24	1.71	1.43	1.23	2.69	1.67	1.55
Chloroflexi_D2.Anaerolineae_D3.SBR1031_D4.A4b_D5.uncultured Caldilineales bacterium	0.07	0.08	0.09	0.12	0.04	0.03	0.03	0.04
Chloroflexi_D2.Anaerolineae_D3.SBR1031_D4.A4b_D5.uncultured sludg ebacteriumS14	0.15	0.12	0.14	0.21	0.04	0.02	0.02	0.05
Chloroflexi_D2.Anaerolineae_D3.SBR1031_D4.A4b_D5.uncultured soilbacterium	0.13	0.07	0.10	0.14	0.04	0.03	0.01	0.04
Chloroflexi_D2.Anaerolineae_D3.SBR1031_D4.uncultured bacterium	0.13	0.13	0.19	0.14	0.21	0.24	0.19	0.18
Chloroflexi_D2.Anaerolineae_D3.SBR1031_D4.uncultured Gemmatimonadetes bacterium	0.12	0.13	0.15	0.13	0.03	0.05	0.05	0.05
Chloroflexi_D2.Chloroflexia_D3.Chloroflexiales_D4.Roseiflexaceae_D5.uncultured	0.18	0.16	0.21	0.18	0.08	0.19	0.08	0.18
Chloroflexi_D2.Chloroflexia_D3.Thermomicrobiales_D4.AKYG1722_D5.uncultured bacterium	0.08	0.08	0.06	0.06	0.05	0.05	0.04	0.04
Chloroflexi_D2.Chloroflexia_D3.Thermomicrobiales_D4.JG30-KF-CM45	0.20	0.12	0.13	0.14	0.08	0.10	0.05	0.10
Chloroflexi_D2.KD4-96_Ambiguoustaxa_Ambiguoustaxa_Ambiguoustaxa	0.08	0.08	0.03	0.06	0.03	0.04	0.03	0.05
Chloroflexi_D2.Ktedonobacteria_D3.C0119_D4.uncultured bacterium	0.10	0.10	0.07	0.08	0.02	0.02	0.03	0.02
Chloroflexi_D2.Ktedonobacteria_D3.C0119_D4.uncultured soilbacterium	0.22	0.13	0.17	0.15	0.28	0.24	0.19	0.19
Entotheonellaota_D2.Entotheonellia_D3.Entotheonellales_D4.Entotheonellaceae_D5.uncultured bacterium	0.82	0.81	0.75	0.87	0.18	0.19	0.21	0.18
Firmicutes_D2.Bacilli_D3.Bacillales.	0.02	0.05	0.06	0.03	0.11	0.05	0.27	0.04
Firmicutes_D2.Bacilli_D3.Bacillales_D4.Bacillaceae_D5.Bacillus	1.46	1.32	1.39	1.43	2.10	1.58	3.66	1.32
Firmicutes_D2.Bacilli_D3.Bacillales_D4.Bacillaceae_D5.Fictibacillus	0.06	0.07	0.05	0.09	1.70	0.28	1.07	0.31
Firmicutes_D2.Bacilli_D3.Bacillales_D4.Paenibacillaceae_D5.Paenibacillus	0.05	0.04	0.07	0.06	0.57	0.10	0.63	0.31

TIEMPO TRATAMIENTO	T1 M1	T1 M2	T1 M3	T1 M4	T2 M1	T2 M2	T2 M3	T2 M4
Firmicutes_D2.Bacilli_D3.Bacillales_D4.Planococcaceae_D5.Lysinibacillus	0.06	0.05	0.05	0.06	0.07	0.03	0.07	0.02
Firmicutes_D2.Bacilli_D3.Bacillales_D4.Planococcaceae_D5.Paenisporsarcina	0.00	0.00	0.00	0.00	0.16	0.03	0.13	0.10
Firmicutes_D2.Bacilli_D3.Bacillales_D4.Planococcaceae_D5.Psychrobacillus	0.00	0.00	0.00	0.00	0.32	0.00	0.50	0.23
Firmicutes_D2.Bacilli_D3.Bacillales_D4.Planococcaceae_D5.Solibacillus	0.03	0.04	0.03	0.02	0.15	0.03	0.29	0.15
Firmicutes_D2.Clostridia_D3.Clostridiales_D4.Clostridiaceae1_D5.Clostridiumsensustricto1	0.10	0.05	0.05	0.09	0.19	0.13	0.31	0.22
Firmicutes_D2.Clostridia_D3.Clostridiales_D4.FamilyXI_D5.Sedimentibacter	0.01	0.01	0.02	0.01	0.11	0.02	0.14	0.14
Firmicutes_D2.Clostridia_D3.Clostridiales_D4.Heliobacteriaceae_D5.Hydrogenispora	0.04	0.03	0.03	0.04	0.44	0.10	0.84	0.36
Firmicutes_D2.Clostridia_D3.Clostridiales_D4.Peptostreptococcaceae_D5.Paeniclostridium	0.04	0.02	0.03	0.03	0.24	0.10	0.33	0.23
Firmicutes_D2.Clostridia_D3.Clostridiales_D4.Peptostreptococcaceae_D5.Romboutsia	0.12	0.09	0.09	0.12	0.34	0.18	0.46	0.38
Firmicutes_D2.Erysipelotrichia_D3.Erysipelotrichales_D4.Erysipelotrichaceae_D5.Turicibacter	0.08	0.08	0.06	0.08	0.18	0.10	0.23	0.17
Gemmatimonadetes_D2.AKAU4049_Ambiguoustaxa_Ambiguoustaxa_Ambiguoustaxa	0.54	0.48	0.48	0.65	0.56	0.38	0.51	0.44
Gemmatimonadetes_D2.BD2-11terrestrialgroup_D3.uncultured soil bacterium	0.12	0.06	0.09	0.16	0.08	0.06	0.07	0.08
Gemmatimonadetes_D2.Gemmatimonadetes_D3.Gemmatimonadales_D4.Gemmatimonadaceae	0.73	0.57	0.79	0.84	0.31	0.38	0.33	0.35
Gemmatimonadetes_D2.Gemmatimonadetes_D3.Gemmatimonadales_D4.Gemmatimonadaceae_D5.Gemmatimonas	0.22	0.18	0.17	0.20	0.17	0.22	0.14	0.19
Gemmatimonadetes_D2.Gemmatimonadetes_D3.Gemmatimonadales_D4.Gemmatimonadaceae_D5.uncultured	2.09	1.72	1.92	2.18	0.95	1.16	0.91	1.11
Gemmatimonadetes_D2.Longimicrobia_D3.Longimicrobiales_D4.Longimicrobiaceae_D5.uncultured bacterium	0.04	0.03	0.04	0.04	0.50	0.42	0.31	0.31
Gemmatimonadetes_D2.S0134terrestrialgroup.	0.04	0.03	0.05	0.03	0.11	0.20	0.09	0.13
Gemmatimonadetes_D2.S0134terrestrialgroup_D3.uncultured Gemmatimonadales bacterium	0.11	0.10	0.10	0.07	0.11	0.12	0.09	0.07
Gemmatimonadetes_D2.S0134terrestrialgroup_D3.uncultured bacterium	0.06	0.06	0.06	0.04	0.10	0.12	0.10	0.08
Gemmatimonadetes_D2.S0134terrestrialgroup_D3.uncultured Gemmatimonadetes bacterium	0.10	0.06	0.09	0.10	0.15	0.17	0.19	0.18
Latescibacteria..	0.32	0.35	0.36	0.40	0.09	0.11	0.12	0.10
Latescibacteria_Ambiguoustaxa_Ambiguoustaxa_Ambiguoustaxa_Ambiguoustaxa	0.15	0.19	0.14	0.18	0.06	0.07	0.05	0.06
Latescibacteria_D2.uncultured Acidobacteriumsp.	0.07	0.10	0.10	0.13	0.01	0.02	0.02	0.02
Latescibacteria_D2.uncultured bacterium	0.43	0.50	0.40	0.52	0.07	0.11	0.15	0.11
Latescibacteria_D2.uncultured soil bacterium	0.34	0.45	0.29	0.38	0.05	0.11	0.15	0.09
Latescibacteria_D2.uncultured soil bacteriumPBS-III-30	0.06	0.08	0.10	0.09	0.02	0.05	0.06	0.05
Nitrospirae_D2.Nitrospira_D3.Nitrospirales_D4.Nitrospiraceae_D5.Nitrospira	0.66	0.60	0.69	0.80	0.29	0.38	0.29	0.27
Planctomycetes_D2.OM190.	0.06	0.07	0.07	0.07	0.02	0.05	0.06	0.05
Planctomycetes_D2.OM190_D3.uncultured bacterium	0.56	0.57	0.58	0.59	0.31	0.38	0.29	0.25
Planctomycetes_D2.Phycisphaerae_D3.CCM11a_D4.groundwater metagenome	0.14	0.16	0.16	0.11	0.05	0.05	0.07	0.04
Planctomycetes_D2.Phycisphaerae_D3.Phycisphaerales_D4.Phycisphaeraceae_D5.AKYG587	0.40	0.47	0.50	0.51	0.13	0.14	0.18	0.12
Planctomycetes_D2.Phycisphaerae_D3.Tepidisphaerales_D4.WD2101soilgroup	0.32	0.35	0.24	0.33	0.15	0.18	0.13	0.12
Planctomycetes_D2.Phycisphaerae_D3.Tepidisphaerales_D4.WD2101soilgroup_D5.uncultured bacterium	1.11	1.08	1.07	1.31	0.51	0.37	0.40	0.44
Planctomycetes_D2.Phycisphaerae_D3.Tepidisphaerales_D4.WD2101soilgroup_D5.uncultured planctomycete	0.42	0.38	0.36	0.54	0.18	0.13	0.09	0.13
Planctomycetes_D2.Planctomycetacia_D3.Gemmatales_D4.Gemmataceae_D5.Gemmata	0.14	0.12	0.10	0.18	0.16	0.15	0.12	0.14
Planctomycetes_D2.Planctomycetacia_D3.Gemmatales_D4.Gemmataceae_D5.uncultured	0.57	0.60	0.48	0.59	0.27	0.33	0.29	0.25

TIEMPO TRATAMIENTO	T1 M1	T1 M2	T1 M3	T1 M4	T2 M1	T2 M2	T2 M3	T2 M4
Planctomycetes_D2.Planctomycetacia_D3.Pirellulales_D4.Pirellulaceae_D5.Blastopirellula	0.08	0.05	0.08	0.10	0.06	0.04	0.06	0.06
Planctomycetes_D2.Planctomycetacia_D3.Pirellulales_D4.Pirellulaceae_D5.Pir4lineage	1.17	0.87	0.95	1.08	0.61	0.46	0.62	0.67
Planctomycetes_D2.Planctomycetacia_D3.Pirellulales_D4.Pirellulaceae_D5.Pirellula	0.88	0.70	0.82	0.94	0.22	0.37	0.27	0.34
Planctomycetes_D2.Planctomycetacia_D3.Pirellulales_D4.Pirellulaceae_D5.Rhodopirellula	0.07	0.06	0.10	0.09	0.03	0.03	0.04	0.03
Planctomycetes_D2.Planctomycetacia_D3.Pirellulales_D4.Pirellulaceae_D5.uncultured	0.58	0.57	0.51	0.59	0.37	0.39	0.34	0.43
Planctomycetes_D2.Planctomycetacia_D3.Planctomycetales_D4.Rubinisphaeraceae_D5.SH-PL14	0.20	0.20	0.21	0.23	0.05	0.03	0.05	0.07
Planctomycetes_D2.Planctomycetacia_D3.Planctomycetales_D4.uncultured_D5.uncultured bacterium	0.25	0.20	0.17	0.29	0.24	0.21	0.20	0.20
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Acetobacterales_D4.Acetobacteraceae_D5.Roseomonas	0.00	0.01	0.00	0.00	0.20	0.06	0.20	0.12
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Azospirillales_D4.Azospirillaceae_D5.Skermanella	0.06	0.03	0.04	0.03	0.06	0.06	0.08	0.05
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Azospirillales_D4.uncultured_D5.uncultured bacterium	0.17	0.13	0.19	0.20	0.07	0.06	0.07	0.06
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Caulobacterales_D4.Caulobacteraceae_D5.Phenylobacterium	0.05	0.04	0.04	0.06	0.26	0.15	0.28	0.15
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Caulobacterales_D4.Hyphomonadaceae_D5.Hirschia	0.12	0.13	0.14	0.14	0.01	0.01	0.01	0.02
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Caulobacterales_D4.Hyphomonadaceae_D5.SWB02	0.60	0.48	0.54	0.61	0.28	0.42	0.26	0.34
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Dongiiales_D4.Dongiaceae_D5.Dongia	0.71	0.60	0.67	0.73	0.21	0.85	0.27	0.48
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Amb-16S-1323_D5.uncultured bacterium	0.17	0.12	0.11	0.13	0.06	0.06	0.08	0.07
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Beijerinckiaceae_D5.Microvirga	0.02	0.02	0.04	0.02	0.41	0.24	0.27	0.24
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Devosiaceae	0.04	0.03	0.04	0.03	0.09	0.15	0.10	0.20
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Hyphomicrobiaceae	0.02	0.02	0.02	0.02	0.09	0.15	0.08	0.07
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Hyphomicrobiaceae_D5.Hyphomicrobium	0.10	0.09	0.11	0.10	0.43	0.47	0.42	0.39
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Hyphomicrobiaceae_D5.Pedomicrobium	0.93	0.81	0.76	0.82	0.37	0.37	0.37	0.43
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.KF-JG30-B3	0.49	0.40	0.48	0.57	0.10	0.11	0.07	0.10
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Methyloligellaceae_D5.uncultured	0.61	0.56	0.66	0.64	0.38	0.33	0.41	0.43
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Rhizobiaceae	0.04	0.04	0.04	0.03	0.07	0.12	0.08	0.16
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Rhizobiaceae_D5.Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium	0.29	0.37	0.38	0.20	0.55	0.74	0.51	1.11
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Rhizobiaceae_D5.Ensifer	0.38	0.16	0.14	0.08	0.02	0.09	0.00	0.07
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Rhizobiaceae_D5.Mesorhizobium	0.19	0.14	0.17	0.18	0.08	0.10	0.06	0.21
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.RhizobialesIncertaeSedis_D5.Bauldia	0.15	0.15	0.17	0.18	0.05	0.04	0.05	0.08
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.RhizobialesIncertaeSedis_D5.Nordella	0.13	0.13	0.22	0.15	0.06	0.11	0.10	0.08
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Rhodomicrobiaceae_D5.Rhodomicrobium	1.08	0.61	0.77	0.98	0.39	0.28	0.39	0.48
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Xanthobacteraceae	0.11	0.08	0.09	0.09	0.35	0.33	0.30	0.39
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Xanthobacteraceae_D5.Bradyrhizobium	0.12	0.07	0.07	0.10	0.01	0.02	0.02	0.02
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Xanthobacteraceae_D5.Pseudolabrys	0.27	0.29	0.32	0.29	0.27	0.23	0.30	0.31
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Xanthobacteraceae_D5.Rhodoplanes	0.12	0.08	0.11	0.09	0.03	0.04	0.04	0.04
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Xanthobacteraceae_D5.uncultured	0.31	0.29	0.31	0.32	0.12	0.11	0.12	0.17
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhodospirillales_D4.uncultured_D5.uncultured Rhodospirillaceae bacterium	0.03	0.01	0.01	0.01	0.15	0.05	0.10	0.11
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Sneathiellales_D4.Sneathiellaceae_D5.Ferrovibrio	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.14	0.11	0.13

TIEMPO TRATAMIENTO	T1 M1	T1 M2	T1 M3	T1 M4	T2 M1	T2 M2	T2 M3	T2 M4
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Sphingomonadales_D4.Sphingomonadaceae_D5.Altererythrobacter	0.20	0.17	0.18	0.26	0.44	0.31	0.33	0.31
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Sphingomonadales_D4.Sphingomonadaceae_D5.Ellin6055	0.02	0.03	0.03	0.04	0.06	0.10	0.08	0.07
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Sphingomonadales_D4.Sphingomonadaceae_D5.Novosphingobium	0.07	0.07	0.11	0.08	0.05	0.05	0.04	0.04
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Sphingomonadales_D4.Sphingomonadaceae_D5.Rhizorhapis	0.58	0.59	0.60	0.73	0.05	0.04	0.04	0.06
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Sphingomonadales_D4.Sphingomonadaceae_D5.Sphingobium	0.14	0.09	0.09	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Sphingomonadales_D4.Sphingomonadaceae_D5.Sphingomonas	1.21	1.10	1.45	1.03	0.72	1.10	0.86	0.87
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Tistrellales_D4.Geminicoccaceae_D5.uncultured	0.07	0.07	0.06	0.07	0.03	0.02	0.04	0.05
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.uncultured.	0.66	0.53	0.58	0.69	0.34	0.48	0.35	0.41
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.uncultured_D4.uncultured Acetobacteraceae bacterium	0.03	0.03	0.02	0.02	0.21	0.16	0.15	0.15
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.uncultured_D4.uncultured bacterium	0.10	0.09	0.11	0.11	0.16	0.13	0.13	0.11
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.uncultured_D4.uncultured Rhodospirillaceae bacterium	0.27	0.25	0.25	0.29	0.13	0.12	0.14	0.10
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.uncultured_D4.uncultured Stella sp.	0.09	0.06	0.09	0.07	0.08	0.10	0.10	0.12
Proteobacteria_D2.Deltaproteobacteria.	0.92	0.90	0.89	0.97	0.20	0.36	0.34	0.33
Proteobacteria_D2.Deltaproteobacteria_D3.Desulfarculales_D4.Desulfarculaceae_D5.uncultured	0.33	0.34	0.40	0.37	0.14	0.19	0.21	0.13
Proteobacteria_D2.Deltaproteobacteria_D3.Myxococcales.	0.04	0.04	0.04	0.02	0.11	0.15	0.15	0.11
Proteobacteria_D2.Deltaproteobacteria_D3.Myxococcales_D4.Archangiaceae_D5.Anaeromyxobacter	0.01	0.00	0.00	0.00	0.16	0.11	0.14	0.11
Proteobacteria_D2.Deltaproteobacteria_D3.Myxococcales_D4.bacteriap25	0.89	0.91	0.88	0.97	0.49	0.54	0.54	0.47
Proteobacteria_D2.Deltaproteobacteria_D3.Myxococcales_D4.bacteriap25_D5.metagenome	0.43	0.36	0.36	0.34	0.18	0.14	0.18	0.14
Proteobacteria_D2.Deltaproteobacteria_D3.Myxococcales_D4.bacteriap25_D5.uncultured soil bacterium	0.20	0.28	0.24	0.16	0.01	0.03	0.05	0.03
Proteobacteria_D2.Deltaproteobacteria_D3.Myxococcales_D4.Haliangiaceae_D5.Haliangium	0.07	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.04	0.05
Proteobacteria_D2.Deltaproteobacteria_D3.NB1-j.	0.69	0.60	0.71	0.76	0.19	0.17	0.27	0.24
Proteobacteria_D2.Deltaproteobacteria_D3.NB1-j_D4.uncultured Myxococcalesbacterium_	0.09	0.07	0.06	0.10	0.04	0.03	0.05	0.04
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.B1-7BS_D5.uncultured bacterium	0.14	0.12	0.12	0.13	0.03	0.04	0.04	0.03
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.Burkholderiaceae	0.79	0.61	0.65	0.61	0.41	0.25	0.25	0.37
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.Burkholderiaceae_D5.Cupriavidus	0.50	1.11	1.52	0.06	0.05	1.28	0.07	0.23
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.Burkholderiaceae_D5.Hydrogenophaga	0.06	0.02	0.10	0.04	1.26	0.22	0.92	1.77
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.Burkholderiaceae_D5.Limnobacter	0.03	0.01	0.02	0.02	0.26	0.10	0.23	0.20
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.Burkholderiaceae_D5.Massilia	0.07	0.06	0.30	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.Burkholderiaceae_D5.Noviherbaspirillum	0.01	0.01	0.07	0.01	0.14	0.03	0.09	0.07
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.Burkholderiaceae_D5.Ramlibacter	0.03	0.03	0.09	0.00	1.02	0.64	0.73	0.91
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.Burkholderiaceae_D5.Variovorax	0.50	0.43	0.42	0.33	0.09	0.03	0.02	0.23
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.Nitrosomonadaceae_D5.IS-44	0.04	0.05	0.10	0.06	0.03	0.08	0.03	0.07
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.Nitrosomonadaceae_D5.mle1-7	0.27	0.26	0.35	0.25	0.16	0.16	0.17	0.15
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.Nitrosomonadaceae_D5.MND1	0.73	0.78	0.81	0.81	0.45	0.52	0.48	0.49
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.Rhodocyclaceae_D5.Thaueria	0.00	0.00	0.00	0.00	0.17	0.10	0.26	0.39
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.SC-I-84	0.47	0.46	0.42	0.42	0.22	0.26	0.21	0.23

TIEMPO TRATAMIENTO	T1 M1	T1 M2	T1 M3	T1 M4	T2 M1	T2 M2	T2 M3	T2 M4
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.TRA3-20	0.41	0.43	0.49	0.49	0.27	0.44	0.29	0.27
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.CCD24.	0.43	0.49	0.40	0.44	0.48	0.50	0.45	0.41
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Diplorickettsiales_D4.Diplorickettsiaceae_D5.Aquicella	0.19	0.08	0.21	0.24	0.02	0.03	0.04	0.06
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Diplorickettsiales_D4.Diplorickettsiaceae_D5.uncultured	0.13	0.08	0.14	0.08	0.01	0.01	0.01	0.01
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Enterobacteriales_D4.Enterobacteriaceae_D5.Pantoea	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.50	0.00	0.00
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Gammaproteobacteria Incertae Sedis_D4.UnknownFamily_D5.Acidibacter	0.75	0.60	0.61	0.75	0.71	1.05	0.55	0.59
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.KI89Aclade_D4.uncultured bacterium	0.08	0.08	0.08	0.06	0.10	0.16	0.13	0.09
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Methylococcales_D4.Methylococcaceae_D5.Methylocaldum	0.02	0.01	0.01	0.01	0.08	0.04	0.12	0.13
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Methylococcales_D4.Methylomonaceae_D5.Methylobacter	0.00	0.00	0.00	0.00	0.18	0.07	0.10	0.23
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.PLTA13.	0.07	0.10	0.11	0.09	0.01	0.03	0.03	0.02
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.PLTA13_Ambiguoustaxa_Ambiguoustaxa	0.90	0.72	0.62	0.89	0.17	0.19	0.11	0.14
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Pseudomonadales_D4.Moraxellaceae_D5.Acinetobacter	2.42	4.90	3.34	0.00	0.08	0.10	0.01	0.18
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Pseudomonadales_D4.Pseudomonadaceae_D5.Azotobacter	2.55	4.21	0.00	0.71	0.00	0.02	0.01	3.02
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Pseudomonadales_D4.Pseudomonadaceae_D5.Pseudomonas	1.35	1.00	1.20	0.48	8.12	15.70	7.05	7.55
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.R7C24_D4.uncultured bacterium_D5.uncultured bacterium	0.02	0.01	0.01	0.02	0.33	0.26	0.21	0.43
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Steroidobacteriales_D4.Steroidobacteraceae_D5.Steroidobacter	1.19	1.07	0.97	1.01	1.10	1.72	1.02	1.05
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Steroidobacteriales_D4.Steroidobacteraceae_D5.uncultured	0.53	0.45	0.46	0.54	0.29	0.26	0.37	0.23
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Steroidobacteriales_D4.Woeseiaceae_D5.JTB255marinebenthic group	0.11	0.07	0.10	0.11	0.04	0.04	0.04	0.02
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Steroidobacteriales_D4.Woeseiaceae_D5.Woeseia	0.19	0.10	0.07	0.14	0.03	0.02	0.01	0.02
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Xanthomonadales_D4.Xanthomonadaceae	0.00	0.00	0.04	0.00	0.09	0.15	0.11	0.10
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Xanthomonadales_D4.Xanthomonadaceae_D5.Arenimonas	0.06	0.05	0.05	0.10	0.03	0.02	0.02	0.06
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Xanthomonadales_D4.Xanthomonadaceae_D5.Luteimonas	0.49	0.15	0.34	0.58	0.53	0.52	0.39	0.83
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Xanthomonadales_D4.Xanthomonadaceae_D5.Lysobacter	3.96	3.13	3.12	2.75	0.83	1.50	1.04	1.55
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Xanthomonadales_D4.Xanthomonadaceae_D5.Pseudoxanthomonas	0.17	0.04	0.11	0.09	0.20	0.24	0.08	0.27
Rokubacteria_D2.NC10_D3.Rokubacteriales.	0.40	0.50	0.51	0.49	0.14	0.13	0.23	0.13
Rokubacteria_D2.NC10_D3.Rokubacteriales_Ambiguoustaxa	0.39	0.36	0.41	0.47	0.17	0.15	0.19	0.14
Rokubacteria_D2.NC10_D3.Rokubacteriales_D4.uncultured bacterium	0.46	0.49	0.47	0.54	0.09	0.10	0.13	0.12
Spirochaetes_D2.Spirochaetia_D3.Spirochaetales_D4.Spirochaetaceae_D5.Spirochaeta2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.56	0.12	0.92	0.56
Verrucomicrobia_D2.Verrucomicrobiae_D3.Chthoniobacteriales_D4.Chthoniobacteraceae_D5.CandidatusUdaeobacter	0.16	0.13	0.12	0.15	0.01	0.03	0.01	0.03
Verrucomicrobia_D2.Verrucomicrobiae_D3.Pedosphaerales_D4.Pedosphaeraceae	0.23	0.28	0.24	0.25	0.13	0.29	0.08	0.12
Verrucomicrobia_D2.Verrucomicrobiae_D3.Pedosphaerales_D4.Pedosphaeraceae_D5.uncultured bacterium	0.09	0.16	0.17	0.13	0.04	0.03	0.06	0.04
Verrucomicrobia_D2.Verrucomicrobiae_D3.Pedosphaerales_D4.Pedosphaeraceae_D5.uncultured Pedosphaera sp.	0.08	0.09	0.09	0.05	0.04	0.16	0.04	0.05
Verrucomicrobia_D2.Verrucomicrobiae_D3.Pedosphaerales_D4.Pedosphaeraceae_D5.uncultured soil bacterium	0.12	0.10	0.09	0.13	0.05	0.16	0.05	0.09
Verrucomicrobia_D2.Verrucomicrobiae_D3.Pedosphaerales_D4.Pedosphaeraceae_D5.uncultured Verrucomicrobia bacterium	0.04	0.35	0.30	0.12	0.00	0.08	0.06	0.07
WS2_D2.uncultured bacterium	0.10	0.30	0.27	0.27	0.01	0.01	0.01	0.02

**Tabla A.5 |** Datos promedio de abundancia de OTUs 16S (bacterias) del Capítulo 7.

TRATAMIENTO	C	CA	CB	MA	MB
Acidobacteria_D2.Acidobacteriia_D3.Solibacterales_D4.Solibacteraceae(Subgroup3)	0.10	0.15	0.09	0.16	0.15
Acidobacteria_D2.Acidobacteriia_D3.Solibacterales_D4.Solibacteraceae(Subgroup3)_D5.Bryobacter	0.40	0.61	0.52	0.62	0.57
Acidobacteria_D2.Acidobacteriia_D3.Solibacterales_D4.Solibacteraceae(Subgroup3)_D5.CandidatusSolibacter	0.20	0.21	0.18	0.18	0.21
Acidobacteria_D2.Blastocatellia(Subgroup4)_D3.11-24	0.47	0.42	0.62	0.52	0.61
Acidobacteria_D2.Blastocatellia(Subgroup4)_D3.Blastocatellales_D4.Blastocatellaceae_D5.uncultured	0.45	0.40	0.40	0.42	0.50
Acidobacteria_D2.Blastocatellia(Subgroup4)_D3.Pyrinomonadales_D4.Pyrinomonadaceae_D5.RB41	1.04	1.13	1.20	1.10	1.29
Acidobacteria_D2.Holophagae_D3.Subgroup7	1.35	1.28	1.76	1.67	1.60
Acidobacteria_D2.Holophagae_D3.Subgroup7_D4.uncultured Desulfovirga sp.	0.71	0.85	0.91	0.95	1.01
Acidobacteria_D2.Holophagae_D3.Subgroup7_D4.uncultured proteobacterium	0.14	0.11	0.18	0.12	0.17
Acidobacteria_D2.Subgroup11_D3.uncultured bacterium	0.57	0.70	0.63	0.73	0.86
Acidobacteria_D2.Subgroup17	1.21	1.07	0.91	0.81	1.03
Acidobacteria_D2.Subgroup22	1.35	1.36	1.31	1.47	1.37
Acidobacteria_D2.Subgroup22_D3.uncultured Holophaga sp.	0.26	0.33	0.30	0.38	0.41
Acidobacteria_D2.Subgroup22_D3.uncultured proteobacterium	0.16	0.13	0.08	0.13	0.15
Acidobacteria_D2.Subgroup5	0.75	0.88	1.08	1.14	1.29
Acidobacteria_D2.Subgroup6	14.95	15.60	16.32	17.88	16.95
Acidobacteria_D2.Subgroup6_D3.unculturedGeothrixsp._D4.unculturedGeothrixsp._D5.uncultured Geothrixsp.	0.24	0.23	0.13	0.17	0.12
Acidobacteria_D2.Subgroup6_D3.unculturedHolophagasp._D4.unculturedHolophagasp._D5.uncultured Holophaga sp.	0.15	0.10	0.18	0.29	0.19
Acidobacteria_D2.Subgroup6_D3.uncultured microorganism	0.11	0.21	0.12	0.21	0.15
Acidobacteria_D2.Subgroup6_D3.unidentified	0.28	0.23	0.26	0.29	0.24
Acidobacteria_D2.Thermoanaerobaculia_D3.Thermoanaerobaculales_D4.Thermoanaerobaculaceae_D5.Subgroup10	0.42	0.50	0.57	0.53	0.44
Actinobacteria_D2.Actinobacteria_D3.Micrococcales_D4.Micrococcaceae	0.22	0.24	0.18	0.19	0.21
Actinobacteria_D2.Actinobacteria_D3.Propionibacteriales_D4.Nocardiodaceae_D5.Kribbella	0.11	0.14	0.13	0.10	0.10
Actinobacteria_D2.Actinobacteria_D3.Streptomycetales_D4.Streptomycetaceae_D5.Streptomyces	0.12	0.23	0.07	0.61	0.37
Actinobacteria_D2.MB-A2-108	0.15	0.22	0.20	0.12	0.13
Actinobacteria_D2.MB-A2-108_Ambiguoustaxa_Ambiguoustaxa_Ambiguoustaxa	0.14	0.17	0.11	0.08	0.12
Actinobacteria_D2.Thermoleophilia_D3.Gaiellales_D4.Gaiellaceae_D5.Gaiella	0.53	0.61	0.41	0.28	0.35
Actinobacteria_D2.Thermoleophilia_D3.Gaiellales_D4.uncultured	0.47	0.63	0.53	0.33	0.34
Actinobacteria_D2.Thermoleophilia_D3.Gaiellales_D4.uncultured_D5.uncultured microorganism	0.17	0.25	0.12	0.11	0.16

TRATAMIENTO	C	CA	CB	MA	MB
Armatimonadetes_D2.Fimbriimonadia_D3.Fimbriimonadales_D4.Fimbriimonadaceae	0.37	0.38	0.35	0.50	0.41
Armatimonadetes_D2.Fimbriimonadia_D3.Fimbriimonadales_D4.Fimbriimonadaceae_D5.uncultured bacterium	0.10	0.08	0.13	0.16	0.12
Armatimonadetes_D2.uncultured_D3.metagenome_D4.metagenome_D5.metagenome	0.09	0.12	0.11	0.15	0.17
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Chitinophagales_D4.Chitinophagaceae	3.39	3.12	2.70	3.27	3.54
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Chitinophagales_D4.Chitinophagaceae_D5.Ferruginibacter	0.30	0.30	0.17	0.27	0.29
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Chitinophagales_D4.Chitinophagaceae_D5.Flavisolibacter	0.89	1.13	1.09	1.27	1.11
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Chitinophagales_D4.Chitinophagaceae_D5.Flavitalea	0.66	0.48	0.49	0.63	0.60
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Chitinophagales_D4.Chitinophagaceae_D5.Niastella	0.42	0.51	0.36	0.36	0.31
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Chitinophagales_D4.Chitinophagaceae_D5.Terrimonas	1.88	1.26	1.31	1.51	1.41
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Chitinophagales_D4.Chitinophagaceae_D5.uncultured	0.84	0.91	0.89	0.85	0.88
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Chitinophagales_D4.Saprospiraceae_D5.uncultured	0.85	0.56	0.60	0.82	0.78
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Cytophagales_D4.Hymenobacteraceae_D5.Adhaeribacter	0.22	0.22	0.19	0.21	0.17
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Cytophagales_D4.Microscillaceae	1.26	1.38	1.21	1.33	1.12
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Cytophagales_D4.Microscillaceae_D5.uncultured	0.36	0.41	0.36	0.40	0.37
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Flavobacteriales_D4.Flavobacteriaceae_D5.Flavobacterium	0.24	0.21	0.24	0.25	0.32
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Sphingobacteriales_D4.AKYH767_D5.uncultured bacterium	0.26	0.14	0.22	0.21	0.18
Chloroflexi_D2.Anaerolineae_D3.Anaerolineales_D4.Anaerolineaceae_D5.uncultured	0.09	0.07	0.12	0.14	0.18
Chloroflexi_D2.Anaerolineae_D3.Anaerolineales_D4.Anaerolineaceae_D5.UTCFX1	0.41	0.34	0.44	0.38	0.47
Chloroflexi_D2.Anaerolineae_D3.SBR1031	0.13	0.26	0.10	0.15	0.14
Chloroflexi_D2.Anaerolineae_D3.SBR1031_D4.A4b	0.19	0.19	0.15	0.16	0.26
Chloroflexi_D2.Chloroflexia_D3.Chloroflexales_D4.Roseiflexaceae_D5.uncultured	0.12	0.13	0.14	0.07	0.14
Chloroflexi_D2.KD4-96	0.18	0.19	0.20	0.11	0.13
Entotheonellaeota_D2.Entotheonellia_D3.Entotheonellales_D4.Entotheonellaceae	0.35	0.44	0.38	0.45	0.43
Firmicutes_D2.Bacilli_D3.Bacillales_D4.Bacillaceae_D5.Bacillus	0.13	0.28	0.20	0.59	0.62
Gemmatimonadetes_D2.AKAU4049_Ambiguoustaxa_Ambiguoustaxa_Ambiguoustaxa	0.27	0.33	0.26	0.28	0.26
Gemmatimonadetes_D2.Gemmatimonadetes_D3.Gemmatimonadales_D4.Gemmatimonadaceae	0.37	0.40	0.37	0.27	0.38
Gemmatimonadetes_D2.Gemmatimonadetes_D3.Gemmatimonadales_D4.Gemmatimonadaceae_D5.Gemmatimonas	0.46	0.52	0.43	0.36	0.48
Gemmatimonadetes_D2.Gemmatimonadetes_D3.Gemmatimonadales_D4.Gemmatimonadaceae_D5.Gemmatirosa	0.18	0.18	0.20	0.15	0.19
Gemmatimonadetes_D2.Gemmatimonadetes_D3.Gemmatimonadales_D4.Gemmatimonadaceae_D5.uncultured	1.73	1.85	1.70	1.84	2.01
Latescibacteria	2.83	2.70	3.06	2.83	2.88



TRATAMIENTO	C	CA	CB	MA	MB
Latescibacteria_Ambiguoustaxa_Ambiguoustaxa_Ambiguoustaxa_Ambiguoustaxa	0.33	0.34	0.38	0.27	0.38
Latescibacteria_D2.Latescibacteria_D3.Latescibacterales_D4.Latescibacteraceae_D5.metagenome	0.24	0.18	0.16	0.19	0.18
Latescibacteria_D2.uncultured Acidobacterium sp	0.73	0.68	0.74	0.74	0.56
Latescibacteria_D2.uncultured Fibrobacteres bacterium	0.12	0.09	0.17	0.11	0.12
Latescibacteria_D2.uncultured soil bacterium	0.48	0.37	0.42	0.51	0.46
Latescibacteria_D2.uncultured bacterium	0.36	0.42	0.36	0.39	0.43
Latescibacteria_D2.uncultured prokaryote	0.16	0.12	0.14	0.11	0.13
Nitrospirae_D2.Nitrospira_D3.Nitrospirales_D4.Nitrospiraceae_D5.Nitrospira	1.17	0.90	1.10	1.05	1.14
Planctomycetes_D2.OM190	0.60	0.72	0.59	0.56	0.56
Planctomycetes_D2.OM190_D3.uncultured bacterium	0.25	0.25	0.27	0.17	0.19
Planctomycetes_D2.Phycisphaerae_D3.Phycisphaerales_D4.Phycisphaeraceae_D5.AKYG587	0.19	0.24	0.18	0.21	0.25
Planctomycetes_D2.Phycisphaerae_D3.Tepidisphaerales_D4.WD2101soilgroup	1.34	1.70	1.49	1.41	1.36
Planctomycetes_D2.Phycisphaerae_D3.Tepidisphaerales_D4.WD2101soilgroup_D5.uncultured bacterium	0.67	0.72	0.60	0.75	0.58
Planctomycetes_D2.Phycisphaerae_D3.Tepidisphaerales_D4.WD2101soilgroup_D5.uncultured planctomycete	0.17	0.24	0.25	0.23	0.22
Planctomycetes_D2.Pla3lineage	0.12	0.09	0.10	0.11	0.17
Planctomycetes_D2.Planctomycetacia_D3.Gemmatales_D4.Gemmataceae_D5.uncultured	0.30	0.26	0.30	0.27	0.34
Planctomycetes_D2.Planctomycetacia_D3.Gemmatales_D4.Gemmataceae_D5.Zavarzinella	0.22	0.23	0.09	0.12	0.15
Planctomycetes_D2.Planctomycetacia_D3.Pirellulales_D4.Pirellulaceae_D5.Pir4lineage	0.48	0.51	0.45	0.34	0.44
Planctomycetes_D2.Planctomycetacia_D3.Pirellulales_D4.Pirellulaceae_D5.Pirellula	0.91	0.98	0.86	0.71	0.94
Planctomycetes_D2.Planctomycetacia_D3.Pirellulales_D4.Pirellulaceae_D5.uncultured	0.46	0.43	0.45	0.42	0.46
Planctomycetes_D2.Planctomycetacia_D3.Planctomycetales_D4.Rubinisphaeraceae_D5.SH-PL14	0.23	0.12	0.23	0.18	0.17
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria	0.11	0.18	0.19	0.18	0.14
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Caulobacterales_D4.Caulobacteraceae_D5.Phenylobacterium	0.31	0.21	0.11	0.16	0.07
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Dongiiales_D4.Dongiaceae_D5.Dongia	1.44	1.72	1.59	1.20	1.58
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Reyranellales_D4.Reyranellaceae_D5.Reyranella	0.57	0.68	0.40	0.44	0.44
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Beijerinckiaceae_D5.Microvirga	0.21	0.26	0.15	0.18	0.28
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Hyphomicrobiaceae_D5.Pedomicrobium	0.83	1.05	0.82	0.61	0.64
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.KF-JG30-B3	0.52	0.57	0.58	0.70	0.74
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Methyloligellaceae_D5.uncultured	0.36	0.58	0.36	0.30	0.40
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Rhizobiaceae	0.17	0.10	0.09	0.12	0.15

TRATAMIENTO	C	CA	CB	MA	MB
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Rhizobiaceae_D5.Ensifer	0.10	0.09	0.18	0.14	0.09
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.RhizobialesIncertaeSedis_D5.Nordella	0.18	0.11	0.13	0.12	0.16
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Xanthobacteraceae	0.41	0.46	0.32	0.24	0.30
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Xanthobacteraceae_D5.Bradyrhizobium	1.26	0.93	0.96	0.61	1.02
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Xanthobacteraceae_D5.Pseudolabrys	0.59	0.51	0.58	0.47	0.63
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Xanthobacteraceae_D5.Rhodoplanes	0.26	0.09	0.17	0.08	0.12
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Xanthobacteraceae_D5.uncultured	0.71	0.65	0.45	0.37	0.46
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhodospirillales_D4.Rhodopirillaceae_D5.Defluviococcus	0.13	0.12	0.15	0.07	0.09
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Sphingomonadales_D4.Sphingomonadaceae_D5.Sphingomonas	2.08	1.10	1.34	1.79	1.62
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.uncultured	0.27	0.32	0.27	0.24	0.26
Proteobacteria_D2.Deltaproteobacteria	0.25	0.39	0.38	0.35	0.51
Proteobacteria_D2.Deltaproteobacteria_D3.Desulfarculales_D4.Desulfarculaceae_D5.uncultured	0.86	0.90	1.06	0.73	0.91
Proteobacteria_D2.Deltaproteobacteria_D3.Myxococcales_D4.bacteria p25	0.61	0.78	0.88	0.79	0.91
Proteobacteria_D2.Deltaproteobacteria_D3.Myxococcales_D4.bacteriap25_D5.metagenome	0.16	0.19	0.14	0.17	0.12
Proteobacteria_D2.Deltaproteobacteria_D3.Myxococcales_D4.Haliangiaceae_D5.Haliangium	0.32	0.57	0.30	0.31	0.45
Proteobacteria_D2.Deltaproteobacteria_D3.NB1-j	0.64	0.67	0.54	0.51	0.60
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales	0.08	0.17	0.14	0.15	0.17
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.B1-7BS_D5.uncultured bacterium	0.20	0.24	0.20	0.23	0.10
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.Burkholderiaceae	3.56	2.69	3.33	3.09	2.64
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.Burkholderiaceae_D5.Cupriavidus	0.08	0.35	0.30	0.13	0.19
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.Burkholderiaceae_D5.Massilia	0.34	0.33	0.25	0.34	0.34
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.Burkholderiaceae_D5.Noviherbaspirillum	0.17	0.07	0.20	0.17	0.12
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.Burkholderiaceae_D5.uncultured	0.84	1.05	0.78	0.78	0.85
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.Burkholderiaceae_D5.Variovorax	0.18	0.11	0.12	0.18	0.11
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.Chromobacteriaceae_D5.Vogesella	0.00	0.03	0.60	0.01	0.67
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.Nitrosomonadaceae_D5.Ellin6067	0.65	0.71	0.64	0.39	0.40
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.Nitrosomonadaceae_D5.mle1-7	0.27	0.47	0.45	0.42	0.38
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.Nitrosomonadaceae_D5.MND1	1.21	2.54	1.43	1.44	1.34
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.Rhodocyclaceae_D5.Dechloromonas	0.09	0.02	0.18	0.06	0.71
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.SC-I-84	2.84	2.85	2.35	2.42	2.20

TRATAMIENTO	C	CA	CB	MA	MB
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.SC-I-84_D5.uncultured Nitrosomonadaceae bacterium	0.30	0.37	0.28	0.27	0.24
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.TRA3-20	0.12	0.20	0.10	0.12	0.11
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.TRA3-20_D5.uncultured Burkholderiaceae bacterium	0.12	0.15	0.10	0.10	0.09
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.CCD24	0.49	0.59	0.42	0.46	0.52
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.GammaproteobacterialIncertaeSedis_D4.UnknownFamily_D5.Acidibacter	1.45	1.56	1.33	1.34	1.57
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.PLTA13	0.34	0.35	0.38	0.35	0.31
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Pseudomonadales_D4.Pseudomonadaceae_D5.Pseudomonas	0.44	0.23	2.81	1.05	0.95
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Steroidobacteriales_D4.Steroidobacteraceae_D5.Steroidobacter	1.54	1.47	1.42	1.44	1.81
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Steroidobacteriales_D4.Steroidobacteraceae_D5.uncultured	0.75	0.73	0.70	0.71	0.67
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Steroidobacteriales_D4.Woeseiaceae_D5.JTB255marinebenthicgroup	0.14	0.16	0.16	0.17	0.13
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Xanthomonadales_D4.Xanthomonadaceae	3.29	2.29	2.39	3.16	2.16
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Xanthomonadales_D4.Xanthomonadaceae_D5.Arenimonas	0.76	0.55	0.61	0.55	0.39
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Xanthomonadales_D4.Xanthomonadaceae_D5.Luteimonas	1.24	0.93	1.04	1.18	0.95
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Xanthomonadales_D4.Xanthomonadaceae_D5.Lysobacter	4.60	3.32	3.11	3.62	2.46
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Xanthomonadales_D4.Xanthomonadaceae_D5.Pseudoxanthomonas	0.26	0.21	1.38	0.36	0.12
Rokubacteria_D2.NC10_D3.Rokubacteriales	1.02	0.96	0.73	0.89	0.83
Rokubacteria_D2.NC10_D3.Rokubacteriales_Ambiguoustaxa_Ambiguoustaxa	0.40	0.47	0.40	0.43	0.33
Rokubacteria_D2.NC10_D3.Rokubacteriales_D4.metagenome_D5.metagenome	0.23	0.24	0.15	0.12	0.12
Rokubacteria_D2.NC10_D3.Rokubacteriales_D4.unculturedbacterium_D5.unculturedbacterium	0.54	0.44	0.49	0.46	0.49
Rokubacteria_D2.NC10_D3.Rokubacteriales_D4.unculturedFirmicutesbacterium_D5.uncultured Firmicutes bacterium	0.16	0.19	0.16	0.17	0.15
Verrucomicrobia_D2.Verrucomicrobiae_D3.Chthoniobacteriales_D4.Chthoniobacteraceae_D5.Candidatus aeobacter	0.86	0.79	0.80	0.89	0.94
Verrucomicrobia_D2.Verrucomicrobiae_D3.Chthoniobacteriales_D4.Chthoniobacteraceae_D5.Chthoniobacter	0.22	0.21	0.20	0.27	0.20
Verrucomicrobia_D2.Verrucomicrobiae_D3.Pedosphaerales_D4.Pedosphaeraceae	0.37	0.76	0.52	0.49	0.55
Verrucomicrobia_D2.Verrucomicrobiae_D3.Pedosphaerales_D4.Pedosphaeraceae_D5.ADurb.Bin063-1	0.21	0.35	0.21	0.27	0.29

**Tabla A.6 |** Datos promedio de abundancia de OTUs 16S (bacterias) del Capítulo 8.

TIEMPO TRATAMIENTO	T1 BD	T1 BDC	T1 C	T1 CC	T2 BD	T2 BDC	T2 C	T2 CC	T3 BD	T3 BDC	T3 C	T3 CC
Acidobacteria_D2.Acidobacteriia_D3.Solibacterales_D4.Solibacteraceae(Subgroup3)	0.29	0.10	0.09	0.09	0.02	0.04	0.11	0.04	0.07	0.04	0.22	0.07
Acidobacteria_D2.Acidobacteriia_D3.Solibacterales_D4.Solibacteraceae(Subgroup3)_D5.Bryobacter	1.12	1.02	1.18	1.21	1.06	1.42	1.00	0.99	1.04	1.11	1.13	0.90
Acidobacteria_D2.Acidobacteriia_D3.Solibacterales_D4.Solibacteraceae(Subgroup3)_D5.CandidatusSolibacter	0.29	0.18	0.17	0.22	0.27	0.46	0.23	0.27	0.17	0.13	0.09	0.18
Acidobacteria_D2.Acidobacteriia_D3.Solibacterales_D4.Solibacteraceae(Subgroup3)_D5.PAUC26f	0.36	0.34	0.39	0.27	0.13	0.17	0.27	0.17	0.12	0.13	0.62	0.17
Acidobacteria_D2.Blastocatellia(Subgroup4)_D3.11-24	0.27	0.14	0.08	0.18	0.13	0.05	0.07	0.06	0.19	0.09	0.07	0.09
Acidobacteria_D2.Blastocatellia(Subgroup4)_D3.Blastocatellales_D4.Blastocatellaceae	0.36	0.19	0.09	0.12	0.49	0.30	0.13	0.21	0.22	0.12	0.07	0.15
Acidobacteria_D2.Blastocatellia(Subgroup4)_D3.Blastocatellales_D4.Blastocatellaceae_D5.uncultured	0.25	0.27	0.37	0.34	0.17	0.17	0.35	0.34	0.12	0.13	0.46	0.21
Acidobacteria_D2.Blastocatellia(Subgroup4)_D3.Pyrinomonadales_D4.Pyrinomonadaceae_D5.RB41	0.93	0.81	0.52	0.80	0.66	0.55	0.60	0.49	0.51	0.47	0.54	0.55
Acidobacteria_D2.Holophagae_D3.Subgroup7	0.65	0.42	0.30	0.38	0.50	0.40	0.25	0.23	0.59	0.55	0.29	0.40
Acidobacteria_D2.Subgroup11_D3.uncultured bacterium	0.11	0.11	0.09	0.08	0.06	0.14	0.21	0.06	0.10	0.15	0.19	0.12
Acidobacteria_D2.Subgroup17	1.52	1.71	1.67	1.82	0.76	0.53	1.28	1.04	0.96	0.79	1.74	1.58
Acidobacteria_D2.Subgroup17_D3.uncultured Holophagasp.	0.15	0.14	0.11	0.17	0.13	0.08	0.15	0.08	0.15	0.09	0.17	0.20
Acidobacteria_D2.Subgroup22	0.67	0.84	1.04	0.79	0.45	0.37	0.72	0.48	0.51	0.41	0.76	0.41
Acidobacteria_D2.Subgroup5	0.86	1.00	0.90	0.96	0.56	0.51	0.70	0.55	0.77	0.51	0.56	0.64
Acidobacteria_D2.Subgroup6	9.65	10.55	12.32	12.10	8.12	6.56	12.43	10.18	9.64	8.57	10.28	8.70
Acidobacteria_D2.Subgroup6_D3.uncultivated soil bacterium cloneC028	0.25	0.27	0.33	0.24	0.32	0.45	0.46	0.27	0.49	0.41	0.40	0.31
Acidobacteria_D2.Subgroup6_D3.uncultured Holophaga sp.	0.50	0.42	0.26	0.36	0.16	0.06	0.25	0.26	0.31	0.15	0.25	0.33
Acidobacteria_D2.Subgroup6_D3.uncultured microorganism	0.62	0.73	0.76	1.09	0.31	0.26	1.01	0.96	0.55	0.43	0.81	0.54
Acidobacteria_D2.Subgroup6_D3.unidentified_D4.unidentified_D5.unidentified	0.78	0.91	1.11	1.01	0.31	0.24	0.93	0.67	0.42	0.47	0.53	0.46
Acidobacteria_D2.Subgroup6_D3.UnknownOrder_D4.UnknownFamily_D5.Vicinamibacter	0.10	0.06	0.02	0.06	0.12	0.08	0.00	0.06	0.26	0.27	0.03	0.18
Acidobacteria_D2.Subgroup9	0.12	0.11	0.17	0.13	0.11	0.08	0.12	0.06	0.18	0.14	0.10	0.10
Acidobacteria_D2.Thermoanaerobaculia_D3.Thermoanaerobaculales_D4.Thermoanaerobaculaceae_D5.Subgroup10	3.05	2.30	2.19	1.85	2.14	1.53	1.48	0.91	2.60	2.57	1.61	1.81
Actinobacteria_D2.Acidimicrobiia_D3.Actinomarinales_D4.uncultured	0.16	0.19	0.17	0.24	0.04	0.01	0.14	0.13	0.06	0.05	0.09	0.07
Actinobacteria_D2.Actinobacteria_D3.Micrococcales_D4.Intrasporangiaceae	0.20	0.22	0.13	0.24	0.28	0.26	0.39	0.27	0.24	0.32	0.25	0.36
Actinobacteria_D2.Actinobacteria_D3.Micrococcales_D4.Microbacteriaceae_D5.Agromyces	0.22	0.21	0.11	0.17	0.12	0.13	0.15	0.23	0.18	0.23	0.25	0.28
Actinobacteria_D2.Actinobacteria_D3.Micrococcales_D4.Micrococcaceae	0.15	0.10	0.06	0.07	0.56	0.33	0.20	0.39	0.61	0.29	0.40	0.62
Actinobacteria_D2.Actinobacteria_D3.Propionibacteriales_D4.Nocardioideaceae	0.18	0.23	0.20	0.36	0.50	0.22	0.43	0.33	0.38	0.26	0.43	0.38

TIEMPO TRATAMIENTO	T1 BD	T1 BDC	T1 C	T1 CC	T2 BD	T2 BDC	T2 C	T2 CC	T3 BD	T3 BDC	T3 C	T3 CC
Actinobacteria_D2.Actinobacteria_D3.Propionibacteriales_D4.Nocardioideaceae_D5.Nocardioide	0.15	0.22	0.18	0.22	0.16	0.08	0.44	0.56	0.26	0.20	0.25	0.27
Actinobacteria_D2.Actinobacteria_D3.Streptomycetales_D4.Streptomycetaceae_D5.Streptomyces	0.40	0.24	0.11	0.22	0.23	0.46	0.15	0.49	0.17	0.17	0.08	0.15
Actinobacteria_D2.MB-A2-108	0.08	0.22	0.14	0.18	0.05	0.05	0.07	0.08	0.07	0.08	0.10	0.09
Actinobacteria_D2.MB-A2-108_Ambiguoustaxa_Ambiguoustaxa_Ambiguoustaxa	0.07	0.18	0.10	0.16	0.06	0.05	0.12	0.10	0.10	0.07	0.09	0.15
Actinobacteria_D2.Thermoleophilia_D3.Gaiellales_D4.Gaiellaceae_D5.Gaiella	0.43	0.56	0.35	0.57	0.23	0.11	0.36	0.25	0.20	0.25	0.60	0.35
Actinobacteria_D2.Thermoleophilia_D3.Gaiellales_D4.uncultured	0.30	0.46	0.31	0.41	0.14	0.11	0.27	0.25	0.18	0.21	0.26	0.24
Actinobacteria_D2.Thermoleophilia_D3.Gaiellales_D4.uncultured_D5.uncultured microorganism	0.14	0.22	0.10	0.24	0.10	0.08	0.10	0.11	0.09	0.14	0.21	0.10
Actinobacteria_D2.Thermoleophilia_D3.Solirubrobacterales_D4.67-14	0.06	0.07	0.08	0.16	0.05	0.05	0.14	0.09	0.05	0.19	0.12	0.09
Armatimonadetes_D2.uncultured_D3.uncultured bacterium	0.10	0.15	0.17	0.16	0.08	0.07	0.10	0.08	0.06	0.06	0.05	0.09
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Chitinophagales_D4.Chitinophagaceae	0.73	0.71	1.01	0.87	2.74	2.95	1.32	1.08	0.84	0.67	0.67	0.54
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Chitinophagales_D4.Chitinophagaceae_D5.Chitinophaga	0.00	0.00	0.04	0.03	0.27	0.09	0.47	0.25	0.05	0.17	0.00	0.10
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Chitinophagales_D4.Chitinophagaceae_D5.Flavisolibacter	0.30	0.34	0.30	0.22	1.23	0.94	0.45	0.61	0.44	0.36	0.26	0.26
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Chitinophagales_D4.Chitinophagaceae_D5.Flavitalea	0.07	0.05	0.04	0.06	0.19	0.26	0.07	0.13	0.12	0.18	0.03	0.09
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Chitinophagales_D4.Chitinophagaceae_D5.Niastella	0.30	0.27	0.27	0.30	0.53	0.67	0.22	0.45	0.33	0.74	0.20	0.35
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Chitinophagales_D4.Chitinophagaceae_D5.Terrimonas	2.49	3.96	3.51	2.86	3.21	2.55	2.38	2.22	2.64	2.97	3.04	2.75
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Chitinophagales_D4.Chitinophagaceae_D5.uncultured	0.33	0.13	0.18	0.11	0.34	0.91	0.11	0.14	0.19	0.30	0.08	0.18
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Chitinophagales_D4.Saprospiraceae_D5.uncultured	0.43	0.64	0.77	0.57	0.05	0.07	0.38	0.22	0.22	0.35	0.29	0.49
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Cytophagales_D4.Hymenobacteraceae_D5.Adhaeribacter	0.34	0.34	0.39	0.46	0.05	0.12	0.29	0.53	0.04	0.05	0.25	0.25
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Cytophagales_D4.Microscillaceae	2.18	1.66	1.88	1.90	0.71	1.31	2.43	2.58	0.89	0.98	2.31	1.75
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Cytophagales_D4.Microscillaceae_D5.Chryseolinea	0.17	0.10	0.14	0.15	0.42	0.18	0.20	0.13	0.07	0.40	0.27	0.25
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Cytophagales_D4.Microscillaceae_D5.Ohtaekwangia	0.28	0.16	0.21	0.24	0.32	0.23	0.18	0.21	0.45	0.49	0.07	0.50
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Cytophagales_D4.Microscillaceae_D5.uncultured	0.96	0.97	1.68	1.27	1.46	1.91	2.37	2.12	0.95	1.95	1.16	1.40
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Flavobacteriales_D4.Flavobacteriaceae_D5.Flavobacterium	0.28	0.25	0.24	0.24	0.55	0.17	0.37	0.39	0.13	0.06	0.54	0.42
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Flavobacteriales_D4.Weeksellaceae_D5.Chryseobacterium	0.00	0.00	0.00	0.01	1.09	0.59	0.05	0.14	0.35	0.06	0.00	0.10
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Sphingobacteriales_D4.AKYH767_D5.unculturedbacterium	0.18	0.19	0.21	0.19	0.02	0.02	0.09	0.06	0.06	0.10	0.08	0.08
Bacteroidetes_D2.Bacteroidia_D3.Sphingobacteriales_D4.Sphingobacteriaceae_D5.Sphingobacterium	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	2.00	0.02	2.12	0.12	0.05	0.00	0.03
Bacteroidetes_D2.Ignavibacteria_D3.SJA-28	0.22	0.14	0.13	0.14	0.04	0.07	0.05	0.02	0.09	0.12	0.05	0.10
Chloroflexi_D2.Anaerolineae_D3.Anaerolineales_D4.Anaerolineaceae	0.46	0.27	0.13	0.17	0.50	0.45	0.04	0.09	0.71	0.84	0.19	0.34
Chloroflexi_D2.Anaerolineae_D3.Anaerolineales_D4.Anaerolineaceae_D5.uncultured	0.43	0.27	0.10	0.13	0.28	0.13	0.02	0.04	0.24	0.26	0.06	0.11

TIEMPO TRATAMIENTO	T1 BD	T1 BDC	T1 C	T1 CC	T2 BD	T2 BDC	T2 C	T2 CC	T3 BD	T3 BDC	T3 C	T3 CC
Chloroflexi_D2.Anaerolineae_D3.Anaerolineales_D4.Anaerolineaceae_D5.UTCFX1	1.08	0.86	0.78	0.94	1.12	0.96	0.51	0.43	1.35	1.29	0.59	0.84
Chloroflexi_D2.Anaerolineae_D3.Ardenticatenales_D4.uncultured_D5.unculturedLitorilineasp.	0.15	0.15	0.17	0.12	0.12	0.10	0.12	0.06	0.30	0.29	0.13	0.20
Chloroflexi_D2.Anaerolineae_D3.SBR1031_D4.A4b	0.83	0.66	0.59	0.53	1.44	1.70	0.29	0.23	2.21	2.94	0.40	1.46
Chloroflexi_D2.Anaerolineae_D3.SBR1031_D4.A4b_D5.uncultured bacterium	0.43	0.26	0.19	0.21	0.77	0.16	0.12	0.10	0.55	0.63	0.10	0.35
Chloroflexi_D2.Anaerolineae_D3.SBR1031_D4.uncultured bacterium	0.20	0.26	0.17	0.16	0.09	0.12	0.08	0.11	0.20	0.28	0.08	0.19
Chloroflexi_D2.Chloroflexia_D3.Chloroflexales_D4.Roseiflexaceae_D5.uncultured	0.05	0.08	0.03	0.05	0.28	0.07	0.00	0.02	0.26	0.26	0.00	0.05
Chloroflexi_D2.Chloroflexia_D3.Thermomicrobiales_D4.JG30-KF-CM45	0.13	0.17	0.16	0.22	0.13	0.07	0.13	0.09	0.11	0.12	0.07	0.06
Chloroflexi_D2.KD4-96	0.21	0.31	0.16	0.25	0.10	0.05	0.12	0.08	0.13	0.12	0.08	0.11
Entotheonellaeota_D2.Entotheonellia_D3.Entotheonellales_D4.Entotheonellaceae	0.25	0.16	0.17	0.18	0.06	0.07	0.21	0.10	0.12	0.04	0.33	0.16
Entotheonellaeota_D2.Entotheonellia_D3.Entotheonellales_D4.Entotheonellaceae_D5.uncultured bacterium	0.36	0.59	0.88	0.68	0.11	0.10	0.63	0.35	0.13	0.14	0.35	0.27
Firmicutes_D2.Bacilli_D3.Bacillales_D4.Bacillaceae_D5.Bacillus	0.19	0.29	0.34	0.29	0.28	0.51	0.33	0.19	0.50	0.76	0.97	0.70
Firmicutes_D2.Bacilli_D3.Bacillales_D4.Paenibacillaceae_D5.Paenibacillus	0.17	0.15	0.07	0.18	0.07	0.05	0.06	0.11	0.26	0.20	0.59	0.26
Gemmatimonadetes_D2.AKAU4049_Ambiguoustaxa_Ambiguoustaxa_Ambiguoustaxa	0.55	0.53	0.74	0.50	0.45	0.37	0.82	0.43	0.60	0.42	1.05	0.50
Gemmatimonadetes_D2.BD2-11terrestrialgroup_D3.uncultured soil bacterium	0.14	0.12	0.16	0.09	0.15	0.14	0.11	0.11	0.26	0.22	0.10	0.16
Gemmatimonadetes_D2.Gemmatimonadetes_D3.Gemmatimonadales_D4.Gemmatimonadaceae	0.16	0.15	0.09	0.11	0.34	0.17	0.12	0.16	0.38	0.27	0.13	0.18
Gemmatimonadetes_D2.Gemmatimonadetes_D3.Gemmatimonadales_D4.Gemmatimonadaceae_D5.uncultured	0.83	0.91	0.73	0.86	1.61	1.48	0.90	0.86	1.84	1.56	0.83	1.10
Latescibacteria	0.81	1.14	1.15	1.00	0.57	0.53	0.95	0.64	0.77	0.67	0.98	0.79
Latescibacteria_Ambiguoustaxa_Ambiguoustaxa_Ambiguoustaxa_Ambiguoustaxa	0.26	0.37	0.39	0.40	0.20	0.16	0.31	0.22	0.32	0.31	0.37	0.22
Latescibacteria_D2.uncultured Fibrobacteres bacterium	0.15	0.15	0.15	0.15	0.05	0.05	0.04	0.06	0.14	0.07	0.13	0.14
Latescibacteria_D2.uncultured soil bacterium	1.26	1.65	1.96	1.70	0.57	0.50	0.99	0.75	0.97	0.78	1.14	0.95
Nitrospirae_D2.Nitrospira_D3.Nitrospirales_D4.Nitrospiraceae_D5.Nitrospira	1.27	0.68	0.56	0.64	0.72	0.68	0.48	0.37	0.44	0.36	1.06	0.58
Planctomycetes	0.43	0.24	0.19	0.24	0.29	0.24	0.29	0.10	0.23	0.23	0.13	0.18
Planctomycetes_D2.OM190	0.40	0.42	0.38	0.37	0.27	0.32	0.50	0.41	0.40	0.45	0.65	0.51
Planctomycetes_D2.OM190_D3.uncultured bacterium	1.40	1.27	1.12	1.01	0.68	0.96	1.75	0.89	0.63	0.66	1.64	0.90
Planctomycetes_D2.OM190_D3.uncultured microorganism	0.19	0.32	0.20	0.15	0.06	0.11	0.36	0.11	0.05	0.05	0.23	0.19
Planctomycetes_D2.Phycisphaerae_D3.Phycisphaerales_D4.Phycisphaeraceae_D5.AKYG587	0.41	0.46	0.53	0.45	0.17	0.22	0.44	0.28	0.20	0.30	0.51	0.44
Planctomycetes_D2.Phycisphaerae_D3.Phycisphaerales_D4.Phycisphaeraceae_D5.SM1A02	0.21	0.31	0.36	0.33	0.19	0.19	0.24	0.16	0.20	0.32	0.30	0.20
Planctomycetes_D2.Phycisphaerae_D3.Tepidisphaerales_D4.WD2101soilgroup	0.32	0.33	0.22	0.32	0.30	0.27	0.38	0.37	0.33	0.22	0.43	0.20

TIEMPO TRATAMIENTO	T1 BD	T1 BDC	T1 C	T1 CC	T2 BD	T2 BDC	T2 C	T2 CC	T3 BD	T3 BDC	T3 C	T3 CC
Planctomycetes_D2.Phycisphaerae_D3.Tepidisphaerales_D4.WD2101soilgroup_D5.uncultured bacterium	0.64	0.71	0.74	0.74	0.45	0.32	0.72	0.66	0.51	0.39	0.62	0.42
Planctomycetes_D2.Phycisphaerae_D3.Tepidisphaerales_D4.WD2101soilgroup_D5.uncultured planctomycete	0.64	0.52	0.47	0.55	0.60	0.53	0.70	0.52	0.58	0.57	0.52	0.51
Planctomycetes_D2.Planctomycetacia_D3.Gemmatales_D4.Gemmataceae_D5.Fimbriiglobus	0.18	0.15	0.18	0.12	0.06	0.04	0.08	0.07	0.11	0.11	0.08	0.17
Planctomycetes_D2.Planctomycetacia_D3.Gemmatales_D4.Gemmataceae_D5.Gemmata	0.38	0.37	0.40	0.40	0.21	0.15	0.33	0.29	0.19	0.20	0.24	0.31
Planctomycetes_D2.Planctomycetacia_D3.Gemmatales_D4.Gemmataceae_D5.uncultured	1.57	1.70	1.90	1.79	0.68	0.30	1.06	0.61	1.17	0.80	1.25	0.87
Planctomycetes_D2.Planctomycetacia_D3.Gemmatales_D4.Gemmataceae_D5.Zavarzinella	0.21	0.09	0.16	0.12	0.03	0.04	0.14	0.11	0.04	0.04	0.64	0.09
Planctomycetes_D2.Planctomycetacia_D3.Pirellulales_D4.Pirellulaceae	0.14	0.19	0.22	0.14	0.11	0.06	0.13	0.07	0.19	0.19	0.13	0.14
Planctomycetes_D2.Planctomycetacia_D3.Pirellulales_D4.Pirellulaceae_D5.Blastopirellula	0.17	0.20	0.26	0.21	0.08	0.07	0.18	0.11	0.13	0.12	0.23	0.19
Planctomycetes_D2.Planctomycetacia_D3.Pirellulales_D4.Pirellulaceae_D5.Pir4lineage	1.46	1.65	2.59	2.04	0.81	0.45	2.14	1.01	1.58	1.47	2.39	2.06
Planctomycetes_D2.Planctomycetacia_D3.Pirellulales_D4.Pirellulaceae_D5.Pirellula	1.91	1.67	2.13	2.09	0.73	0.51	1.32	0.93	0.91	0.88	1.86	1.39
Planctomycetes_D2.Planctomycetacia_D3.Pirellulales_D4.Pirellulaceae_D5.uncultured	0.93	0.89	1.04	0.99	0.53	0.24	0.81	0.47	0.94	0.83	1.08	0.92
Planctomycetes_D2.Planctomycetacia_D3.Planctomycetales_D4.Rubinisphaeraceae_D5.SH-PL14	0.39	0.44	0.76	0.49	0.27	0.25	0.34	0.25	0.42	0.47	0.47	0.59
Planctomycetes_D2.Planctomycetacia_D3.Planctomycetales_D4.Schlesneriaceae_D5.Planctopirus	0.33	0.24	0.28	0.20	0.13	0.04	0.09	0.07	0.16	0.09	0.09	0.13
Planctomycetes_D2.Planctomycetacia_D3.Planctomycetales_D4.uncultured	0.28	0.35	0.43	0.33	0.14	0.08	0.24	0.14	0.21	0.24	0.26	0.25
Planctomycetes_D2.Planctomycetacia_D3.Planctomycetales_D4.uncultured	0.07	0.15	0.27	0.22	0.11	0.11	0.22	0.22	0.16	0.18	0.11	0.12
Planctomycetes_D2.Planctomycetacia_D3.Planctomycetales_D4.uncultured_Ambiguoustaxa	0.12	0.07	0.10	0.08	0.12	0.06	0.03	0.05	0.22	0.14	0.06	0.14
Planctomycetes_D2.Planctomycetacia_D3.Planctomycetales_D4.uncultured_D5.uncultured Planctomycetales bacterium	0.07	0.13	0.21	0.15	0.03	0.03	0.17	0.10	0.05	0.07	0.09	0.08
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria	0.20	0.16	0.18	0.17	0.21	0.21	0.23	0.22	0.20	0.18	0.09	0.16
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Acetobacterales_D4.Acetobacteraceae_D5.Roseomonas	0.02	0.01	0.01	0.01	0.27	0.28	0.03	0.05	0.22	0.35	0.02	0.10
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Azospirillales_D4.Azospirillaceae_D5.Skermanella	0.12	0.10	0.09	0.06	0.08	0.21	0.09	0.10	0.22	0.28	0.21	0.24
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Azospirillales_D4.uncultured	0.12	0.16	0.13	0.12	0.15	0.10	0.09	0.08	0.14	0.10	0.11	0.10
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Caulobacterales_D4.Caulobacteraceae_D5.Phenylobacterium	0.20	0.13	0.06	0.11	0.32	0.34	0.10	0.23	0.21	0.22	0.08	0.28
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Caulobacterales_D4.Hyphomonadaceae_D5.SWB02	0.36	0.25	0.27	0.36	0.39	0.33	0.30	0.20	0.69	0.54	0.33	0.53
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Dongiiales_D4.Dongiaceae_D5.Dongia	0.49	0.42	0.32	0.50	1.16	1.02	0.53	0.53	1.38	1.47	0.56	1.08
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Micropepsales_D4.Micropepsaceae_D5.uncultured	0.07	0.06	0.05	0.07	0.07	0.12	0.01	0.06	0.15	0.19	0.20	0.21
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Reyranellales_D4.Reyranellaceae_D5.Reyranella	0.24	0.21	0.28	0.29	0.14	0.09	0.22	0.25	0.18	0.16	0.13	0.31
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Reyranellales_D4.Reyranellaceae_D5.uncultured	0.12	0.06	0.08	0.07	0.08	0.10	0.05	0.06	0.20	0.19	0.04	0.12
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Beijerinckiaceae_D5.Microvirga	0.11	0.08	0.07	0.05	0.49	0.37	0.10	0.09	0.58	0.49	0.07	0.26

TIEMPO TRATAMIENTO	T1 BD	T1 BDC	T1 C	T1 CC	T2 BD	T2 BDC	T2 C	T2 CC	T3 BD	T3 BDC	T3 C	T3 CC
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Devosiaceae_D5.Devosia	0.08	0.08	0.07	0.08	0.40	0.25	0.03	0.05	0.29	0.52	0.04	0.24
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Hyphomicrobiaceae_D5.Hyphomicrobium	0.19	0.15	0.12	0.13	0.20	0.11	0.14	0.11	0.22	0.24	0.19	0.38
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Hyphomicrobiaceae_D5.Pedomicrobium	0.66	0.57	0.58	0.70	0.30	0.27	0.75	0.47	0.42	0.39	0.76	0.81
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.KF-JG30-B3	0.43	0.32	0.32	0.32	0.12	0.10	0.36	0.23	0.30	0.17	0.17	0.26
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Methyloligellaceae_D5.uncultured	0.37	0.36	0.40	0.45	0.19	0.20	0.51	0.28	0.30	0.28	0.63	0.42
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Rhizobiaceae	0.16	0.12	0.10	0.15	0.07	0.04	0.06	0.09	0.12	0.28	0.07	0.36
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Rhizobiaceae_D5.Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium	0.11	0.08	0.06	0.06	0.26	0.20	0.14	0.59	0.32	0.43	0.17	0.26
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Rhizobiaceae_D5.Ensifer	0.12	0.08	0.08	0.09	0.03	0.03	0.12	0.20	0.06	0.11	0.15	0.22
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Rhizobiaceae_D5.Mesorhizobium	0.18	0.18	0.17	0.22	0.09	0.02	0.12	0.09	0.14	0.10	0.22	0.13
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Rhodomicrobiaceae_D5.Rhodomicrobium	0.16	0.19	0.16	0.20	0.07	0.08	0.16	0.13	0.15	0.13	0.21	0.22
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Xanthobacteraceae	0.29	0.30	0.22	0.31	0.23	0.21	0.21	0.14	0.26	0.26	0.13	0.34
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Xanthobacteraceae_D5.Bradyrhizobium	0.27	0.16	0.10	0.12	0.08	0.07	0.05	0.08	0.14	0.18	0.22	0.33
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Xanthobacteraceae_D5.Pseudolabrys	0.56	0.63	0.57	0.65	0.19	0.12	0.26	0.23	0.34	0.27	0.30	0.41
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Xanthobacteraceae_D5.Pseudorhodoplanes	0.16	0.09	0.08	0.09	0.14	0.04	0.04	0.03	0.19	0.17	0.09	0.12
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Xanthobacteraceae_D5.Rhodoplanes	0.10	0.17	0.11	0.18	0.09	0.07	0.08	0.09	0.11	0.11	0.11	0.15
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhizobiales_D4.Xanthobacteraceae_D5.uncultured	0.79	0.83	0.85	0.87	0.38	0.19	0.34	0.32	0.42	0.39	0.41	0.55
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Rhodobacterales_D4.Rhodobacteraceae_D5.Amaricoccus	0.14	0.12	0.13	0.11	0.04	0.06	0.15	0.07	0.08	0.11	0.39	0.25
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Sphingomonadales_D4.Sphingomonadaceae	0.39	0.32	0.26	0.40	0.22	0.11	0.11	0.22	0.40	0.22	0.18	0.32
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Sphingomonadales_D4.Sphingomonadaceae_D5.Altererythrobacter	0.33	0.32	0.34	0.35	0.29	0.42	0.54	0.34	0.31	0.31	0.54	0.48
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Sphingomonadales_D4.Sphingomonadaceae_D5.Novosphingobium	0.09	0.10	0.11	0.12	0.07	0.13	0.19	0.42	0.08	0.07	0.09	0.15
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Sphingomonadales_D4.Sphingomonadaceae_D5.Sphingomonas	0.70	0.24	0.31	0.35	0.37	0.48	0.50	0.44	0.63	0.45	0.81	0.75
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.Tistrellales_D4.Geminococcaceae_D5.uncultured	0.05	0.12	0.16	0.13	0.03	0.06	0.18	0.12	0.07	0.12	0.18	0.06
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.uncultured	0.54	0.58	0.60	0.64	1.17	1.46	0.57	0.79	0.97	1.07	2.38	0.86
Proteobacteria_D2.Alphaproteobacteria_D3.uncultured_D4.uncultured Rhodospirillaceae bacterium	0.34	0.28	0.17	0.27	0.45	0.60	0.22	0.44	0.34	0.51	0.30	0.49
Proteobacteria_D2.Deltaproteobacteria	0.22	0.54	0.67	0.60	0.29	0.42	0.65	0.51	0.27	0.28	0.48	0.33
Proteobacteria_D2.Deltaproteobacteria_D3.Desulfarculales_D4.Desulfarculaceae_D5.uncultured	0.54	0.53	0.48	0.52	0.60	0.45	0.27	0.32	0.51	0.34	0.53	0.47
Proteobacteria_D2.Deltaproteobacteria_D3.Myxococcales_D4.bacteriap25	0.29	0.43	0.42	0.53	0.36	0.52	0.40	0.26	0.26	0.30	0.34	0.28



TIEMPO TRATAMIENTO	T1 BD	T1 BDC	T1 C	T1 CC	T2 BD	T2 BDC	T2 C	T2 CC	T3 BD	T3 BDC	T3 C	T3 CC
Proteobacteria_D2.Deltaproteobacteria_D3.Myxococcales_D4.bacteriap25_D5.metagenome	0.15	0.12	0.15	0.15	0.06	0.04	0.17	0.11	0.13	0.15	0.11	0.18
Proteobacteria_D2.Deltaproteobacteria_D3.Myxococcales_D4.Blrii41	0.17	0.24	0.11	0.19	0.16	0.15	0.23	0.22	0.16	0.45	0.46	0.37
Proteobacteria_D2.Deltaproteobacteria_D3.Myxococcales_D4.Haliangiaceae_D5.Haliangium	0.09	0.13	0.07	0.11	0.32	0.13	0.06	0.12	0.16	0.21	0.04	0.05
Proteobacteria_D2.Deltaproteobacteria_D3.Myxococcales_D4.Sandaracinaceae_D5.uncultured	0.04	0.07	0.03	0.05	0.15	0.16	0.02	0.04	0.09	0.33	0.37	0.32
Proteobacteria_D2.Deltaproteobacteria_D3.NB1-j	1.00	1.15	1.02	0.98	1.04	1.15	1.13	0.63	0.86	0.90	1.02	0.92
Proteobacteria_D2.Deltaproteobacteria_D3.NB1-j_D4.uncultured Desulfoglaeba sp	0.18	0.24	0.15	0.21	0.17	0.18	0.14	0.15	0.16	0.17	0.12	0.21
Proteobacteria_D2.Deltaproteobacteria_D3.Syntrophobacteriales_D4.Syntrophaceae_D5.uncultured	0.19	0.15	0.13	0.08	0.11	0.09	0.11	0.02	0.11	0.08	0.02	0.08
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.B1-7BS_D5.uncultured bacterium	0.24	0.22	0.09	0.16	0.11	0.05	0.05	0.04	0.09	0.05	0.04	0.05
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.Burkholderiaceae	0.98	1.00	0.84	0.75	0.73	1.26	0.86	2.14	0.76	0.96	0.85	0.99
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.Burkholderiaceae_D5.Cupriavidus	0.00	0.01	0.00	0.00	0.07	0.53	0.02	0.03	0.03	0.44	0.01	0.04
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.Burkholderiaceae_D5.uncultured	0.21	0.17	0.13	0.26	0.16	0.17	0.17	0.30	0.11	0.07	0.17	0.23
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.Burkholderiaceae_D5.Variovorax	0.16	0.09	0.16	0.19	0.06	0.19	0.28	1.90	0.12	0.17	0.33	0.18
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.Nitrosomonadaceae_D5.Ellin6067	0.28	0.25	0.23	0.28	0.20	0.26	0.30	0.22	0.17	0.15	0.32	0.25
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.Nitrosomonadaceae_D5.IS-44	0.10	0.05	0.05	0.05	0.21	0.12	0.10	0.03	0.25	0.19	0.05	0.08
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.Nitrosomonadaceae_D5.mle1-7	0.28	0.30	0.24	0.28	0.37	0.27	0.20	0.25	0.45	0.35	0.15	0.31
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.Nitrosomonadaceae_D5.MND1	2.15	2.17	1.20	1.65	1.45	1.58	2.43	1.73	1.02	0.91	1.12	1.09
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.Rhodocyclaceae	0.00	0.00	0.00	0.00	0.30	0.63	0.00	0.00	0.11	0.31	0.00	0.04
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.Rhodocyclaceae_D5.Azoarcus	0.05	0.02	0.04	0.00	0.25	1.83	0.07	0.07	0.08	0.11	0.02	0.08
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.SC-I-84	0.59	0.63	0.70	0.58	1.08	1.14	0.76	0.92	0.98	0.78	0.54	0.79
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.TRA3-20	0.19	0.34	0.25	0.28	0.07	0.06	0.25	0.14	0.06	0.09	0.14	0.10
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.TRA3-20_D5.uncultured gammaproteobacterium	0.17	0.19	0.15	0.19	0.12	0.15	0.20	0.21	0.12	0.14	0.13	0.12
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Betaproteobacteriales_D4.TRA3-20_D5.uncultured Rhodocyclaceae bacterium	0.05	0.05	0.06	0.07	0.32	0.21	0.09	0.07	0.26	0.17	0.08	0.10
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.CCD24	1.16	1.20	1.22	0.99	0.91	0.95	1.46	1.17	0.91	0.88	0.78	0.87
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Enterobacteriales_D4.Enterobacteriaceae	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.24	0.01	0.33	1.98	0.03	0.00	0.01
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.EPR3968-O8a-Bc78	0.29	0.19	0.13	0.16	0.02	0.03	0.50	0.14	0.05	0.00	0.06	0.05
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.GammaproteobacterialIncertaeSedis_D4.Unknown Family_D5.Acidibacter	1.74	1.55	1.40	1.31	1.41	1.50	1.76	1.35	2.34	2.30	1.56	2.16
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.JG36-GS-52	0.16	0.10	0.13	0.09	0.10	0.10	0.10	0.05	0.16	0.19	0.12	0.13

TIEMPO TRATAMIENTO	T1 BD	T1 BDC	T1 C	T1 CC	T2 BD	T2 BDC	T2 C	T2 CC	T3 BD	T3 BDC	T3 C	T3 CC
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.PLTA13	0.68	0.66	0.61	0.71	0.51	0.62	0.61	0.61	0.73	0.78	0.68	0.85
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Pseudomonadales_D4.Moraxellaceae_D5.Acinetobacter	0.00	0.00	0.00	0.00	0.15	2.18	0.00	0.78	0.08	0.23	0.03	0.17
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Pseudomonadales_D4.Pseudomonadaceae_D5.Pseudomonas	0.28	0.10	0.24	0.12	1.35	3.44	2.47	3.81	0.64	1.23	2.87	2.27
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.R7C24_D4.uncultured bacterium	0.01	0.01	0.02	0.01	0.21	0.26	0.01	0.04	0.36	0.40	0.00	0.21
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Steroidobacterales_D4.Steroidobacteraceae_D5.Steroidobacter	0.86	0.75	0.78	0.99	1.40	1.56	1.04	0.92	1.11	1.57	1.58	1.81
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Steroidobacterales_D4.Steroidobacteraceae_D5.uncultured	0.78	0.82	1.00	0.75	0.59	0.87	0.86	0.81	0.81	0.66	1.35	0.85
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Steroidobacterales_D4.Woeseiaceae_D5.Woeseia	0.12	0.09	0.19	0.15	0.02	0.03	0.21	0.12	0.01	0.02	0.23	0.12
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Xanthomonadales_D4.Rhodanobacteraceae_D5.uncultured	0.10	0.03	0.07	0.03	0.18	0.05	0.07	0.02	0.22	0.23	0.05	0.25
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Xanthomonadales_D4.Xanthomonadaceae	0.14	0.10	0.30	0.28	2.73	1.48	0.52	0.94	1.22	1.04	0.34	0.65
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Xanthomonadales_D4.Xanthomonadaceae_D5.Arenimonas	0.34	0.31	0.22	0.25	0.36	0.21	0.18	0.23	0.32	0.32	0.13	0.25
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Xanthomonadales_D4.Xanthomonadaceae_D5.Luteimonas	0.00	0.02	0.11	0.07	0.45	0.33	0.14	0.37	0.03	0.06	0.03	0.09
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Xanthomonadales_D4.Xanthomonadaceae_D5.Lysobacter	2.44	2.15	1.93	1.97	2.03	2.78	3.60	6.29	1.91	2.03	2.25	3.37
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Xanthomonadales_D4.Xanthomonadaceae_D5.Pseudoxanthomonas	0.03	0.01	0.01	0.03	3.48	2.27	0.25	0.69	0.53	1.00	0.30	0.52
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Xanthomonadales_D4.Xanthomonadaceae_D5.Stenotrophomonas	0.02	0.00	0.00	0.00	0.27	0.15	0.00	0.46	0.05	0.22	0.02	0.04
Proteobacteria_D2.Gammaproteobacteria_D3.Xanthomonadales_D4.Xanthomonadaceae_D5.Vulcaniibacterium	0.00	0.00	0.00	0.00	1.10	0.61	0.00	0.00	0.23	0.14	0.00	0.03
Rokubacteria_D2.NC10_D3.Rokubacteriales	0.54	0.65	0.83	0.58	0.52	0.37	1.09	0.61	0.71	0.48	0.88	0.52
Rokubacteria_D2.NC10_D3.Rokubacteriales_Ambiguoustaxa	0.19	0.22	0.26	0.25	0.29	0.23	0.30	0.33	0.23	0.25	0.21	0.21
Rokubacteria_D2.NC10_D3.Rokubacteriales_D4.metagenome_D5.metagenome	0.63	1.04	1.31	0.92	0.37	0.20	0.80	0.37	0.57	0.48	0.81	0.48
Rokubacteria_D2.NC10_D3.Rokubacteriales_D4.uncultured bacterium	0.19	0.30	0.37	0.34	0.29	0.30	0.34	0.22	0.38	0.45	0.37	0.27
Verrucomicrobia_D2.Verrucomicrobiae_D3.Pedosphaerales_D4.Pedosphaeraceae	0.25	0.21	0.25	0.29	0.19	0.23	0.33	0.22	0.26	0.22	0.30	0.26

### Anexo 1.3. Abundancia relativa de hongos

**Tabla A.7** | Datos promedio de abundancia de OTUs ITS (hongos) del Capítulo 6.

TIEMPO TRATAMIENTO	T1 M1	T1 M2	T1 M3	T1 M4	T2 M1	T2 M2	T2 M3	T2 M4
Ascomycota	0.10	0.15	0.11	0.25	0.14	0.05	0.35	0.02
Ascomycota_c.Dothideomycetes_o.Capnodiales	0.37	0.23	0.46	0.39	0.03	0.47	0.28	0.05
Ascomycota_c.Dothideomycetes_o.Capnodiales_f.Cladosporiaceae_g.Cladosporium	0.54	0.22	0.36	0.74	0.06	0.01	0.04	0.01
Ascomycota_c.Dothideomycetes_o.Pleosporales_f.Didymellaceae	0.25	0.60	0.25	0.19	4.41	0.98	1.19	0.78
Ascomycota_c.Dothideomycetes_o.Pleosporales_f.Didymellaceae_g.Epicoccum	0.00	0.00	0.00	0.00	0.49	3.00	0.00	0.01
Ascomycota_c.Dothideomycetes_o.Pleosporales_f.Leptosphaeriaceae	0.06	0.29	0.02	0.03	0.93	0.00	0.00	0.00
Ascomycota_c.Dothideomycetes_o.Pleosporales_f.Pleosporaceae_g.Alternaria	0.06	0.04	0.03	0.00	0.04	1.46	0.05	0.56
Ascomycota_c.Dothideomycetes_o.Pleosporales_f.Pleosporaceae_g.Curvularia	0.03	0.03	0.01	0.05	0.00	2.25	0.37	0.00
Ascomycota_c.Dothideomycetes_o.Pleosporales_f.Sporormiaceae_g.Preussia	0.13	0.15	0.09	0.13	0.36	0.23	0.14	0.02
Ascomycota_c.Dothideomycetes_o.Pleosporales_f.Sporormiaceae_g.Westerdykella	0.00	0.02	0.00	0.01	1.63	0.02	0.39	0.00
Ascomycota_c.Eurotiomycetes_o.Eurotiales_f.Aspergillaceae_g.Aspergillus	0.07	0.03	0.08	0.07	15.05	3.88	6.17	0.47
Ascomycota_c.Eurotiomycetes_o.Eurotiales_f.Trichocomaceae_g.Thermomyces	0.08	0.04	0.13	0.04	0.11	0.18	0.47	0.06
Ascomycota_c.Eurotiomycetes_o.Onygenales_f.Onygenales_fam_Incertae_sedis_g.Chrysosporium	0.41	0.33	0.27	0.35	0.25	0.07	0.38	0.08
Ascomycota_c.Eurotiomycetes_o.Onygenales_f.unidentified_g.unidentified	0.18	0.29	0.25	0.38	0.04	0.11	0.11	0.09
Ascomycota_c.Leotiomycetes_o.Thelebolales_f.Pseudeurotiaceae_g.Pseudeurotium	3.71	1.08	0.33	0.70	1.74	0.48	0.49	0.29
Ascomycota_c.Leotiomycetes_o.Thelebolales_f.Pseudeurotiaceae_g.Pseudogymnoascus	0.12	0.06	0.12	0.04	0.16	0.01	0.00	0.29
Ascomycota_c.Pezizomycetes_o.Pezizales_f.Ascobolaceae_g.Ascobolus	0.11	0.31	0.34	0.93	0.44	0.42	5.74	0.62
Ascomycota_c.Pezizomycetes_o.Pezizales_f.Ascodesmidaceae_g.Cephalophora	0.09	0.17	0.15	0.12	0.02	0.00	0.23	0.11
Ascomycota_c.Pezizomycetes_o.Pezizales_f.Pezizaceae_g.Peziza	0.06	0.48	0.06	0.63	0.00	0.00	0.01	0.00
Ascomycota_c.Pezizomycetes_o.Pezizales_f.Pyronemataceae_g.Pseudaleuria	0.15	0.24	0.22	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00
Ascomycota_c.Pezizomycetes_o.Pezizales_f.Pyronemataceae_g.Trichophaeopsis	0.41	0.72	2.97	1.37	0.06	0.14	0.00	0.06
Ascomycota_c.Pezizomycetes_o.Pezizales_f.Pyronemataceae_g.unidentified	0.19	0.07	0.21	0.06	0.00	0.12	0.58	0.04
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Glomerellales_f.Plectosphaerellaceae_g.Gibellulopsis	1.22	0.96	1.18	0.44	0.15	0.21	0.53	0.04
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Glomerellales_f.Plectosphaerellaceae_g.Plectosphaerella	1.63	2.36	4.57	3.01	0.11	0.05	0.10	0.11
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Hypocreales_f.Hypocreales_fam_Incertae_sedis_g.Emericellopsis	0.05	0.07	0.06	0.08	0.11	0.20	0.48	0.07
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Hypocreales_f.Nectriaceae	2.13	1.75	2.25	2.20	0.15	0.06	0.00	0.64
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Hypocreales_f.Nectriaceae_g.Fusarium	67.36	65.69	64.63	56.46	16.09	45.20	11.86	46.27
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Hypocreales_f.Nectriaceae_g.Gibberella	4.54	6.04	4.43	8.23	0.70	1.60	0.04	0.56
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Hypocreales_f.Stachybotryaceae_g.Stachybotrys	0.17	0.27	0.27	0.30	0.14	0.16	0.40	0.05
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Microascales_f.Microascaceae	0.16	0.16	0.13	0.22	0.10	0.02	0.05	0.07
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Microascales_f.Microascaceae_g.Kernia	0.19	0.41	0.28	0.22	0.30	1.66	0.31	0.11
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Microascales_f.Microascaceae_g.Lophotrichus	0.27	0.13	0.07	0.11	0.07	0.03	0.32	0.02

TIEMPO TRATAMIENTO	T1 M1	T1 M2	T1 M3	T1 M4	T2 M1	T2 M2	T2 M3	T2 M4
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Microascales_f.Microascaceae_g.Scedosporium	0.07	0.13	0.08	0.05	3.54	2.43	7.21	0.42
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Sordariales	0.13	0.15	0.12	0.11	0.80	1.35	2.24	0.31
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Sordariales_f.Chaetomiaceae	2.65	2.64	2.53	2.10	4.05	10.13	4.56	8.66
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Sordariales_f.Chaetomiaceae_g.Botryotrichum	0.22	0.32	0.13	0.19	0.14	0.11	0.11	0.23
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Sordariales_f.Chaetomiaceae_g.Melanocarpus	0.04	0.06	0.01	0.02	0.16	0.09	0.48	0.03
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Sordariales_f.Chaetomiaceae_g.Mycothermus	0.09	0.07	0.05	0.06	8.63	13.36	22.92	2.14
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Sordariales_f.Chaetomiaceae_g.Zopfiella	3.41	6.06	4.06	3.55	3.24	3.39	3.12	4.96
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Sordariales_f.Lasiosphaeriaceae_g.Cladorrhinum	0.45	0.60	0.46	0.28	2.37	0.42	3.27	0.09
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Sordariales_f.Sordariales_fam_Incertae_sedis_g.Madurella	0.01	0.02	0.05	0.02	0.38	0.84	0.35	0.09
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Sordariales_f.Sordariales_fam_Incertae_sedis_g.Remersonia	0.39	0.31	0.38	0.29	0.91	0.76	2.66	0.22
Basidiomycota_c.Agaricomycetes	0.00	0.16	0.00	1.01	0.00	0.00	0.00	0.00
Basidiomycota_c.Agaricomycetes_o.Agaricales_f.Bolbitiaceae_g.Conocybe	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	1.02	0.00	0.00
Basidiomycota_c.Agaricomycetes_o.Agaricales_f.Psathyrellaceae_g.Coprinopsis	0.16	0.16	0.12	0.07	0.76	0.70	0.69	0.61
Basidiomycota_c.Agaricomycetes_o.Geastrales_f.Geastraceae_g.Geastrum	0.39	0.14	0.06	0.43	0.34	0.12	0.34	0.18
Fungi	0.66	0.91	1.15	1.06	0.90	0.64	1.54	0.44
Mortierellomycota_c.Mortierellomycetes_o.Mortierellales_f.Mortierellaceae_g.Mortierella	6.39	4.84	6.40	12.56	27.92	1.31	16.24	29.66
Mucoromycota_c.Mucoromycetes_o.Mucorales_f.Mucoraceae_g.Actinomucor	0.03	0.02	0.04	0.06	1.06	0.09	1.54	0.43
Mucoromycota_c.Mucoromycetes_o.Mucorales_f.Rhizopodaceae_g.Rhizopus	0.05	0.02	0.02	0.21	0.94	0.21	1.68	0.01

**Tabla A.7 |** Datos promedio de abundancia de OTUs ITS (hongos) del Capítulo 7.

TRATAMIENTO	C	CA	CB	MA	MB
Ascomycota_c.Dothideomycetes_o.Capnodiales_f.Cladosporiaceae_g.Cladosporium	0.59	0.55	0.36	0.31	0.22
Ascomycota_c.Dothideomycetes_o.Pleosporales_f.Cucurbitariaceae_g.Pyrenochaeta	0.17	0.13	0.10	0.11	0.07
Ascomycota_c.Dothideomycetes_o.Pleosporales_f.Cucurbitariaceae_g.Pyrenochaetopsis	0.20	0.07	0.15	0.11	0.03
Ascomycota_c.Dothideomycetes_o.Pleosporales_f.Didymellaceae	1.10	0.91	0.80	0.90	0.50
Ascomycota_c.Dothideomycetes_o.Pleosporales_f.Didymosphaeriaceae	1.74	1.37	1.79	2.28	1.09
Ascomycota_c.Dothideomycetes_o.Pleosporales_f.Leptosphaeriaceae_g.Plenodomus	0.30	0.29	0.32	0.28	0.10
Ascomycota_c.Dothideomycetes_o.Pleosporales_f.Periconiaceae_g.Periconia	0.47	0.27	0.45	0.27	0.20
Ascomycota_c.Dothideomycetes_o.Pleosporales_f.Phaeosphaeriaceae_g.Ophiosphaerella	0.12	0.25	0.09	0.12	0.13
Ascomycota_c.Dothideomycetes_o.Pleosporales_f.Phaeosphaeriaceae_g.Setophoma	0.99	0.64	0.86	0.62	0.40
Ascomycota_c.Dothideomycetes_o.Pleosporales_f.Pleosporaceae_g.Alternaria	0.14	0.42	0.20	0.25	0.21
Ascomycota_c.Dothideomycetes_o.Pleosporales_f.Tetraplosphaeriaceae_g.Tetraplosphaeria	0.12	0.15	0.15	0.09	0.10
Ascomycota_c.Dothideomycetes_o.Pleosporales_f.Trematosphaeriaceae_g.Trematosphaeria	0.18	0.11	0.42	0.25	0.04
Ascomycota_c.Eurotiomycetes	0.21	0.79	0.28	0.18	0.10
Ascomycota_c.Eurotiomycetes_o.Chaetothyriales_f.Herpotrichiellaceae_g.Exophiala	0.20	0.22	0.16	0.17	0.20
Ascomycota_c.Eurotiomycetes_o.Chaetothyriales_f.Herpotrichiellaceae_g.Phialophora	0.76	0.08	0.17	0.10	0.24
Ascomycota_c.Eurotiomycetes_o.Eurotiales_f.Aspergillaceae_g.Aspergillus	0.10	0.11	0.17	0.07	0.15
Ascomycota_c.Eurotiomycetes_o.Eurotiales_f.Trichocomaceae_g.Talaromyces	1.33	0.97	1.68	0.98	0.82
Ascomycota_c.Leotiomycetes_o.Helotiales_f.Helotiaceae_g.Scytalidium	0.12	0.07	0.12	0.14	0.08
Ascomycota_c.Leotiomycetes_o.Helotiales_f.Helotiaceae_g.Tetracladium	0.82	0.34	0.42	0.37	0.24
Ascomycota_c.Leotiomycetes_o.Helotiales_f.Helotiales_fam_Incertae_sedis_g.Leohumicola	0.42	0.10	0.05	0.04	0.05
Ascomycota_c.Leotiomycetes_o.Helotiales_f.Leotiaceae_g.Neobulgaria	0.15	0.15	0.34	0.21	0.15
Ascomycota_c.Leotiomycetes_o.Thelebolales_f.Pseudeurotiaceae_g.Pseudeurotium	0.80	0.76	0.97	0.64	0.72
Ascomycota_c.Pezizomycetes_o.Pezizales_f.Ascobolaceae_g.Ascobolus	0.00	0.01	0.34	0.07	0.64
Ascomycota_c.Pezizomycetes_o.Pezizales_f.Pyronemataceae_g.Pseudaleuria	0.30	0.40	0.72	0.21	0.30
Ascomycota_c.Pezizomycetes_o.Pezizales_f.Pyronemataceae_g.Scutellinia	0.09	0.21	0.54	0.07	0.06
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Diaporthales_f.Diaporthaceae_g.Phaeocystostroma	0.08	0.09	0.19	0.13	0.07
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Diaporthales_f.Schizoparmaceae_g.Coniella	0.14	0.14	0.14	0.11	0.19
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Glomerellales_f.Plectosphaerellaceae_g.Gibellulopsis	1.36	1.58	2.21	1.16	2.06
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Hypocreales_f.Bionectriaceae_g.Clonostachys	0.60	0.64	0.55	0.52	0.69
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Hypocreales_f.Clavicipitaceae_g.Metacordyceps	0.11	0.12	0.16	0.10	0.15

TRATAMIENTO	C	CA	CB	MA	MB
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Hypocreales_f.Clavicipitaceae_g.Metarhizium	1.25	1.54	1.54	1.10	1.62
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Hypocreales_f.Hypocreaceae_g.Trichoderma	0.86	1.07	1.39	0.78	1.09
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Hypocreales_f.Hypocreales_fam_Incertae_sedis_g.Acremonium	0.51	0.34	0.77	0.52	0.43
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Hypocreales_f.Nectriaceae	1.75	1.13	0.93	1.08	0.99
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Hypocreales_f.Nectriaceae_g.Cylindrocarpon	1.16	1.58	1.32	1.13	1.36
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Hypocreales_f.Nectriaceae_g.Fusarium	15.68	17.84	17.46	17.25	16.44
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Hypocreales_f.Nectriaceae_g.Fusicolla	2.03	1.44	1.65	1.02	1.40
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Hypocreales_f.Nectriaceae_g.Gibberella	5.24	3.32	3.92	3.23	3.29
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Hypocreales_f.Nectriaceae_g.Ilyonectria	0.37	0.30	0.32	0.30	0.27
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Hypocreales_f.Nectriaceae_g.Thelonectria	0.46	0.35	0.31	0.29	0.35
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Hypocreales_f.Nectriaceae_g.Volutella	0.14	0.12	0.12	0.09	0.10
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Hypocreales_f.Niessliaceae_g.Eucasphaeria	0.21	0.28	0.21	0.19	0.26
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Hypocreales_f.Stachybotryaceae_g.Myrothecium	0.15	0.14	0.10	0.12	0.14
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Hypocreales_f.Stachybotryaceae_g.Stachybotrys	0.14	0.13	0.19	0.12	0.14
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Microascales_f.Microascaceae_g.Scedosporium	0.09	0.18	0.57	0.34	0.33
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Myrmecridiales_f.Myrmecridiaceae_g.Myrmecridium	0.28	0.15	0.27	0.10	0.06
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Sordariales	0.02	0.40	0.75	0.61	0.29
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Sordariales_f.Chaetomiaceae	0.79	0.72	0.83	0.49	0.71
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Sordariales_f.Chaetomiaceae_g.Chaetomium	7.81	13.47	5.70	4.28	5.91
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Sordariales_f.Chaetomiaceae_g.unidentified	0.18	0.20	0.34	0.17	0.19
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Sordariales_f.Chaetomiaceae_g.Zopfiella	0.12	0.22	0.25	0.13	0.11
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Sordariales_f.Lasiosphaeriaceae	0.93	1.30	1.35	0.70	1.21
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Sordariales_f.Lasiosphaeriaceae_g.Cercophora	0.87	0.69	0.75	0.75	0.56
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Sordariales_f.Lasiosphaeriaceae_g.Schizothecium	1.31	2.24	1.34	1.48	1.65
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Sordariales_f.Lasiosphaeriaceae_g.unidentified	0.41	0.31	0.34	0.09	0.33
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Sordariales_f.Sordariales_fam_Incertae_sedis_g.Staphylotrichum	0.64	0.69	0.78	0.44	0.59
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Sordariales_f.unidentified_g.unidentified	0.09	0.07	0.20	0.15	0.04
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Xylariales_f.Bartalinaceae_g.Truncatella	0.48	0.39	0.29	0.26	0.41
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Xylariales_f.Microdochiaceae_g.Microdochium	0.96	0.85	1.09	1.15	0.90
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Xylariales_f.Xylariales_fam_Incertae_sedis_g.Fusidium	0.23	0.20	0.19	0.21	0.18
Basidiomycota_c.Agaricomycetes	0.36	0.23	0.51	0.36	0.33

TRATAMIENTO	C	CA	CB	MA	MB
Basidiomycota_c.Agaricomycetes_o.Agaricales	0.12	0.12	0.42	0.26	0.06
Basidiomycota_c.Agaricomycetes_o.Agaricales_f.Agaricaceae_g.Coprinus	0.00	0.00	0.98	0.00	0.00
Basidiomycota_c.Agaricomycetes_o.Agaricales_f.Bolbitiaceae_g.Conocybe	2.20	0.18	0.08	0.04	0.02
Basidiomycota_c.Agaricomycetes_o.Agaricales_f.Psathyrellaceae_g.Coprinellus	0.23	0.30	0.31	0.17	0.24
Basidiomycota_c.Agaricomycetes_o.Agaricales_f.Psathyrellaceae_g.Psathyrella	0.49	0.03	0.09	0.06	0.05
Basidiomycota_c.Agaricomycetes_o.Cantharellales_f.Cantharellales_fam_Incertae_sedis_g.Minimedusa	1.90	1.10	2.41	1.23	1.85
Basidiomycota_c.Tremellomycetes_o.Filobasidiales_f.Piskurozymaceae_g.Solicoccozyma	0.21	0.16	0.25	0.11	0.24
Basidiomycota_c.Tremellomycetes_o.Tremellales_f.Rhynchogastremataceae_g.Papiliotrema	0.22	0.12	0.12	0.18	0.06
Basidiomycota_c.Ustilaginomycetes_o.Ustilaginales_f.Ustilaginaceae_g.Ustilago	0.08	0.13	0.13	0.10	0.28
Chytridiomycota	0.35	0.23	0.33	0.15	0.47
Chytridiomycota_c.Rhizophlyctidomycetes_o.Rhizophlyctidales_f.Rhizophlyctidaceae_g.Rhizophlyctis	0.12	0.45	0.72	0.00	0.01
Chytridiomycota_c.Rhizophyidiomycetes_o.Rhizophydiales_f.Rhizophydiaceae_g.Rhizophydium	0.10	0.14	0.16	0.05	0.08
Chytridiomycota_c.Spizellomycetes_o.Spizellomycetales_f.Powellomycetaceae_g.unidentified	0.08	0.31	0.16	0.14	0.18
Chytridiomycota_c.Spizellomycetes_o.Spizellomycetales_f.Spizellomycetaceae_g.Spizellomyces	0.00	0.25	0.24	0.17	0.38
Chytridiomycota_c.Spizellomycetes_o.Spizellomycetales_f.unidentified_g.unidentified	0.19	0.44	0.46	0.18	0.07
Fungi	0.48	0.53	0.72	0.66	0.44
Mortierellomycota_c.Mortierellomycetes_o.Mortierellales_f.Mortierellaceae_g.Mortierella	33.78	31.10	31.30	46.56	43.75
Mortierellomycota_c.unidentified	0.17	0.58	0.42	0.15	0.14

**Tabla A.8** | Datos promedio de abundancia de OTUs ITS (hongos) del Capítulo 8.

TIEMPO TRATAMIENTO	T1 BD	T1 BDC	T1 C	T1 CC	T2 BD	T2 BDC	T2 C	T2 CC	T3 BD	T3 BDC	T3 C	T3 CC
Ascomycota	1.63	0.61	0.46	0.59	8.51	4.10	0.46	0.47	3.93	4.07	0.32	0.95
Ascomycota_c.Dothideomycetes_o.Capnodiales_f.Cladosporiaceae_g.Cladosporium_s.Cladosporium sphaerospermum	0.06	0.08	0.05	0.09	0.18	0.01	0.06	0.07	0.57	0.02	0.13	0.09
Ascomycota_c.Dothideomycetes_o.Capnodiales_f.Cladosporiaceae_g.Cladosporium_s.Cladosporium tenuissimum	0.33	0.01	0.04	0.09	1.73	0.02	0.11	0.13	0.67	13.52	0.40	0.23
Ascomycota_c.Dothideomycetes_o.Pleosporales_f.Didymellaceae	0.15	0.24	0.07	0.07	0.02	0.01	0.26	0.06	0.29	0.02	0.27	0.10
Ascomycota_c.Dothideomycetes_o.Pleosporales_f.Pleosporaceae_g.Alternaria	0.01	0.01	0.01	0.04	0.31	0.00	0.23	0.03	0.27	0.11	0.13	0.07
Ascomycota_c.Eurotiomycetes_o.Eurotiales_f.Trichocomaceae_g.Thermomycetes	0.01	0.00	0.01	0.00	0.17	3.51	0.03	1.30	0.09	0.83	0.03	0.32
Ascomycota_c.Eurotiomycetes_o.Onygenales_f.Onygenales_fam_Incertae sedis_g.Chrysosporium_s.unidentified	0.23	0.31	0.27	0.34	0.09	0.05	0.17	0.15	0.08	0.05	0.12	0.12
Ascomycota_c.Pezizomycetes_o.Pezizales_f.Ascobolaceae_g.Ascobolus_s.unidentified	0.33	0.30	0.14	0.20	0.39	2.02	0.18	1.21	0.74	0.51	0.30	0.49
Ascomycota_c.Pezizomycetes_o.Pezizales_f.Ascodesmidaceae_g.Cephalophora_s.unidentified	0.19	0.37	0.18	0.33	0.53	0.03	0.14	0.04	0.14	0.20	0.08	0.11
Ascomycota_c.Pezizomycetes_o.Pezizales_f.Pyronemataceae_g.Heydenia_s.Heydenia alpina	1.04	0.93	1.17	1.21	0.34	17.16	1.28	6.46	0.33	20.58	1.85	9.96
Ascomycota_c.Pezizomycetes_o.Pezizales_f.Pyronemataceae_g.Pseudaleuria_s.unidentified	3.63	1.45	3.14	3.71	0.85	0.68	1.98	0.30	0.92	0.29	3.63	1.33
Ascomycota_c.Pezizomycetes_o.Pezizales_f.Pyronemataceae_g.Scutellinia_s.Scutellinia scutellata	1.75	0.61	0.51	0.48	1.91	0.41	0.43	0.23	4.70	0.48	0.45	0.75
Ascomycota_c.Pezizomycetes_o.Pezizales_f.Pyronemataceae_g.Trichophaeopsis_s.unidentified	17.36	37.66	36.84	26.25	4.30	7.91	24.99	20.97	8.78	25.67	23.23	20.73
Ascomycota_c.Pezizomycetes_o.Pezizales_f.Pyronemataceae_g.unidentified_s.unidentified	1.13	1.23	0.74	1.02	2.78	1.80	0.81	0.22	1.21	1.88	0.40	0.80
Ascomycota_c.Sordariomycetes	0.43	0.15	0.51	0.13	1.69	0.38	0.16	0.22	0.13	0.31	0.06	0.12
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Branch06_f.unidentified_g.unidentified	0.78	0.20	0.03	0.05	0.05	0.02	0.14	0.03	0.00	0.02	0.00	0.00
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Coniochaetales_f.Coniochaetaceae	0.62	0.33	0.08	0.17	0.27	0.14	0.08	0.06	0.27	0.06	0.07	0.16
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Glomerellales_f.Plectosphaerellaceae_g.Gibellulopsis_s.Gibellulopsis piscis	0.42	0.45	0.38	0.45	0.51	0.10	0.54	0.24	0.57	0.29	0.57	0.23
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Glomerellales_f.Plectosphaerellaceae_g.Plectosphaerella_s.Plectosphaerella cucumerina	0.90	0.87	0.32	0.41	0.21	0.01	2.61	0.56	9.29	0.33	0.58	2.23
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Hypocreales_f.Bionectriaceae_g.Bionectria_s.Bionectria rossmaniae	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.24	0.00
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Hypocreales_f.Nectriaceae	3.96	4.66	5.07	5.49	3.22	0.39	9.17	5.99	3.19	0.21	7.67	4.94
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Hypocreales_f.Nectriaceae_g.Fusarium	0.85	0.66	0.69	1.17	1.37	0.29	3.96	2.19	1.12	0.55	4.25	3.02
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Hypocreales_f.Nectriaceae_g.Fusarium_s.Fusarium delphinoides	0.04	0.07	0.17	0.02	0.17	0.02	0.29	0.12	0.11	0.08	0.26	0.06
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Hypocreales_f.Nectriaceae_g.Fusarium_s.Fusarium oxysporum	1.80	1.64	2.38	2.75	7.16	1.25	9.87	6.41	6.44	2.89	8.65	5.69
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Hypocreales_f.Nectriaceae_g.Fusarium_s.Fusarium solani	0.66	0.92	0.85	0.83	6.42	1.27	5.93	2.34	3.21	1.35	5.92	5.23
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Hypocreales_f.Nectriaceae_g.Paracremonium_s.unidentified	0.27	0.04	0.23	0.04	0.52	0.06	0.13	0.05	0.28	0.03	0.14	0.14
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Hypocreales_f.Ophiocordycipitaceae_g.Purpureocillium	0.17	0.17	0.12	0.21	0.15	0.03	0.17	0.25	0.21	0.04	0.25	0.10
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Hypocreales_f.Stachybotryaceae_g.Stachybotrys_s.Stachybotrys chartarum	0.13	0.32	0.10	0.09	0.05	0.04	0.11	0.01	0.44	0.46	0.11	2.70
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Microascales_f.Microasceae	1.02	1.32	1.36	2.09	0.48	3.01	1.00	5.31	0.27	0.25	1.00	0.55
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Microascales_f.Microasceae_g.Kernia_s.Kernia nitida	3.09	0.62	0.81	1.55	0.80	0.63	0.62	0.57	0.42	0.28	0.64	0.45
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Microascales_f.Microasceae_g.Lophotrichus_s.Lophotrichus fimeti	1.88	2.55	2.59	4.68	1.10	0.65	2.28	1.80	0.83	0.52	2.74	1.29
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Microascales_f.Microasceae_g.Microascus_s.Microascus brevicaulis	0.73	0.01	0.01	0.04	0.02	0.18	0.02	0.14	0.01	0.02	0.02	0.07
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Microascales_f.Microasceae_g.Microascus_s.Microascus verrucosus	0.14	0.25	0.16	0.26	0.12	0.05	0.13	0.09	0.08	0.04	0.18	0.09



TIEMPO TRATAMIENTO	T1 BD	T1 BDC	T1 C	T1 CC	T2 BD	T2 BDC	T2 C	T2 CC	T3 BD	T3 BDC	T3 C	T3 CC
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Microascales_f.Microasceae_g.Scedosporium	0.18	0.14	0.12	0.13	0.77	1.06	0.12	0.04	0.21	0.20	0.13	0.12
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Sordariales	7.51	5.16	9.58	6.95	9.68	9.50	5.18	5.25	4.70	7.01	2.91	7.07
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Sordariales_f.Chaetomiaceae	11.94	14.56	11.19	14.58	12.66	22.09	10.66	16.40	7.73	5.36	1.69	8.10
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Sordariales_f.Chaetomiaceae_g.Botryotrichum_s.Botryotrichum spirotrichum	1.85	2.56	2.47	4.22	0.60	3.98	2.19	11.59	0.55	0.37	2.24	1.34
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Sordariales_f.Chaetomiaceae_g.Chaetomium	0.22	0.13	0.13	0.56	0.03	0.01	0.38	1.03	0.03	0.01	1.30	0.76
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Sordariales_f.Chaetomiaceae_g.Mycothermus_s.Mycothermus thermophilus	0.05	0.07	0.05	0.07	8.68	4.53	0.06	0.01	4.66	1.84	0.10	1.20
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Sordariales_f.Chaetomiaceae_g.Zopfiella_s.unidentified	0.04	0.04	0.04	0.02	1.34	0.10	0.02	0.00	2.18	0.68	0.07	0.14
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Sordariales_f.Lasiosphaeriaceae	3.05	1.19	1.68	1.57	0.13	0.19	1.46	0.78	0.07	0.04	1.22	0.90
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Sordariales_f.Lasiosphaeriaceae_g.Cercophora_s.Cercophora samala	0.49	0.66	0.65	0.13	0.28	0.87	0.56	0.16	0.58	0.21	0.24	0.32
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Sordariales_f.Lasiosphaeriaceae_g.Cercophora_s.unidentified	0.26	0.19	0.19	0.36	0.05	0.06	0.17	0.13	0.07	0.01	0.27	0.26
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Sordariales_f.Lasiosphaeriaceae_g.Cladorrhinum_s.Cladorrhinum bulbillosum	0.78	0.47	0.13	0.43	0.36	0.14	0.37	0.12	0.58	0.30	0.55	0.42
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Sordariales_f.Lasiosphaeriaceae_g.Cladorrhinum phialophoroides	2.75	1.09	0.65	1.11	0.82	0.31	0.71	0.34	1.02	1.70	0.54	2.12
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Sordariales_f.Sordariaceae	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.84	0.00	0.36	0.00	0.87	0.05	0.08
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Sordariales_f.Sordariales_fam_Incertae_sedis_g.Remersonia_s.Remersonia thermophila	0.96	1.35	1.37	1.76	1.58	1.32	1.13	0.45	1.32	0.56	1.37	1.06
Ascomycota_c.Sordariomycetes_o.Sordariales_f.Sordariales_fam_Incertae_sedis_g.Staphylotrichum_s.Staphylotrichum boninense	0.19	0.12	0.07	0.16	0.04	0.02	0.10	0.17	0.04	0.01	0.11	0.30
Basidiomycota_c.Agaricomycetes	0.95	0.39	0.03	0.08	0.02	0.01	0.05	0.06	0.02	0.01	0.03	0.01
Basidiomycota_c.Agaricomycetes_o.Agaricales_f.Agaricaceae_g.Coprinus_s.Coprinus annuloporus	0.00	0.00	0.00	0.00	0.23	0.13	0.00	0.00	0.36	0.57	0.02	0.01
Basidiomycota_c.Agaricomycetes_o.Agaricales_f.Agaricaceae_g.Coprinus_s.Coprinus cordisporus	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.58
Basidiomycota_c.Agaricomycetes_o.Agaricales_f.Bolbitiaceae_g.Panaeolus_s.Panaeolus subbalteatus	0.01	0.05	0.00	0.08	0.00	2.63	0.02	0.00	0.00	0.01	0.00	0.11
Basidiomycota_c.Agaricomycetes_o.Agaricales_f.Psathyrellaceae_g.Coprinopsis_s.Coprinopsis narcotica	4.97	0.28	0.59	0.45	0.87	0.06	0.24	0.05	0.98	0.06	0.60	0.14
Glomeromycota_c.Glomeromycetes_o.Glomerales_f.Claroideoglomeraceae_g.Claroideoglomus	0.97	1.22	0.16	0.43	0.07	0.00	0.23	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00
Glomeromycota_c.Glomeromycetes_o.Glomerales_f.Claroideoglomeraceae_g.Claroideoglomus_s.Claroideoglomus etunicatum	0.96	0.95	0.15	0.37	0.08	0.00	0.16	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00
Fungi	3.90	2.69	2.43	2.83	4.70	2.53	1.84	1.78	3.30	2.20	1.23	2.06
Mortierellomycota_c.Mortierellomycetes_o.Mortierellales_f.Mortierellaceae_g.Mortierella_s.Mortierella alpina	0.35	0.11	0.04	0.25	0.01	0.00	0.04	0.03	9.93	0.01	0.15	0.23
Mortierellomycota_c.Mortierellomycetes_o.Mortierellales_f.Mortierellaceae_g.Mortierella_s.Mortierella ambigua	0.18	0.10	0.04	0.09	0.22	0.99	0.04	0.04	0.10	0.11	0.05	0.04
Mortierellomycota_c.Mortierellomycetes_o.Mortierellales_f.Mortierellaceae_g.Mortierella_s.Mortierella capitata	1.19	1.44	1.56	1.12	9.06	1.23	1.79	0.65	9.23	1.40	2.59	2.46
Mortierellomycota_c.Mortierellomycetes_o.Mortierellales_f.Mortierellaceae_g.Mortierella_s.Mortierella elongata	2.83	2.94	3.81	2.38	0.71	0.79	2.43	1.13	2.31	0.46	2.63	3.69
Mortierellomycota_c.Mortierellomycetes_o.Mortierellales_f.Mortierellaceae_g.Mortierella_s.Mortierella exigua	0.31	0.21	0.38	0.69	0.16	0.01	0.37	0.12	0.02	0.01	1.05	0.28
Mortierellomycota_c.Mortierellomycetes_o.Mortierellales_f.Mortierellaceae_g.Mortierella_s.Mortierella gamsii	0.30	0.40	0.27	0.46	0.04	0.00	0.28	0.21	0.00	0.00	0.29	0.10
Mortierellomycota_c.Mortierellomycetes_o.Mortierellales_f.Mortierellaceae_g.Mortierella_s.Mortierella minutissima	6.65	2.18	2.58	3.69	0.06	0.00	0.99	0.87	0.08	0.00	2.80	0.86
Mucoromycota_c.Mucoromycotina cls Incertae sedis_o.Mucoromycotina ord Incertae sedis_f.Mucoromycotina	0.39	0.22	0.10	0.18	0.21	0.09	0.09	0.06	0.32	0.05	0.09	0.11

fam\_Incertae sedis g.Bifiguratus s.unidentified

---