



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

**"EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ENMIENDAS
ORGÁNICAS LÍQUIDAS SOBRE UN SISTEMA DE
PRODUCCIÓN
CONVENCIONAL DE BANANO CAVENDISH VAR.
WILLIAMS EN DAULE-ECUADOR"**

**Trabajo de titulación Previo a la obtención del Título de
Magister en Biociencias Aplicadas con mención en
Biodescubrimiento**

Presentado por: Bertha Lorena Monserrate Maggi

Guayaquil – Ecuador

2022

AGRADECIMIENTO

A Dios, porque nos da la capacidad, fuerzas y sabiduría para culminar con éxito cualquier meta propuesta en nuestra vida. A la ESPOL, Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) y personal de la Hacienda Bananera Bellavista por permitirme cursar el programa de maestría y desarrollar mi proyecto de titulación. A los docentes - investigadores Ph.D Daynet Sosa, Ph.D Freddy Magdama, Ph.D Julio Bonilla, Ph.D Eduardo Chica, Ph.D Francisco Flores, Ph.D Francisco Vera, Ph.D Omar Ruiz y M.Sc. Jessica Vera. A mis compañeros del área de Técnica agrícolas, Fitopatología y Biología Molecular: Leonardo León, Carlos Arias, Víctor Hernández, Nano Moyano, Fernando Espinoza, Marcos Vera, Rodrigo Oviedo, Carlos Riera y Ricardo Pacheco. A mi esposo David y mi hermana Verónica por el apoyo y ánimo para culminar este proyecto.

DEDICATORIA

A Dios, a mi familia, en especial a mi esposo David y mi hijo Juan David por su amor, comprensión y paciencia. A mis padres Juan y Bertha, por su gran ejemplo de perseverancia y del hacer bien las cosas en todo momento. A mis hermanos Juanito y Pochita por su ánimo y ayuda para continuar.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

María Isabel Jiménez, Ph.D.

Presidenta del Tribunal

Freddy Magdama, Ph.D.

Tutor de Tesis

Eduardo J. Chica Ph.D.

Cotutor de tesis

Julio Bonilla, Ph.D.

Evaluador

Eduardo Chávez, Ph.D.

Evaluador

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido del presente trabajo de titulación, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral”.

Bertha Lorena Monserrate Maggi

RESUMEN

El uso de enmiendas orgánicas líquidas (EOLs) es una práctica común para mejorar el desarrollo de cultivos, aunque muchas veces es discontinuado en cultivos perennes, como el banano, por la falta de resultados inmediatos, lo cual no ocurre en cultivos de ciclo corto. Se conoce de ciertos efectos de EOLs en banano, pero poco se conoce sobre su efecto a corto plazo en las poblaciones microbiológicas del suelo asociados a este cultivo. La presente investigación incorpora una visión integral para entender el efecto de una EOL sobre el cultivo de banano, incorporando a los parámetros tradicionales de medición en suelo y plantas, herramientas ómicas para el estudio de la dinámica de microorganismos y parámetros agronómicos dentro de un ciclo de producción de banano var. Williams como modelo de estudio. Los resultados obtenidos sugieren que la EOL sirve como un estimulante de la microbiología del suelo y no como biofertilizante, ya que no se encontraron diferencias significativas en los macro, micro y metales pesados en el suelo con excepción del Nitrógeno y Boro, este último, fue el único que también presentó diferencias a nivel de la planta. Y referente a los parámetros agronómicos importantes como la tasa de crecimiento para altura y diámetro, número de hojas en plantas madre con sus respectivos retornos, y los parámetros de producción como peso de racimo, ratio, entre otras, no reportaron cambios significativos por aplicación de la enmienda. El mayor efecto de la aplicación de la enmienda se evidenció en los cambios de la estructura y abundancia de poblaciones microbianas del suelo, y esto se evidenció por los filos y géneros bacterianos presentes y más abundantes en el EOL como Proteobacteria (*Acetobacter*), Firmicutes (*Lactobacillus*) y Bacterioidota (*Prevotella*), y en el suelo, para el caso de las bacterias se reportó un incremento diferencial de géneros pertenecientes al filo Atinobacteriota (*Acidothermus*), Nitrospirota (*Nitrospira*) y Proteobacteria (*Chujaibacter*), y en hongos, los grupos de ascomicetos se redujeron en gran medida, incluyendo especies patógenas del género *Fusarium*, a su vez, de manera simultánea, el EOL promovió el incremento diferencial de géneros de hongos benéficos, pertenecientes al filo Basidiomicetos (*Trichosporum*) y Ascomicetos (*Trichoderma* y *Arthrobotrys*). Estos grupos reportados, juegan un rol importante en el ciclo del nitrógeno, además están relacionados con el control de enfermedades. Los cambios reflejados en las estructuras y abundancias de las poblaciones microbianas sugieren que esta enmienda tiene un efecto modulador sobre las comunidades presentes en el suelo más estos cambios no se deben a la adición propia de microorganismos presentes en la enmienda orgánica. Este estudio demostró que el uso de herramientas metataxonómicas pueden representar aliados para medir el verdadero impacto a corto plazo de la aplicación de enmiendas orgánicas, favoreciendo la obtención de cultivos más sanos con menor impacto en la erosión y pérdida de diversidad de los suelos agrícolas. Futuras investigaciones permitirán determinar el efecto a mediano y largo plazo de las enmiendas sobre el suelo, comunidad microbiológica en la planta y parámetros de cosecha relevantes para los productores de banano.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTO	I
DEDICATORIA	II
TRIBUNAL DE GRADUACIÓN	III
DECLARACIÓN EXPRESA	IV
RESUMEN	V
ÍNDICE GENERAL	VI
Abreviaturas	VIII
Simbología	X
ÍNDICE DE TABLAS	XI
INDICE DE FIGURAS.....	XII
Capítulo 1.....	1
Introducción y objetivos	1
1.1 Antecedentes y justificación	1
1.2 Objetivo general.....	2
1.3 Objetivos específicos	3
1.4 Marco Teórico.....	3
1.4.1 Generalidades del Banano <i>Musa acuminata</i> (Var. “Williams” AAA)	3
1.4.2 Mercado <i>Musa acuminata</i> (Var. “Williams” AAA).....	5
1.4.3 Enmiendas orgánicas (EOL) en sistemas de producción.....	6
1.4.4 Microbiomas	6
1.4.5 Secuenciación de próxima generación (NGS)	8
1.4.6 Herramientas bioinformáticas y flujos de trabajo para el análisis exploratorio de microbiomas.....	8
Capítulo 2.....	10
Metodología	10
2.1 Diseño experimental	10
2.2 Elaboración de la enmienda orgánica líquida	10
2.3 Variables de estudio y procesamiento de muestras.....	11
2.3.1 Parámetros agronómicos-productivos.....	11
2.3.2 Parámetros físico-químicos y de nutrientes en muestras de la EOL y suelo	11
2.3.3 Parámetros físicos-químicos y de nutrientes en muestras foliares.....	12

2.3.4 Extracción de ADN y análisis de microbiomas	13
2.3.5 Análisis bioinformáticos	15
2.4 Análisis estadísticos	17
Capítulo 3.....	19
RESULTADOS y DiscuSión.....	19
3.1 EOL y efecto de su aplicación en suelo	19
3.2 EOL y su efecto en planta.....	26
3.3 Análisis del microbioma	31
3.3.1 Perfiles taxonómicos: grupos bacterianos.....	32
3.3.2 Perfiles taxonómicos: grupos fúngicos	44
3.3.3 Ecología microbiana: diversidad alfa, curvas de rarefacción	52
3.3.4 Ecología microbiana: diversidad alfa, índices de riqueza y diversidad	53
3.3.5 Ecología microbiana: diversidad beta	57
3.4 Análisis estadísticos basados en abundancia diferencial	59
3.4.1 Abundancia diferencial para bacterias del suelo.....	59
3.4.2 Abundancia diferencial para hongos del suelo	61
3.5 Efecto de la EOL en parámetros agronómicos y productivos de banano	63
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	68
Conclusiones	68
Recomendaciones	69
BIBLIOGRAFÍA	70
ANEXOS	82
Anexo 1. Ficha de evaluación en campo para parámetros agronómicos y de producción	83
Anexo 2. Preprocesamiento de muestras según el Laboratorio de Suelos y Nutrición vegetal de la FCV-ESPOL para el análisis físico-químico	84
Anexo 3. Coeficientes de variación de suelo para los parámetros químicos evaluados por tratamiento y período de evaluac	86

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AGROCALIDAD: Agencia de Regulación y control Fito y Zoonosanitario

Al: Aluminio

ASV: Amplicon sequence variant

B: Boro

BLD: Límite detectable para el equipo

C/N: relación Carbono/Nitrógeno

Ca: Calcio

Cd: Cadmio

CE: Conductividad eléctrica

CIBE: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador

CIC: capacidad de intercambio catiónico

Co: Cobalto

Cr: Cromo

Cu: Cobre

CV: Coeficiente de variación

DADA: Divisive Amplicon Denoising Algorithm,

EOL: Enmienda orgánica líquida

ESPOL: Escuela Superior Politécnica del Litoral

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)

FCV: Facultad de Ciencias de la Vida

Fe: Hierro

ICP-OES: Plasma de acoplamiento inductivo espectrometría de emisión óptica

INAMHI: Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología

INIAP: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Ecuador

ITS: Internal transcribed spacer (espaciador transcrito interno)

K: Potasio

LME: Modelos lineales aleatorios con efecto aleatorio mixto

MaxEE: Máximo de error

Mg: Magnesio

Mn: Manganeseo

MO: materia orgánica

Na: Sodio

NGS: Secuenciación de próxima generación

OUT: Unidad taxonómica operativa

P: Fósforo

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PCoA: Análisis de coordenadas principales

PERMANOVA: Análisis de varianza multivariante permutacional

pH: Potencial de Hidrógeno

TDS: Total de sólidos disueltos

Zn: Zinc

SIMBOLOGÍA

%: porcentaje

ppm: partes por millón

Bp: pares de bases

Kb: kilo base

β : beta vector desconocido de efectos fijos.

μ : media

ϵ : error aleatorio

Mm: milímetro

$^{\circ}\text{C}$: grados Celsius

$\mu\text{S/cm}$: microSiemens por centímetro

psu: Unidades de Salinidad Práctica

C/N: relación carbono/nitrógeno

ng/ μL : nanogramos por microlitros

m: metros

cm: centímetros

cmol/kg: Centimol por kilogramo

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Nomenclatura de las etiquetas para las muestras de suelo y hojas para análisis físico-químico y foliar.....	13
Tabla II. Nomenclatura de las muestras de suelo para análisis de microbioma.	14
Tabla III. Parámetros físicos-químicos del EOL..	21
Tabla IV. Parámetros químicos del suelo..	23
Tabla V. Efecto del tratamiento en los parámetros químicos del suelo al mes 6 de las variables que presentaron cambios significativos..	24
Tabla VI. Parámetros químicos de hojas..	28
Tabla VII. Efecto del tratamiento en los parámetros químicos de hojas que presentaron cambios significativos.	29
Tabla VIII. Parámetros químicos en hojas con diferencias significativas al considerar diferencias de porcentaje.....	29
Tabla IX. Resumen de la evaluación de la calidad del ADN extraído en muestras de EOL y suelo.	31
Tabla X. Preprocesamiento de lecturas de bacterias y hongos de muestras de EOL y suelo previo a la inferencia de ASVs.	31
Tabla XI. ASVs bacterianas más abundantes del EOL.....	32
Tabla XII. Top 20 ASVs del microbioma central común y grupos exclusivas de las muestras BR1 y BR2 del EOL..	35
Tabla XIII. ASVs bacterianas más abundantes en las muestras suelo.....	36
Tabla XIV. Top ASVs del microbioma central común bacteriano del suelo, exclusivas del control y del tratamiento..	43
Tabla XV. ASVs fúngicos más abundantes en las muestras de suelo..	44
Tabla XVI. Top ASVs del microbioma central común fúngico del suelo, exclusivas del control y del tratamiento.	51
Tabla XVII. PERMANOVA para ASVs bacterianas de muestras de suelo considerando las distancias Bray Curtis y Chiq.	59
Tabla XVIII. Resumen ASVs bacterianas con abundancia diferencial.	59
Tabla XIX. Top 20 de géneros bacterianas por tratamiento en base a la frecuencia de la abundancia diferencial.	60
Tabla XX. PERMANOVA para ASVs fúngicos de muestras de suelo considerando las distancias Bray Curtis y Chiq.	61
Tabla XXI. Resumen de ASVs fúngicas con abundancia diferencial.	61
Tabla XXII. Top 20 de géneros fúngicos por tratamiento en base a la frecuencia de la abundancia diferencial.	62
Tabla XXIII. Resumen de los modelos lineales con efectos aleatorios mixtos (lme) con interacción de tratamiento con el período de evaluación en planta madre como hijos.....	66
Tabla XXIV. Resumen de los modelos lineales con efectos aleatorios mixtos (lme) antes de la cosecha en plantas madre y correspondiente evaluación de las plantas hijos.....	66
Tabla XXV. Resumen de los modelos lineales con efectos aleatorios mixtos (lme) de las variables de cosecha en plantas madre.....	67

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta de banano y sus partes.....	3
Figura 2. Relaciones de cruce de algunas de las Musa comestibles más cultivadas.....	4
Figura 3. Relaciones de cruce de algunas de las Musa comestibles más cultivadas y comerciales.....	5
Figura 4. Microbioma.....	7
Figura 5. Diseño de Bloques Aleatorios (DBA) en campo.....	10
Figura 6. Aplicación en campo de EOL.....	11
Figura 7. Esquema del flujo de trabajo para los análisis bioinformáticos.....	15
Figura 8. Mapa de calor parámetros químicos del suelo.....	25
Figura 9. Mapa de calor con diferencia de porcentajes en los parámetros químicos de hojas	30
Figura 10. ASVs bacterianas más abundantes en muestras de EOL. A) por filo y B) por género.....	33
Figura 11. Mapa de calor géneros bacterianos del EOL por muestra.....	33
Figura 12. Microbioma central común bacteriano del EOL.....	34
Figura 13. ASVs bacterianas más abundantes (top 20) en muestras del suelo. A) por filo y B) por género.....	38
Figura 14. Mapa de calor del top 20 de géneros bacterianos en suelo por tratamiento control y tratamiento experimental al considerar períodos de evaluación.....	40
Figura 15. Mapa de calor del top 20 de géneros bacterianos en suelo por tratamiento control y tratamiento experimental al considerar profundidad.....	41
Figura 16. Microbioma central común bacteriano del suelo al considerar los tratamientos....	42
Figura 17. ASVs fúngicas más abundantes (top 20) en muestras del suelo. A) por filo y B)..	46
Figura 18. Mapa de calor del top 20 de géneros fúngicos en suelo por tratamiento control y tratamiento experimental al considerar períodos de evaluación.....	48
Figura 19. Mapa de calor del top 20 de géneros fúngicos en suelo por tratamiento control y tratamiento experimental al considerar profundidad.....	49
Figura 20. Microbioma central común fúngico del suelo al considerar tratamientos.....	50
Figura 21. Curvas de rarefacción de ASVs bacterianas en muestras del EOL.....	52
Figura 22. Curvas de rarefacción de ASVs bacterianas en muestras de suelo.....	52
Figura 23. Curvas de rarefacción de ASVs fúngicas en muestras de suelo.....	53
Figura 24. Riqueza y diversidad de la comunidad bacteriana del EOL.....	54
Figura 25. Riqueza y diversidad bacteriana de las muestras de suelo. A) considerando los tratamientos B) Período de evaluación y tratamiento y C) Profundidad y tratamiento.....	55
Figura 26. Riqueza y diversidad fúngicas de las muestras de suelo. A) considerando los tratamientos B) Período de evaluación y tratamiento y C) Profundidad y tratamiento.....	56
Figura 27. PCoA de muestras bacterianas de suelo considerando distancia Bray Curtis para: A) PCoA general y b) PCoA segmentado por período de evaluación.....	57
Figura 28. PCoA de muestras fúngicas de suelo considerando distancia Bray Curtis para: A) PCoA general y b) PCoA segmentado por período de evaluación.....	58
Figura 29. Tasa de crecimiento de altura y diámetro, y número de hojas en plantas madre alcanzado en la última semana en cada período de evaluación.....	64
Figura 30. Tasa de crecimiento de altura y diámetro, y número de hojas en plantas hijo por período de evaluación.....	65

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

El banano es la fruta fresca más exportada del mundo y fundamental para la economía de muchos países en vías de desarrollo, además es un alimento altamente nutricional que contribuye a la seguridad alimentaria de millones de personas (1).

Desde las últimas cuatro décadas, el Ecuador se ha posesionado como el principal exportador mundial de banano, abarcando más del 32% del mercado internacional. El banano Cavendish, la actual variedad, se siembra en 9 de las 24 provincias del Ecuador, siendo las principales provincias productoras El Oro, Guayas y Los Ríos. Esta industria representa más del 30% del total de productos exportables del país con una ganancia de \$2,4 billones por año, y está impulsada en casi en un 78% por medianos y pequeños productores, por lo que, esta actividad representa un eje central para la economía familiar, en especial en las zonas rurales (2).

En el Ecuador, los múltiples escenarios edafo-climáticos, sumado a la producción intensiva del cultivo de banano favorecen la aparición de plagas y enfermedades, principalmente aquellas causada por hongos, virus y nemátodos, dicha situación demanda un gran esfuerzo y gasto económico a los productores, quienes incurren en la compra de fertilizantes y pesticidas, para mantener los niveles de producción dentro de los límites aceptables para continuar operativos (3). Esta práctica basada en el uso de insumos, por un lado, incrementa los costos de producción, mientras por otro, genera problemas de salud (4) e impactos negativos en el suelo, agua y aire (5).

La literatura reporta que el uso inadecuado de agroquímicos a largo plazo disminuye el rendimiento y la calidad del cultivo, y esto muy probable se deba a la pérdida de diversidad y actividad microbiológica, dicho efecto incluso se ha reportado como enfermedad del suelo (6,7). En Ecuador, ya se han reportado pérdidas económicas, e incluso en algunos casos, el abandono de bananeras, debido al desgaste de suelos (3,8). En respuesta, y para mejorar este efecto erosivo, se han propuesto como alternativas de manejo, en paralelo a la frecuente aplicación de fertilizantes, el uso de enmiendas orgánicas líquidas (EOL) (4,9,10).

El uso de EOL se vislumbran como una herramienta al alcance y de fácil adopción en sistemas de producción convencional y orgánico de banano al ofrecer beneficios como la reducción de carga química, mejora en las propiedades del suelo (11–13) y la obtención de alimentos más saludables, estándares que cada vez más se exigen por los mercados europeos donde mayormente se consume la fruta (14).

Las enmiendas orgánicas son el producto de la fermentación anaerobia de restos de origen animal o vegetal que contienen nitrógeno, hormonas, vitaminas, aminoácidos y microorganismos benéficos que influyen directa e indirectamente sobre las plantas (15,16).

Los consorcios microbianos de la EOL influyen directamente sobre la planta ya que regulan el metabolismo y crecimiento vegetal (17,18). También se han reportado como productos con actividad frente a patógenos que causan importantes enfermedades en el banano como Sigatoka negra y Fusariosis (4, 13, 19) muy probable por la acción de competencia por nutrientes debido

a la presencia de microorganismos, o la acción de metabolitos liberados por estos consorcios (20).

Otro mecanismo de acción es la inducción del sistema de defensa en las plantas, y su rol en la absorción de nutrientes (21). Además, se conoce que estos consorcios mejoran la estructura y fertilidad del suelo (22), lo cual contribuye a la productividad de los cultivos (23).

Algunos estudios reportan los efectos individuales de enmiendas orgánicas sobre las propiedades fisicoquímicas del suelo (24) o sobre los parámetros agronómicos, tanto en condiciones *in vitro*, *in situ* y en invernadero (25–27). Otros estudios, a través de métodos cultivables ilustran como las enmiendas orgánicas pueden afectar la composición y diversidad de los microorganismos del suelo que intervienen en la nutrición y defensa de la planta lo que influye en la calidad y productividad agrícola (10,28,29). Estos esfuerzos han permitido aislar cepas con potencial biotecnológico, pero el conocimiento sobre la interacción EOL-suelo-microbiota-planta, aún es limitado.

En la actualidad, en un esfuerzo por entender mejor estas interacciones, se emplean métodos no cultivables como el empleo de secuenciación de próxima generación, o conocido mejor como “Next Generation Sequencing”- NGS (Por sus siglas en inglés) (30) cuyo uso representa una alternativa para conocer mejor la dinámica de interacción entre las poblaciones de microorganismos con la planta, que responden también a otras variables como el suelo, cambios ambientales, variaciones de temperatura, entre otras, todo bajo un concepto unificador denominado microbioma (31,32). El uso de esta herramienta es utilizada para caracterizar la fertilidad del suelo (24,33), conocer como los microorganismos promueven los mecanismos de defensa de las plantas (34,35) e incluso, ser integradas en planes de manejo para mejorar producción y sostenibilidad de cultivos (32).

Desde el punto de vista del mercado de consumo, en las últimas décadas se ha incrementado la demanda del banano orgánico por parte, de los mayores consumidores de esta fruta: Estados Unidos, la Unión Europea y Japón. Esto ha obligado a los productores de banano convencional considerar que, para continuar siendo competitivos, y cumplir con las exigencias de estos mercados, deben reducir su carga química acorde a las normativas vigentes internacionales (2).

Por lo antes expuesto, en el presente trabajo se incorpora una visión integral para entender el efecto de enmiendas orgánicas líquidas sobre el banano incorporando nuevas herramientas ómicas, que además de la evaluación de suelo y parámetros productivos, puedan capturar los cambios que muchas veces no se observan en la planta ya sea por las limitantes de los métodos empleados o por la prolongada fase de desarrollo del cultivo que muchas veces desmotiva al productor en valorar estos bio insumos que por lo general tienen un efecto a largo plazo en cultivos perennes. En la actualidad, no existe información en el Ecuador sobre comunidades microbianas asociadas a suelos bananeros, por lo cual este trabajo representaría el primer esfuerzo en entender las interacciones EOL-suelo-planta para la validación de este tipo de tecnologías como aplicaciones útiles que pueden incorporarse en los planes de manejo en la producción del banano.

1.2 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la aplicación de enmiendas orgánicas líquidas “Bioles” sobre el microbioma y parámetros fisicoquímicos de suelo asociado a banano Cavendish var. Williams,

para validar su uso como herramienta tecnológica dentro de un sistema de producción convencional.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar cambios en parámetros fisicoquímicos del suelo antes y después de la aplicación periódica de una enmienda orgánica líquida en banano bajo un sistema de producción convencional.
2. Evaluar el efecto de la aplicación de la enmienda orgánica líquida sobre la composición y abundancia de grupos bacterianos y fúngicos del suelo mediante el uso de técnicas de secuenciación masiva.
3. Cuantificar el efecto de la aplicación de la enmienda orgánica líquida en banano, como complemento a la fertilización y manejo del suelo, mediante la evaluación de parámetros agronómicos.

1.4 MARCO TEÓRICO

1.4.1 Generalidades del Banano *Musa acuminata* (Var. "Williams" AAA)

Los bananos son plantas herbáceas monocotiledóneas con pseudotallos aéreos que se originan de cormos carnosos, en los que se desarrollan numerosas yemas laterales o "hijos", las hojas crecen en filotaxis espiral y tienen una distribución helicoidal como se muestra en la Figura 1 (10).

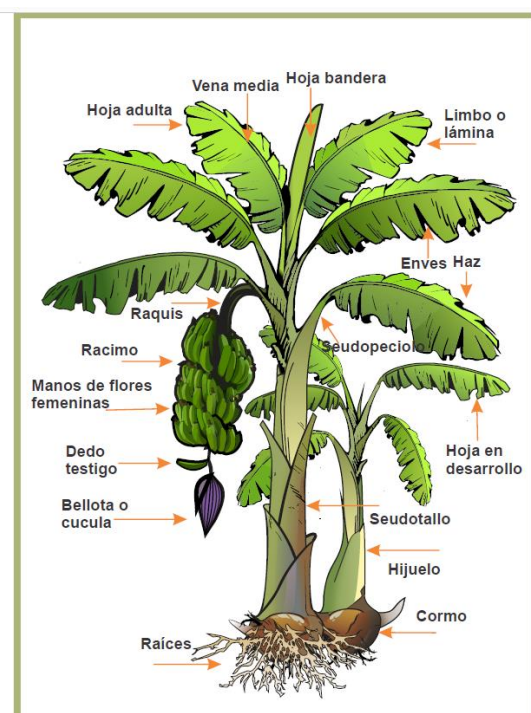


Figura 1. Planta de banano y sus partes. Fuente: Torres, 2012

El cultivo es perenne y pasa por 3 fases en su ciclo de desarrollo, las cuales incluyen: fase vegetativa (donde aparece un brote o retorno y dura aproximadamente hasta la semana 17 o mes 4), fase vegetativa-reproductiva (se caracteriza por la emisión de hojas y dura aproximadamente hasta la semana 22 o mes 6), y la fase reproductiva-productiva (inicia con la diferenciación floral hasta la cosecha del fruto y dura aproximadamente hasta la semana 37

o mes 9). La duración del ciclo de producción está determinada por la variedad, altitud, latitud, manejo y las condiciones edafoclimáticas de cada una de las regiones productivas (36–38).

Su fruta puede cosecharse durante todo el año (1) y contiene vitaminas y minerales (vitamina A, C, E, fósforo, magnesio, potasio, hierro) y compuestos bioactivos (fibra dietética, fenoles, carotenoides, aminos biogénicos y fitoesteroles) con actividades antioxidantes altamente deseables por su valor nutritivo y medicinal (39).

Aunque no se conoce con exactitud su centro de origen, se cree que se originó en el sureste asiático (Malasia, regiones de la Península Malay, Indonesia, Filipinas e India) y la distribución de este cultivo fuera de Asia se lo relaciona con los movimientos y asentamientos del hombre, por ejemplo, en América este llegó por los españoles en la época de la colonización (40). Actualmente se conoce que este cultivo está distribuido en más de 135 países en las regiones tropicales y en algunas regiones subtropicales de Asia, África, América Latina, el Caribe, y el Pacífico (41). El banano de consumo actual es el resultado de cruza intra e inter-específicas entre otras especies de *Musa acuminata* Colla y *Musa balbisiana* Colla, variedades silvestres cultivadas e híbridas (42).

Según su taxonomía el banano pertenece a la familia *Musaceae* y género *Musa* (tradicionalmente conocido como Eumusa), de este último se han descrito alrededor de 60 especies silvestres, donde las principales para el desarrollo de diferentes variedades de consumo (entre estos bananos de postre) y programas de mejoramiento (43) son las especies *Musa acuminata* Colla y *Musa balbisiana* Colla. El genotipo *Musa acuminata*, es designado por su genoma con la letra A, mientras que el genotipo de *Musa balbisiana* es designado con la letra B. Normalmente el banano es el resultado de cruces de genotipos diploides (AA y AB), triploides (AAA, AAB y ABB) y hasta tetraploides (AAAA, AAAB y AABB) (40,43) cómo se detalla en la Figura 2.

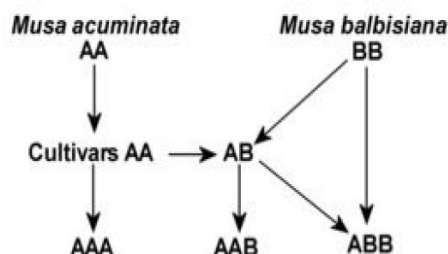


Figura 2. Relaciones de cruce de algunas de las Musa comestibles más cultivadas. Fuente: OECD, 2009.

Los principales cultivares comerciales conocidos son triploides AAA, del tipo Cavendish, este grupo es el principal para fines de exportación, porque puede alcanzar altos rendimientos por hectárea, es menos propenso a sufrir daños por variaciones ambientales, y son más tolerantes a los daños mecánicos ocasionados por los largos viajes en el comercio internacional (44). En este grupo se encuentra el cultivar Gros Michel, que en un momento fue el cultivo comercial líder en el mundo, pero tuvo su declive a mediados del siglo XX debido a la alta susceptibilidad a la enfermedad del marchitamiento por *Fusarium* (45,46) dando paso a otras variedades más resistentes contra patógenos (47,48) entre ellos los más conocidos Grande Naine, Valery, Robusta, Poyo, Dwarf Cavendish y Williams (43) ver Figura 3.

CROSSED SPECIES	GENOME	GROUP/VARIETY/CULTIVAR
Section <i>Musa</i> (<i>Eumusa</i>) <i>M. acuminata</i> (AA) × <i>M. acuminata</i> (AA)		
	AA	Sucrier: Pisang Mas / Bocadillo Pisang Lilin Pisang Jari Buaya Inarnibal Lakatan (in part)
	AAA	Cavendish: Robusta, Valery Grande Naine (Grand Nain) Pisang Masak Hijau / Lacatan Gros Michel Ambon Putih Red Ibota
	AAAA	Mutika/Lujugira (Highland bananas) Pisang Ustrali Golden Beauty

Figura 3. Relaciones de cruce de algunas de las *Musa* comestibles más cultivadas y comerciales. Fuente: OECD, 2009

1.4.2 Mercado *Musa acuminata* (Var. “Williams” AAA)

El banano es la fruta fresca más exportada del mundo, es importante para la economía de muchos países de bajos ingresos y en vías de desarrollo (1) de las regiones de Asia, África, Oceanía y América Latina y el Caribe, siendo esta última la principal región exportadora de banano con casi el 80% de las exportaciones mundiales (49). A pesar de esta dinámica, solo el 15% de la producción mundial total se comercializa en el mercado internacional, mientras que el producto restante se destina al consumo local (50), proporcionando hasta el 25 % de la ingesta diaria de calorías en las zonas rurales de los países productores (49).

El mercado de exportación de banano ha ido en aumento, y en el año 2020, a pesar de la pandemia ocasionada por el COVID-19, las exportaciones alcanzaron un récord de 22,2 millones de toneladas de fruta, un crecimiento del 1,7 por ciento en comparación con 2019 generando más de 12 000 millones de USD al año, esto se debe a varios factores entre ellos: campañas de salud de los principales importadores de la fruta como la UE y Rusia para mejorar el sistema inmunológico a través de una nutrición de frutas frescas, el consumo y expansión del área cosechada en países productores, además de las estrategias que estos tomaron en las primeras etapas de la pandemia minimizando las interrupciones en su capacidad de suministrar bananos al mercado (44,51,52).

El banano tipo Cavendish representa alrededor del 40-50 % de la producción mundial (44), y más del 95 % de la producción de exportación depende de las variedades cultivadas como Grand Naine y Williams (53).

Por otra parte, desde las cuatro últimas décadas, el Ecuador se ha posesionado como el principal exportador mundial de banano convencional, abarcando el 34,86% del mercado internacional (54). En el año 2020 alcanzó un máximo sin precedentes de 6,9 millones de toneladas de producción (49), lo cual generó ingresos que representaron el 3% del PIB con el 39,5% de los ingresos por exportaciones tradicionales (2,54).

Estimaciones a mediano plazo según reportes de la FAO sugieren que, para el año 2028 se espera que el mercado del banano a nivel mundial siga en aumento, alcance una producción mayor de 255 millones de toneladas, y crezca su superficie cosechada aproximadamente un 1 % anual, hasta alcanzar los 15 millones de hectáreas. Así mismo se espera que el Ecuador

alcance un volumen de producción de 8 millones de toneladas representando más del 35% del mercado internacional (49).

1.4.3 Enmiendas orgánicas (EOL) en sistemas de producción

Las enmiendas orgánicas líquidas (conocidos como bioles en plural, o biol en singular), son bioinsumos que se obtienen a partir de la incorporación de residuos de origen vegetal y animal con inóculos microbianos, en algunos casos con sustratos enriquecidos, como la melaza, para apoyar la viabilidad y el crecimiento microbiano. Son elaborados de bajo costo, obtenidos mediante procesos biológicos como la fermentación anaerobia (18,55).

La aplicación de estas enmiendas dentro de un sistema de producción puede aportar una carga microbiana benéfica a la comunidad microbiana existente del suelo, o incluso estimularla para mejorar las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los suelos (28,29). Dependiendo de su modo de acción se pueden clasificar como biofertilizantes, fitoestimuladores y bioplaguicidas y su aplicación no representa ningún efecto nocivo para la planta, con menor impacto en el ambiente a largo plazo (11,12,56).

Las EOL, contribuyen principalmente a las características fisicoquímicas del suelo al proporcionar elementos como N, P y K y materia orgánica, lo que mejora la fertilidad y estructura de los mismos (24,57,58). Contribuyen con las características biológicas del suelo al acelerar procesos microbianos que aumentan la disponibilidad de nutrientes que pueden ser fácilmente asimilados por las plantas, fijan el nitrógeno atmosférico y solubilizan fosfatos y el hierro (58,59).

Además, se ha demostrado que estas enmiendas pueden activar o estimular en las poblaciones microbianas del suelo rutas metabólicas para la producción de fitohormonas promotoras del crecimiento vegetal, como las auxinas, que juegan un rol importante frente al estímulo de la luz, estrés biótico y abiótico (17,22), y juegan un rol importante en la producción de proteínas, aminoácidos esenciales, vitaminas y estimulan al sistema de defensa de la planta con la síntesis de diferentes tipos de antibióticos (58,60) y efecto contra patógenos de enfermedades de banano como la Sigatoka negra y Fusariosis (13,26,61).

Los efectos de las EOL en condiciones de campo depende de varios factores como climas locales, el estado nutricional de las plantas, las propiedades fisicoquímicas del suelo, propiedades biológicas y fisicoquímicas de la misma enmienda (21,62,63) y por último, pero no menos relevante, las estrategias de aplicación adecuadas que puedan implementarse (2,17).

1.4.4 Microbiomas

En los últimos años, en el campo de la agricultura, se ha dado énfasis a la metagenómica, que estudia las estructuras y funciones de las comunidades microbianas presente en diferentes tipos de muestras como enmiendas orgánicas, suelo y rizosfera, sin la necesidad de aislar y cultivar especies (64).

Esta aplicación ha permitido estudiar lo que hoy conocemos como microbioma, aunque en el pasado algunos autores empleaban el término para describir lo que actualmente se conoce como microbiota, hoy muchos estudios se enfocan en el microbioma central común, que se refiere a grupos comunes de microbios o genes particularmente importantes y característicos para la función biológica dentro de un huésped o ambiente y se establece bajo ciertos criterios como la frecuencia y abundancia de especies. Otros estudios, se enfocan sobre los microbiomas

temporales, funcionales y ecológicos, a menudo identificando microbios clave con respecto a su distribución espacial y temporal, influencia externa y ecológica, y la función que estos tienen con el ambiente (65) este término sigue en desarrollo y dependerá de cuanto avance el conocimiento (66,67).

En este contexto, es importante resaltar ciertos términos que nos permitan esclarecer el enfoque y alcance de cualquier estudio metagenómico. Como microbiota se entiende a la composición taxonómica microbiana de una muestra o muestras, mientras que, metagenoma, se refiere al conjunto de genes y genomas del microbiota, y el término microbioma encierra en conjunto la microbiota, genes y metabolitos tratando de establecer las relaciones ecológicas microbianas en un ambiente (66,67) como se lo ejemplifica en la Figura 4.

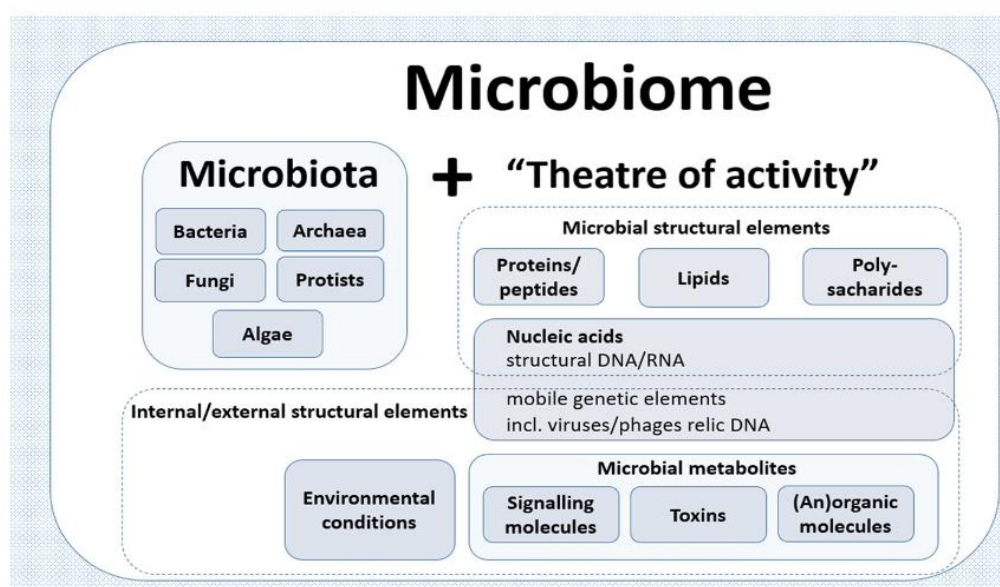


Figura 4. Microbioma. Fuente: Berg, 2020 (66).

Los estudios basados en metataxonómica son aquellos que, amplifican y secuencian en base a un gen marcador, generalmente en bacterias se utiliza una región variable del gen 16S ARNr, y en hongos la región espaciadora transcrita interna, ITS. Sin embargo, estos estudios presentan ciertas limitaciones porque son productos de PCR basados en un solo gen marcador, producen fragmentos de secuenciación cortos y la información funcional es básicamente predictiva, aunque también hay ventajas ya que nos ofrecen una primicia informativa, requieren menos capacidad de cómputo para los análisis y son más económicos que los estudios de metagenómica shotgun (68).

Por otro lado, los estudios de metagenómica tipo shotgun se basan en secuencias aleatorias de ADN de una muestra del que se pueden reconstruir genomas completos, inferir genes, rutas metabólicas y rasgos específicos (como la resistencia a antibióticos) considerando la parte funcional depositadas en bases de datos disponibles, como KEGG Orthology (69). Este método es más costoso y requiere una mayor profundidad de secuenciación y de cobertura para construir contigs de alta calidad, así como de herramientas y capacidad de cómputo mayor. Sin embargo, estos estudios tienen la ventaja de ser más informativos al analizar el microbioma (65–67,70).

1.4.5 Secuenciación de siguiente generación (NGS)

La metagenómica engloba a la metagenómica por amplicon, metabarcoding o también llamada metataxonómica y metagenómica “shotgun”, aunque hay algunos autores que sugieren referirse al término metagenómica únicamente cuando la información genética se obtenga mediante secuenciación tipo “shotgun” (71).

En la búsqueda de estudiar el microbioma y abaratar costos se han desarrollado secuenciadores de alto rendimiento que generan cientos de miles de secuencias de una forma más rápida y económica. Actualmente existen 4 plataformas disponibles para secuenciación masiva, entre estas la plataforma de Illumina basado en PCR de puente, que ha ido incorporando progresivamente una serie de instrumentos como MiSeq, HiSeq, NextSeq y Novaseq que cada vez son más potentes en cuanto a información generada a bajos costos (72). Esta plataforma aplica un método basado en la polimerización del ADN que incorpora un nucleótido marcado con fluorescencia y protegido en la cadena naciente que impide que ésta siga creciendo, después de detectar la señal fluorescente el equipo elimina el grupo protector pudiéndose incorporar otro nucleótido marcado e iniciar un nuevo ciclo (67). En el caso particular del secuenciador Novaseq, plataforma empleada en este estudio, se obtienen lecturas de ADN crudas en sentido forwards y reverse de extremo emparejado de 2x250pb, lo que quiere decir, que se puede obtener un tamaño de amplicon de ADN de hasta 500pb con una profundidad de secuenciación de hasta 200000 lecturas por muestra (<http://www.illumina.com/support>). Dicho de otra manera, Novaseq incrementa el número de lecturas por muestras cuya calidad garantizan una mejor identificación de los posibles grupos de microorganismos presentes.

1.4.6 Herramientas bioinformáticas y flujos de trabajo para el análisis exploratorio de microbiomas

Una vez obtenidas las lecturas del secuenciador se sigue un flujo de trabajo o pipeline bioinformático, para lo cual, se requiere el empleo de herramientas informáticas, para el alineamiento, ensamblaje e inferir en variantes de secuencias de amplicones, ASVs (por sus siglas en inglés Amplicon sequence variant) que son análogas de mayor resolución que las unidades taxonómicas operacionales (OTUs, por sus siglas en inglés). Entre otras herramientas se encuentra el software DADA2, que es un sistema de filtrado de calidad de secuencia más estricto, que favorece la identificación de ASVs (73).

Las ASVs son las secuencias que proporcionan la información de la composición taxonómica para entender la estructura de las muestras y para ello se comparan con grandes bases de datos disponibles públicamente, entre ellas, para bacterias SILVA (74) y para hongos, UNITE general FASTA release (Abarenkov et al, 2020) hasta alcanzar el nivel taxonómico más cercano de género y en algunos casos de especie (70).

Existen varios flujos de trabajos que permiten explorar el microbioma a través de: a) perfiles taxonómicos a través de métodos filogenéticos y no filogenéticos, visualizaciones en tablas y gráficos de abundancias, mapas de calor y diagramas de Venn b) ecología microbiana: curvas de rarefacción, diversidad alfa (análisis por muestra) y beta (diversidad entre muestras) y c) análisis estadísticos basados en diversidad y abundancia diferencial de las comunidades microbianas. (76)

En los análisis ecológicos, una medida de diversidad, son las curvas de rarefacción, que permiten visualizar la profundidad de secuenciación, representan el número de especies en ASVs u OTUs, versus un subgrupo de número de secuencias por muestra. Si la curva alcanza

las mesetas de riqueza y diversidad se puede determinar que se ha alcanzado la suficiente profundidad en la secuenciación para cubrir toda la diversidad de la muestra incluido los taxones minoritarios (77), cuanto mayor sea la profundidad de secuenciación, más probable es que se alcance la cobertura de diversidad (Sims, Sudbery, Ilott, Heger, & Ponting, 2014). Para desarrollar las curvas es necesario normalizar, y uno de estos métodos es la rarefacción, la cual, crea un conjunto de datos submuestreados aleatoriamente de secuencias de entrada hasta un número determinado y como resultado se obtienen curvas de diversidad basadas en el número de secuencias en una muestra (79).

La diversidad alfa usa distintas métricas, llamados índices clásicos entre estos: Chao1, Shannon-Wiener y Simpson. Chao1 es un estimador de riqueza, y cuanto mayor sea el número de ASVs únicas en una muestra, mayor es el valor de este índice. Los índices de Shannon-Wiener y Simpson, consideran la riqueza de especies y la combinan con la abundancia para dar una medida de diversidad. Los valores de salida Shannon - Wiener comienzan en 0 y los valores más altos están asociados con una mayor diversidad, mientras que, el índice de Simpson representa la probabilidad de que dos ASVs u OTUs seleccionadas al azar de la misma muestra, sean la misma especie. Los valores de salida están delimitados entre 0 y 1, donde 0 representa el valor más alto de diversidad (79).

La diversidad beta compara la composición microbiana entre muestras de diferentes entornos, en base a las diferencias en los perfiles microbianos, el resultado de las medidas de diversidad beta es una matriz de distancia que contiene un valor de disimilitud para cada comparación por pares (cada muestra en comparación con otra), para ello, entre otros métodos, se normaliza por la abundancia relativa dentro de cada muestra, y se usa distancias como la de Bray Curtis (método no filogenético que tiene en cuenta la abundancia de ASVs o OTUs), unweighted UniFrac (método filogenético que tiene en cuenta la presencia o ausencia de ASVs o OTUs) y weighted UniFrac (método filogenético que tiene en cuenta la abundancia de ASVs o OTUs) y se lo representa en gráficos, como el de análisis de coordenadas principales, PCoA (80).

Finalmente, el análisis estadístico diferencial entre muestras reúne distintas condiciones considerando la diversidad, abundancia o ambos criterios y que son objeto de estudio a todos los niveles taxonómicos. En cuanto a la abundancia diferencial de ASVs, es común emplear un análisis de varianza multivariante permutacional (PERMANOVA) previo a probar los supuestos de homogeneidad y normalidad. Para este análisis, debe existir homogeneidad aunque no exista una distribución normal en los datos (81).

El potencial de estas y nuevas herramientas bioinformáticas es enorme y ha transformado las investigaciones aplicadas al estudio de microbiomas desde que se ha reducido los tiempos de análisis y costos (70).

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA

2.1 Diseño experimental

El estudio se realizó en la Hacienda Bellavista, ubicado vía Daule, en Guayas, Ecuador (S:1°54'18.0", W:80°00'3.7"). Se empleó un diseño de bloques completos al azar en campo con cuatro repeticiones por 2 tratamientos durante todo un ciclo de producción convencional de banano Cavendish de la variedad Williams (aproximadamente 9 meses). Como unidades de observación en cada bloque se seleccionaron 10 unidades de producción en estado vegetativo con características homogéneas considerando características como altura, diámetro de pseudotallo y número de hojas verdaderas de entre 25 a 50 plantas por cada bloque. El tratamiento control consistió en el manejo propio que lleva la finca para sus bloques, mientras que al tratamiento experimental se le adicionó 300 mL de EOL sin diluir por planta de manera edáfica en la base de la planta en semiluna (82,83) con una frecuencia de aplicación quincenal. Las condiciones de manejo del cultivo se mantuvieron homogéneas para ambos tratamientos durante todo el periodo de evaluación del ensayo (Figura 5).

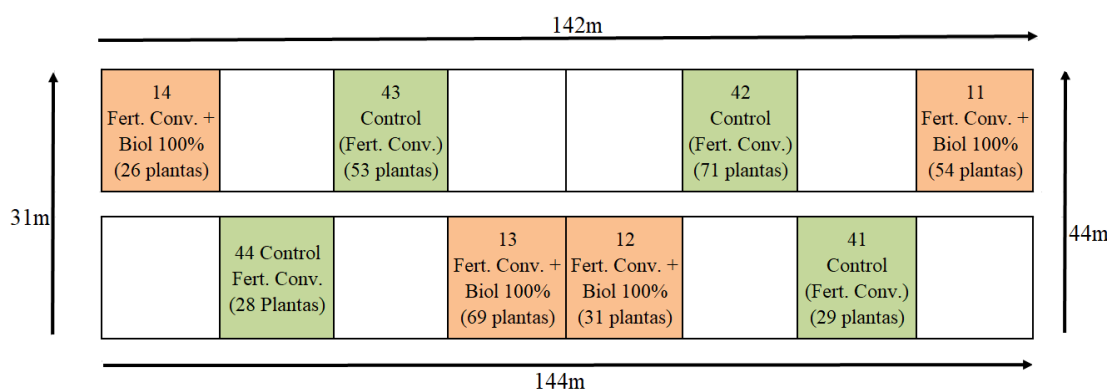


Figura 5. Diseño de Bloques Aleatorios (DBA) en campo con 4 repeticiones para el tratamiento experimental (11,12,13 y 14) y para el tratamiento control (41,42,43 y 44). El primer dígito de la numeración en cada bloque representa el tratamiento: 1 con aplicación de EOL y 2 sin aplicación de EOL (control); y el segundo dígito representa el número de repetición por bloque.

2.2 Elaboración de la enmienda orgánica líquida

La elaboración de la EOL artesanal se desarrolló dentro de la misma hacienda siguiendo una metodología estandarizada por el grupo de técnicas agrícolas del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE-ESPOL), los ingredientes usados para la elaboración fueron: estiércol de ganado vacuno, microorganismos eficientes locales, rocas minerales (roca fosfórica y sulfato de potasio y magnesio), tamo de arroz, suero de leche, melaza y agua, y se colocaron en un biorreactor de plástico con capacidad para 600 L sellado herméticamente (84,85). Los microorganismos eficientes locales se capturaron siguiendo la metodología descrita por Jimenez (2007) (4).

La fermentación se realizó por cuatro meses con reactivaciones mensuales de microorganismos eficientes locales y melaza (86). Al término de este tiempo se considera un biol maduro listo

para cosechar con un tiempo de viabilidad de entre 4 y 10 meses (4). Al tratamiento experimental se le adicionó el EOL con una mochila aspersora mecánica como se evidencia en la Figura 6.



Figura 6. Aplicación en campo de EOL.

2.3 Variables de estudio y procesamiento de muestras

2.3.1 Parámetros agronómicos-productivos

Los datos de los parámetros agronómicos y de producción se registraron en una ficha de evaluación de campo (Anexo 1) y se tomaron de las unidades de observación cada 15 días abarcando todas las fases de desarrollo hasta la cosecha y para los retornos se tomaron datos hasta la semana 22 (fase vegetativa-reproductiva). Estos parámetros evaluados fueron: altura, diámetro de pseudotallo (considerado a 0.67cm de la base), número de hojas, emisión foliar (según escala de Brun, 1963) y tasa de emisión foliar. Los datos de las variables de producción se tomaron el día de la cosecha en cada unidad de observación y fueron: semanas transcurridas entre floración y cosecha, hojas a cosecha, número de manos por racimo, dedos (bananas) por mano, promedio y longitud de dedos por mano, peso de racimo bruto (peso de manos y raquis en kg), peso de racimo neto (peso de manos en kg), ratio bruto (cajas/racimo peso bruto) y neto (cajas/racimo peso neto).

2.3.2 Parámetros físico-químicos y de nutrientes en muestras de la EOL y suelo

Para determinar la calidad y contenido nutricional del EOL que se usó en el ensayo, se evaluaron parámetros físico-químicos, para ello, se recolectaron 3 muestras técnicas, es decir del mismo lote de producción del EOL, cuando este alcanza un estado maduro y viable. Los parámetros considerados se detallan a continuación:

1. Parámetros físicos-químicos: conductividad eléctrica, pH, salinidad, total de sólidos disueltos, temperatura y salinidad (ppm).
2. Macronutrientes (ppm): Fósforo (P), Calcio (Ca), Potasio (K) y Magnesio (Mg).
3. Micronutrientes (ppm): Sodio (Na), Cobre (Cu), Hierro (Fe), Manganeso (Mn), Cobalto (Co), Zinc (Zn), Boro (B).
4. Metales pesados: Aluminio (Al), Cadmio (Cd).

Los parámetros físicos-químicos se midieron con el equipo multiparamétrico STARA3295 ORION (Thermo Scientific, USA), y la determinación de macro, micronutrientes y metales pesados se determinó mediante espectrometría de emisión óptica (ICP-OES) por el método soluble en agua, digestión de agua regia y digestión con ácido nítrico. Los resultados de macro, micronutrientes y metales pesados se reportaron considerando 2 fracciones del EOL, la fracción fácilmente disponible o líquida (d) para microorganismos y planta, y la fracción sólida o sedimentable (p), que tomará más tiempo en que pueda ser absorbida (82,86).

Para el análisis de suelo, con un barreno se extrajo suelo siguiendo una forma de semiluna al lugar de aplicación del EOL para obtener una muestra compuesta (15,38,83,87), es decir, se mezcló el suelo de las 10 unidades de observación tomada a una profundidad de 5-15cm en dos períodos de evaluación, mes 0 y mes 6 por bloque, que coincidieron con la fase vegetativa y fase reproductiva-productiva respectivamente de las unidades de observación. Los parámetros evaluados fueron:

1. Parámetros físicos-químicos: textura, pH, capacidad de intercambio catiónico (CIC, cmol/kg), % materia orgánica (MO).
2. Macronutrientes(ppm): Nitrógeno (N), Carbono (C), relación Carbono/Nitrógeno (C/N), Fósforo (P), Calcio (Ca), Potasio (K) y Magnesio (Mg).
3. Micronutrientes(ppm): Sodio (Na), Cobre (Cu), Hierro (Fe), Manganeso (Mn), Zinc (Zn), Boro (B).
4. Metal pesado(ppm): Cadmio (Cd), Cromo (Cr).

La textura del suelo se determinó por el método del hidrómetro; el pH mediante el método de agua: suelo (5:1); el nitrógeno total se analizó mediante el método Kjendahl; materia orgánica mediante el método de DUMAS y los elementos extraíbles (macro, micronutrientes y metales pesados) por el método de acetato de amonio a 1 molar.

A partir de los valores obtenidos de: CIC, MO, relación C/N, macro y micronutrientes y metales pesados, se calculó el coeficiente de variación del suelo (desviación estándar de la variable dividido para media de la variable) con el fin de descartar que los cambios significativos obtenidos se deban a la variación propia del suelo más que al efecto del tratamiento o período de evaluación.

2.3.3 Parámetros físicos-químicos y de nutrientes en muestras foliares

Para este análisis, con un podón se realizó un corte en la sección central de la tercera hoja verdadera de la planta en orden descendente (83,87) de cada unidad de observación por bloque, en los períodos de evaluación respectivos, meses 0 y 6, que también coinciden con la fase vegetativa y reproductiva-productiva de las unidades de observación. Una vez tomadas, las muestras se almacenaron en fundas de papel para conservar la humedad hasta su posterior análisis. Los parámetros evaluados fueron:

1. Parámetros físicos-químicos: % materia orgánica.

2. Macronutrientes (ppm): Nitrógeno (N), Carbono (C), relación carbono/nitrógeno (C/N), Fósforo (P), Calcio (Ca), Potasio (K) y Magnesio (Mg).
3. Micronutrientes (ppm): Sodio (Na), Cobre (Cu), Hierro (Fe), Manganeso (Mn), Zinc (Zn), Boro (B).
4. Metal pesado (ppm): Aluminio (Al).

La determinación de macro, micronutrientes y metales pesados se determinó mediante espectrometría de emisión óptica (ICP-OES) por el método de digestión con ácido nítrico.

Las muestras de EOL, suelo y hojas se enviaron al Laboratorio de Suelos y Nutrición vegetal de la FCV-ESPOL para los análisis respectivos previo a un preprocesamiento de las muestras como se indica en el Anexo 2. Las muestras de suelo y hojas se codificaron con etiquetas de 4 dígitos según la Tabla I.

Dígito	Nomenclatura	Descripción
1	C	Control
	T	Tratamiento
2, 3	L1	Bloque repetición 1
	L2	Bloque repetición 2
	L3	Bloque repetición 3
	L4	Bloque repetición 4
4	R1	Réplica 1

Tabla I. Nomenclatura de las etiquetas para las muestras de suelo y hojas para análisis físico-químico y foliar. Por ejemplo, la muestra CL1R1, quiere decir que, es una muestra del control correspondiente al bloque 1 con réplica número 1.

2.3.4 Extracción de ADN y análisis de microbiomas

Se tomaron muestras estratificadas de cada bloque por tratamiento para el estudio de microbiomas, cada muestreo se realizó en tres períodos de evaluación (0, 6 y 9 meses) y a diferentes profundidades (0-5cm y 10-15cm). Para análisis comparativo también se incluyeron muestras del EOL maduro (10 meses de elaboración). En total se enviaron 113 muestras de las cuales, 3 réplicas técnicas pertenecieron a la EOL usada durante el experimento y 110 muestras de suelo de los diferentes tratamientos para el análisis de poblaciones bacterianas y fúngicas incluidos sus respectivas réplicas por triplicado.

Las muestras se almacenaron en fundas ziploc y se mantuvieron en refrigeración hasta su transporte al laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE-ESPOL) donde se almacenaron a -80°C y se procesaron dentro de las 24 horas para extracción de ADN total y el posterior análisis de las comunidades bacterianas y fúngicas. Las muestras de suelo se codificaron con etiquetas de 8 dígitos según se detallan en la Tabla II.

Dígito	Nomenclatura	Descripción
1	1	Tratamiento
	4	Control
2, 3	L1	Bloque repetición 1
	L2	Bloque repetición 2
	L3	Bloque repetición 3
	L4	Bloque repetición 4
4, 5	M0	Mes 0
	M6	Mes 6
	M9	Mes 9
6	0	0-5cm de profundidad
	5	5-15cm de profundidad
7, 8	R1	Réplica 1
	R2	Réplica 2
	R3	Réplica 3

Tabla II. Nomenclatura de las muestras de suelo para análisis de microbioma. Por ejemplo, la muestra 1L2M05R3, quiere decir que, es una muestra del tratamiento 1 correspondiente al bloque 2 tomada en el período de evaluación mes 0, a una profundidad de 5-15cm con réplica número 3.

Previo a la extracción de ADN, las muestras de la EOL se preprocesaron centrifugando una alícuota de 50 a 100 ml a 3200 rpm durante 15 min para producir un sedimento semisólido, al cual se le realizó la extracción de ADN respectiva. El sobrenadante se descartó. Las muestras de suelo se homogenizaron previo al proceso de extracción. En ambos casos, el ADN se obtuvo mediante el kit comercial, DNeasy Power Soil (Qiagen, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para verificar la calidad de la extracción del ADN (integridad, concentración y pureza), cada muestra se analizó bajo electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y espectrofotometría con el equipo Nanodrop para verificar los ratios A260/A280, y A260/A230 (88). El servicio de secuenciación de siguiente generación (NGS) se basó en metagenómica por amplicón y se realizó en un laboratorio externo, Novogene Corporation Inc, mediante la plataforma NovaSeq 6000 de Illumina de extremo emparejado de 2×250 pb, con una profundidad de secuenciación de 100.000 lecturas por muestra. Para la comunidad bacteriana se usó la región V3-V4 del gen ADNr 16S con los cebadores 341F (CCTAYGGGRBGCASCAG) y 806R (GGACTACNNGGGTATCTAAT) para obtener amplicones de una longitud aproximada de

470bp. En el caso de hongos, se usó la región espaciadora transcrita interna, ITS1, del operón ARNr usando los cebadores ITS1-1F-F (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) e ITS2 (GCTGCGTTCTTCATCGATGC) para obtener amplicones esperados entre 200 a 400bp.

2.3.5 Análisis bioinformáticos

El flujo de trabajo se basó en los cuatro pasos principales en un análisis típico de amplicones (1) preprocesamiento, (2) selección de OTU /ASVs, (3) la anotación o asignación taxonómica y (4) análisis estadísticos y visualización (89,90) según se muestra en la Figura 7.

El pipeline bioinformático se realizó desde un cluster de alto rendimiento (High performance Computing, HPC) de CEDIA utilizando un paquete R de código abierto llamado Divisive Amplicon Denoising Algorithm, DADA2, versión dada2-v1.14 (<https://github.com/benjjneb/dada2>), siguiendo los tutoriales para bacteria, pipeline 1.16 para 16S V3-V4 (benjjneb.github.io/dada2/tutorial) y para hongos con el pipeline 1.8 para ITS2 (benjjneb.github.io/dada2/ITS_workflow) (91). Para el análisis exploratorio del microbioma se trabajó desde la plataforma de CEDIA con R/RStudio, R version 4.1.0 y RStudio version 1.3.1093.

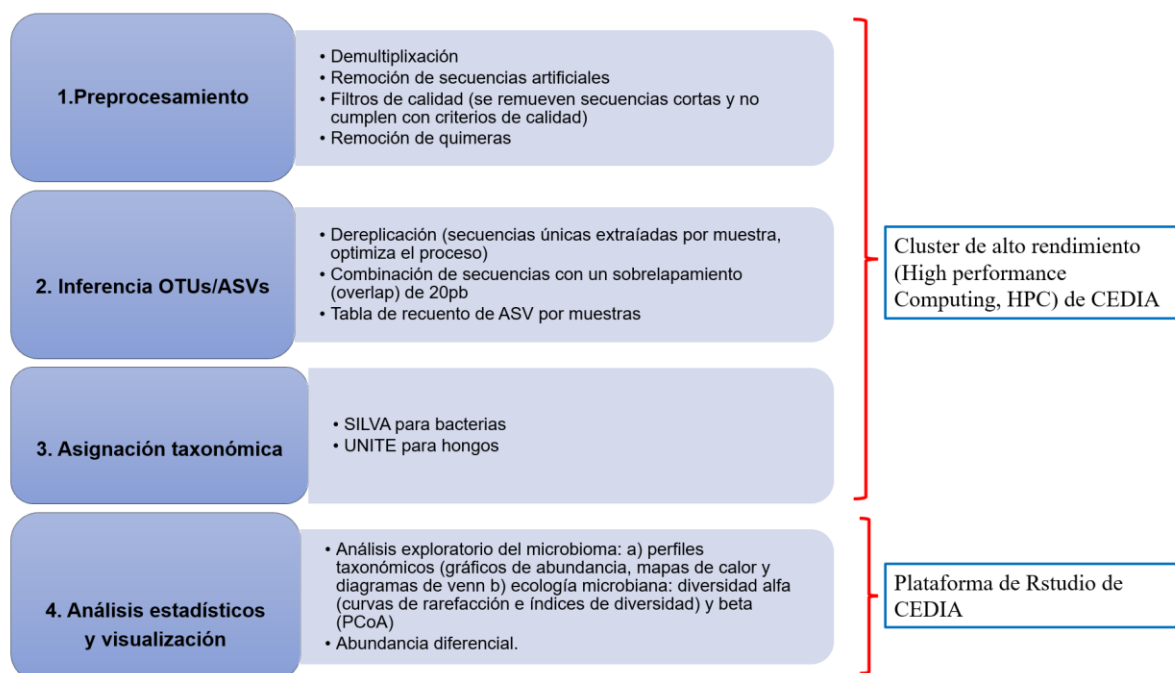


Figura 7. Esquema del flujo de trabajo para los análisis bioinformáticos

Las lecturas obtenidas de la secuenciación fueron demultiplexadas y ordenadas según adaptadores y cebadores usados por muestra de origen. Las secuencias artificiales (adaptadores y cebadores) se removieron usando el programa cutadapt (92). También, se aplicaron filtros de calidad siguiendo ciertos criterios para bacterias y hongos como, bases ambiguas = 0, homopolímeros = 0 y una longitud mínima de 175 pb. Adicional a estos criterios, para bacterias, se estableció como número máximo de errores permitidos en una lectura de

maxEE=2,2 y para hongos, un límite de maxEE= 2,3. Lecturas demasiado cortas o fuera de estos criterios de calidad se eliminaron.

Para las inferencias de ASVs, primero se emparejaron lecturas por sus extremos formando contigs con un solapamiento (overlap) de 20pb, y luego se removieron las secuencias quiméricas. Las secuencias resultantes se alinearon con la base de datos Silva 138 para bacterias y UNITE general FASTA release para hongos. A partir de este paso se generó un esquema jerárquico de clasificación taxonómica (reino, filo, clase, orden, familia, género y especie) por cada ASVs.

El análisis exploratorio del microbioma se realizó desde la plataforma de Rstudio de Cedia y para ello fue necesario importar desde el HPC las tablas de recuento de ASVs por muestra y los archivos de taxonomía de bacterias y de hongos. Además, se generaron archivos de metadatos con la información del experimento (muestra, tratamiento, bloque, período de evaluación, profundidad y réplica) para los análisis de bacterias de EOL y suelo, y de hongos de suelo, esto con el fin de crear un objeto phyloseq previo a la instalación del paquete phyloseq R (versión 1.22.3) (76) y proceder con los respectivos análisis.

En el caso particular de las bacterias del EOL y suelo, las ASVs que se identificaron como mitocondriales, eucariotas o cloroplastos, se removieron de la tabla de recuento como un control de calidad adicional (63,93,94).

El paquete Microbiome (versión 1.13.9) se usó para determinar la composición microbiana considerando la abundancia relativa y el paquete ampvis2 (versión 2.7.4) se usó para visualizar mapas de calor y un diagrama de venn de ASVs, de este último gráfico, se pudo determinar el microbioma central común considerando los criterios de ASVs con una frecuencia igual o mayor al 60% y una abundancia igual o mayor al 10%. La diversidad alfa, se representó mediante índice de riqueza Chao y de diversidad Simpson y Shannon, mientras que para la diversidad beta se hizo un análisis de coordenadas principales (PCoA) considerando la distancia de Bray Curtis. Además, como medida de diversidad se graficó curvas de rarefacción y para la parte inferencial se empleó adicionalmente el paquete vegan (versión 2.2-0), dentro de este último análisis, se consideró la abundancia diferencial para bacterias y hongos de suelo a través de un PERMANOVA basado en las distancias Bray Curtis y Chi cuadrado (Chiq), con un valor $p \leq 0.05$ y modelos multifactoriales con la siguiente estructura de fórmula:

$$y = A + B + C + AB + AC + BC + ABC + \epsilon$$

donde

y: abundancia

A: Tratamiento

B: Profundidad

C: Estado Fisiológico

ϵ : error

En resumen, los resultados de la exploración del microbioma, se presentan en la sección de resultados tanto para grupos bacterianos como fúngicos en: a) perfiles taxonómicos del EOL y suelo a través de tablas y gráficos de abundancias, mapas de calor y diagramas de venn b)

ecología microbiana: diversidad alfa (gráficos de curva de rarefacción, índices de riqueza Chao 1 e índices de diversidad Shannon y Simpson y beta (gráfico de PCoA) y c) análisis estadísticos basados en abundancia diferencial ($p \leq 0.05$).

2.4 Análisis estadísticos

Para el análisis de datos se usaron los programas R/RSudio, R versión 4.1.0. y Rstudio versión 1.4.1717 y una estadística descriptiva e inferencial para el análisis de los parámetros físico-químicos de las muestras de suelo y hojas analizadas, así como también para los parámetros agronómicos y de producción.

Los resultados de los parámetros físico-químicos de EOL, suelo y hojas se presentaron en tablas describiendo medias y rangos de los parámetros. La librería pheatmap se empleó para hacer gráficos de mapa de calor con los parámetros físico-químicos de suelo y hojas, considerando la diferencia de porcentaje y para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Diferencia de porcentaje} = \frac{\text{valor Mes 0} - \text{valor Mes 6}}{\text{valor Mes 0}} \times 100$$

Se realizaron gráficos de líneas, con la librería ggplot2, para los parámetros agronómicos, considerando dos matrices; la primera, con datos de las unidades de observación, considerando la tasa de crecimiento en la altura, diámetro y, en el número de hojas alcanzadas en la última semana de cada período de evaluación (mes 3, 6 y 9) y la segunda matriz, incluyó los mismos datos, pero en referencia a la planta hijo o retorno (mes 3 y 6). Se trabajó con tasa de crecimiento para las variables de altura y diámetro, para cumplir con el supuesto de homogeneidad, mientras que para el número de hojas se trabajó con los datos tomados directamente en campo.

Los parámetros físico-químicos del suelo, análisis foliar, parámetros agronómicos y de producción, se analizaron a través de modelos univariados lineales con efectos aleatorios mixtos (lme) considerando un valor de significancia de $p \leq 0.05$. Las librerías empleadas para estos modelos fueron AICcmodavg y Performance. Para los lme con los parámetros físico-químicos de suelo y análisis foliar se consideraron 2 matrices de datos, la primera matriz, con los resultados obtenidos posterior a los análisis en el laboratorio, y la segunda matriz considerando la diferencia de porcentaje obtenido entre el mes 0 y mes 6.

De manera general los lme se expresaron mediante la siguiente ecuación:

$$y = X\beta + Z\mu + \epsilon$$

donde,

y: vector de observaciones con medias, variable de respuesta $E(y) = X\beta$;

β : vector desconocido de efectos fijos;

μ : vector desconocido influenciado por el efecto aleatorio (determinado por los bloques), con medias $E(\mu) = 0$ y matriz de varianza y covarianza $\text{var}(\mu) = G$;

ϵ : es un vector desconocido con error aleatorio, con medias $E(\epsilon) = 0$ y varianza $\text{var}(\epsilon) = R$;

X y Z son las matrices del diseño relacionado con las observaciones y a β y μ , respectivamente.

En todos los lme, el efecto aleatorio estuvo dado por los bloques (es decir cuantas unidades varían entre bloques en el campo). El supuesto de normalidad se verificó con la prueba de Shapiro y gráfico de qqplot con los residuos de los modelos.

Por otra parte, se obtuvo un coeficiente de cuantificación al mes 6, basado en las predicciones y efectos de los modelos cuyas variables reportaron diferencias significativas, es decir se evaluó el efecto en unidades de estas variables del tratamiento experimental respecto el tratamiento control.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 EOL y efecto de su aplicación en suelo

Los parámetros físicos-químicos de la EOL analizados evidenciaron el uso de un producto maduro bajo fermentación anaeróbica y que en condiciones climáticas y parecidas de elaboración, parámetros como: pH, temperatura y conductividad eléctrica reportaron valores similares (25,84,85).

En este estudio, el EOL registró en mayor cantidad de los macronutrientes N, C y K, y los micronutrientes Na, Fe y Mn respecto a los otros elementos, además, los análisis también revelaron que el metal Al se encontraba en mayor cantidad que el Cd (Tabla III). Estos resultados concuerdan con investigaciones previas donde algunos de estos elementos también estuvieron en mayores concentraciones en bioles de este tipo, por ejemplo, el N, K y en algunos casos el P fueron los macronutrientes en mayor cantidad, y mientras que los microelementos Fe, Mn y en algunos casos el Zn también se reportaron en mayor cantidad al término de la cosecha del biol (25,84,85,95).

El banano es un cultivo que demanda gran cantidad de N y K obtenido básicamente de fertilizantes nitrogenados y potásicos o distintos abonos orgánicos durante la preparación del suelo o siembra, minimizando el riesgo de deficiencias de estos nutrientes, (96). En este estudio el biol presentó variaciones de contenido con respecto a estos dos macroelementos, sin embargo, su uso debe dirigirse como suplemento al manejo tradicional del cultivo ya que su aporte es mínimo y no reemplaza la fertilización química.

También se debe dar importancia al contenido de metales pesados en este tipo de bio insumos, ya que muchos de ellos podrían contribuir, aún más, al problema de acumulación en el suelo (5), el incremento de estos metales en una enmienda puede deberse a la roca fosfórica (97). En nuestra enmienda el Al estuvo en mayor cantidad y se conoce que en suelos ácidos, el P reacciona con el Fe y el Al formando compuestos insolubles que no permiten que el P sea disponible para la planta (15). Además, la contaminación por metales pesados se puede retener por mucho tiempo en el suelo, migrar a los cultivos e ingresar a la cadena alimentaria involucrando la salud humana (98).

Es importante resaltar que, aunque la elaboración de las enmienda orgánicas sea artesanal y se siga una misma metodología en condiciones climáticas similares, los materiales, los microorganismos eficientes, la época del año de elaboración y edad del biol influyen sobre los parámetros obtenidos en las enmiendas, referente a este último punto, se ha demostrado que cuando el biol recién se cosecha (4 meses) se registran mayores valores en macro y microelementos en especial en la fracción sedimentable, todos estos son factores que reflejan variaciones en las evaluaciones entre bioles (95).

En la tTabla III evidencia los demás valores obtenidos para otros parámetros analizados.

Parámetro	Media	Rangos	Unidad
Conductividad eléctrica (CE)	23,29	16,53- 33,76	uS/cm

pH	4.48	3.53- 5.05	
Salinidad	14,15	9,71- 21,29	psu
Sólidos Disueltos Totales	11397	8090- 16640	ppm
Temperatura	23.28	16.20- 25.00	° C
Materia orgánica	44,78		%
Macronutrientes			
Nitrógeno (N) *	20700 (p)	19600 - 21800	ppm
Carbono (C) *	260350 (p)	253100 - 267600	ppm
Carbono: Nitrógeno (C/N) *	12,59 (p)		
Fósforo (P)	360 (d) 13033 (p)	7500- 16300 (p)	ppm
Calcio (Ca)	1060 (d) 12367 (p)	1060- 16000 (p)	ppm
Potasio (K)	4820 (d) 100600 (p)	92500-109300 (p)	ppm
Magnesio (Mg)	1320 (d) 22267 (p)	17700-23800 (p)	ppm
Micronutrientes			
Sodio (Na)	418.26 (d) 7480 (p)	6852.22-8259.59 (p)	ppm
Cobre (Cu)	0.54 (d) 11 (p)	8.65-12.15 (p)	ppm
Hierro (Fe)	25,34 (d) 1887 (p)	1739-2130.42 (p)	ppm
Manganeso (Mn)	23,50 (d) 396,97 (p)	350.90- 435.89 (p)	ppm
Cobalto	0.13 (d) 1.59 (p)	1.45-1.85 (p)	pmm
Zinc (Zn)	2.65 (d) 49 (p)	46.79-53.01 (p)	ppm
Boro (B)	1.27 (d)		ppm

	26.95 (p)	25.17-30.28 (p)	
Metales pesados			
Aluminio (Al)	5.09 (d) 2400.35 (p)	658.59-5872,98 (p)	ppm
Cadmio (Cd)	0.01 (d) 0.23 (p)	0.20-0.25 (p)	ppm

Tabla III. Parámetros físicos-químicos del EOL. Los macro, micronutrientes y metales pesados del EOL se reportaron por fracciones fácilmente disponible o líquida (d) y sólida o sedimentable (p), a excepción del N, C y C/N que debido a razones técnicas no se pudo obtener la fracción fácilmente disponible, estos elementos se representan en la tabla con un (*).

En el suelo, los análisis de los parámetros químicos mostraron que no existieron diferencias significativas ($p \leq 0.05$), con excepción del N y B, entre los tratamientos, debido a la aplicación del biol, en particular al analizar este parámetro en el mes 6 (Tabla IV), este cambio quizás responda a la composición de los materiales incorporados del EOL, por ejemplo, es conocido que los ingredientes de excretas de origen animal son fuentes de N (99), además la materia orgánica y microorganismos del EOL hacen que exista una mayor disponibilidad a través del proceso de mineralización de estos elementos en el suelo, en especial del N (100,101).

Los modelos lineales además indicaron que la mayoría de los elementos estudiados cambiaron por efecto del período de evaluación, incluyendo al N y B, además del % MO, C/N, C, Cu, Fe y Cr (

	Parámetro	Efecto al mes 6	Valor-p		
			Tratamiento	PE	Tratamiento x PE
Suelo	MO	- 0.18	0.46	0.01	0.69
	C/N	0.41	0.99	0.00	0.36
	C	-1075	0.45	0.00	0.67
	N	-400	0.21	0.00	0.03
	Cu	0.02	0.19	0.00	0.54
	Fe	- 0.08	0.19	0.00	0.46
	B	- 0.05	0.58	0.35	0.04
	Cr	- 0.01	0.19	0.00	0.26

Tabla V), estos cambios pueden estar relacionado al consumo de la planta propio en la etapa vegetativa-reproductiva o a la aplicación de fertilizantes sintéticos durante el ciclo productivo del banano (15,83).

La tabla V también muestra los coeficientes de cuantificación para cada elemento en el mes 6. Aunque el N y el B incrementaron su concentración en ambos tratamientos para el mes 6, al comparar el tratamiento experimental respecto a control en este período, estos estuvieron en menor concentración. Se especula, que la menor cantidad de estos elementos se deba a la actividad microbiana ejercida por este bioinsumo, ya que la adición de microorganismos en el suelo ha demostrado que mejoran la absorción de nutrientes a través de la raíces, reduciendo su contenido en el suelo (57,102). Aunque tampoco hay que descartar que, en el caso particular

del nitrógeno, el exceso de este debido a la enmienda, pueden hacer que este se pierda fácilmente por condiciones climáticas como precipitaciones que hacen que se libere el N por lixiviación, y/o volatilización lo que es usual en zonas tropicales húmedas (103).

La mayoría de los elementos presentaron coeficientes negativos, con excepción de la relación C/N y Cu, aunque estos redujeron su contenido para el mes 6, los resultados sugieren que estos estuvieron en mayor cantidad respecto al control luego de la aplicación del EOL. La relación C/N es un parámetro que se relaciona con la descomposición de la materia orgánica, indicando la disponibilidad de nitrógeno en un suelo, cuando la materia orgánica tiene un alto contenido de nitrógeno, los microorganismos (bacterias, hongos y actinomicetos) tienen mayor mineralización satisfaciendo los requerimientos del nitrógeno hacia la planta (100). Por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio podrían interpretarse a que existe una mayor tasa de mineralización en el tratamiento experimental haciendo disponible el nitrógeno para las plantas y favoreciendo la relación C/N.

Todos los parámetros químicos del suelo y en especial los que registraron cambios significativos se compararon con el coeficiente de variación del suelo para aseverar que los cambios suscitados fueran dados por los efectos del tratamiento o período de evaluación más no debido a la variación propia del suelo (Anexo 3). En este estudio, en el tratamiento experimental en el mes 6, se reportaron coeficientes de muy bajos a bajos para el N (5.8%) y B (17.2%) y la mayoría de parámetros que reportaron cambios significativos debido al período de evaluación, a excepción del Cu (53.8%) que reportó un coeficiente de variación de suelo alto según referencias de Larrea 2009 (104).

El Nitrógeno y Boro son elementos indispensables en los requerimientos nutricionales del banano, por lo que se los considera dentro de los programas de fertilización aplicados al suelo. El papel del N en el suelo es crítico, pues promueve la absorción de cationes de potasio, magnesio y calcio, y en la planta participa en la síntesis de proteínas y vitaminas para el crecimiento, es indispensable para la formación de la clorofila y es un componente de los nucleótidos, ácidos nucleicos, aminoácidos, coenzimas, hexosaminas, etc. Además, el N es esencial para lograr una buena división celular (15).

Por otra parte, el Boro en el suelo es requerido para el desarrollo y alargamiento de la raíz, da fortaleza a la planta, permite el mantenimiento de la transpiración (absorción de agua) e interviene en la absorción de calcio (15). Su papel en la lignificación y como componente estructural parece que está involucrado en la formación de una barrera contra la invasión de patógenos (105), las deficiencias de este elemento por lo general incrementa las probabilidades de enfermedades ocasionadas por hongos y reduce la tolerancia de la planta a diversos tipos de estrés ambiental, sin embargo, a mayores concentraciones son tóxicos para hongos patógenos en condiciones de campo (106).

Es importante resaltar que ni por la acción de los productos químicos aplicados en el ciclo de producción, ni por la aplicación del EOL, el Zn, B, Cd, y Cr que se consideran contaminantes en suelos agrícolas a concentraciones mayores de 200ppm, 2ppm, 2ppm y 63ppm respectivamente, no excedieron los valores máximos permisibles según la legislación ambiental ecuatoriana (107).

El pH en el control estuvo comprendido en rangos de 5.75 – 6.54, con una media de 6,03 y en el tratamiento abarcó rangos de 5,4 – 6.02 con una media de 5,66. La mayor acidez en el tratamiento también se alude al efecto del EOL, y se puede destacar que estos valores están

dentro de los rangos de referencias para suelos usados para el cultivo de banano pH de 4,7-6.9, alegando que, suelos dentro de estos valores con mayor tendencia a la acidez permiten una mayor adsorción de nutrientes como el N, P, Cu, Fe, Mn, Zn y B entre otros, por parte de la planta (15,83).

Parámetros químicos del suelo																		
Muestra	Período Evaluación	CIC (cmol/Kg)	% MO	C/N	Macroelementos						Microelementos						Metales Pesados	
					C	N*	P	Ca	k	Mg	Na	Cu	Fe	Mn	Zn	B*	Cd	Cr
					(ppm)													
CL1R1	mes_0	27,24	3,29	7,40	19100	2600	3,46	3720	720	790	53,74	0,14	0,74	25,15	0,23	0,14	0,07	0,02
	mes_6	30,80	3,18	6,40	18500	2900	3,69	4400	560	860	41,45	0,02	0,39	11,91	0,04	0,16	0,07	0,08
CL2R1	mes_0	31,34	4,28	9,65	24900	2600	4,92	4320	660	940	51,15	0,14	0,85	12,00	0,00	0,07	0,05	0,00
	mes_6	32,80	3,75	6,34	21800	3400	3,72	4640	600	940	51,91	0,04	0,71	11,40	0,03	0,27	0,08	0,08
CL3R1	mes_0	27,49	2,89	8,37	16800	2000	2,78	3930	330	810	55,23	0,14	0,69	19,08	0,04	0,05	0,06	0,01
	mes_6	28,60	2,63	6,03	15300	2500	2,22	4100	420	810	52,03	0,04	0,36	20,46	BLD	0,11	0,08	0,07
CL4R1	mes_0	26,14	3,25	8,62	18900	2200	4,25	3590	510	800	45,76	0,14	0,72	10,98	BLD	0,11	0,04	0,01
	mes_6	24,50	2,25	4,16	13100	3100	2,37	3390	660	670	51,18	0,05	0,37	17,52	0,07	0,14	0,07	0,07
TL1R1	mes_0	32,14	3,63	7,95	21100	2700	3,59	4370	720	980	56,99	0,17	0,72	21,62	0,18	0,23	0,07	0,01
	mes_6	30,50	3,53	7,48	20500	2700	2,69	4330	400	910	56,26	0,06	0,40	9,48	0,06	0,14	0,07	0,08
TL2R1	mes_0	28,19	4,18	8,46	24300	2900	6,18	3790	960	780	58,68	0,15	0,76	11,31	BLD	0,11	0,04	0,02
	mes_6	28,50	3,29	7,09	19100	2700	4,94	3850	1020	770	60,59	0,03	0,37	8,10	0,06	0,12	0,06	0,06
TL3R1	mes_0	22,44	2,61	8,66	15200	1800	3,53	3200	410	620	44,30	0,12	0,69	15,46	0,04	0,15	0,04	0,01
	mes_6	22,10	2,27	5,20	13200	2500	3,82	3080	610	590	46,12	0,10	0,37	13,42	0,14	0,17	0,07	0,06
TL4R1	mes_0	24,91	3,08	7,29	17900	2500	3,00	3590	270	720	52,56	0,15	0,73	30,78	0,10	BLD	0,06	0,02
	mes_6	23,30	2,00	4,80	11600	2400	3,08	3290	320	700	50,00	0,04	0,36	12,39	0,03	0,12	0,07	0,06

Tabla IV. Parámetros químicos del suelo. Los parámetros con asterisco (*) reportaron cambios significativos considerando el tratamiento. En la nomenclatura de las muestras C: representa control, T: tratamiento, L: número de bloque y R1: repetición 1. Las siguientes abreviaturas representan: CIC= Capacidad de Intercambio Catiónico, %MO = porcentaje materia orgánica, C/N=Relación, Carbono/Nitrógeno C= Carbono N=Nitrógeno, P=Fósforo, Ca= Calcio, k= Potasio, Mg =Magnesio, Na=Sodio, Cu=Cobre, Fe=Hierro, Mn=Manganeso, Zn=Zinc, B=Boro, Cd=Cadmio, Cr=Cromo y BLD= representa valores por debajo del límite detectable para el equipo (below limit detection, por sus siglas en inglés).

	Parámetro	Efecto al mes 6	Valor-p		
			Tratamiento	PE	Tratamiento x PE
Suelo	MO	- 0.18	0.46	0.01	0.69
	C/N	0.41	0.99	0.00	0.36
	C	-1075	0.45	0.00	0.67
	N	-400	0.21	0.00	0.03
	Cu	0.02	0.19	0.00	0.54
	Fe	- 0.08	0.19	0.00	0.46
	B	- 0.05	0.58	0.35	0.04
	Cr	- 0.01	0.19	0.00	0.26

Tabla V. Efecto del tratamiento en los parámetros químicos del suelo al mes 6 de las variables que presentaron cambios significativos. La siguiente abreviación representa: PE= período de evaluación. El efecto al mes 6 representa en cuantas unidades aumentó (signo positivo) o disminuyó (signo negativo) el tratamiento respecto el control al período de evaluación mes 6.

El mapa de calor obtenido con las diferencias de porcentajes entre cada elemento analizado mostró resultados similares que aquellos previamente obtenidos. Es decir, que la variabilidad de los elementos químicos presentes en el suelo en su mayoría no se debe al efecto del EOL. Esto se puede evidenciar en la Figura 8 donde no se observan agrupamientos claros por efecto de la aplicación del EOL. Sin embargo, se cree que el agrupamiento puede estar relacionado con la textura de suelo, ya que, por un lado, se agrupan los suelos francos correspondientes a CL1, TL2 y TL4 y por otro lado, los suelos francos-arcillosos TL1, CL2, CL3, CL4, ambos tipos de suelos bien drenados son considerados fértiles en el banano (108). La única incongruencia encontrada en este análisis fue que los modelos lineales para este tipo de datos no encontraron diferencias significativas ni para el Nitrógeno, ni para el Boro.

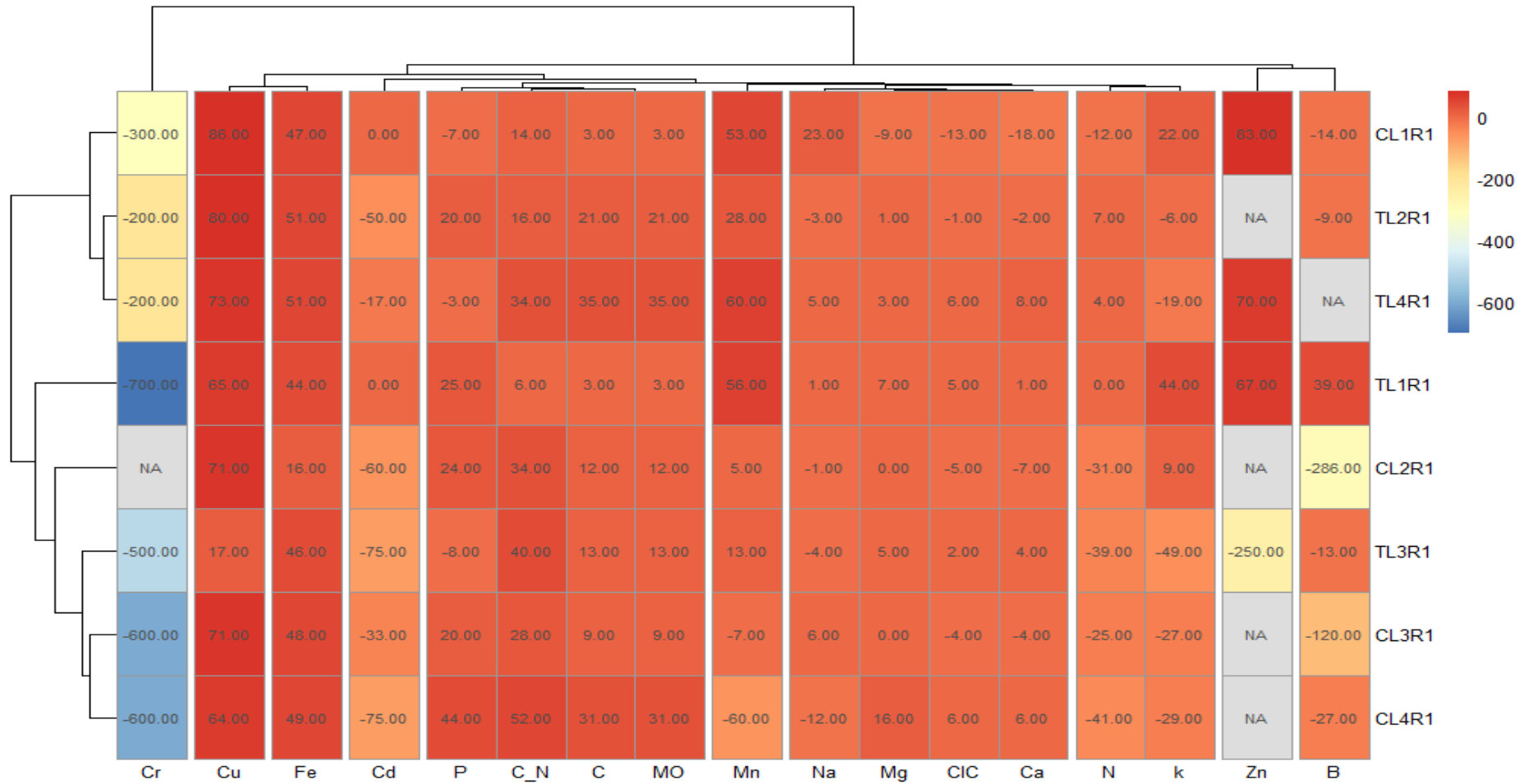


Figura 8. Mapa de calor parámetros químicos del suelo. La abreviatura NA= representa valores por debajo del límite detectable para el equipo (BLD). Los porcentajes con signo positivo significan que el parámetro en el suelo al mes 0 estaba en mayor cantidad respecto la medición realizada en el período de evaluación, mes 6 es decir, hubo una reducción de mismo, mientras que los valores con signo negativo indican que el elemento al mes 0 estuvo en menor cantidad, respecto a la medición realizada en el período de evaluación, mes 6, es decir, que hubo un incremento en la concentración de este elemento.

3.2 EOL y su efecto en planta

El resultado del análisis foliar mostró que no existió diferencias significativas en los valores de la mayoría de los elementos analizados, con excepción del Boro (B) ($p < 0.05$), por efecto de la aplicación de la EOL (Tabla VI y Tabla VII). Los resultados del análisis foliar están en concordancia con los resultados del análisis del suelo que indican cambios significativos en el elemento Boro.

Además, los resultados muestran que los cambios significativos encontrados se deben en su mayoría al período de evaluación de los parámetros C/N, N, Ca, K, Mg, Na, Fe, Zn, B y Al, y en nuestro caso estos cambios se alinearon con diferentes fases de desarrollo del cultivo. Este resultado puede explicarse a los diferentes niveles de requerimiento nutricional de la planta de banano, cuyo desarrollo de masa vegetal demanda mayor cantidad de elementos (83,105).

En este estudio, el cambio en el B tanto para el tratamiento como el período de evaluación, pudo verse mayormente marcado por la acción de los microorganismos del biol que permitieron un mayor consumo del elemento, además de la demanda propia de la planta para pasar de la fase vegetativa a vegetativa-reproductiva, pues se conoce que una vez que las raíces absorben el B, este se distribuye preferentemente a los tejidos en desarrollo, como los meristemas y los órganos reproductivos induciendo vías moleculares para activar y desactivar genes, regulando así las transiciones de fase de desarrollo de las plantas para que completen su ciclo de vida (106).

Además, la mayor demanda del B en el tratamiento puede deberse a otras funciones importantes que este realiza este elemento, entre ellas, el rol estructural en las paredes celulares, además de actividades metabólicas como el mantenimiento de las funciones de la membrana plasmática, biosíntesis de las pectinas en los frutos y lípidos de las membranas celulares, de algunos compuestos metabólicos, como los antioxidantes, polifenoles, aumenta el contenido del ácido indol-3-acético (IAA) oxidasa, también está involucrado en la síntesis de ácidos nucleicos, translocación de azúcares y carbohidratos y en la participación de transporte de compuestos asimilados en el interior de la planta, pues actúa en el mantenimiento del floema y transporte del ATP (15,109,110), a pesar de este conocimiento aún faltan por elucidar el sistema de translocación del boro en la planta (106).

Nuestros resultados están acordes a los reportados por Jiménez (2007) (4), quién reportó que el efecto foliar de una EOL similar a la de nuestro estudio no causó cambios significativos en los macro y microelementos analizados. El estudio mostró que incluso la aplicación de este producto en diferentes sistemas productivos de banano, convencional u orgánico, no condicionó el aporte directo de nutrientes por estos productos a la planta. Es importante reconocer que este estudio se basó en la aplicación foliar del producto y diluido, lo cual difiere de nuestro enfoque el cual se basó en la metodología de drench directo al suelo.

En la Tabla VII se muestran los coeficientes de cuantificación en el mes 6 del tratamiento respecto el control en las hojas para cada elemento que presentó un cambio significativo. La mayoría de los elementos que reportaron coeficientes negativos respecto el control a excepción de C/N y N. Aunque la relación C/N disminuyó para el mes 6 en ambos tratamientos, al compararlos, esta relación estuvo en mayor concentración en el tratamiento experimental, mientras que, la concentración del N se incrementó su para este período sobre todo en el tratamiento experimental.

Debido a la constante aplicación del biol a lo largo del ensayo se cree que esto permitió un incremento del nitrógeno, el excedente de este elemento es el que queda disponible para las plantas y está estrechamente relacionado con la relación C/N, la cual es ideal en sistemas agrícolas con un ratio de 24 (111), para este estudio los valores reportados se aproximan a esta relación. Por otra parte, el nitrógeno es uno de los macronutrientes más absorbidos y con mayor movilidad en la planta de banano, cuando este es absorbido en su forma de nitrato, cerca del 40% se transporta a las hojas, el nitrato se reduce a amonio, y se combina inmediatamente con los azúcares para producir aminoácidos, entre estos la glutamina que es un aminoácido que incrementa el crecimiento y rendimiento del cultivo, promoviendo el desarrollo del pseudotallo, hojas, y racimo, de hecho, el nitrógeno, es considerado como el principal promotor del crecimiento y es igualmente esencial para lograr el proceso de respiración en la planta (83,96).

Parámetros químicos de hojas																
Muestra	Período de Evaluación	% MO	C/N	Macroelementos						Microelementos						Metal Pesado
				C	N	P	Ca	K	Mg	Na	Cu	Fe	Mn	Zn	B*	Al
CL1R1	mes_0	77,95	22,08	453200	20500	2200	8200	38600	3800	44,11	532,66	550,92	466,76	14,53	33,23	125,76
	mes_6	77,50	17,79	450600	25300	1300	5200	30800	2200	29,89	5,30	79,35	336,97	11,03	18,04	25,38
CL2R1	mes_0	78,26	23,18	455000	19600	1600	7500	34800	3200	48,64	77,75	577,36	481,94	14,55	23,32	129,30
	mes_6	78,19	17,86	454600	25500	1300	4100	30600	1800	18,98	5,36	87,36	397,65	12,01	19,51	43,31
CL3R1	mes_0	79,46	21,51	462000	21500	1800	7400	38100	3500	41,58	18,34	453,87	481,05	16,19	23,73	87,56
	mes_6	77,45	21,32	450300	21100	1300	4300	36800	2600	42,72	74,77	114,02	441,97	11,15	25,30	52,84
CL4R1	mes_0	77,62	21,69	451300	20800	2000	8100	42000	4000	37,02	142,33	366,55	415,07	19,46	26,73	192,53
	mes_6	76,57	18,46	445200	24100	1500	5300	38500	3000	18,64	191,87	106,30	464,65	11,90	27,37	45,22
TL1R1	mes_0	77,62	20,91	451300	21600	2100	9100	39300	4700	43,60	122,16	563,04	599,90	19,76	44,96	119,78
	mes_6	78,09	17,91	454000	25400	1500	3900	33300	2200	14,69	5,61	79,99	306,69	10,90	17,55	34,46
TL2R1	mes_0	78,26	22,26	455000	20400	2200	6100	43900	2800	37,89	111,61	376,38	347,66	14,55	32,45	82,56
	mes_6	78,40	19,59	455800	23300	1300	3900	31000	1700	11,28	6,17	65,50	212,94	10,82	15,75	20,70
TL3R1	mes_0	79,00	19,28	459300	23800	16600	6400	43700	3000	68,22	4042,82	408,97	498,02	15,00	33,80	79,40
	mes_6	78,55	18,35	456700	24900	1300	5200	29800	2000	47,02	5,84	94,75	328,48	12,13	16,81	47,27
TL4R1	mes_0	78,38	20,74	455700	22000	1800	7500	34600	3500	47,38	27,28	470,03	522,74	24,03	38,92	318,15
	mes_6	79,27	19,82	460900	23300	1100	4800	27400	1800	23,68	5,29	95,50	565,59	10,16	15,06	43,08

Tabla VI. Parámetros químicos de hojas. Los parámetros con asterisco (*) reportaron cambios significativos considerando el tratamiento. Las siguientes abreviaturas representan: %MO = porcentaje materia orgánica, C/N = Relación, Carbono/Nitrógeno C = Carbono N = Nitrógeno, P = Fósforo, Ca = Calcio, K = Potasio, Mg = Magnesio, Na = Sodio, Cu = Cobre, Fe = Hierro, Mn = Manganeso, Zn = Zinc, B = Boro, Al = Aluminio.

	Parámetro	Efecto al mes 6	Valor-p		
			Tratamiento	PE	Tratamiento x PE
Hojas	C/N	0.06	0.31	0.00	0.27
	N	225	0.29	0.00	0.44
	Ca	-275	0.30	<.00	0.73
	K	-3800	0.62	0.00	0.14
	Mg	-475	0.21	0.00	0.45
	Na	-3.39	0.73	0.00	0.29
	Fe	-12.82	0.50	<.00	0.77
	Zn	-0.52	0.51	0.00	0.30
	B	-6.26	0.29	0.00	0.00
	Al	-5.31	0.84	0.00	0.70

Tabla VII. Efecto del tratamiento en los parámetros químicos de hojas que presentaron cambios significativos. La siguiente abreviación representa: PE = período de evaluación.

A considerar la diferencia de porcentajes de todos los parámetros químicos de las hojas, solo el Mn y B reportaron un cambio significativo, esto quiere decir, que en un 18% y 43% respectivamente estos elementos se mantuvieron una mayor concentración en el tratamiento que el control en el mes 0, es decir hubo una reducción considerable de estos elementos transcurridos al mes 6 (Tabla VIII) y este efecto también podría estar relacionado con el efecto estimulante del biol sobre las plantas. El mapa de calor realizado con los porcentajes de diferencias de cada elemento analizado no mostró clusters de agrupamiento por efecto del tratamiento. En este caso, como se muestra en la Figura 9, solo un bloque perteneciente al control se diferenció de los demás, esta diferenciación se debió al aumento del elemento Cu en ese bloque en particular, que pudo haberse dado por alguna eventualidad particular.

El Mn y B son unos de los micronutrientes más absorbidos por la planta de banano. El Mn está involucrado en la producción de aminoácidos, proteínas procesos redox y síntesis de ARN y ADN, es factor esencial en los procesos de la respiración y el metabolismo del N, y en ambos procesos actúa como activador de enzimas como las deshidrogenasas, quinasas (15). Este elemento también tiene un papel directo en la fotosíntesis al sintetizar la clorofila. Además, el Mn controla la biosíntesis de lignina y suberina, que son barreras bioquímicas importantes para la invasión fúngica (83).

Parámetros	Efecto Aleatorio	Efecto Fijo		Valor -p
	Estimación	Beta 0	Beta 1	Tratamiento
Mn	20.29	10.37	17.99	0.03
B	7.71	13.26	42.74	0.03

Tabla VIII. Parámetros químicos en hojas con diferencias significativas al considerar diferencias de porcentaje. El efecto aleatorio determinada por la variación que ejercen entre bloques (lotes) sobre el ensayo, representan en cuantas unidades varían entre bloques. El efecto fijo es explicado a través de: beta 0 que representa en promedio el porcentaje de diferencia del parámetro en el control y beta 1 representa el porcentaje de diferencia en el tratamiento que varía respecto al control (este puede ser mayor si el efecto es positivo o menor si el efecto tiene signo negativo).

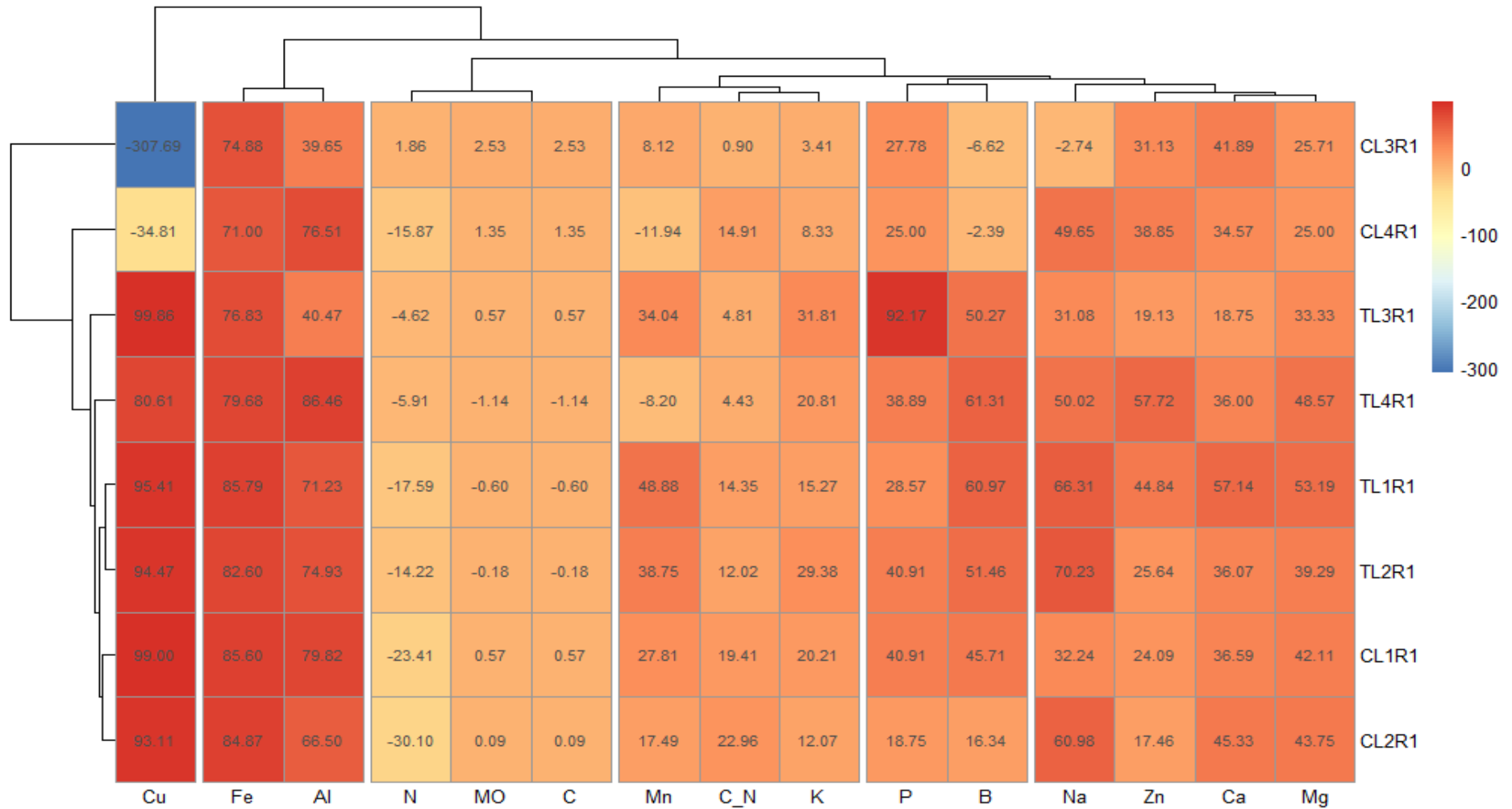


Figura 9. Mapa de calor con la diferencia de porcentajes en los parámetros químicos de hojas. Los elementos con signo positivo significan que el parámetro en el mes 0 estaba en mayor cantidad respecto la medición realizada al mes 6, es decir hubo una reducción de mismo, mientras que los porcentajes con signo negativo indican que el elemento aumentó en las hojas transcurrido el período de evaluación mes 6.

3.3 Análisis del microbioma

De las 113 muestras enviadas a secuenciar bacterias y hongos, los análisis se realizaron en base 2 muestras de biol para bacterias y 108 muestras (53 control y 55 tratamiento) en suelo y en 93 muestras (43 control y 50 tratamiento) en suelo para hongos. Las muestras faltantes fueron descartadas por problemas de secuenciación y baja calidad, incluidas las muestras para el análisis de hongos en el EOL.

Las muestras que pudieron secuenciarse fueron aquellas que presentaron cantidades de ADN superior a los 100ng y el ratio 260/280 con valores aproximados de 1.5 y rangos entre 0.6 y 1.8 para el ratio 260/230. Los valores referenciales del ADN obtenido previo a la secuenciación se muestran a continuación en la Tabla IX.

Matriz	Concentración	Ratio A260/A280	Ratio A260/A230	Cantidad enviada a secuenciar
EOL	21 - 57ng/ μ L	1.42 -1.5	0.52-0.63	210-570 ng
Suelo	4-84.3 ng/ μ L	1.32-2.7	0.14-1.8	40-843 ng

Tabla IX. Resumen de la evaluación de la calidad del ADN extraído en muestras de EOL y suelo. Los valores de concentración y ratios presentan los rangos registrados.

Del total de muestras secuenciadas, se logró obtener más de 100000 lecturas por muestra y con más del 60% de estas lecturas por muestras se pudo realizar las inferencias para las ASVs (Tabla X).

LECTURAS POR MUESTRAS	Bacterias (Región v3-v4 del gen 16S)		Hongos (Región ITS1)
	EOL	Suelo	Suelo
De entrada	194939	156079	186352
Filtradas y recortadas	152852	128184	145194
Forward dereplicadas	149737	124555	143901
Reverse dereplicadas	148856	124324	143757
Secuencias combinadas	129654	107036	138767
Secuencias sin quimeras	122031	92933	134791
Porcentaje de lecturas retenidas	62	60	73

Tabla X. Preprocesamiento de lecturas de bacterias y hongos de muestras de EOL y suelo previo a la inferencia de ASVs.

Se identificaron un total de 6616 ASVs bacterianas en las 2 muestras de EOL (BR1: 4677 y BR2: 3762), distribuidos en 25 filios y 495 géneros. Mientras que en las muestras de suelo se obtuvieron un total de 91225 ASVs de bacterias (control: 64614 y tratamiento: 66003) distribuidos en distribuidos en 73 filios y 1292 géneros y 13017 ASVs fúngicas (control: 8311 y tratamiento: 8960) distribuidos en 15 filios y 689 géneros.

3.3.1 Perfiles taxonómicos: grupos bacterianos

En el grupo bacteriano de la EOL, las 20 ASVs bacterianas más abundantes representaron más del 60% del total de la comunidad y correspondieron a los filos y géneros Proteobacteria (*Acetobacter*), seguido por Firmicutes (*Lactobacillus*), Bacteroidota (*Prevotella*) y Actinobacteriota (género no identificado correspondiente a la familia *Eggerthellaceae*). Ver Tabla XI y Figura 10.

Filo	Nivel taxonómico más cercano	ASV	BR1	BR2	Porcentaje de abundancia total
Proteobacteria	<i>g_Acetobacter</i>	ASV_6	32,30	33,49	65,78
Firmicutes	<i>g_Lactobacillus</i>	ASV_138	5,41	5,40	10,81
Firmicutes	<i>f_Erysipelatoclostridiaceae</i>	ASV_303	3,23	3,46	6,68
Bacteroidota	<i>g_Prevotella</i>	ASV_489	2,21	2,69	4,90
Firmicutes	<i>g_Romboutsia</i>	ASV_443	2,18	1,30	3,49
Firmicutes	<i>g_Streptococcus</i>	ASV_750	1,61	1,48	3,08
Proteobacteria	<i>f_Xanthomonadaceae</i>	ASV_853	1,25	1,20	2,45
Firmicutes	<i>g_Lactobacillus</i>	ASV_1268	0,86	1,11	1,97
Bacteroidota	<i>g_Prevotella</i>	ASV_1362	0,77	1,19	1,96
Bacteroidota	<i>g_Prevotella</i>	ASV_1403	0,78	1,10	1,88
Bacteroidota	<i>g_Prevotella</i>	ASV_1481	0,85	0,95	1,80
Actinobacteriota	<i>f_Eggerthellaceae</i>	ASV_1264	0,78	0,97	1,75
Firmicutes	<i>f_Peptostreptococcaceae</i>	ASV_1036	1,07	0,62	1,69
Firmicutes	<i>g_Caproiciproducens</i>	ASV_1470	0,70	0,77	1,47
Firmicutes	<i>g_Paeniclostridium</i>	ASV_1475	0,82	0,49	1,31
Bacteroidota	<i>Rikenellaceae RC9 gut group</i>	ASV_2015	0,55	0,70	1,26
Firmicutes	<i>Clostridium sensu stricto 12</i>	ASV_1793	0,51	0,58	1,09
Firmicutes	<i>g_Lactobacillus</i>	ASV_2294	0,48	0,58	1,06
Firmicutes	<i>g_Asteroleplasma</i>	ASV_2306	0,45	0,59	1,04
Firmicutes	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	ASV_1935	0,56	0,44	1,00

Tabla XI. ASVs bacterianas más abundantes del EOL. Las abreviaturas representan: *f_*= familia y *g_*= género. Los valores reportados muestran la abundancia relativa en porcentaje.

La caracterización de EOL por lo general ha dependido de métodos básicos para asegurar que cumplan una madurez óptima como la medición de parámetros como pH, conductividad, entre otros. El uso de herramientas ómicas, como la metataxonómica, representa una ventaja sobre este tipo de estudios por su alcance en secuenciar cepas de bacterias y hongos tanto cultivables como no cultivables (112). La secuenciación de la EOL usada en este estudio mostró la presencia de diversos grupos bacterianos, principalmente de los filos Proteobacterias y Firmicutes.

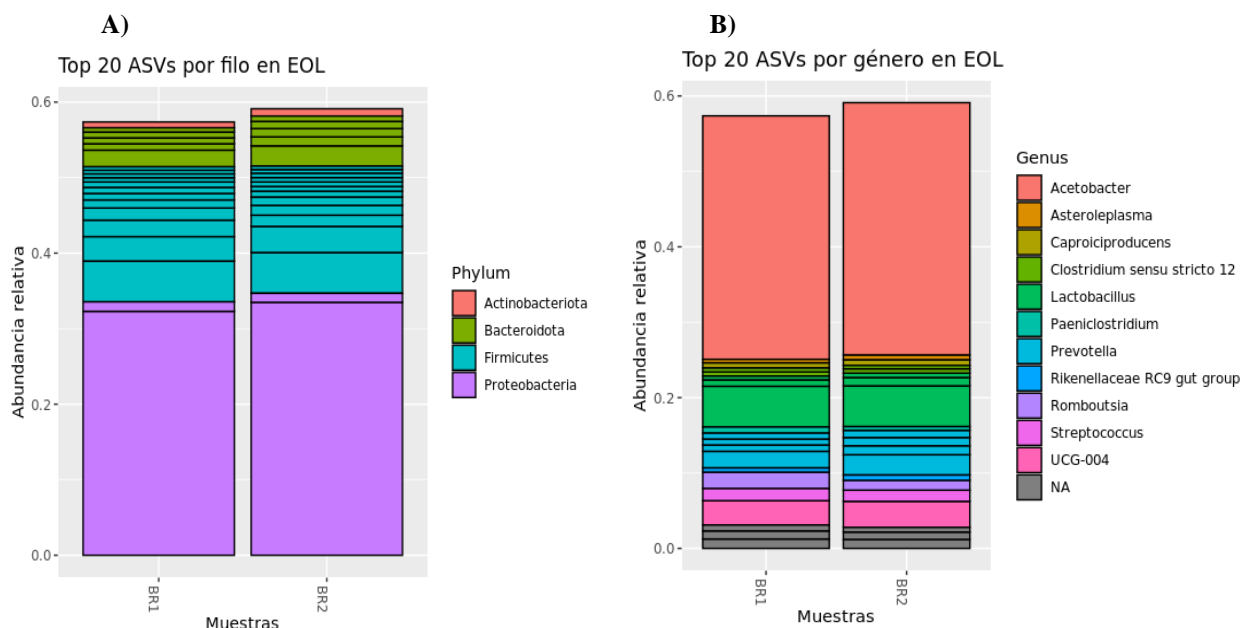


Figura 10. ASVs bacterianas más abundantes en las muestras de EOL. A) por filo y B) por género.

Al igual que los gráficos de abundancia, el mapa de calor que utiliza valores de porcentaje la abundancia relativa, también confirmó que las ASVs más abundantes correspondieron a los géneros *Acetobacter*, seguido de los géneros *Lactobacillus*, *Prevotella*, *UCG-004* (perteneciente a la familia *Erysipelatoclostridiaceae*) y *Caproiciproducens* en ambas muestras de la EOL, como se muestra en la Figura 11. Esto indica que las poblaciones de microorganismos presentes en el biol estaban homogéneas.

	BR1	BR2
Acetobacter-	32.4	33.7
Lactobacillus-	8.5	9.2
Prevotella-	5.9	7.7
UCG-004-	3.5	3.8
Caproiciproducens-	3.2	3.9
Romboutsia-	2.7	1.6
Rikenellaceae RC9 gut group-	1.6	2
Clostridium sensu stricto 12-	1.6	1.5
Streptococcus-	1.6	1.5
f_Xanthomonadaceae_ASV_853-	1.3	1.2
Megasphaera-	0.9	1.2
Atopobium-	0.8	1
f_Eggerthellaceae_ASV_1264-	0.8	1
f_Peptostreptococcaceae_ASV_1036-	1.1	0.6
Acidothermus-	0.9	0.6
Paeniclostridium-	0.8	0.5
Asteroleplasma-	0.6	0.7
UCG-005-	0.6	0.5
Oxobacter-	0.5	0.5
Acholeplasma-	0.4	0.5

Figura 11. Mapa de calor géneros bacterianos del EOL por muestra. La abreviatura f_= familia, cuando no se pudo identificar a nivel de género.

La presencia de los géneros *Acetobacter* y *Lactobacillus* ha sido reportado previamente en enmiendas de este tipo, muy probable debido al proceso anaeróbico que se lleva en la producción de la EOL, además ambos géneros se consideran de importancia biotecnológica en la industria. En el caso de las especies del género *Acetobacter*, se ha descrito su rol como bacterias fijadoras de nitrógeno capaces de promover el crecimiento de las plantas mediante

una variedad de mecanismos, además, este grupo generalmente se asocian con la rizósfera y establecen una asociación más específica dentro de las raíces, hojas y otros tejidos vegetales como endófito. Sus funciones como microorganismos promotores del crecimiento de las plantas generalmente están relacionadas con el aumento de la biomasa vegetal, la solubilización de fosfatos y otros minerales y el control de patógenos de las plantas (113). Del género *Lactobacillus* es conocido que permite la liberación lenta de nutrientes de la rizósfera para que las plantas los absorban, producen ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y biosurfactantes que confieren protección a la planta y producen antibióticos contra algunas bacterias patógenas, especies de este género también son usadas como fertilizante fortificado y probiótico para mejorar los cultivos (114,115).

Del género *Prevotella* se conoce que es un taxón altamente conectado con interacciones competitivas y cooperativas con muchos miembros de la microbiota intestinal, pues contribuye significativamente al metabolismo de los carbohidratos y del nitrógeno en los rumiantes (116,117). Además, la adición de componentes del EOL como el estiércol y la melaza pueden explicar la presencia de especies patógenas del género *Clostridium* que pueden causar infecciones intestinales y otros males (118,119). Aunque trabajar con ADN no corrobora la viabilidad de cepas patogénicas, sugiere que la preparación y manejo del biol se realice con precaución. Estudios de caracterización de enmiendas obtenidas bajo procesos de fermentación han demostrado que la carga de patógenos humanos con la fermentación anaeróbica se reduce (120). En nuestro caso se prevé que la presencia de *Prevotella* y *Clostridium* se debe al uso de estiércol vacuno, componente esencial de la EOL.

El microbioma central común bacteriano del EOL, estuvo representado por el 68% de la comunidad (Figura 12) perteneciente a 25 géneros de los cuales los más abundantes (top 20) están descritos en la Tabla XII.

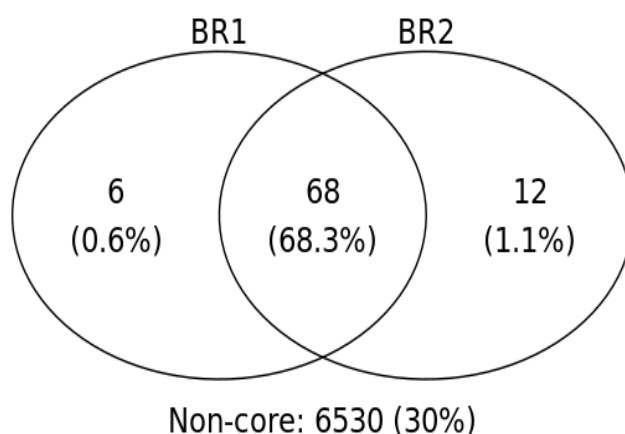


Figura 12. Microbioma central común bacteriano del EOL

El microbioma central del EOL está conformado en su mayoría por taxones propios de procesos anaeróbicos y otros taxones reportados en enmiendas orgánicas pertenecientes a filos Proteobacterias y Bacteroidota (121), también se hallaron microorganismos propios del intestino procedentes del estiércol de ganado (*Prevotella*, *Clostridium*, *Streptococcus*). Finalmente, algunos de los géneros encontrados en el biol en los cultivos se los han relacionado con la función de fijar nitrógeno (*Acetobacter* y *Prevotella*) (116,122) y se asume que pueden estar relacionados con los cambios en el elemento nitrógeno en suelo que se reportó para el tratamiento experimental en los análisis previos.

ASVs exclusivas de BR1		Microbioma central común		ASVs exclusivas de BR2	
Filo	Género	Filo	Género	Filo	Género
Firmicutes	<i>g_ Clostridium</i>	Proteobacteria	<i>g_ Acetobacter</i>	Actinobacteriota	<i>g_ N.I del o_ Coriobacteriales</i>
Proteobacteria	<i>g_ Pelagibacterium</i>	Firmicutes	<i>g_ Lactobacillus</i>	Proteobacteria	<i>g_ Acetobacter</i>
	<i>g_ Oscillibacter</i>		<i>g_ UCG-004 de la f_ Erysipelatoclostridiaceae</i>	Firmicutes	<i>g_ Megasphaera</i>
	<i>g_ Faecalibacterium</i>	Bacteroidota	<i>g_ Prevotella</i>		<i>g_ Caproiciproducens</i>
Firmicutes	<i>g_ Caproiciproducens</i>	Firmicutes	<i>g_ Romboutsia</i>	Proteobacteria	<i>g_ Salmonella</i>
			<i>g_ Streptococcus</i>	Firmicutes	<i>g_ Caproiciproducens</i>
		Proteobacteria	<i>g_ N.I de la f_ Xanthomonadaceae</i>		<i>g_ Oxobacter</i>
		Firmicutes	<i>g_ Lactobacillus</i>		<i>g_ Oxobacter</i>
		Actinobacteriota	<i>g_ N.I de la f_ Eggerthellaceae</i>	Euryarchaeota	<i>g_ Methanobrevibacter</i>
		Firmicutes	<i>g_ N.I de la f_ Peptostreptococcaceae</i>	Firmicutes	<i>g_ Incertae Sedis</i>
			<i>g_ Caproiciproducens</i>	Actinobacteriota	<i>g_ Atopobium</i>
			<i>g_ Paeniclostridium</i>	Firmicutes	<i>g_ N.I del o_ Oscillospirales</i>
		Bacteroidota	<i>g_ Rikenellaceae RC9 gut group</i>		
		Firmicutes	<i>g_ Clostridium sensu stricto 12</i>		
			<i>g_ Asteroleplasma</i>		

Tabla XII. Top 20 ASVs del microbioma central común y grupos exclusivas de las muestras BR1 y BR2 del EOL. Las siguientes abreviaturas representan *o_* = orden, *f_* = familia; *g_* = género, N. I= no identificado.

Para el caso del microbioma de suelo, las top 20 ASVs del grupo bacteriano, alcanzaron cerca del 10% del total de la comunidad. El top 20 se encuentran representado por los filos y géneros: Nitrospirota (*Nitrospira*), seguido por Proteobacteria (*Chujaibacter*, *Pseudolabrys*, *Sphingomonas*, *Bradyrhizobium*, *Acetobacter*), Firmicutes, Actinobacteriota (*Acidothermus*, *Gaiella*), Chloroflexi, Acidobacteriota (*Terracidiphilus*), Gemmatimonadota. Ver Tabla XIII.

Filo	Nivel taxonómico más cercano	Abundancia relativa total
Nitrospirota	<i>g_Nitrospira</i>	1,32
Proteobacteria	<i>f_Reyraneliaceae</i>	0,76
Firmicutes	<i>f_Bacillaceae</i>	0,70
Proteobacteria	<i>g_Chujaibacter</i>	0,68
	<i>g_Pseudolabrys</i>	0,67
Actinobacteriota	<i>g_Acidothermus</i>	0,45
Proteobacteria	<i>g_Sphingomonas</i>	0,41
Nitrospirota	<i>g_Nitrospira</i>	0,41
Firmicutes	<i>f_Bacillaceae</i>	0,35
Actinobacteriota	<i>g_Acidothermus</i>	0,35
Proteobacteria	<i>g_Chujaibacter</i>	0,35
Chloroflexi	<i>g_N.I del o_Ktedonobacterales</i>	0,32
Acidobacteriota	<i>c_Acidobacteriae</i>	0,29
Proteobacteria	<i>g_Bradyrhizobium</i>	0,28
Gemmatimonadota	<i>f_Gemmatimonadaceae</i>	0,28
Acidobacteriota	<i>g_Terracidiphilus</i>	0,28
Proteobacteria	<i>f_Xanthobacteraceae</i>	0,27
NB1-j	<i>p_NBI-j</i>	0,25
Actinobacteriota	<i>g_Acidothermus</i>	0,24
	<i>g_Gaiella</i>	0,23

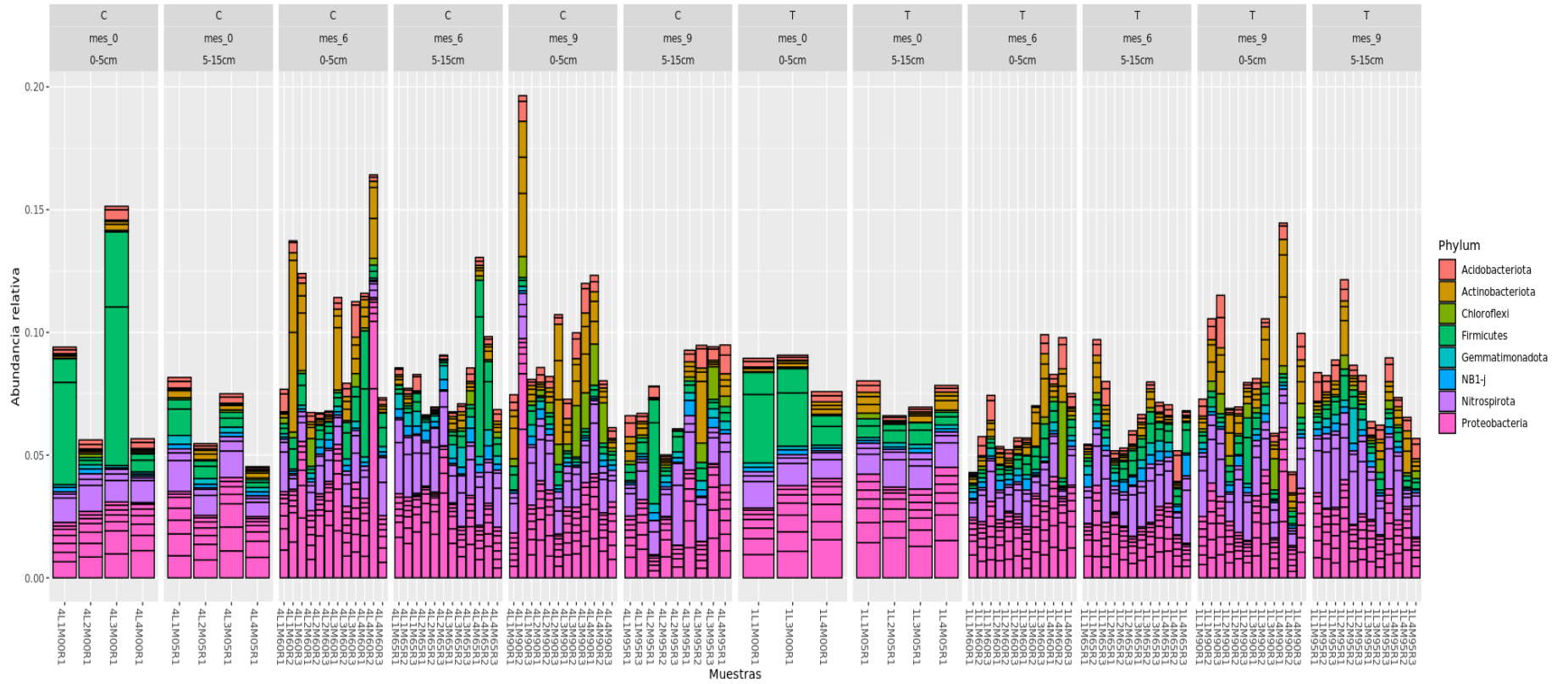
Tabla XIII. ASVs bacterianas más abundantes en las muestras suelo. Las abreviaturas representan: *p_*= filo, *c_*= clase, *o_*= orden, *f_*= familia y *g_*= género, N. I.= No Identificado. Los valores reportados muestran la abundancia relativa en porcentaje.

El gráfico de barras de abundancia relativa muestra que los grupos encontrados tanto en el tratamiento control como en el tratamiento con la EOL, presentaron una composición similar (Figura 13). Sin embargo, ciertos grupos pertenecientes al filo Actinobacteriota tuvieron una abundancia relativa superior a aquellos presentes en el control, a partir del mes 6.

En un análisis detallado, se observa que los filos Nitrospirota y Proteobacteria fueron predominantes a lo largo del estudio, seguido por Firmicutes, este último filo, se destacó por tener mayor abundancia en el mes 0 a una profundidad entre 0 a 5cm. El género *Acidothermus* fue el taxón más abundante al mes 6 y 9, a la profundidad de 0 a 5cm, tanto en el tratamiento control como en el tratamiento con la EOL. El género *Chujaibacter* tuvo mayor presencia al mes 6 y 9 a una profundidad de 0 -5 cm en las muestras del control y tratamiento experimental.

A)

Top 20 ASVs bacterianas por filo en suelo



B)

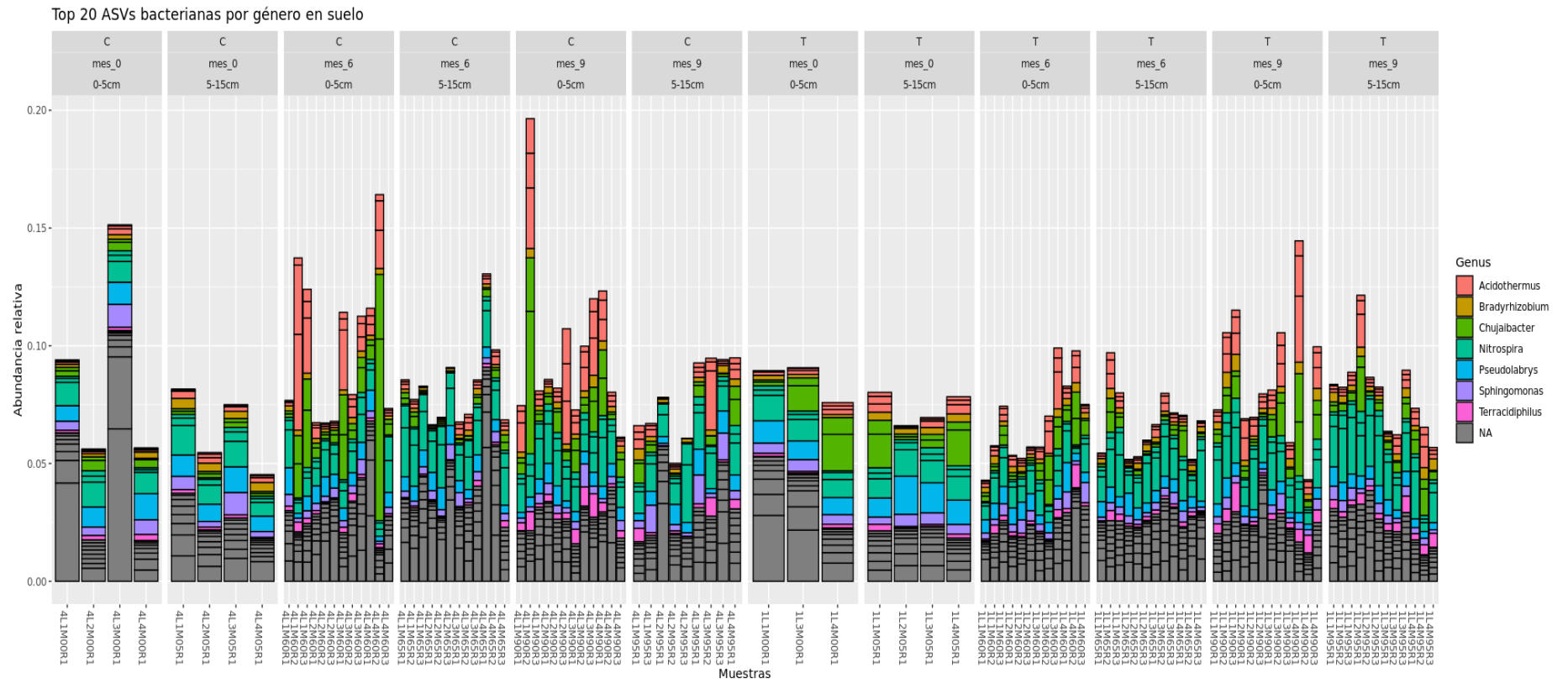


Figura 13. ASVs bacterianas más abundantes (top 20) en muestras del suelo. A) por filo y B) por género. La abreviatura representa NA= no identificado.

El análisis del mapa de calor mostró que los grupos más abundantes (top 20) presentes en las muestras control y del tratamiento experimental (Figura 14 y Figura 15) tuvieron un patrón similar al considerar el período de evaluación. De estos los 5 géneros más abundantes fueron *Acidothermus*, *Nitrospira*, *Chujaibacter*, *Sphingomonas* y *Haliangium*, uno de los grupos no encontrados en el control fue *Candidatus Udaeobacter*, *Anaeromyxobacter* y *Bryobacter*.

El mapa de calor por profundidad de suelo mostró que la aplicación del biol causó el incremento de ciertos grupos, entre ellos *Acidothermus*, *Nitrospira*, *Chujaibacter*, *Sphingomonas* y *Haliangium*, de manera específica en profundidades de 0-5 cm, en comparación con el control. Estos resultados sugieren que los cambios ocurridos mayoritariamente suceden en la superficie del suelo donde el producto tendría mayor acción. Otros estudios han mostrado resultados similares donde se evidencia que la aplicación de enmiendas causa un mayor impacto en la superficie del suelo (123).

Taxones de los filos Nitrospirota, Proteobacteria, Acidobacteriota y Gemmatimonadota en otros estudios han sido reportados como los más abundantes en el suelo a una profundidad de 0 a 10 cm en otros cultivos convencionales en especial cuando usan fertilizantes sean orgánicos o químicos, pues se conoce que estos pueden afectar el pH del suelo y el contenido de sales, lo que hace que haya un mayor impacto entre los taxones de estos grupos en la composición de la comunidad como es el caso del género *Acidothermus* (124), y estos resultados concuerdan con nuestro estudio.

En el caso particular del filo Proteobacteria (género *Chujaibacter*) se lo ha reportado abundantemente en suelos agrícolas y en algunos casos en cultivos convencionales cuyo crecimiento es favorecido en entornos de bajo pH y en suelos con altos contenidos de materia orgánica (124, 125).

Nitrospira, *Gaiella*, *Chujaibacter*, *Candidatus_Udaeobacter* y géneros de la familia *Reyranellaceae* y Acidobacterias han sido reportados de gran importancia dentro del ciclo del nitrógeno (125–127), además, taxones de los filos Nitrospirota, Proteobacteria(*Sphingomonas*) Acidobacteriota, Gemmatimonadota y en especial el filo Firmicutes han demostrado tener una incidencia en la supresión de la enfermedad del marchitamiento en banano causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 (FOC) (128,129).

Por otro lado, se resalta especies del género *Haliangium*, los cuales son organismos reportados como predadores de otros microorganismos y con secreción de moléculas de interés, como antibióticos y compuestos antifúngicos llamados halianginas (130,131).

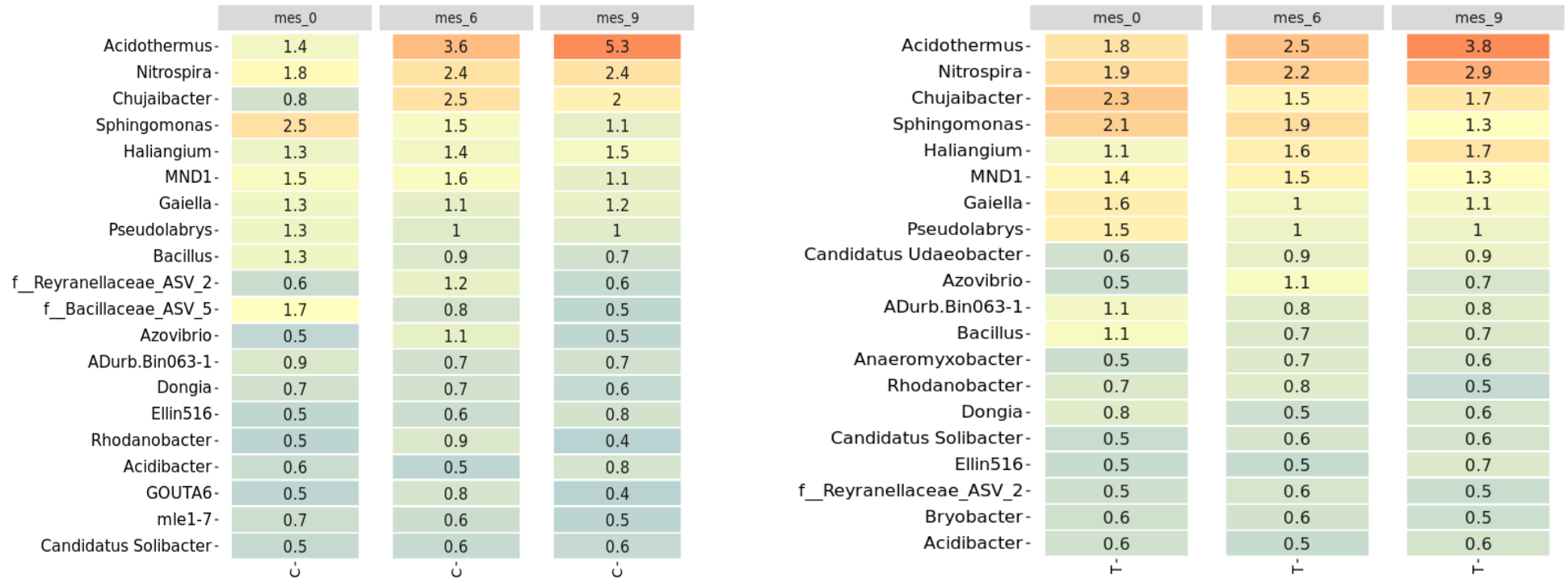


Figura 14. Mapa de calor del top 20 de géneros bacterianos en suelo por tratamiento control y tratamiento experimental al considerar períodos de evaluación. Cuando no fue posible identificar a nivel de género, la abreviatura f_=familia. Los valores reportados representan el porcentaje de abundancia relativa.

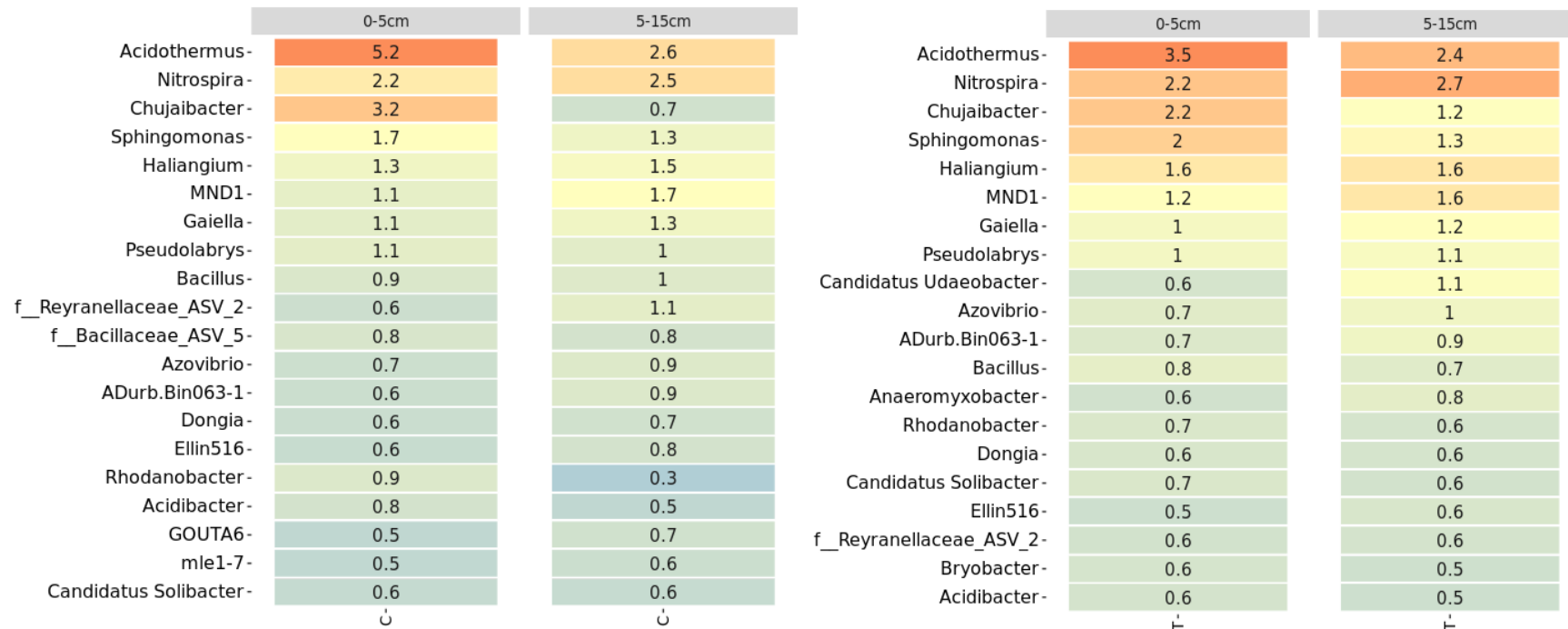


Figura 15. Mapa de calor del top 20 de géneros bacterianos en suelo por tratamiento control y tratamiento experimental al considerar profundidad. Cuando no fue posible identificar a nivel de género, la abreviatura f_= familia. Los valores reportados representan el porcentaje de abundancia relativa.

El microbioma central común del grupo bacteriano del suelo estuvo representado por 36 ASVs que representó el 10.9% de la comunidad. Un grupo conformado por 5 ASVs que representa un 0.7% fueron exclusivas del control, mientras que 7 ASVs fueron exclusivas del tratamiento, representando solo el 1.2% de la comunidad (Figura 16).

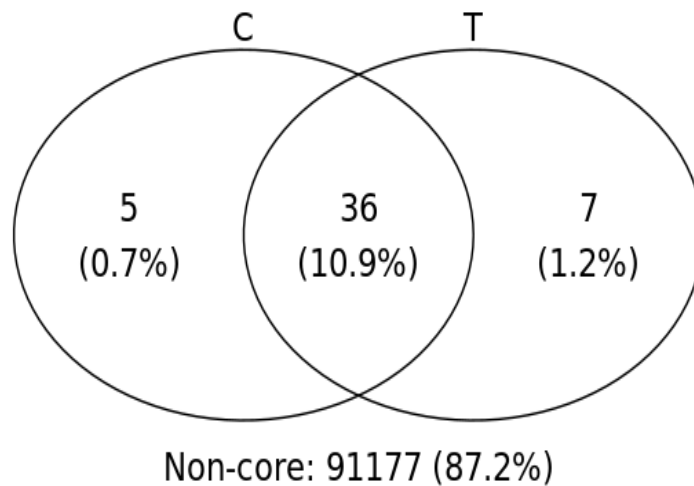


Figura 16. Microbioma central común bacteriano del suelo al considerar los tratamientos.

Los géneros exclusivos encontrados en las muestras de suelo con aplicación de la EOL fueron *Terracidiphilus*, *Nitrospira*, *Fictibacillus*, *Azovibrio*, *Sphingomonas* (Tabla XIV), y como se ha descrito anteriormente estos géneros están relacionados con un aumento en su abundancia en presencia de un mayor contenido de materia orgánica que en este estudio lo aporta el biol, su actividad de: bacterias fijadoras de nitrógeno y controladores biológicos de patógenos como *Fusarium*.

En cuanto a las ASVs del microbioma central común y las que son exclusivas del tratamiento, se ha determinado que la abundancia de géneros como *Bradyrhizobium* y *Sphingomonas*, cumplen un rol como bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (124) .

ASVs exclusivas del Control		Microbioma central común		ASVs exclusivas del Tratamiento	
Phylum	Nivel taxonómico más cercano	Phylum	Nivel taxonómico más cercano	Phylum	Nivel taxonómico más cercano
RCP2-54	<i>g_ N.I de la p_RCP2-54</i>	Proteobacteria	<i>g_Pseudolabrys</i>	Acidobacteriota	<i>g_Terracidiphilus</i>
			<i>g_ N.I de la f_Reyranellaceae</i>	Nitrospirota	<i>g_Nitrospira</i>
		Nitrospirota	<i>g_Nitrospira</i>	Firmicutes	<i>g_Fictibacillus</i>
		Proteobacteria	<i>g_Sphingomonas</i>	Proteobacteria	<i>g_Azovibrio</i>
		Firmicutes	<i>g_ N.I de la f_Bacillaceae</i>	Acidobacteriota	<i>g_ N.I de la f_Vicinamibacteraceae</i>
		Gemmatimonadota	<i>g_ N.I de la f_Gemmatimonadaceae</i>	Myxococcota	<i>g_ N.I del p_Myxococcota</i>
		Actinobacteriota	<i>g_Acidothermus</i>	Proteobacteria	<i>g_Sphingomonas</i>
		Proteobacteria	<i>g_ N.I de la f_Hyphomonadaceae</i>	Myxococcota	<i>g_ N.I del p_Myxococcota</i>
			<i>g_Chujaibacter</i>		
			<i>g_ N.I de la f_Hyphomonadaceae</i>		
		Firmicutes	<i>g_ N.I de la f_Bacillaceae</i>		
		NB1-j	<i>g_ N.I del p_NB1-j</i>		
		Actinobacteriota	<i>g_ N.I del p_Actinobacteriota</i>		
		Chloroflexi	<i>g_ N.I del c_Dehalococcoidia</i>		
		Acidobacteriota	<i>g_ N.I del c_Acidobacteriae</i>		
		Proteobacteria	<i>g_ N.I del f_Xanthobacteraceae</i>		
		Methylomirabilota	<i>g_ N.I del o_Rokubacteriales</i>		
		Actinobacteriota	<i>g_ N.I del o_Gaiellales</i>		
Proteobacteria	<i>g_Bradyrhizobium</i>				

Tabla XIV. Top ASVs del microbioma central común bacteriano del suelo, exclusivas del control y del tratamiento. Se presentan hasta el top 20 ASVs del microbioma, las siguientes abreviaturas representan f_ = familia; N. I= no identifica.

3.3.2 Perfiles taxonómicos: grupos fúngicos

Las 20 ASVs fúngicas con mayor abundancia en las muestras de suelo estuvieron representadas por los filos y géneros: Ascomycota (*Fusarium*, *Leptobacillium*, *Musicillium*, *Myxocephala*, *Penicillium*, *Pyrenochaetopsis*, *Simplicillium*, *Trichoderma*) y Basidiomycota (*Trichosporon*, *Exobasidium*) ver Tabla XV.

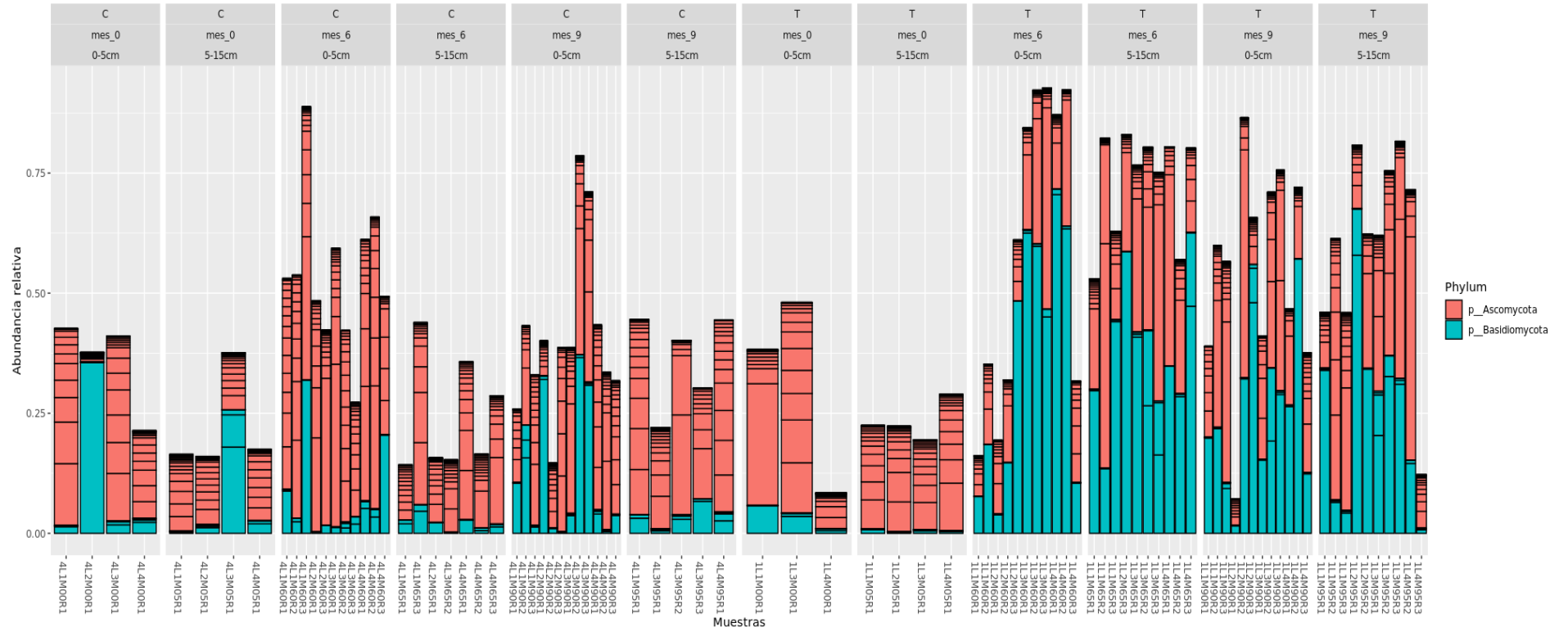
Mayor abundancia presentaron las muestras con la aplicación del EOL, algunas incluso que alcanzaron hasta un 75% de abundancia relativa total de la población, versus las muestras del control que alcanzaron en su mayoría un 50% de la abundancia relativa de la población. Los cambios de abundancia en las muestras de suelo tratadas con la EOL fueron evidentes a partir del mes 6 y la aplicación de este ocasionó un incremento en la abundancia de grupos pertenecientes al filo Basidiomycota en relación con el control donde predominantemente se encontraron hongos Ascomicetos. Fue de particular interés evidenciar que el género *Fusarium* que incluye algunas especies patógenas predominó en el tratamiento control en comparación con el tratamiento donde se aplicó la EOL (Figura 17).

Filo	Nivel taxonómico más cercano	Porcentaje de abundancia total
Basidiomycota	<i>g__Trichosporon</i>	13,03
Ascomycota	<i>g__Trichoderma</i>	5,23
	<i>g__Trichoderma</i>	5,12
	<i>g__Myxocephala</i>	4,05
	<i>g__Fusarium</i>	2,13
Basidiomycota	<i>g_N.I del o_Trechisporales</i>	2,05
Ascomycota	<i>g__Fusarium</i>	1,72
	<i>g__Musicillium</i>	1,51
Basidiomycota	<i>g_N.I del o_Trechisporales</i>	1,19
	<i>g__Exobasidium</i>	1,14
Ascomycota	<i>g__Penicillium</i>	0,98
	<i>g__Pyrenochaetopsis</i>	0,92
	<i>g_N.I de la f_Nectriaceae</i>	0,91
	<i>g_del p_Ascomycota</i>	0,78
	<i>g_N.I de la f_Nectriaceae</i>	0,78
	<i>g__Penicillium</i>	0,75
	<i>g__Penicillium</i>	0,70
	<i>g__Penicillium</i>	0,64
	<i>g__Simplicillium</i>	0,63
	<i>g__Leptobacillium</i>	0,60

Tabla XV. ASVs fúngicos más abundantes en las muestras de suelo. Las abreviaturas representan: *p_*= filo, *o_*= orden, *f_*= familia y *g_*= género, N. I = No identificado. Los valores reportados muestran la abundancia relativa en porcentaje.

A)

Top 20 ASVs fúngicas por filo en suelo



B)

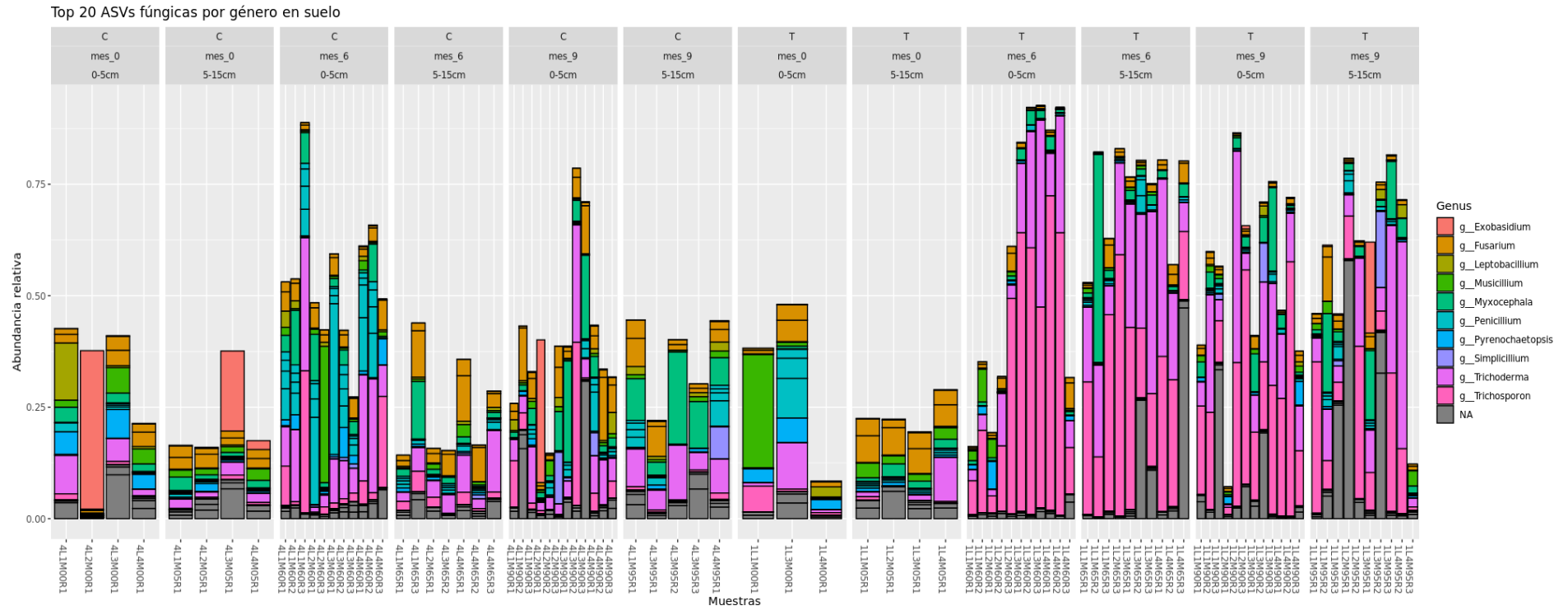


Figura 17. ASVs fúngicas más abundantes (top 20) en muestras del suelo. A) por filo y B) por género. La abreviatura NA representa no identificado.

En los mapas de calor fúngicos en suelo por período de evaluación y profundidad, mostraron que la aplicación del biol causó la reducción de ciertos grupos, evidenciado en los top 20 géneros descritos en la fFigura 18 y Figura 19. Un ejemplo notable es la reducción del género *Fusarium* el cual presentó un porcentaje de abundancia relativa total del 9.3 al inicio de la evaluación (mes 0), y de 3.5% al final de la evaluación (mes 9), por efecto de la EOL. En el análisis por profundidad también mostró que este género se reduce en ambos niveles de profundidad en comparación con el control probablemente debido al efecto del EOL. Por otro lado, grupos de hongos considerados benéficos, incrementaron su número por la aplicación de la EOL. Entre estos destaca el género *Trichoderma* el cual presentó valores iniciales de 4.3% y terminó en 15.1%, por efecto de la aplicación de la EOL al considerar el período de evaluación.

De los dos géneros que se incrementaron abundantemente en el tratamiento, la levadura *Trichosporon* y el hongo *Trichoderma*, comparten la función de ser controladoras biológicas sobre fitopatógenos. En el caso de *Trichosporon*, es un género de levadura basidiomiceto anamórfico distribuido ampliamente en la naturaleza, se encuentra en zonas tropicales y templadas, y en sustratos como el suelo y materia orgánica, su rol en la simulación de elementos como el carbono y en nitrógeno todavía está en curso (132), y la eficiencia de esta levadura sobre patógenos se debe a la producción de compuestos orgánicos volátiles (COV), competencia por nutrientes, formación de biopelículas, producción de toxinas asesinas y β -1,3-glucanasa como mecanismos de acción para controlar el micelio de patógenos como *Alternaria* spp. (133).

En cuanto a *Trichoderma*, es considerado como un hongo antagonista benéfico (134), conocido por su actividad como biopesticida y biofungicida contra patógenos como *Pythium*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*, entre otros. Esta resistencia se debe a sus inductores liberados por sus hifas que son enzimas como: serina proteasa, xilanasas, quitinasas, celulasas y proteasas. Sin embargo, también se destacan otras funciones como: fijador de nitrógeno (127), solubilizadores de fosfato en suelo, lo cual lo hace disponible para la planta, son hongos promotores de crecimiento (PGPF) a través de la descomposición de materia orgánica y la producción de sustancias bioactivas como hormonas vegetales entre estas el ácido indol-3-acético (IAA), que es la principal auxina en las plantas, y controla diversos procesos fisiológicos como la elongación y división celular, favoreciendo el alargamiento y peso de la raíz y del brote, además de mejorar la fertilidad del suelo (136 – 139). Y *Arthrobotrys* un excelente controlador de nemátodos mediante mecanismos físicos de atrapamiento (Yang et al. 2011).

La literatura también documenta que el incremento de la acidez del suelo favorecerá el número de ciertos taxones de hongos, y como buen indicador de calidad del suelo se espera una mayor cantidad de ciertos grupos como *Trichoderma* y cepas no patogénicas de *Fusarium*, considerados como hongos benéficos (102). Creemos que en este estudio la naturaleza y la aplicación frecuente del EOL pudo acidificar el suelo incrementando considerablemente grupos benéficos de *Trichosporum* y *Trichoderma*, redujo la abundancia de hongos fitopatógenos pertenecen al filo Ascomycota como *Fusarium oxysporum* (129), pero persistieron especies de este género consideradas como benéficas (139,140).

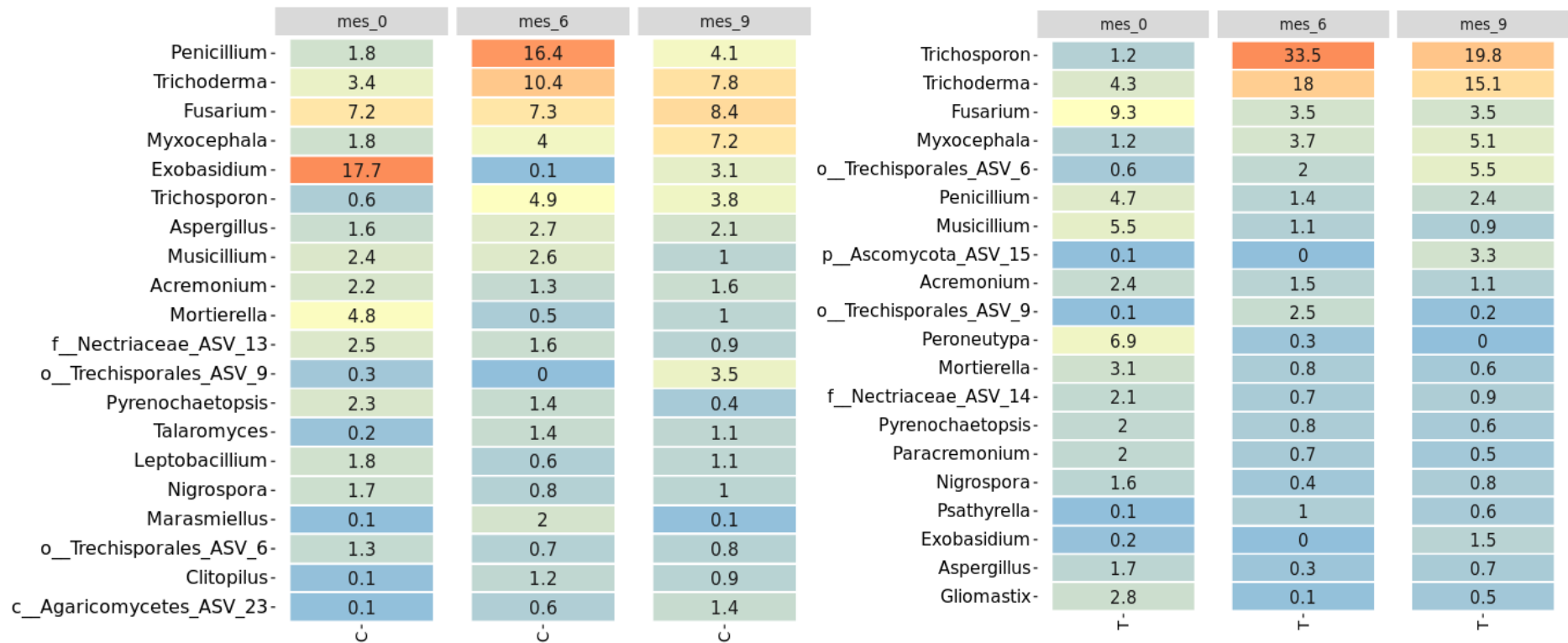


Figura 18. Mapa de calor del top 20 de géneros fúngicos en suelo por tratamiento control y tratamiento experimental al considerar períodos de evaluación. Cuando no fue posible identificar a nivel de género, las abreviaturas representan: c_= clase, o_= orden y f_=familia. Los valores reportados representan el porcentaje de abundancia relativa.

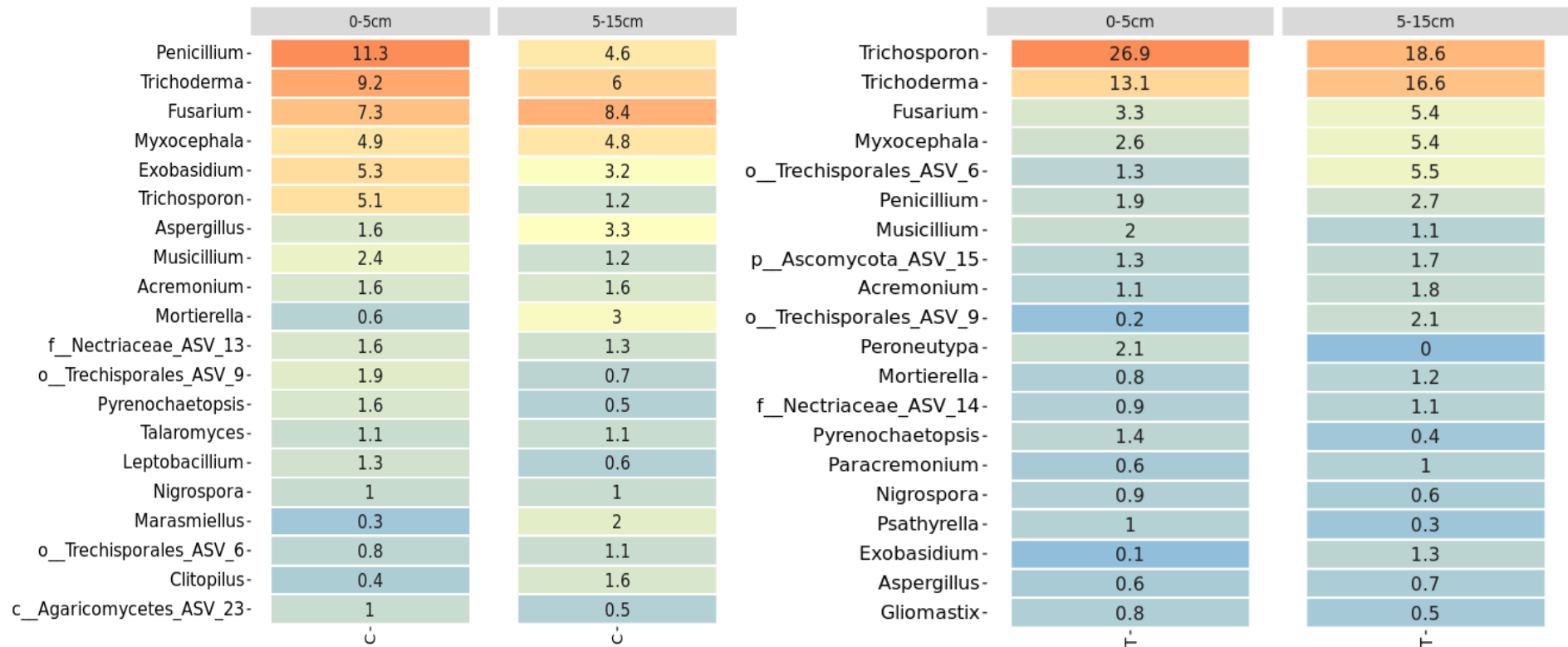


Figura 19. Mapa de calor del top 20 de géneros fúngicos en suelo por tratamiento control y tratamiento experimental al considerar profundidad. Cuando no fue posible identificar a nivel de género, las abreviaturas representan: c_= clase, o_= orden y f_= familia. Los valores reportados representan el porcentaje de abundancia relativa.

En la Figura 20 se visualiza el microbioma central común de hongos en el suelo a considerarse ambos tratamientos y representan el 28.1% (representado por 11 ASVs) del total de la comunidad, un 6.3% (representado por 12 ASVs) específico para el control y un 0.4% de ASVs (1) para el tratamiento con la EOL.

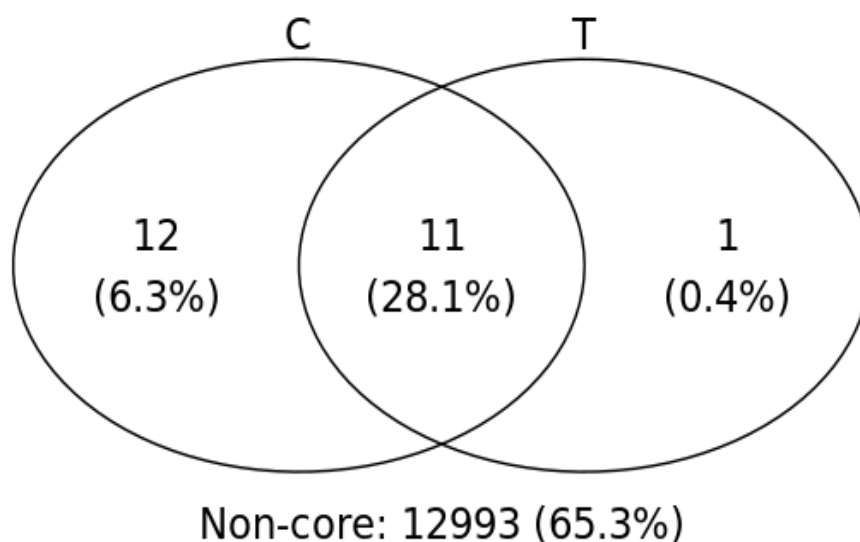


Figura 20. Microbioma central común fúngico del suelo al considerar tratamientos.

En la Tabla XVI se describen el filo y nivel taxonómico más cercano de estas top 20 ASVs exclusivas por control, tratamiento y del microbioma central común.

De este análisis se puede destacar que la levadura *Apiotrichum* se reportó exclusivamente dentro del tratamiento experimental, se conoce que esta levadura comúnmente se encuentra en suelos y material orgánico, y produce enzimas que le permiten degradar biomasa y subsistir incluso en sustratos complejos, además, este grupo suele crear relaciones simbióticas con el huésped como las plantas, como un aporte adicional, se puede indicar a en menor nitrógeno es te grupo encuentra un medio propicio para su desarrollo (141). Esto también puede explicar porque incrementó su abundancia con la aplicación del biol, pues nuestros hallazgos reportaron que hubo una mejor asimilación de nitrógeno en suelo en el tratamiento experimental.

Algunas especies de levaduras del género anteriormente descrito que son de carácter oleaginoso lo que las convierte en fuentes prometedoras de aceites utilizados en la agricultura como posibles antagonistas de los patógenos de las plantas que se transmiten por el suelo o como promotores del crecimiento de las plantas (138,139), probablemente el efecto como controlador biológico de la levadura también ocasionó la reducción de patógenos del género *Fusarium*.

ASVs exclusivas del Control		Microbioma central común		ASVs exclusivas del Tratamiento	
Filo	Nivel taxonómico más cercano	Filo	Nivel taxonómico más cercano	Filo	Nivel taxonómico más cercano
Ascomycota	<i>g_Penicillium</i>	Basidiomycota	<i>g_Trichosporon</i>	Basidiomycota	<i>g_Apiotrichum (scarabaeorum)</i>
	<i>g_Simplicillium (obclavatum)</i>	Ascomycota	<i>g_Myxocephala(albida)</i>		
	<i>g_Leptobacillium (leptobactrum)</i>		<i>g_Fusarium (acutatum)</i>		
	<i>g_Penicillium</i>		<i>g_Fusarium</i>		
	<i>g_Penicillium (raperi)</i>		<i>g_Musicillium (theobromae)</i>		
	<i>g_Gliomastix</i>		<i>g_Penicillium</i>		
	<i>g_Acremonium (furcatum)</i>		<i>g_Pyrenochaetopsis (tabarestanensis)</i>		
	<i>g_Stachybotrys (limonisporea)</i>		<i>g_N.I de la f_Nectriaceae</i>		
	<i>g_Fusarium (oxysporum)</i>		<i>g_Acremonium (furcatum)</i>		
	<i>g_Nigrospora (oryzae)</i>		<i>g_N.I de la c_Sordariomycetes</i>		
	<i>g_Acremonium (stromaticum)</i>		<i>g_Fusarium</i>		
	<i>g_Metacordyceps (chlamydosporia)</i>		<i>g_Nigrospora (oryzae)</i>		
			<i>g_Paracremonium(inflatum)</i>		
	<i>g_Trichoderma</i>				
	<i>g_Lasiodiplodia (bruguierae)</i>				

Tabla XVI. Top ASVs del microbioma central común fúngico del suelo, exclusivas del control y del tratamiento. Se presentan hasta el top 20 ASVs del microbioma, las siguientes abreviaturas representa *f_*= familia; *g_*= género, N. I= no identificado.

3.3.3 Ecología microbiana: diversidad alfa, curvas de rarefacción

Para este ensayo, la profundidad de secuenciación se evaluó mediante curvas de rarefacción sobre conjuntos de ASVs bacterianas de EOL (Figura 21) suelo (Figura 22) y fúngicas de suelo (Figura 23). En el caso de las ASVs de bacterias, los esfuerzos de secuenciación de 100000 lecturas por muestra no fueron suficientes para cubrir la diversidad de la muestra, sin embargo, esto no ocurrió con el caso de las ASVs fúngicas, donde las curvas de rarefacción alcanzaron las mesetas de riqueza y diversidad a la profundidad de secuenciación con la plataforma de Novaseq 6000.

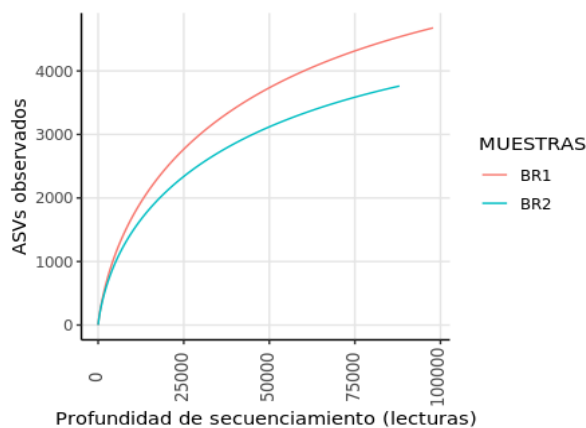


Figura 21. Curvas de rarefacción de ASVs bacterianas en muestras del EOL.

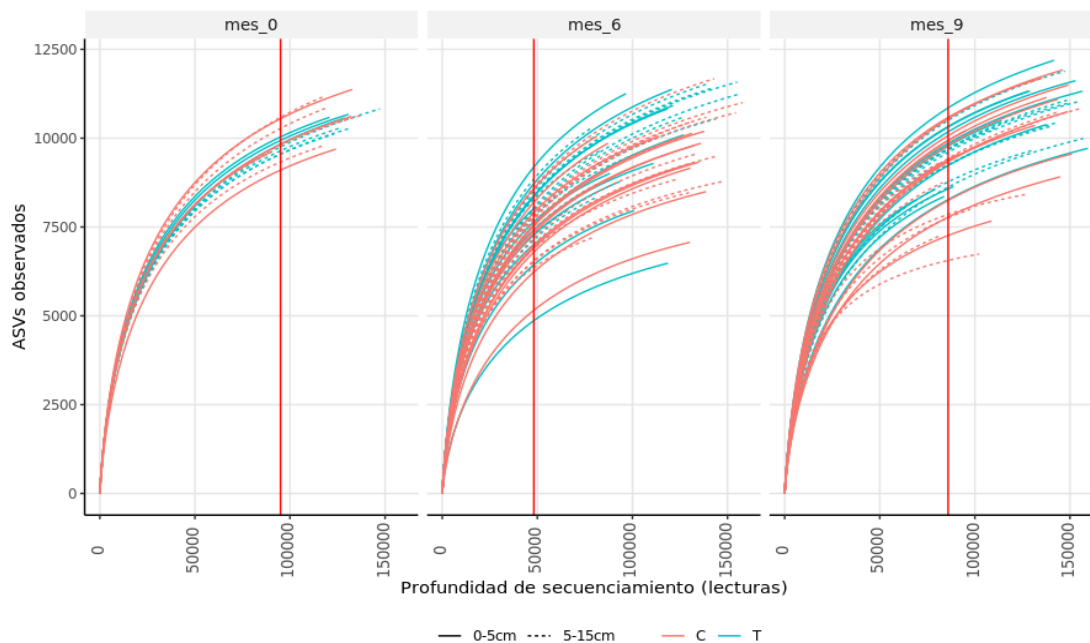


Figura 22. Curvas de rarefacción de ASVs bacterianas en muestras de suelo. La línea roja representa la muestra con menor número de muestras para encontrar toda la riqueza disponible en la muestra.

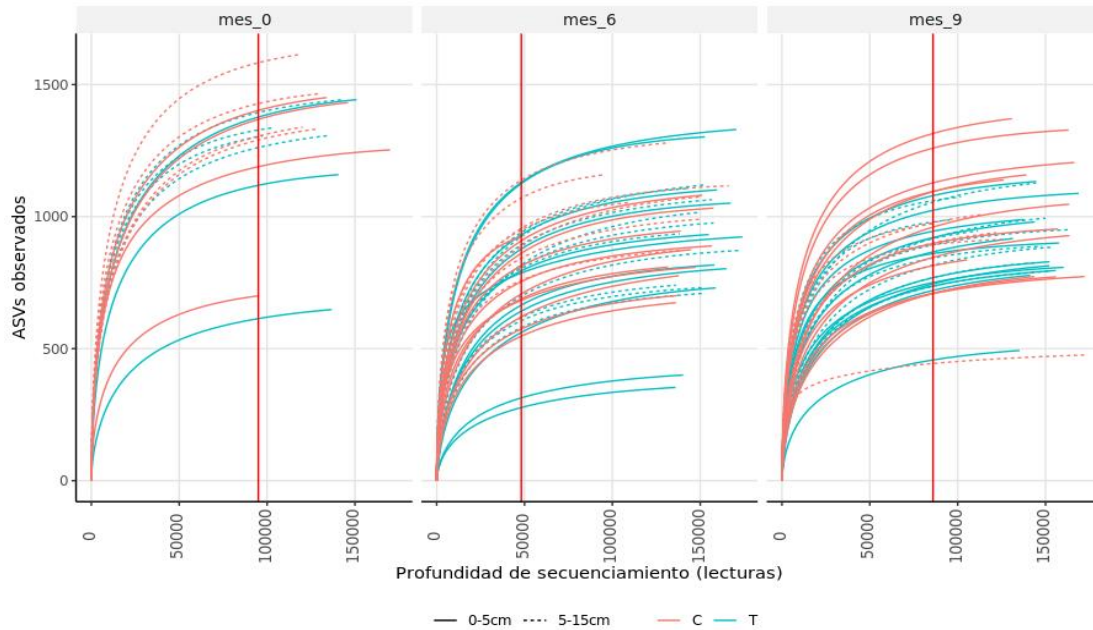


Figura 23. Curvas de rarefacción de ASVs fúngicas en muestras de suelo. La línea roja representa la muestra con menor número de muestras para encontrar toda la riqueza disponible en la muestra.

Se sugiere considerar, para estudios posteriores de este tipo con bacterias una mayor profundidad de secuenciación o utilizar una plataforma con mayor capacidad de secuenciamiento para alcanzar la meseta de saturación y tener un panorama completo de la comunidad bacteriana.

3.3.4 Ecología microbiana: diversidad alfa, índices de riqueza y diversidad

Las muestras del EOL, presentaron una riqueza de especies entre 4500 a 5750. La muestra BR1 del EOL tiene una mayor riqueza y diversidad que la muestra BR2, aunque los índices de diversidad no presentaron una mayor diferencia (Figura 24).

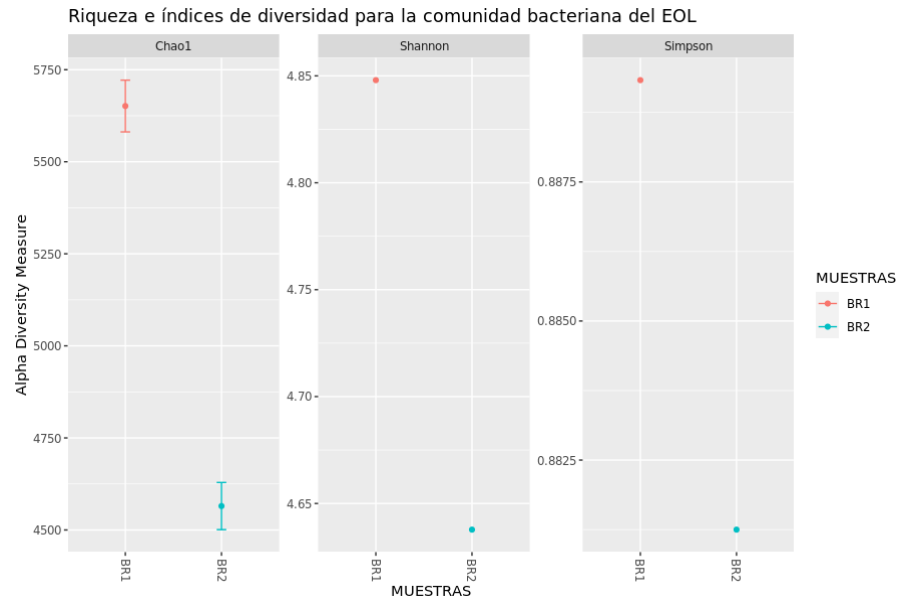
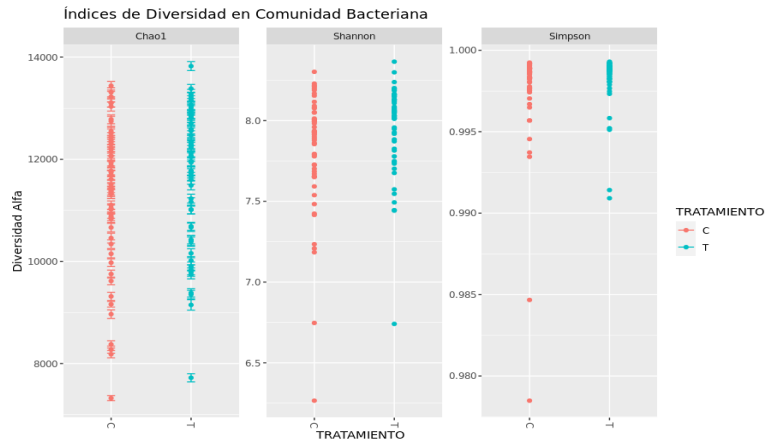


Figura 24. Riqueza y diversidad de la comunidad bacteriana del EOL.

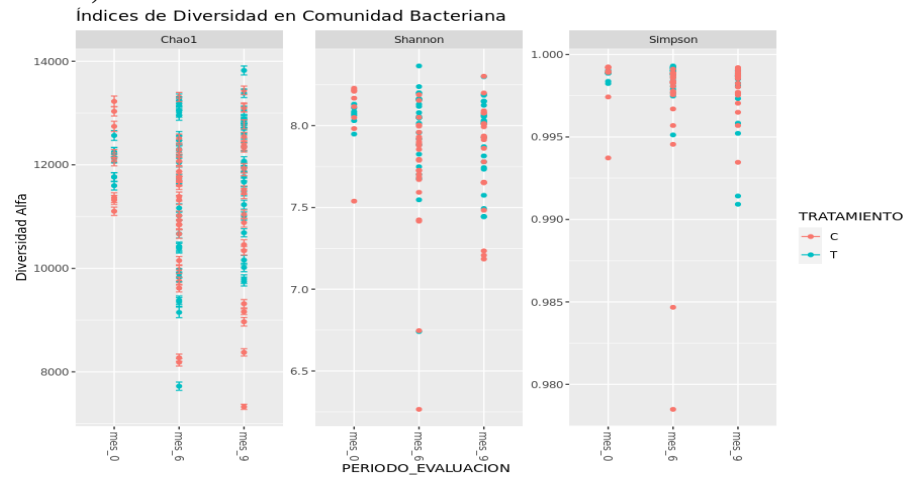
La diversidad bacteriana en suelo, estudiada por los índices de Chao, Shannon y Simpson, mostraron patrones similares en los tratamientos evaluados y al considerar los tratamientos por período de evaluación y profundidad (Figura 25).

En el caso de las muestras de hongos, el tratamiento control presentó una aparente riqueza y diversidad superior en comparación al tratamiento experimental. Esta distribución se observó tanto en análisis por período de evaluación y profundidad (Figura 26). Esto sugiere que la EOL tuvo un efecto sobre la comunidad fúngica del suelo, reduciendo su diversidad. Las enmiendas orgánicas líquidas, producto del proceso de fermentación anaeróbica, obtienen valores de pH muy bajos, es decir soluciones ácidas. Es probable que esta acidez haya causado la reducción de ciertos grupos (102). Otra posibilidad, es que la materia orgánica y metabolitos presentes en la EOL haya favorecido el aumento de ciertos grupos fúngicos cuya dominancia haya causado una competencia por nutrientes (143).

A)



B)



C)

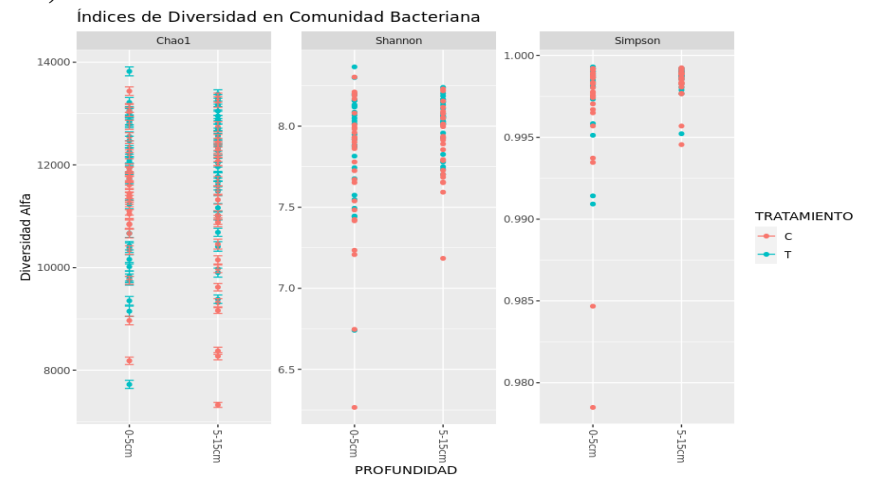
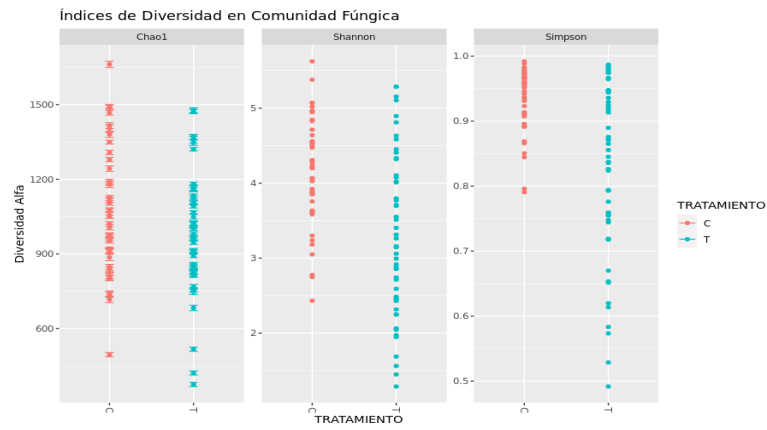
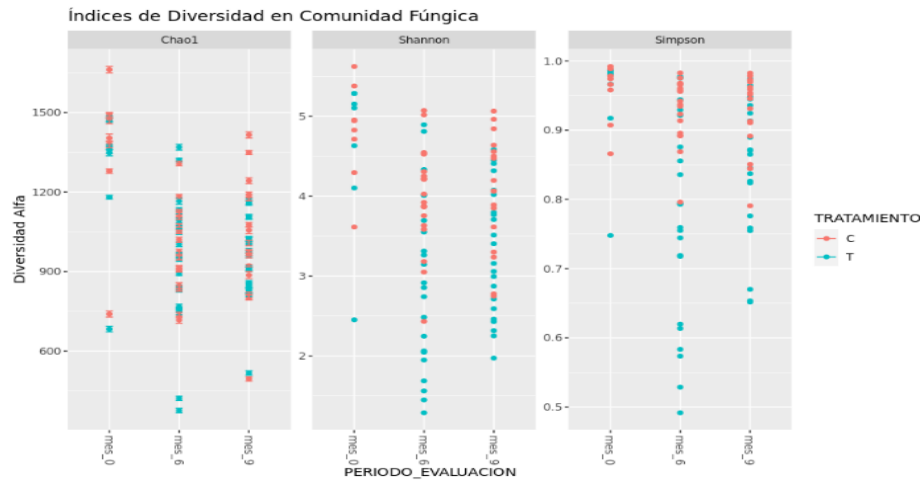


Figura 25. Riqueza y diversidad bacteriana de las muestras de suelo. A) considerando los tratamientos B) Por período de evaluación y tratamiento y C) Por profundidad y tratamiento.

A)



B)



C)

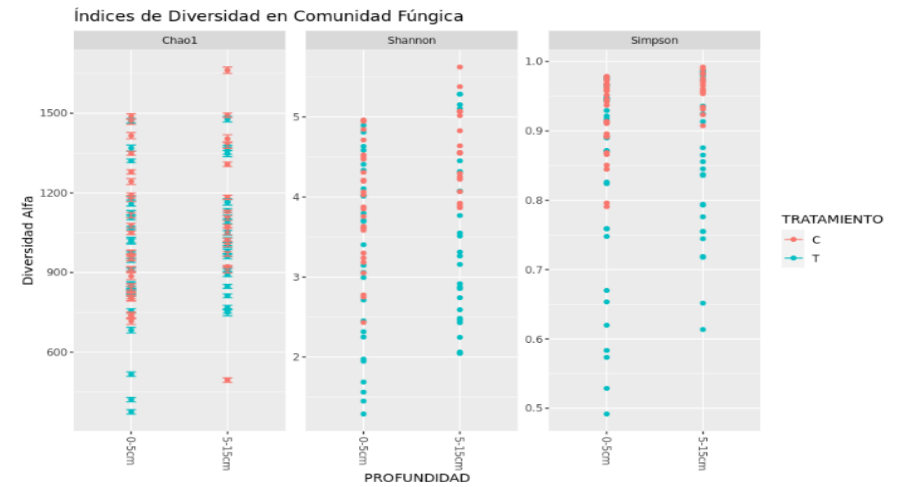
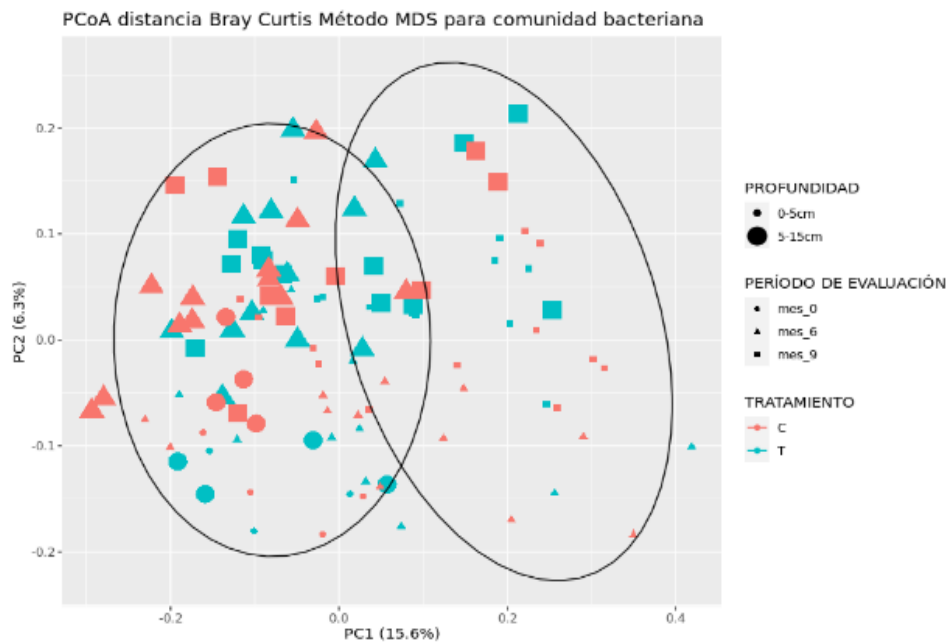


Figura 26. Riqueza y diversidad fúngicas de las muestras de suelo. A) considerando los tratamientos B) Por período de evaluación y tratamiento y C) Por profundidad y tratamiento.

3.3.5 Ecología microbiana: diversidad beta

El PCoA realizado para el análisis de bacterias del suelo reveló agrupamientos acordes a las diferentes profundidades evaluadas y no por efecto del tratamiento, este mismo patrón se observó cuando el análisis se lo segmentó por período de evaluación, aunque es evidente también cambios en la composición bacteriana al mes 6 y mes 9. Y al analizar el PCoA segmentado, se evidencia mejor la separación por distinción por profundidad en especial para el mes 6 (Figura 27).

A)



B)

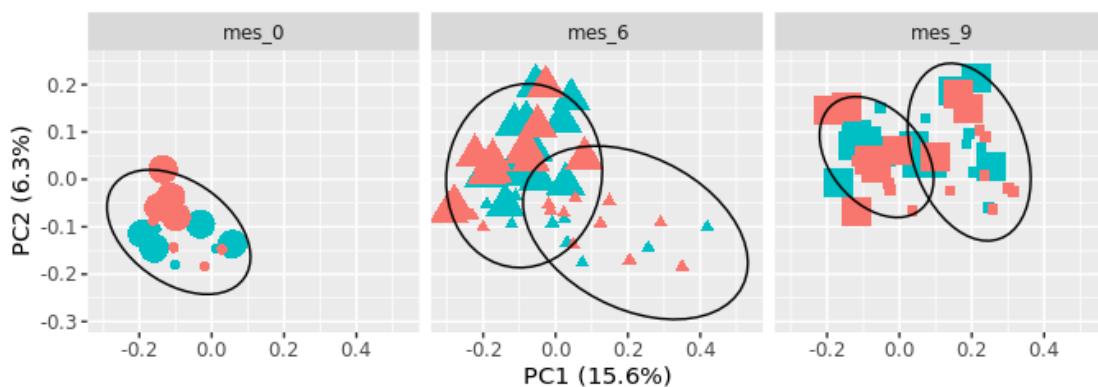
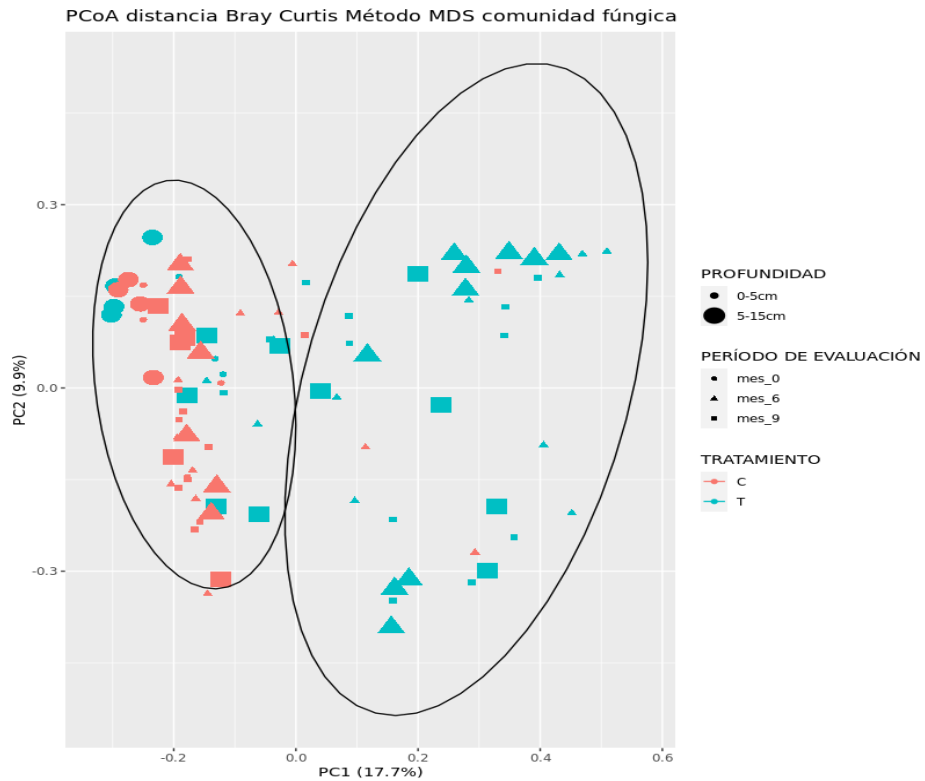


Figura 27. PCoA de muestras bacterianas de suelo considerando distancia Bray Curtis para: A) PCoA general y b) PCoA segmentado por período de evaluación.

Contrariamente, el PCoA realizado para el análisis de hongos mostró que si existió una estructura diferenciada por efecto del tratamiento en los diversos períodos de evaluación e incluso por diferentes niveles de profundidad evaluados. Este agrupamiento se observa mejor en el análisis segmentado por período de evaluación, específicamente al mes 6 y mes 9 (Figura 28).

A)



B)

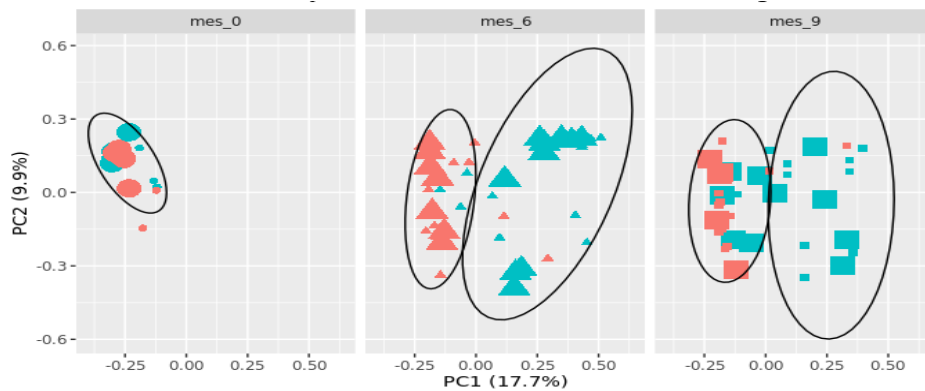


Figura 28. PCoA de muestras fúngicas de suelo considerando distancia Bray Curtis para: A) PCoA general y b) PCoA segmentado por período de evaluación.

3.4 Análisis estadísticos basados en abundancia diferencial

3.4.1 Abundancia diferencial para bacterias del suelo

El PERMANOVA realizado al tomar en cuenta la abundancia de las muestras bacterianas del suelo, basadas en distancias Bray curtis y Chiq, mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) para cada factor al considerarse de manera individual como se muestra en la Tabla XVII. De las interacciones evaluadas solo se reportó diferencias para la interacción de período de evaluación con profundidad. El incremento o disminución de la abundancia para cada factor con respecto al control se observa en la Tabla XVIII. Y de los top 20 géneros ordenados por frecuencia de abundancia por efecto de la EOL, los géneros *Haliangium*, *Anaeromixobacteria* y *Ramlibacter* fueron los que predominaron (Tabla XIX).

PERMANOVA para ASVs bacterianas de muestras de suelo	Distancia Bray Curtis	Distancia Chiq
Tratamiento	0.01*	0.01*
Período de evaluación	0.00*	0.00*
Profundidad	0.00*	0.00*
Tratamiento x Período de evaluación	0.08	0.25
Tratamiento x Profundidad	0.12	0.19
Período de evaluación x Profundidad	0.01*	0.11
Tratamiento x Período de evaluación x Profundidad	0.88	0.92

Tabla XVII. PERMANOVA para ASVs bacterianas de muestras de suelo considerando las distancias Bray Curtis y Chiq. Los valores con (*) representan diferencias significativas.

Factor	Diferencia	Cantidad ASVs	Filos únicos	Géneros únicos	Abundancia respecto al control	Cantidad ASVs	Filos únicos	Géneros únicos
Tratamiento	Significativa	3402	38	347	Disminuyó	1217	28	201
					Aumentó	2185	37	273
	No significativa	87823						
Período de evaluación	Significativa	13861	51	656	Disminuyó	10642	49	588
					Aumentó	3219	38	215
	No significativa	77364						
Profundidad	Significativa	5683	43	402	Disminuyó	2424	37	316
					Aumentó	3259	38	215
	No significativa	85542						

Tabla XVIII. Resumen ASVs bacterianas con abundancia diferencial.

TRATAMIENTO ABUNDANCIA DIFERENCIAL									
Top 20 por frecuencia	SIGNIFICATIVOS RESPECTO AL CONTROL			DISMINUYERON RESPECTO AL CONTROL			AUMENTARON RESPECTO AL CONTROL		
	Filo	Género	Frecuencia	Filo	Género	Frecuencia	Filo	Género	Frecuencia
1	Myxococcota	<i>Haliangium</i>	130	Myxococcota	<i>Haliangium</i>	26	Myxococcota	<i>Haliangium</i>	104
2	Myxococcota	<i>Anaeromyxobacter</i>	40	Actinobacteriota	<i>Acidothermus</i>	15	Myxococcota	<i>Anaeromyxobacter</i>	34
3	Firmicutes	<i>Paenibacillus</i>	27	Firmicutes	<i>Paenibacillus</i>	11	Proteobacteria	<i>Ramlibacter</i>	22
4	Actinobacteriota	<i>Gaiella</i>	26	Proteobacteria	<i>Acidibacter</i>	10	Proteobacteria	<i>Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia</i>	21
5	Proteobacteria	<i>Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia</i>	25	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	10	Acidobacteriota	<i>Bryobacter</i>	17
6	Myxococcota	<i>Pajaroellobacter</i>	25	Actinobacteriota	<i>Conexibacter</i>	10	Bacteroidota	<i>Flavobacterium</i>	17
7	Proteobacteria	<i>Ramlibacter</i>	24	Myxococcota	<i>Pajaroellobacter</i>	10	Actinobacteriota	<i>Gaiella</i>	17
8	Acidobacteriota	<i>Bryobacter</i>	23	Actinobacteriota	<i>Gaiella</i>	9	Firmicutes	<i>Paenibacillus</i>	16
9	Proteobacteria	<i>Acidibacter</i>	21	Bacteroidota	<i>Edaphobaculum</i>	8	Proteobacteria	<i>Aquicella</i>	15
10	Actinobacteriota	<i>Acidothermus</i>	21	Actinobacteriota	<i>Mycobacterium</i>	8	Myxococcota	<i>Pajaroellobacter</i>	15
11	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	21	Actinobacteriota	<i>Nocardioides</i>	8	Proteobacteria	<i>Cupriavidus</i>	14
12	Bacteroidota	<i>Edaphobaculum</i>	21	Firmicutes	<i>Pullulanibacillus</i>	8	Gemmatimonadota	<i>Gemmatimonas</i>	14
13	Gemmatimonadota	<i>Gemmatimonas</i>	21	Gemmatimonadota	<i>Gemmatimonas</i>	7	Nitrospirota	<i>Nitrospira</i>	14
14	Actinobacteriota	<i>Mycobacterium</i>	21	Myxococcota	<i>Anaeromyxobacter</i>	6	Verrucomicrobiota	<i>Chthoniobacter</i>	13
15	Actinobacteriota	<i>Nocardioides</i>	21	Acidobacteriota	<i>Bryobacter</i>	6	Bacteroidota	<i>Edaphobaculum</i>	13
16	Proteobacteria	<i>Aquicella</i>	19	Proteobacteria	<i>Bauldia</i>	5	Actinobacteriota	<i>Mycobacterium</i>	13
17	Actinobacteriota	<i>Conexibacter</i>	19	Proteobacteria	<i>Cavicella</i>	5	Actinobacteriota	<i>Nocardioides</i>	13
18	Verrucomicrobiota	<i>Chthoniobacter</i>	18	Verrucomicrobiota	<i>Chthoniobacter</i>	5	Proteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	13
19	Bacteroidota	<i>Flavobacterium</i>	18	Proteobacteria	<i>Chujaibacter</i>	5	Proteobacteria	<i>Acidibacter</i>	11
20	Nitrospirota	<i>Nitrospira</i>	17	Proteobacteria	<i>Luteimonas</i>	5	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	11

Tabla XIX. Top 20 de géneros bacterianas por tratamiento en base a la frecuencia de la abundancia diferencial.

3.4.2 Abundancia diferencial para hongos del suelo

De igual forma, el PERMANOVA realizado para muestras fúngicas, basadas en distancias Bray curtis y Chiq, mostró también diferencias significativas ($p < 0.05$) para cada factor al considerarse de forma individual como se muestra en la Tabla XX. De las interacciones evaluadas solo se reportó diferencias para la interacción del tratamiento con el período de evaluación. El incremento o disminución de la abundancia en cada factor con respecto al control se observa en la Tabla XXI, donde se puede observar como la aplicación de la enmienda orgánica disminuyó la cantidad de ciertos grupos de hongos respecto al control. De los top 20 grupos ordenados en base a la frecuencia que disminuyeron su abundancia por efecto de la EOL, los géneros *Penicillium*, *Exobasidium* y *Aspergillus*, fueron los que estuvieron presentes en mayor cantidad de muestras (Tabla XXII). Dentro de este grupo también se encontraron géneros como *Fusarium* y *Chaetomium*, ambos patógenos en cultivos comerciales (19, 141), mientras que se cree que especies benéficas (140,145,146) de estos géneros incrementaron su abundancia en este estudio.

PERMANOVA para ASVs fúngicas de muestras de suelo	Distancia Bray Curtis	Distancia Chiq
Tratamiento	0.00*	0.00*
Período de evaluación	0.00*	0.00*
Profundidad	0.01*	0.02*
Tratamiento X Período de evaluación	0.00*	0.00*
Tratamiento X Profundidad	0.45	0.34
Período de evaluación X Profundidad	0.09	0.06
Tratamiento X Período de evaluación X Profundidad	0.28	0.23

Tabla XX. PERMANOVA para ASVs fúngicas de muestras de suelo considerando las distancias Bray Curtis y Chiq. Los valores con * representan diferencias significativas.

Factor	Diferencia	Cantidad ASVs	Filos únicos	Géneros únicos	Abundancia respecto al control	Cantidad ASVs	Filos únicos	Géneros únicos
Tratamiento	Significativa	555	8	145	Disminuyó	414	8	119
					Aumentó	141	6	42
	No significativa	12462						
Período de evaluación	Significativa	1452	14	261	Disminuyó	1141	15	224
					Aumentó	311	8	96
	No significativa	11565						
Profundidad	Significativa	622	12	155	Disminuyó	151	8	54
					Aumentó	471	13	115
	No significativa	12395						

Tabla XXI. Resumen de ASVs fúngicas con abundancia diferencial.

TRATAMIENTO ABUNDANCIA DIFERENCIAL									
Top 20 por frecuencia	SIGNIFICATIVOS RESPECTO AL CONTROL			DISMINUYERON RESPECTO AL CONTROL			AUMENTARON RESPECTO AL CONTROL		
	Filo	Género	Frecuencia	Filo	Género	Frecuencia	Filo	Género	Frecuencia
1	Ascomycota	<i>Penicillium</i>	22	Ascomycota	<i>Penicillium</i>	20	Basidiomycota	<i>Trichosporon</i>	4
2	Basidiomycota	<i>Exobasidium</i>	16	Basidiomycota	<i>Exobasidium</i>	16	Mortierellomycota	<i>Mortierella</i>	3
3	Ascomycota	<i>Aspergillus</i>	11	Ascomycota	<i>Aspergillus</i>	11	Basidiomycota	<i>Apiotrichum</i>	2
4	Mortierellomycota	<i>Mortierella</i>	11	Ascomycota	<i>Cyphellophora</i>	8	Ascomycota	<i>Discosia</i>	2
5	Ascomycota	<i>Cyphellophora</i>	8	Mortierellomycota	<i>Mortierella</i>	8	Ascomycota	<i>Penicillium</i>	2
6	Ascomycota	<i>Acremonium</i>	6	Ascomycota	<i>Acremonium</i>	5	Basidiomycota	<i>Trechispora</i>	2
7	Ascomycota	<i>Fusarium</i>	5	Ascomycota	<i>Nigrospora</i>	5	Ascomycota	<i>Trichoderma</i>	2
8	Ascomycota	<i>Nigrospora</i>	5	Ascomycota	<i>Fusarium</i>	4	Ascomycota	<i>Acremonium</i>	1
9	Ascomycota	<i>Chaetomium</i>	4	Ascomycota	<i>Knufia</i>	4	Ascomycota	<i>Arthrotrys</i>	1
10	Ascomycota	<i>Knufia</i>	4	Ascomycota	<i>Podospora</i>	4	Ascomycota	<i>Auxarthron</i>	1
11	Ascomycota	<i>Podospora</i>	4	Ascomycota	<i>Brevistachys</i>	3	Basidiomycota	<i>Bulleromyces</i>	1
12	Basidiomycota	<i>Psathyrella</i>	4	Ascomycota	<i>Chaetomium</i>	3	Ascomycota	<i>Candida</i>	1
13	Basidiomycota	<i>Tomentella</i>	4	Basidiomycota	<i>Cortinarius</i>	3	Ascomycota	<i>Cenococcum</i>	1
14	Ascomycota	<i>Trichoderma</i>	4	Ascomycota	<i>Humicola</i>	3	Ascomycota	<i>Chaetomium</i>	1
15	Basidiomycota	<i>Trichosporon</i>	4	Ascomycota	<i>Oidiodendron</i>	3	Ascomycota	<i>Conlarium</i>	1
16	Ascomycota	<i>Brevistachys</i>	3	Basidiomycota	<i>Psathyrella</i>	3	Basidiomycota	<i>Cristinia</i>	1
17	Basidiomycota	<i>Cortinarius</i>	3	Ascomycota	<i>Sarocladium</i>	3	Ascomycota	<i>Cylindrocladium</i>	1
18	Basidiomycota	<i>Entoloma</i>	3	Ascomycota	<i>Staphylotrichum</i>	3	Ascomycota	<i>Diluvicola</i>	1
19	Ascomycota	<i>Humicola</i>	3	Ascomycota	<i>Talaromyces</i>	3	Ascomycota	<i>Distoseptispora</i>	1
20	Ascomycota	<i>Oidiodendron</i>	3	Ascomycota	<i>Tetracladium</i>	3	Basidiomycota	<i>Entoloma</i>	1

Tabla XXII. Top 20 de géneros fúngicos por tratamiento en base a la frecuencia de la abundancia diferencial.

La aplicación de la EOL causó cambios significativos en la abundancia de las poblaciones de bacterias y hongos en el suelo, en especial la disminución de la mayoría de los grupos, pero favoreció el incremento de ciertos grupos de interés. Esto se evidenció en los diversos análisis realizados, pero de manera particular observable en los gráficos de abundancia relativa, mapas de calor, PCoA y el análisis de abundancia diferencial.

Los grupos de bacterias en suelo que se incrementaron significativamente pertenecieron a los filum, Actinobacteriota, Nitrospirota y Proteobacteria. De manera interesante en nuestro estudio también se encontró que grupos del mismo taxón de bacterias, muy probable otras especies, disminuyeron por acción de la aplicación de la EOL.

El cambio en la comunidad fúngica fue más evidente con el grupo de ascomicetos que predominaron en el tratamiento control, mientras que el tratamiento experimental reduce su incidencia y promovió mayormente a grupos del tipo basidiomiceto. Entre los hallazgos más relevantes se encontró que la aplicación de la EOL tuvo un efecto diferencial en la abundancia de especies del género *Fusarium*, un género de importancia agrícola debido a *Fusarium oxysporum f.sp. cubense* raza 4 tropical, agente causal de la enfermedad del marchitamiento de banano, siendo esta la mayor amenaza actual del sector (147) y estudios previos han demostrado que la aplicación continua de un biofertilizante en banano reduce la incidencia de esta enfermedad (148). El uso de la enmienda en este estudio evidenció que puede reducir poblaciones al parecer patógenas y de forma paralela, incrementar diferencialmente respecto al control hongos benéficos, de los géneros *Triscosporon*, *Trichoderma* y *Arthrobotrys*.

A pesar de que no estuvo contemplado dentro de nuestros objetivos demostrar que el accionar de microorganismos presentes en la EOL puedan mejorar la absorción de nutrientes, hay evidencia robusta que muestra que esto es posible (149). Es más, basado en nuestros resultados que muestran la modulación de poblaciones de microorganismos producto de la aplicación de EOL, su uso en campo puede tener mayor efecto si se la establece como práctica de mejora y no de reemplazo, tanto en plantaciones convencionales como orgánicas debido a su efecto bioestimulante en el ciclo del Nitrógeno y en el efecto biocontrolador de las poblaciones reportadas en este primer ciclo de producción.

3.5 Efecto de la EOL en parámetros agronómicos y productivos de banano

La aplicación de la EOL en la base de las plantas no causó cambios significativos en la tasa de crecimiento de altura y diámetro del pseudotallo, ni tampoco en el número de hojas alcanzados en la última semana de medición del mes 3, 6 y 9 (Figura 29). De igual manera, tampoco se evidenciaron cambios en los mismos parámetros evaluados en las plantas hijo o retorno (

Figura 30).

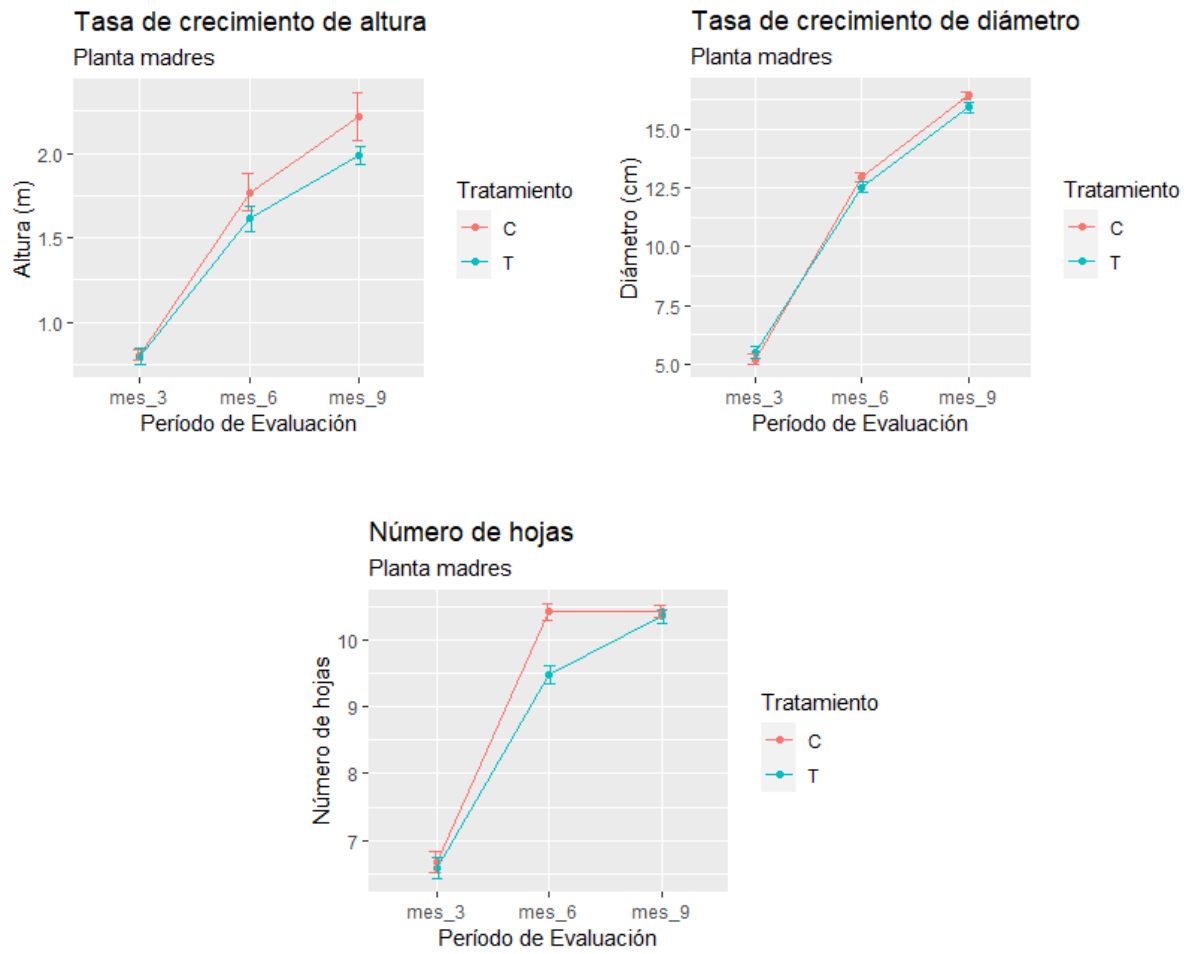


Figura 29. Tasa de crecimiento de altura y diámetro, y número de hojas en plantas madre alcanzado en la última semana en cada período de evaluación.

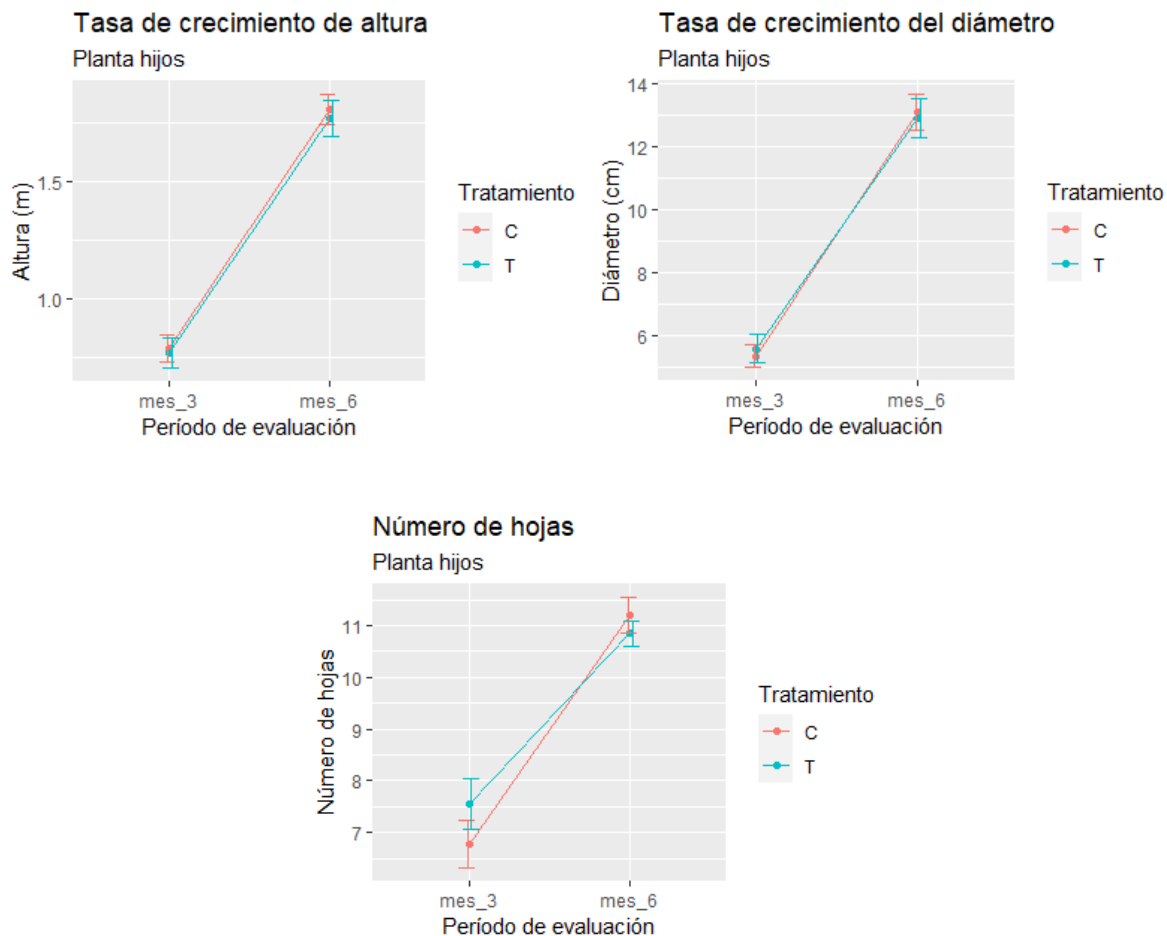


Figura 30. Tasa de crecimiento de altura y diámetro, y número de hojas en plantas hijo por período de evaluación.

Los resultados de los modelos lineales mostraron que los cambios observados en estas variables de estudio no se debieron a los tratamientos sino a los períodos de evaluación, es decir, en concordancia con el máximo desarrollo alcanzado por la planta de banano alcanzado al término de su fase vegetativa, vegetativa reproductiva y la fase vegetativa reproductiva-productiva en las plantas madres y en la etapa vegetativa y vegetativa – reproductiva de los hijos (Tabla XXIII). Estos resultados fueron concordantes no solo cuando se consideró los tres períodos de evaluación (mes 3, 6 y 9), sino cuando se analizaron estos datos únicamente en el momento de la cosecha de las plantas madre, donde también se aprovechó para evaluar los parámetros en la planta hijo correspondiente (Tabla XXIV).

En este análisis de manera general se evidenciaron que las planta madres e hijos presentaron medidas más bajas respecto el control, aunque estos cambios no fueron significativos. Aunque los resultados obtenidos no mostraron el efecto esperado, podemos indicar que al menos los valores reportados son similares en otros cultivos de banano en zonas tropicales (150,151).

Planta	Variable	Efecto Aleatorio	Efecto del tratamiento experimental por período de evaluación			Valor - p			Modelo
		Estimación	Mes 3	Mes 6	Mes 9	Tratamiento	PE	T x PE	
Madre	Altura (m)	0.08	-0.1	-0.15	-0.23	0.13	0.0*	0.08	lme de la última medición al mes 3, 6 y 9, al considerar el crecimiento de altura y diámetro, mientras que el número de hojas es el valor tomado en campo.
	Diámetro (cm)	0.35	0.28	-0.41	-0.52	0.72	0.0*	0.32	
	Número de hojas	0.24	-0.10	-0.94	-0.09	0.07	0.0*	0.16	
Hijo	Altura (m)	8.43	-0.02	-0.04	-	0.75	0.0*	0.94	lme de la última medición al mes 3 y 6, al considerar el crecimiento de altura y diámetro, mientras que el número de hojas es el valor tomado en campo.
	Diámetro (cm)	0.81	0.23	-0.13	-	0.91	0.0*	0.70	
	Número de hojas	0.49	0.79	-0.34	-	0.50	0.0*	0.11	

Tabla XXIII. Resumen de los modelos lineales con efectos aleatorios mixtos (lme) con interacción de tratamiento con el período de evaluación en planta madres como hijos. El efecto aleatorio es la variación positiva o negativa entre bloques por tratamiento (4 bloques para tratamiento experimental y 4 bloques para tratamiento control) dada en las unidades de las variables. El efecto del tratamiento experimental respecto el control que puede ser mayor (signo positivo) o menor (signo negativo) dado en las unidades de las variables. Las siguientes abreviaturas representa T=tratamiento y PE= período de evaluación

Planta	Variable	Efecto Aleatorio	Efecto fijo		Valor - p	Modelo
		Estimación	Beta 0	Beta 1	Tratamiento	
Madre	Altura (m)	0.12	2.45	-0.23	0.12	lme con la última antes de la cosecha al considerar el crecimiento de altura y diámetro, mientras que el número de hojas es el valor tomado en campo.
	Diámetro (cm)	1.38	18.03	-0.34	0.49	
	Número de hojas	0.30	10.38	-0.13	0.57	
Hijo	Altura (m)	3.16	1.80	-0.04	0.79	lme con la última antes de la cosecha de la madre al considerar el crecimiento de altura y diámetro, mientras que el número de hojas es el valor tomado en campo.
	Diámetro (cm)	0.86	13.08	-0.13	0.90	
	Número de hojas	0.32	11.20	-0.34	0.29	

Tabla XXIV. Resumen de los modelos lineales con efectos aleatorios mixtos (lme) antes de la cosecha en plantas madre y correspondiente evaluación de las plantas hijos. El efecto aleatorio es la variación positiva o negativa entre bloques por tratamiento (4 bloques para tratamiento experimental y 4 bloques para tratamiento control) dada en las unidades de las variables. El efecto fijo del beta 0 que es en promedio con las unidades de las variables del tratamiento control y beta 1, el efecto del tratamiento experimental respecto el control que puede ser mayor (signo positivo) o menor (signo negativo) dado en las unidades de las variables.

La aplicación de la EOL tampoco generó cambios significativos ($p < 0.05$) en los parámetros productivos considerados, sin embargo, las plantas con la aplicación de la EOL presentaron medidas superiores respecto al control (Tabla XXV), y este efecto puede estar favorecido por el comportamiento del nitrógeno y la relación C/N que fue superior en suelo con EOL versus el control, sin embargo, esto debe evaluarse en las mismas plantas con mayores ciclos de producción. De igual manera, no se reportaron diferencias en las semanas de floración y cosecha por efecto del biol.

Variables	Efecto Aleatorio	Efecto Fijo		Valor - p
	Estimación	Beta 0	Beta 1	Tratamiento
Semanas entre floración y cosecha	1.23	11.93	0.24	0.62
Manos por racimo	0.20	7.82	0.09	0.58
Dedos por manos	6.32	125.86	3.61	0.44
Promedio de dedos por manos	0.54	15.95	0.31	0.21
Longitud de dedos (cm)	2.64	23.41	0.34	0.30
Peso (bruto) de racimo (kg)	1.47	23.17	1.04	0.35
Peso (neto) de racimo (kg)	1.31	20.71	1.03	0.35
Ratio Bruto	0.08	1.21	0.04	0.37
Ratio Neto	0.06	1.08	0.05	0.40

Tabla XXV. Resumen de los modelos lineales con efectos aleatorios mixtos (lme) de las variables de cosecha en plantas madre. El efecto aleatorio es la variación positiva o negativa entre bloques por tratamiento (4 bloques para tratamiento experimental y 4 bloques para tratamiento control) dada en las unidades de las variables. El efecto fijo del beta 0 que es en promedio con las unidades de las variables del tratamiento control y beta 1, el efecto del tratamiento experimental respecto el control que puede ser mayor (signo positivo) o menor (signo negativo) dado en las unidades de las variables.

El análisis de variables agronómicas y productivas en nuestro estudio sugieren que la EOL usada no funciona como biofertilizante sino como un bioestimulante ya que no se observaron diferencias significativas en parámetros como la tasa de crecimiento de altura y diámetro, número de manos, peso de racimo, entre otros, muchas de las cuales son indicadores importantes en la toma de decisiones para la adopción de tecnologías en el manejo de banano en campo. Por otro lado, los requerimientos nutricionales ejercidos por la planta de banano (152), cuestionan el uso de este tipo de EOL como reemplazo a la aplicación de fertilizantes sintéticos en fincas convencionales, pues, aunque son amigables con el ambiente su efecto por lo general es a largo plazo (58,124,127).

Este estudio demostró que el uso de herramientas metataxonómicas para medir los cambios microbiológicos en suelo por efecto de la aplicación del biol pueden representar aliados para medir el verdadero impacto en este tipo de prácticas. A nuestro conocimiento este estudio representa el primer esfuerzo de este tipo en brindar mayor claridad sobre los cambios microbiológicos en suelo producto de la aplicación de una enmienda orgánica líquida en el cultivo de banano. Este trabajo abre la puerta a futuros estudios relacionados al tema, en particular al estudio continuo de EOL y su uso en banano ya que constituye una práctica muy común en fincas de pequeños agricultores.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

De manera general podemos concluir que la aplicación de la enmienda orgánica líquida (EOL) en un sistema convencional no tuvo un efecto biofertilizante en un ciclo de producción usando como modelo el cultivo de banano var. Williams ni a una dosis pura ni a constantes frecuencias de aplicación, más bien su actividad biológica estuvo enfocada en el efecto bioestimulante de comunidades bacterianas y fúngicas presentes en el suelo. Tampoco se observaron cambios mayores en parámetros fisicoquímicos en suelo ni en el tejido vegetal, y no se evidenció ningún cambio significativo en los parámetros agronómicos y de producción.

A pesar de que se comprobó cambios en los elementos Nitrógeno y Boro en suelo, y este último a nivel foliar también, su efecto sobre el control no fue considerablemente notorio en este primer ciclo de producción. Además, la aplicación de la EOL sin dilución no causó efectos de quema ni toxicidad en las plantas evaluadas aún con tiempos cortos entre aplicación.

Los cambios observados en la estructura microbiana del suelo, para este experimento, muy probable fue ocasionado por el efecto modulador de la EOL sobre las comunidades presentes y no por la adición propia de microorganismos presentes en la enmienda orgánica, esto se evidencia por los grupos dominantes tanto en la EOL y suelo, mientras los filos y géneros bacterianos dominantes en el biol, fueron en el siguiente orden Proteobacteria (*Acetobacter*), Firmicutes (*Lactobacillus*) y Bacteroidota (*Prevotella*) y en el suelo luego de la aplicación los grupos dominantes fueron Actinobacteriota (*Acidothermus*), Nitrospirota (*Nitrospira*), y los grupos fúngicos en el suelo dominantes fue el filo Basidiomycota (*Trichosporum*) y Ascomycota (*Trichoderma*).

Tanto los grupos dominantes bacterianos y fúngicos en el suelo estuvieron ligados a una acción sobre el ciclo del nitrógeno y efecto antagonista sobre fitopatógenos como hongos del género *Fusarium* y nemátodos debido a la liberación de moléculas como antibióticos, compuestos antifúngicos y/o mecanismos físicos de atrapamiento, la comunidad fúngica estuvo mayormente marcada por el efecto de la enmienda orgánica líquida.

Referente a los parámetros agronómicos las plantas bajo el efecto del biol tuvieron una menor tasa de crecimiento de altura y diámetro y número de hojas, y en todos los parámetros de producción evaluados entre estos, el peso de racimo, ratios, entre otros, tuvieron medidas superiores al control, aunque ninguno de estos cambios fue significativo en ambos parámetros, inferimos que cambios a este nivel deben ser a partir del término del segundo o inclusive el tercer ciclo de producción.

El uso de EOL es una práctica ancestral y muy poco se conoce sobre su verdadero efecto en los cultivos donde se aplica. Su uso ha sido cuestionado por la falta de evidencia sobre todo en cultivos de ciclo perenne donde los cambios visibles en la planta pueden tardar meses o años. En este estudio se demostró que el uso de herramientas metataxonómicas para medir los cambios microbiológicos en suelo a corto plazo pueden representar aliados para medir el verdadero impacto en este tipo de prácticas. Es más, se pueden usar incluso para procesos de reingeniería del suelo en favor de mejores cultivos y disminuir el impacto ambiental por uso de agroquímicos.

Recomendaciones

Poco se conoce sobre la estabilidad de las poblaciones microbiológicas durante el proceso de fermentación de este tipo de EOL. Se recomienda el uso de metataxonómica para comprender de mejor manera la dinámica de cambio que existen en estos procesos y mejorar la formulación de estas enmiendas. Mucho más aún cuando la adición constante de nuevas cepas de microorganismos es una práctica común en campo.

Se recomienda realizar ensayos de este tipo multisitio para validar el efecto obtenido en este estudio sobre las poblaciones microbianas del suelo. De manera particular, en sitios con suelos pobres en materia orgánica para comparar el efecto de este tipo de enmiendas en la composición y estructura de grupos bacterianos y fúngicos.

Cambios en la estructura microbiana de la comunidad del suelo luego de la aplicación de la EOL fueron evidentes, por lo que, el uso de la enmienda debe estar direccionado a la estimulación de la actividad microbiana en las matrices donde se aplique, sean estas suelo o tejido foliar dentro de sistemas de cultivos convencionales u orgánicos pero enfocado a la evaluación a largo plazo.

Se debe considerar una mayor profundidad de secuenciación para la comunidad bacteriana en matrices complejas como suelo o enmiendas orgánicas líquidas.

Para manejar eficientemente este tipo de enmiendas con efecto bioestimulante o biofertilizante en los cultivos, entre estos el banano, es necesario obtener información de los suelos en la zona de estudio como la dinámica de los nutrientes, lo que permite planificar el uso de enmiendas orgánicas de acuerdo con las necesidades del cultivo.

Redireccionar el estudio de este tipo de enmiendas al efecto estimulante sobre cultivos de importancia agrícola. Para el caso de banano, el estudio y posterior uso de EOL puede ser interesante para el manejo de estrés fisiológico post trasplante o incluso para estrés ligados a cambios de estaciones climáticas donde plantas pueden sufrir retraso en su crecimiento y “arrepollamiento”.

BIBLIOGRAFÍA

1. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO. La Economía Mundial Del Banano 1985-2002 [Internet]. Arias P, Dankers C, Liu P, Pilkauskas P, editors. Roma: Food & Agriculture Org., 2004; 2004. 108 p. Available from: <https://www.fao.org/3/y5102s/y5102s00.htm#Contents>
2. Ministerio de Comercio Exterior e Inclusión del Ecuador, MCEI. Informe sobre el sector bananero ecuatoriano [Internet]. Quito; 2017. Available from: <https://www.comercioexterior.gob.ec/wp-content/uploads/2017/12/Informe-sector-bananero-español-04dic17.pdf>
3. Matamoros D, Vanrolleghem P a. Pesticide assessment of the banana sector in an Ecuadorian watershed. Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet [Internet]. 2001;66(2b):863–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12425113>
4. Jimenez M, Van der veken L, Neiryneck H, Rodríguez H, Ruiz O, Swennen R. Organic banana production in Ecuador: Its implications on black Sigatoka development and plant-soil nutritional status. Renew Agric Food Syst. 2007;22(4):297–306.
5. Savci S. An Agricultural Pollutant: Chemical Fertilizer. Int J Environ Sci Dev [Internet]. 2012;3(1):73–80. Available from: <http://www.ijesd.org/show-35-736-1.html>
6. Cook RJ. From the Academy: Colloquium perspective. Toward cropping systems that enhance productivity and sustainability. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2006;103(49):18389–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17130454> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1693674>
7. Van der Putten WH, Bardgett RD, Bever JD, Bezemer TM, Casper BB, Fukami T, et al. Plant-soil feedbacks: The past, the present and future challenges. J Ecol. 2013;101(2):265–76.
8. Elbehri, A., G. Calberto, C. Staver, A. Hospido, L. Roibas, D. Skully, P. Siles, J. Arguello, I. Sotomayor y AB. Cambio climático y sostenibilidad del banano en el Ecuador: Evaluación de impacto y directrices de política. Roma, Italia; 2015.
9. Rosales F, Tripon S, Cerna J. Producción de banano orgánico y / o ambientalmente amigable. Memorias del taller internacional realizado en la EARTH, Guácimo, Costa Rica — 27-29 de Julio de 1998. CENTRO EDITORIAL, srl. Editors. Inibap. San Pedro Sula, Honduras,; 1998. 122 p.
10. Torres S. Guía práctica para el manejo de banano orgánico en el valle del Chira. Piura-Perú; 2012. 1–72 p.
11. Glick B. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. Scientifica (Cairo) [Internet]. 2012;2012:1–15. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/scientifica/2012/963401/>
12. Bhattacharyya PN, Jha DK. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. World J Microbiol Biotechnol. 2012;28(4):1327–50.

13. Shen Z, Ruan Y, Wang B, Zhong S, Su L, Li R, et al. Effect of biofertilizer for suppressing Fusarium wilt disease of banana as well as enhancing microbial and chemical properties of soil under greenhouse trial. *Appl Soil Ecol* [Internet]. 2015;93:111–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.04.013>
14. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO. *Perspectivas a mediano plazo: perspectivas para la producción y el comercio mundial de bananos y frutas tropicales 2019-2028*. Roma, Italia; 2020.
15. López A, Espinosa J. *Manual de nutrición y fertilización del Banano* [Internet]. Internatio. Quito-Ecuador; 1995. Available from: <http://tecnologia.iniap.gob.ec/index.php/explore-2/mmusa/rbanano>
16. Picado J, Añasco A. *Preparación y uso de abonos orgánicos sólidos y líquidos*. CEDECO, editor. Vol. I, Serie Agricultura Organica N°7. San José, Costa Rica; 2005. 66 p.
17. Chaparro JM, Sheflin AM, Manter DK, Vivanco JM. Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. *Biol Fertil Soils*. 2012;48(5):489–99.
18. Mosquera B. *Abonos orgánicos protegen el suelo y garantizan alimentación sana. Manual para elaborar y aplicar abonos y plaguicidas orgánicos* [Internet]. Fondo para la protección del agua, FONAG. 2010. 25 p. Available from: www.fonag.org.ec
19. Shen Z, Wang B, Zhu J, Hu H, Tao C, Ou Y, et al. Lime and ammonium carbonate fumigation coupled with bio-organic fertilizer application steered banana rhizosphere to assemble a unique microbiome against Panama disease. *Microb Biotechnol*. 2019;12(3):515–27.
20. Suárez-Estrella F, Vargas-García C, López MJ, Capel C, Moreno J. Antagonistic activity of bacteria and fungi from horticultural compost against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Crop Prot*. 2007;26(1):46–53.
21. Bender SF, Wagg C, van der Heijden MGA. An Underground Revolution: Biodiversity and Soil Ecological Engineering for Agricultural Sustainability. *Trends Ecol Evol* [Internet]. 2016;31(6):440–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2016.02.016>
22. Bardgett RD, Van Der Putten WH. Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature* [Internet]. 2014;515(7528):505–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature13855>
23. Park K, Kremer RJ. Effects of a Biological Amendment on Chemical and Biological Properties and Microbial Diversity in Soils Receiving Different Organic Amendments. 2007;40(4):234–41.
24. Liu Z, Rong Q, Zhou W, Liang G. Effects of inorganic and organic amendment on soil chemical properties, enzyme activities, microbial community and soil quality in yellow clayey soil. *PLoS One*. 2017;12(3).
25. Chavez E. Determinación de la calidad de Biofertilizantes líquidos y estudio del potencial para la inhibición de *Mycosphaerella fijiensis* (Morelet) en condiciones

- controladas y como alternativa en el manejo de SIGATOKA NEGRA en sistemas de producción orgánica. Tesis presentada en la Escuela Superior Politécnica del Litoral previo al título de Ingeniero agropecuario; 2009.
26. Chavez T. Estudios moleculares en la interacción planta-patógeno-biofertilizante [Internet]. Tesis presentada en la Escuela Superior Politécnica del Litoral previo al título de Magister en Ciencias en Biotecnología Agrícola, Mención en Ingeniería Genética y Cultivo de Tejidos. Escuela Superior Politécnica del Litoral; 2018. Available from: <http://ieeauthorcenter.ieee.org/wp-content/uploads/IEEE-Reference-Guide.pdf><http://wwwlib.murdoch.edu.au/find/citation/ieee.html><https://doi.org/10.1016/j.cie.2019.07.022><https://github.com/ethereum/wiki/wiki/White-Paper><https://tore.tuhh.de/hand>
 27. Mora A. Efecto de aplicación de tres bio-insumos en la aclimatización de plántulas meristemáticas de banano (*Musa sp.*) Var. Williams en condiciones de invernadero. Tesis de pregrado para obtener título de Ingeniero Agrónomo. Universidad De Guayaquil; 2017.
 28. Bünemann EK, Schwenke GD, Van Zwieten L. Impact of agricultural inputs on soil organisms - a review . *Aust J Soil Res*. 2006;44(February 2016):379–406.
 29. Herrmann L, Lesueur D. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97(20):8859–73.
 30. Torsvik V, Øvreås L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol*. 2002;5:240–5.
 31. Caputo F, Nicoletti F, De Luca Picione F, Manici LM. Rhizospheric changes of fungal and bacterial communities in relation to soil health of multi-generation apple orchards. *Biol Control* [Internet]. 2015;88:8–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.04.019>
 32. Rames EK, Pattison AB, Czislawski E, Smith MK. Soil microbial community changes associated with ground cover management in cultivation of Ducasse banana (*Musa sp.* ABB, Pisang Awak subgroup) and suppression of *Fusarium oxysporum*. *Australas Plant Pathol*. 2018;47(4):449–62.
 33. Lima ACR, Brussaard L, Totola MR, Hoogmoed WB, de Goede RGM. A functional evaluation of three indicator sets for assessing soil quality. *Appl Soil Ecol* [Internet]. 2013;64:194–200. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.12.009>
 34. Paungfoo-Lonhienne C, Yeoh YK, Kasinadhuni, Rup PN, Thierry L, Robinson N, et al. Nitrogen fertilizer dose alters fungal communities in sugarcane soil and rhizosphere. *Sci Rep*. 2015;5:1–6.
 35. Shen J, Li C, Mi G, Li L, Yuan L, Jiang R, et al. Maximizing root/rhizosphere efficiency to improve crop productivity and nutrient use efficiency in intensive agriculture of China. *J Exp Bot*. 2013;64(5):1181–92.
 36. Martínez Acosta AM, Cayón Salinas G. Dinámica del Crecimiento y Desarrollo del Banano (*Musa AAA Simmonds cvs* . Gran Enano y Valery). *Rev Fac Nac Agron*.

- 2011;64(2):6055–64.
37. Moina M, Soto A. TÍTULO : TUTORA : Universidad Católica Santiago de Guayaquil; 2015.
 38. Vargas A, Watler W, Morales M, Vignola R. Ficha técnica cultivo de banano [Internet]. Vol. 2. Costa Rica; 2017. Available from: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/reduccion-impacto-por-eventos-climaticos/Informe-final-Banano.pdf>
 39. Wall MM. Ascorbic acid, vitamin A, and mineral composition of banana (*Musa* sp.) and papaya (*Carica papaya*) cultivars grown in Hawaii. *J Food Compos Anal.* 2006;19(5):434–45.
 40. Daniells J, Jenny C, Karamura D, Tomekpe K. Musalogue: a catalogue of *Musa* germplasm. Diversity in the genus *Musa* (E. Arnaud and S. Sharrock, compil.). International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France. Montpellier, France: International Network for the Improvement of Banana and Plantain; 2001. 207 p.
 41. Brown A, Tumuhimbise R, Amah D, Uwimana B, Nyine M, Mduma H, et al. Bananas and Plantains (*Musa* spp.). In: Campos H, Caligari PDS, editors. Genetic Improvement of Tropical Crops. Springer: 2017. p. 219–240.
 42. Nadal-Medina R, Manzo-Sánchez G, Orozco-Romero J, Orozco-Santos M, Guzmán-González S. Diversidad genética de bananos y plátanos (*Musa* spp.) determinada mediante marcadores RAPD. *Rev Fitotec Mex.* 2009;32(1):1–7.
 43. Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD. Consensus Document on the Biology of Bananas and Plantains (*Musa* spp.) Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology. Report 2009.No: 48.p.1-61.
 44. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO. Banana Market Review February 2020 snapshot [Internet]. Banana Market Review. Roma; 2020. Available from: <http://www.fao.org/3/cb0168en/cb0168en.pdf%0Ahttp://www.fao.org/economic/est/est-commodities/bananas/en/>
 45. Remy S, Buyens A, Cammue BPA, Swennen R, Sagi L. Production of transgenic banana plants expressing antifungal proteins. *Acta Hortic.* 1998;490.
 46. Remy S, François I, Cammue BPA, Swennen R, Sági L. Co-transformation as a potential tool to create multiple and durable disease resistance in banana (*Musa* spp.). *Acta Hortic.* 1998;461.
 47. Javed MA, Chai MAK, Othman RY. Morphological Characterization of Malaysian Wild Banana *Musa Acuminata*. *Biotropia (Bogor).* 2002;0(18):21–37.
 48. Ploetz RC. Panama Disease: An Old Nemesis Rears its Ugly Head Part 2: The Cavendish Era and Beyond. *APSnet Featur Artic.* 2005;(October).
 49. Altendorf S. BANANAS AND MAJOR TROPICAL FRUITS. *OECD-FAO Agric Outlook 2019-2028.* 2019;(May):73–6.

50. Ploetz RC, Kema GHJ, Ma LJ. Impact of Diseases on Export and Smallholder Production of Banana. *Annu Rev Phytopathol.* 2015;53(May):269–88.
51. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO. Biannual Report of Global Food Markets [Internet]. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Roma, Italia; 2019. Available from: <https://www.fao.org/3/ca6911en/ca6911en.pdf>
52. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO. Banana Market Review 2020. Roma, Italia; 2021.
53. D’hont A, Denoeud F, Aury JM, Baurens FC, Carreel F, Garsmeur O, et al. The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature.* 2012;488(7410):213–7.
54. Sánchez AM, Vayas T, Mayorga F, Freire C. Sector Bananero Ecuatoriano. *Obs Económico y Soc Tungurahua.* 2020;1–4.
55. Durango W, Carrillo M, Peña K. Guía 11: Mitigación de cadmio en el suelo mediante enmiendas orgánicas. Caja de herramientas para la prevención y mitigación de la contaminación de cadmio en la cadena de cacao-Ecuador. Quito, Ecuador; 2021. 1–30 p. [Internet]. Available from: https://balcon.mag.gob.ec/mag01/magapaldia/Caja de Herramientas_Cadmio
56. Wang Y, Gong J, Li J, Xin Y, Hao Z, Chen C, et al. Insights into bacterial diversity in compost: Core microbiome and prevalence of potential pathogenic bacteria. *Sci Total Environ.* 2020;718(2).
57. Ling N, Zhu C, Xue C, Chen H, Duan Y, Peng C, et al. Insight into how organic amendments can shape the soil microbiome in long-term field experiments as revealed by network analysis. *Soil Biol Biochem* [Internet]. 2016;99:137–49. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.05.005>
58. Mahanty T, Bhattacharjee S, Goswami M, Bhattacharyya P, Das B, Ghosh A, et al. Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. *Environ Sci Pollut Res* [Internet]. 2017;24(4):3315–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-8104-0>
59. Papadopoulos A, Bird NRA, Whitmore AP, Mooney SJ. Does organic management lead to enhanced soil physical quality? *Geoderma* [Internet]. 2014;213:435–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2013.08.033>
60. Wang B, Yuan J, Zhang J, Shen Z, Zhang M, Li R, et al. Effects of novel bioorganic fertilizer produced by *Bacillus amyloliquefaciens* W19 on antagonism of *Fusarium* wilt of banana. *Biol Fertil Soils.* 2013;49(4):435–46.
61. Fu L, Penton CR, Ruan Y, Shen Z, Xue C, Li R, et al. Inducing the rhizosphere microbiome by biofertilizer application to suppress banana *Fusarium* wilt disease. *Soil Biol Biochem* [Internet]. 2017;104:39–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.10.008>
62. Youssef M, Eissa M. Biofertilizers and their role in management of plant parasitic

- nematodes. A review. *E3 J Biotechnol Pharm Res* [Internet]. 2014;5(1):1–6. Available from: <http://www.e3journals.org>
63. Wang F, Men X, Zhang G, Liang K, Xin Y, Wang J, et al. Assessment of 16S rRNA gene primers for studying bacterial community structure and function of aging flue-cured tobaccos. *AMB Express* [Internet]. 2018;8(182):1–9. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0713-1>
 64. Chistoserdova L. Recent progress and new challenges in metagenomics for biotechnology. *Biotechnol Lett*. 2010;32:1351–9.
 65. Risely A. Applying the core microbiome to understand host–microbe systems. *J Anim Ecol*. 2020;89(7):1549–58.
 66. Berg G, Rybakova D, Fischer D, Cernava T, Vergès MCC, Charles T, et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*. 2020;8(103):1–22.
 67. Suárez A. Microbioma y secuenciación masiva. *Rev Española Quimioter* [Internet]. 2017;1–7. Available from: www.seq.es
 68. Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol*. 2013;31(9):814–21.
 69. Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, Okuno Y, Hattori M. The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Res*. 2004;32:277–80.
 70. Hird SM. Evolutionary biology needs wild microbiomes. *Front Microbiol*. 2017;8(725):1–10.
 71. Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome* [Internet]. 2015;3(31):1–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5>
 72. Krishnan K, Chen T, Paster B. A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Physiol Behav*. 2017;23(3):276–86.
 73. Callahan BJ, McMurdie PJ, Holmes SP. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J* [Internet]. 2017;11(12):2639–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2017.119>
 74. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(D1):590–6.
 75. Abarenkov K, Zirk A, Piirmann, Timo; Pöhönen R, Ivanov F, Nilsson, R. Henrik; Kõljalg U. UNITE general FASTA release for Fungi. UNITE Community. 2020;
 76. McMurdie PJ, Holmes S. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One*. 2013;8(4).
 77. Mbareche H, Dumont-Leblond N, Bilodeau GJ, Duchaine C. An overview of bioinformatics tools for dna meta-barcoding analysis of microbial communities of

- bioaerosols: Digest for microbiologists. *Life*. 2020;10(9):1–20.
78. Sims D, Sudbery I, Ilott NE, Heger A, Ponting CP. Sequencing depth and coverage: Key considerations in genomic analyses. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2014;15(2):121–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3642>
 79. Carmona-Galindo VD, Carmona T V. La Diversidad De Los Análisis De Diversidad. *Bioma*. 2013;14(December):22–8.
 80. Tuomisto H. A diversity of beta diversities: Straightening up a concept gone awry. Part 1. Defining beta diversity as a function of alpha and gamma diversity. *Ecography (Cop)*. 2010;33(1):2–22.
 81. Anderson MJ. Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA) . Wiley StatsRef Stat Ref Online. 2017;1–15.
 82. Adriano ML, Gutiérrez F, Dendooven L, Salvador-Figueroa M. Influence of compost and liquid bioferment on the chemical and biological characteristics of soil cultivated with banana (*Musa spp. L.*). *J Soil Sci Plant Nutr*. 2012;12(1):33–43.
 83. HAIFA. Recomendaciones nutricionales para Banano. Recomendaciones nutricionales para Banano. 2021.
 84. Chávez E, Peralta E. Recuperación de cacao fino y de aroma mediante la elaboración y aplicación de fermentados anaeróbicos en el Litoral ecuatoriano. In: Campaña A, Hidalgo F, Sigcha A, editors. *Cacao y campesinos: Experiencias de producción e investigación*. Quito, Ecuador: SIPAE; 2016.
 85. Orellana T, Manzano P, Chávez E, Ruiz O, León R, Orellana A, et al. Estándares de Fermentación y Maduración Artesanal de Bioles. *Yachana*. 2013;2(Julio):1–7.
 86. León R. Evaluación de la calidad y potencial agronómico de un biofertilizante fermentado anaeróbicamente para incrementar la producción de fréjol (*Phaseolus vulgaris L.*) bajo condiciones de invernadero. Tesis presentada en la Escuela Superior Politécnica del Litoral previo al título de Magister en Ciencias en Biotecnología Agrícola; 2018.
 87. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, INIAP. *Nutrición Análisis Foliar. Guía INIAP Banano*. 2014.
 88. Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. Banco Nacional de ADN Carlos III (Universidad de Salamanca). 2020. p. 1–10. Available from: www.bancoadn.org
 89. Halwachs B, Madhusudhan N, Krause R, Nilsson RH, Moissl-Eichinger C, Högenauer C, et al. Critical issues in mycobiota analysis. *Front Microbiol*. 2017;8(FEB):1–12.
 90. Kuczynski J, Lauber CL, Walters WA, Parfrey LW, Clemente JC, Gevers D, et al. Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2012;13(1):47–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3129>
 91. Hernández M, Quijada NM, Rodríguez-Lázaro D, Eiros JM. Bioinformatics of next generation sequencing in clinical microbiology diagnosis. *Rev Argent Microbiol* [Internet]. 2020;52(2):150–61. Available from:

<https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.06.003>

92. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*. 2011;17:10–2.
93. Hanshew AS, Mason CJ, Raffa KF, Currie CR. Minimization of chloroplast contamination in 16S rRNA gene pyrosequencing of insect herbivore bacterial communities Alissa. *Journal Microbiol Methods*. 2013;95(2):149–55.
94. Reigel AM, Owens SM, Hellberg ME. Reducing host DNA contamination in 16S rRNA gene surveys of anthozoan microbiomes using PNA clamps. *Coral Reefs [Internet]*. 2020;39(6):1817–27. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00338-020-02006-5>
95. Jimenez MI. Effect of the nutritional status of banana (*Musa spp.*) on leaf disease infestation by *Mycosphaerella fijiensis* morelet in Ecuador. *Nuevos sistemas de comunicación e información*. Catholic University of Leuven; 2008.
96. Kafkafi U, Tarchitzky J. Fertirrigación: Una herramienta para una eficiente fertilización y manejo del agua. *Asociación Internacional de la Industria de Fertilizantes (IFA) Instituto Internacional de la Potasa(IIIP)*. 2012. 150 p.
97. Quinde L. Determinación del grado de contaminación por presencia de metales pesados en suelos, raíces, hojas y frutas en plantas de banano debido al uso de agroquímicos en una finca ubicada en la Provincia de Los Ríos [Internet]. *Escuela Superior Politécnica del Litoral*; 2018. Available from: <https://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/45972>
98. Deng L, Zeng G, Fan C, Lu L, Chen X, Chen M, et al. Response of rhizosphere microbial community structure and diversity to heavy metal co-pollution in arable soil. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015;99(19):8259–69.
99. Soto G. Abonos orgánicos: Producción y uso de compost. In: Meléndez G, Molina E, editors. *Fertilidad de Suelos y Manejo de la Nutrición de Cultivos en Costa Rica*. Costa Rica: Universidad de Costa Rica, Centro de Investigaciones Agronómicas, Laboratorio de suelos y foliares; 2001. p. 45–63.
100. Bazurto JT, Sanchez JD, Salinas GC. Nutrient accumulation models in the banana (*Musa AAA Simmonds cv Williams*) plant under nitrogen doses. *Acta Agron*. 2017;66(3):391–6.
101. Van Delden A. Yield and growth components of potato and wheat under organic nitrogen management. *Agron J*. 2001;93(6):1370–85.
102. Rosales F, Pocasangre L, Trejos J, Serrano E, Peña W. *Guía de diagnóstico de la calidad y salud de suelos bananeros*. Rosales F, editor. *Bioersity International*; 2010.
103. Pérez WA, Torres-Bazurto J. Carbon-nitrogen ratio in soils with fertilizer applications and nutrient absorption in banana (*Musa spp.*) cv. Williams. *Agron Colomb*. 2020;38(2):253–60.
104. Larreal M, Chirinos I, Jiménez L, Polo V, Peters W, Noguera N. Variabilidad de algunas de las propiedades físicas de un suelo para la definición de la serie “Los Cortijos”, sector semiárido de la altiplanicie de Maracaibo, Venezuela. *Rev UDO Agrícola*.

- 2009;9(4):925–36.
105. Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario, AGROCALIDAD. Manual de aplicabilidad de buenas prácticas agrícolas para banano. 2018;1–172.
 106. Pereira GL, Siqueira JA, Batista-Silva W, Cardoso FB, Nunes-Nesi A, Araújo WL. Boron: More Than an Essential Element for Land Plants? *Front Plant Sci.* 2021;11(January).
 107. Ministerio del Ambiente del Ecuador (MAE). Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente, Anexo2 del Libro VI. In: Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente, TULSMA. Ecuador; 2015. p. 1–22.
 108. Flores C. Manejo de suelos y fertilización del cultivo de banano. In: Meléndez G, Molina E, editors. Fertilidad de suelos y manejo de la nutrición de los cultivos en Costa Rica. Costa Rica: Universidad de Costa Rica, Centro de Investigaciones Agronómicas, Laboratorio de suelos y foliares; 2001. p. 132–9.
 109. Brown PH, Bellaloui N, Wimmer MA, Bassil ES, Ruiz J, Hu H, et al. Boron in plant biology. *Plant Biol.* 2002;4(2):205–23.
 110. Shireen F, Nawaz MA, Chen C, Zhang Q, Zheng Z, Sohail H, et al. Boron: Functions and approaches to enhance its availability in plants for sustainable agriculture. *Int J Mol Sci.* 2018;19(7):95–8.
 111. USDA-NRCS. Carbon to Nitrogen Ratios in Cropping Systems. USDA Nat Resour Conserv Serv [Internet]. 2011;2. Available from: <http://www.nrcs.usda.gov>
 112. Sergaki C, Lagunas B, Lidbury I, Gifford ML, Schäfer P. Challenges and approaches in microbiome research: from fundamental to applied. *Front Plant Sci.* 2018;9(August):1–12.
 113. Reis VM, Teixeira KR dos S. Nitrogen fixing bacteria in the family Acetobacteraceae and their role in agriculture. *J Basic Microbiol.* 2015;55(8):931–49.
 114. Amin M, Jorfi M, Khosravi A, Samarbafzadeh A., Farajzadeh A. Plantarum Antimicrobial.Pdf. *J Biol Sci.* 2009;9(8):810–4.
 115. Samedi L, Charles AL. Isolation and characterization of potential probiotic Lactobacilli from leaves of food plants for possible additives in pellet feeding. *Ann Agric Sci* [Internet]. 2019;64(1):55–62. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2019.05.004>
 116. Wirth R, Kádár G, Kakuk B, Maróti G, Bagi Z, Szilágyi Á, et al. The planktonic core microbiome and core functions in the cattle rumen by next generation sequencing. *Front Microbiol.* 2018;9(SEP):1–19.
 117. Amat S, Lantz H, Munyaka PM, Willing BP. Prevotella in pigs: The positive and negative associations with production and health. *Microorganisms.* 2020;8(10):1–27.
 118. Rocha-Vargas M, Sanchez-Ponce J, Azero M. Estudio del mejoramiento de la calidad del suelo por el uso de diferentes enmiendas orgánicas en el cultivo de papa (*Solanum*

- tuberosum ssp. andigena var. *Acta Nov* [Internet]. 2012;5:417–44. Available from: <http://www.ucbcba.edu.bo/Publicaciones/revistas/actanova/documentos/V5N4/ANV5N4RochaMED11.pdf>
119. Dayananda P, Wilcox MH. A Review of Mixed Strain *Clostridium difficile* Colonization and Infection. *Front Microbiol.* 2019;10(April):692.
 120. Li M, Song G, Liu R, Huang X, Liu H. Inactivation and risk control of pathogenic microorganisms in municipal sludge treatment: A review. *Front Environ Sci Eng.* 2022;16(6):1–23.
 121. Green SJ, Inbar E, Michel FC, Hadar Y, Minz D. Succession of bacterial communities during early plant development: Transition from seed to root and effect of compost amendment. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(6):3975–83.
 122. Kim JN, Méndez–García C, Geier RR, Iakiviak M, Chang J, Cann I, et al. Metabolic networks for nitrogen utilization in *Prevotella ruminicola* 23. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–11.
 123. Li D, Zhou J, Zhang Y, Sun T, An S, Jia H. Effects of amendments on physicochemical properties and respiration rate of soil from the arid region of Northwest China. *Sustain.* 2021;13(10).
 124. Lin G-Y, Chen B-J, Hu C-Y, Lin W-Y. The Impacts of Field Management on Soil and Tea Root Microbiomes. *Appl Microbiol.* 2021;1(2):361–76.
 125. Daims H, Lücker S, Wagner M. A New Perspective on Microbes Formerly Known as Nitrite-Oxidizing Bacteria. *Trends Microbiol* [Internet]. 2016;24(9):699–712. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2016.05.004>
 126. Huang W, Sun D, Chen L, An Y. Integrative analysis of the microbiome and metabolome in understanding the causes of sugarcane bitterness. *Sci Rep* [Internet]. 2021;11(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85433-w>
 127. Villamil MB, Kim N, Riggins CW, Zabaloy MC, Allegrini M, Rodríguez-Zas SL. Microbial Signatures in Fertile Soils Under Long-Term N Management. *Front Soil Sci.* 2021;1(December):1–22.
 128. Wang B, Sun M, Yang J, Shen Z, Ou Y, Fu L, et al. Inducing banana Fusarium wilt disease suppression through soil microbiome reshaping by pineapple-banana rotation combined with biofertilizer application. *Soil.* 2021;8(1):17–29.
 129. Zhou D, Jing T, Chen Y, Wang F, Qi D, Feng R, et al. Deciphering microbial diversity associated with Fusarium wilt-diseased and disease-free banana rhizosphere soil. *BMC Microbiol.* 2019;19(1):1–13.
 130. Fudou R, Iizuka T, Yamanaka S. Haliangicin, a novel antifungal metabolite produced by a marine myxobacterium. 1. Fermentation and biological characteristics. *J Antibiot (Tokyo).* 2001;54(2):149–52.
 131. Sun Y, Tomura T, Sato J, Iizuka T, Fudou R, Ojika M. Isolation and biosynthetic analysis of haliamide, a new pks-nrps hybrid metabolite from the marine myxobacterium *haliangium ochraceum*. *Molecules.* 2016;21(1).

132. Jamali S, Ghararei M. The first isolation of *Trichosporon coremiiforme* from soil in Iran. *Curr Med Mycol*. 2015;1(3):3–10.
133. Bosqueiro AS, Bizarria Júnior R, Rosa-Magri MM. Potential of *Trichosporon asahii* against *Alternaria* sp. And mechanisms of action. *Summa Phytopathol*. 2020;46(1):20–5.
134. Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, Del-Val E, Larsen J. Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS Microbiol Ecol*. 2016;92(4):1–17.
135. Mishra J, Prakash J, Arora NK. Role of Beneficial Soil Microbes in Sustainable Agriculture and Environmental Management. *Clim Chang Environ Sustain*. 2016;4(2):137.
136. Yadav J, Prakash J. Plant growth promoting activities of fungi and their effect on chickpea plant growth. *Asian J Biol Sci*. 2011;4(3):291–9.
137. Guigón-López C, Guerrero-Prieto V, Vargas-Albores F, Carvajal-Millán E, Ávila-Quezada GD, Bravo-Luna L. Molecular identification of *Trichoderma* spp. Strains, in vitro growth rate and antagonism against plant pathogen fungi. *Rev Mex Fitopatol*. 2010;87–96.
138. Krauss U, ten Hoopen M, Rees R, Stirrup T, Argyle T, George A, et al. Mycoparasitism by *Clonostachys byssicola* and *Clonostachys rosea* on *Trichoderma* spp. from cocoa (*Theobroma cacao*) and implication for the design of mixed biocontrol agents. *Biol Control* [Internet]. 2013;67(3):317–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.09.011>
139. Ahmed NE, Sugimoto Y, Babiker AGT, Mohamed OE, Ma Y, Inanaga S, et al. Effects of *Fusarium solani* isolates and metabolites on *Striga* germination . *Weed Sci*. 2001;49(3):354–8.
140. Wei F, Zhang Y, Shi Y, Feng H, Zhao L, Feng Z, et al. Evaluation of the Biocontrol Potential of Endophytic Fungus *Fusarium solani* CEF559 against *Verticillium dahliae* in Cotton Plant. *Biomed Res Int*. 2019;2019.
141. Aliyu H, Gorte O, de Maayer P, Neumann A, Ochsenreither K. Genomic insights into the lifestyles, functional capacities and oleagenicity of members of the fungal family Trichosporonaceae. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10(1):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-59672-2>
142. Yurkov AM. Yeasts of the soil – obscure but precious. *Yeast*. 2018;35(5):369–78.
143. Cobb AB, Wilson GWT, Goad CL, Grusak MA. Influence of alternative soil amendments on mycorrhizal fungi and cowpea production. *Heliyon* [Internet]. 2018;4(7):1–21. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00704>
144. Alam M., Malik A, Rehman A, Hameed A, Chichan T., Sarwar M, et al. Disease Note. *Plant Dis*. 2021;105:2241.
145. Hung PM, Wattanachai P, Kasem S, Poeaim S. Efficacy of *Chaetomium* species as biological control agents against *Phytophthora nicotianae* root rot in citrus.

- Mycobiology. 2015;43(3):288–96.
146. Zhao SS, Zhang YY, Yan W, Cao LL, Xiao Y, Ye YH. *Chaetomium globosum* CDW7, a potential biological control strain and its antifungal metabolites. *FEMS Microbiol Lett.* 2017;364(3):1–6.
 147. Magdama F, Monserrate-Maggi L, Serrano L, Onofre JG, Jiménez-Gasco MDM. Genetic diversity of *fusarium oxysporum* f. Sp. cubense, the fusarium wilt pathogen of banana, in ecuador. *Plants.* 2020;9(1133):1–18.
 148. Fu L, Ruan Y, Tao C, Li R, Shen Q. Continuous application of bioorganic fertilizer induced resilient culturable bacteria community associated with banana *Fusarium* wilt suppression. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(27731):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep27731>
 149. Jacoby R, Peukert M, Succurro A, Koprivova A, Kopriva S. The role of soil microorganisms in plant mineral nutrition—current knowledge and future directions. *Front Plant Sci.* 2017;8(September):1–19.
 150. Brenes-Gamboa S. Parámetros de producción y calidad de los cultivares de banano FHIA-17, FHIA-25 y Yangambi. *Agron Mesoam.* 2017;28(3):719–33.
 151. Torres CD, García ÁL, Bermúdez C, Sarría Z, Hurtado RO, Delgado E, et al. Respuesta morfo-agronómica y organoléptica de cinco cultivares de banano (*Musa* spp.) en condiciones de campo. *Rev Biotecnol Veg* [Internet]. 2020;20(1):43–50. Available from: <http://scielo.sld.cu/pdf/bvg/v20n1/2074-8647-bvg-20-01-43.pdf>
 152. Guimarães GGF, Cantú RR, Scherer RF, Beltrame AB, de Haro MM. Banana crop nutrition: Insights into different nutrient sources and soil fertilizer application strategies. *Rev Bras Cienc do Solo.* 2020;44:1–14.

ANEXOS

Anexo 2. Preprocesamiento de muestras según el Laboratorio de Suelos y Nutrición vegetal de la FCV-ESPOL para el análisis físico-químico

Matriz de EOL

1. Las muestras en los tubos falcon de 50ml se filtran y se almacenan a -20°C antes de su procesamiento en el laboratorio.
2. Se centrifugan a temperatura ambiente a 4800rpm por 15 minutos.
3. El sobrenadante y el precipitado es separado en tubos diferentes y llevados al laboratorio para el análisis de macro y micronutrientes.



Matriz suelo (100gr)

1. Se desintegran los grumos de suelo manualmente.
2. Se seca el suelo a temperatura ambiente durante 48-72 horas.
3. Transcurrido este tiempo, se pulveriza el suelo con un mortero y pistilo de porcelana previamente limpios con un paño humedecido con agua desionizada (no se usa detergente, ni autoclave para su desinfección).
4. Se filtra por un tamiz de 2mm.
5. Se almacena aproximadamente 7gr de suelo para el análisis de macro y micronutrientes. En caso de no procesar inmediatamente se puede almacenar a -20°C .



Matriz de hojas

1. Las hojas se limpian previamente con agua para eliminar restos de suelo y posteriormente son enjuagadas con agua desionizada.
2. Se secan las hojas a 65°C durante 72 horas.
3. Las hojas secas son licuadas y tamizadas (tamiz de 250 micras).
4. Se pesan 20gr de hojas pulverizadas para el análisis de macro y micronutrientes.



Anexo 3. Coeficientes de variación de suelo para los parámetros químicos evaluados por tratamiento y período de evaluación

