



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**Evaluación de un consorcio de microorganismos halófilos para la recuperación de
suelos salinos de Chone**

Puchaicela García, Geovanna Daniela

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Gavilanes Quizhpi, Álvaro Petronio M.Sc.

25 de agosto de 2021

Document Information

Analyzed document	TESIS HALOFILOS CHONE_PUCHAICELA GEOVANNA (6).docx (D110921416)
Submitted	8/2/2021 2:37:00 AM
Submitted by	
Submitter email	gdpuchaicela@espe.edu.ec
Similarity	0%
Analysis address	apgavilanes.espe@analysis.urkund.com

Sources included in the report

W	<p>URL: https://repository.udca.edu.co/bitstream/11158/768/1/Aportes%20desde%20el%20enfoque%20agroecol%C3%B3gico%20para%20el%20manejo%20de%20la%20salinizaci%C3%B3n%20del%20suelo%20con%20bacterias%20halofilas%20en%20S%C3%A1chica-Boy~1.pdf</p> <p>Fetches: 12/19/2019 8:38:40 PM</p>		2
W	<p>URL: https://www.aquaculturealliance.org/advocate/la-cal-desempena-un-papel-crucial-en-el-manejo-de-estanques-acuicolas/?fbclid=IwAR2pHO5_TlfaMfs7Hzj90Ho-7E3JRMd7cbgAosR50kq2vMMyn3rPqSHdrCcBriones</p> <p>Fetches: 8/2/2021 2:38:00 AM</p>		1

Gavilanes Quizhpi, Álvaro Petronio M. Sc.

C.C.: 010277858-6

Director del Proyecto de Titulación



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, denominado “**Evaluación de un consorcio de microorganismos halófilos para la recuperación de suelos salinos de Chone**”, fue realizado por la señorita **Puchaicela García, Geovanna Daniela**; el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 2 de agosto de 2021.



Firmado electrónicamente por:
**ALVARO PETRONIO
GAVILANES
QUIZHPI**

Gavilanes Quizhpi, Álvaro Petronio M. Sc.

C.C.: 010277858-6

Director del Proyecto de Titulación



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Puchaicela García, Geovanna Daniela**, con C.C.: 172372224-3, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Evaluación de un consorcio de microorganismos halófilos para la recuperación de suelos salinos de Chone”**, es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 2 de agosto de 2021.

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir 'Geovanna Daniela Puchaicela'. La firma está escrita sobre una línea horizontal.

Puchaicela García, Geovanna Daniela

C.C.: 172372224-3



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo, **Puchaicela García, Geovanna Daniela**, con C.C.: 172372224-3, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Evaluación de un consorcio de microorganismos halófilos para la recuperación de suelos salinos de Chone”**, en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 2 de agosto de 2021.

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir 'Geovanna Puchaicela'. La firma está escrita sobre una línea horizontal.

Puchaicela García, Geovanna Daniela

C.C.: 172372224-3

Dedicatoria

A mi padres, Hugo y Gladis. A ustedes dedico y atribuyo cada logro y cada esfuerzo. Han sido mi mayor ejemplo de responsabilidad, trabajo duro y bondad. A nadie en el mundo debo más amor, respeto y gratitud.

A Armando. Por cada día fijar en mi un pensamiento de amor y protección. Por acompañarme en esta aventura con toda esa intensidad de tu cariño. Por ser mi compañía y fuerza en las noches sin dormir y en gélidas pero hermosas alboradas. A ti, que te has convertido en lo más bonito que atesoro, reitero, por siempre me quedo a tu lado, venga lo que venga, pase lo que pase.

A Javier, Esteban, Eduardo y Mauricio. Su presencia en mi vida, en el día a día, ha sido razón suficiente para impulsarme a ser mejor. Anhele con todo mi corazón verlos superarse y cumplir sus sueños. Yo, siempre estaré para ustedes.

A mis abuelos, Mauricio y Zoila. A pesar de la distancia, su fe en mí, su recuerdo y sus palabras siempre me motivaron a mirar al frente y a no rendirme.

A ustedes, con cariño, dedico el tiempo y esfuerzo que he invertido en este proyecto.

Agradecimientos

A mis padres. No encuentro palabras para agradecer todo su amor, sacrificio, paciencia y confianza en mí. A ustedes debo la oportunidad de haber podido educarme y de culminar mi carrera universitaria. Su apoyo y su sola presencia siempre fueron suficientes para no decaer ni rendirme aun cuando me encontraba cansada y me faltaban fuerzas para seguir.

A Armando. Mi hogar, refugio y paz, mi lugar feliz. Agradezco tu apoyo y amor incondicional, tus palabras de aliento, tu comprensión y tu paciencia. Gracias por todo, por tanto.

A Jhonathan. Amigo, hermano de otra madre. Compañero de madrugadas 5:20 am en la parada del bus. Compañero de regreso a casa 19:00 – 21:00 pm. Compañero de almuerzos/meriendas en la calle y de eventos random con anécdotas que contar. Agradezco tu paciencia, tu apoyo, tus cuidados, tu compañía silenciosa (a veces) cuando mi humor no era el mejor. Valoro inmensamente tu amistad.

A mi tutor M.Sc. Petronio Gavilanes y a demás colaboradores: Ing. Carrera, Ing. Villavicencio, Ing. Solorzano, Don Francisco Reyes; gracias a ustedes, a su guía, su apoyo en campo y a sus conocimientos he logrado llevar a cabo este proyecto de titulación.

Índice de contenidos

Análisis Urkund.....	2
Certificación.....	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos.....	7
Índice de contenidos.....	8
Índice de tablas.....	11
Índice de figuras.....	12
Listado de abreviaturas.....	13
Resumen.....	14
Abstract.....	15
Capítulo 1: Introducción.....	16
Planteamiento del problema.....	18
Justificación del problema.....	18
Hipótesis.....	20
Objetivos.....	20
Objetivo general.....	20
Objetivos específicos.....	20
Capítulo 2: Marco teórico.....	21
Suelo.....	21
Propiedades del suelo.....	22
Composición del suelo.....	23

Degradación del suelo.....	24
Salinidad del suelo	25
Clasificación de suelos de acuerdo con su salinidad y sodicidad.....	26
Relación de la salinidad y sodicidad del suelo y la vegetación	27
Efecto de la salinidad en la germinación de semillas	30
Consortios microbianos	31
Aplicaciones de los consorcios microbianos	31
Comunicación dentro de un consorcio microbiano	32
Organismos extremófilos.....	33
Organismos halófilos	34
Clasificación de los organismos halófilos	37
Mecanismos de tolerancia a salinidad u osmorregulación.....	38
Relación entre microorganismos halófilos y la vegetación	39
Aislamiento y detección de halófilos.....	40
Capítulo 3: Materiales y métodos.....	42
Fase de campo.....	43
Fase de Laboratorio	43
Aislamiento del consorcio halófilo	43
Recuento y cultivo primario	43
Determinación de tolerancia a distintas concentraciones de NaCl	44
Preparación de inóculos.....	44
Bioensayos.....	45
Bioensayo en suelo.....	45

	10
Bioensayo de germinación	46
Determinación de CE, pH y evaluación de la germinación de semillas	47
Análisis estadístico de resultados.....	48
Capítulo 4: Resultados.....	49
Fase de campo.....	49
Fase de laboratorio.....	51
Aislamiento del consorcio halófilo	51
Recuento y cultivo primario	51
Determinación de tolerancia a distintas concentraciones de NaCl	53
Preparación de inóculos.....	54
Bioensayos.....	54
Bioensayo en suelo.....	54
Bioensayo de germinación	59
Capítulo 5: Discusión	65
Fase de campo.....	65
Fase de laboratorio.....	67
Bioensayos.....	68
Bioensayo en suelo.....	68
Bioensayo de germinación	70
Capítulo 6: Conclusiones	72
Capítulo 7: Recomendaciones	74
Capítulo 8. Bibliografía.....	75
Capítulo 9. Anexos.....	80

Índice de tablas

Tabla 1. Propiedades Físicas, Químicas y Biológicas del Suelo.	23
Tabla 2. Tipos de Suelos de Acuerdo con su Salinidad y Sodicidad.	26
Tabla 3. Clase de Salinidad del Suelo (CE 1:1).	27
Tabla 4. Efecto de la CE en la Vegetación.	28
Tabla 5. Efectos de la Salinidad en la Vegetación.	29
Tabla 6. Fases de la Germinación.	30
Tabla 7. Clasificación de Organismos Extremófilos.	33
Tabla 8. Clasificación de Microorganismos de Acuerdo con su Tolerancia a la Salinidad. .	38
Tabla 9. Preparación de Soluciones a Distintas Concentraciones.	45
Tabla 10. Diseño Experimental para Bioensayo en Suelo.	46
Tabla 11. Diseño Experimental para Bioensayo de Germinación.	47
Tabla 12. Datos Determinados en Campo de la Muestra P23, SNA.	49
Tabla 13. Datos Determinados en Campo de la Muestra P31, SA.	50
Tabla 14. Datos Determinados en Campo de la Muestra SNS.	50
Tabla 15. Resultados de Prueba Cualitativa de MOS.	51
Tabla 16. Clasificación de Microorganismos Halófilos de Acuerdo con su Tolerancia a Distintas Concentraciones de NaCl.	53
Tabla 17. Valores de CE _e Registrados en los Distintos Tratamientos Durante el Bioensayo en Suelo.	55
Tabla 18. Análisis de Varianza de Dos Factores con Una Sola Muestra por Grupo.	56
Tabla 19. Medias de los Tratamientos.	57
Tabla 20. Valores de pH Registrados en los Distintos Tratamientos Durante el Bioensayo en Suelo.	58
Tabla 21. Resultados del Bioensayo de Germinación.	61

Índice de figuras

Figura 1. Principales Funciones del Suelo.....	22
Figura 2. Composición del Suelo.....	23
Figura 3. Tipos de Degradación del Suelo.....	25
Figura 4. Distribución de Organismos Halófilos en los Tres Dominios de la Vida.	35
Figura 5. Distribución de Organismos Halófilos en los Reinos: a). Archaea. b). Bacteria. c). Animalia, Chromista, Fungi, Plantae, Protista.	36
Figura 6. Distribución de Organismos Halófilos Leves, Moderados y Extremos.	37
Figura 7. Resultado de Siembra en Cajas Petri con AN 2% NaCl. a). Dilución 10^{-1} . b). Dilución 10^{-2} . c). Dilución 10^{-3} . d). Dilución 10^{-4} . e). Dilución 10^{-5} . f). Dilución 10^{-6}	52
Figura 8. Resultado de Siembra en AN 2, 6, 12 Y 18% NaCl.	53
Figura 9. CEe de Cada Tratamiento vs. Tiempo.....	55
Figura 10. Comparación de Medias de Cada Tratamiento.	57
Figura 11. $pH_{1:1}$ de Cada Tratamiento vs. Tiempo.	58
Figura 12. Semilla de Maíz Germinada.	60
Figura 13. Comparación de Semillas de Maíz Germinadas. a). Control Negativo. b). Control Positivo.	63
Figura 14. Índices de Germinación de CP, T2, T1 y CN.....	64

Listado de abreviaturas

AN	Agar Nutriente
ANOVA	Analysis Of Variance
CE	Conductividad Eléctrica
CMH	Consortio de Microorganismos Halófilos
CN	Caldo Nutriente
FAO	Food and Agriculture Organization
IG	Índice de Germinación
MOS	Materia Orgánica del Suelo
PPMCH	Presa Propósito Múltiple Chone
PSI	Porcentaje de Sodio Intercambiable
SA	Suelo Afectado
SENAGUA	Secretaría Nacional del Agua
SENPLADES	Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo
SNA	Suelo No Afectado
SNS	Suelo Naturalmente Salino
USDA	The United States Department of Agriculture

Resumen

Este proyecto abordó la problemática de salinización del suelo y la posibilidad de emplear microorganismos halófilos con la finalidad de reducir la elevada concentración de sales y así contribuir a mantener un suelo sano y capaz de soportar actividades agrícolas. El objetivo principal consistió en la evaluación de un consorcio de microorganismo halófilos (CMH) con potencial para la recuperación de suelos afectados por elevada salinidad en Chone. Para ello se obtuvo una muestra de suelo naturalmente salino (SNS) procedente del estuario del Río Chone y a partir de esta muestra se aisló un CMH. Posteriormente, se realizaron bioensayos en suelo y de germinación enfocados a determinar el efecto de estos microorganismos tras ser inoculados en distintas concentraciones. En el bioensayo en suelo, los tratamientos T1 y T2 iniciaron con CE_e 7,40 dS/m y 7,28 dS/m y al cabo de aproximadamente un mes llegaron a valores de 3,47 dS/m y 2,78 dS/m respectivamente. El bioensayo de germinación resultó en índices de germinación (IG) de 47% (T1) y 73% (T2) frente a un control negativo (CN) con IG 5%.

PALABRAS CLAVE:

- **MICROORGANISMOS HALÓFILOS**
- **SALINIDAD DEL SUELO**
- **CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA**
- **ÍNDICE DE GERMINACIÓN**

Abstract

This project addressed the problem of soil salinization and the possibility of using halophilic microorganisms in order to reduce the high concentration of salts and thus contribute to maintaining a healthy soil capable of supporting agricultural activities. The main objective consisted in the evaluation of a consortium of halophilic microorganisms (CHM) with potential for the recovery of soils affected by high salinity in Chone. For this, a naturally saline soil sample (SSS) was obtained from the Chone River estuary and a CHM was isolated from this sample. Subsequently, soil and germination bioassays were carried out focused on determining the effect of these microorganisms after being inoculated at different concentrations. In the soil bioassay, the T1 and T2 treatments started with EC_e 7.40 dS / m and 7.28 dS / m and after approximately one month they reached values of 3.47 dS / m and 2.78 dS / m respectively. The germination bioassay resulted in germination indices (GI) of 47% (T1) and 73% (T2) compared to a negative control (NC) with GI 5%.

KEYWORDS:

- **HALOPHILIC MICROORGANISMS**
- **SOIL SALINITY**
- **ELECTRICAL CONDUCTIVITY**
- **GERMINATION INDEX.**

Capítulo 1: Introducción

La Presa Simbocal se encuentra operando desde el año 1982, fue construida por la Corporación Reguladora del Manejo Hídrico de Manabí, debido a la influencia de las incrustaciones salinas producidas por las mareas altas y que provocaban inundaciones en la zona (Ministerio del Ambiente y Agua del Ecuador, 2017; Sumba, 1983). Esta presa se encuentra ubicada en la parroquia de San Antonio, aguas abajo del Río Chone, el cual tiene 14 m de ancho, cuenta con 10 compuertas que deben manejarse de forma adecuada para que exista un flujo normal de los ríos Carrizal y Chone hacia el mar (Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal del Cantón Chone, 2014).

Se esperaba que la construcción de la presa Simbocal contribuya al desarrollo agrícola del sector, sin embargo, la presencia de la presa ha facilitado la construcción de piscinas camaroneras cuyas actividades afectan gravemente al ecosistema (W. Villavicencio, comunicación personal, 28 de mayo del 2021).

En el año 2015 entró en funcionamiento la Presa Propósito Múltiple Chone (PPMCH), esta obra tiene como finalidad controlar el cauce del Río Grande para evitar posibles inundaciones en época lluviosa y almacenar agua. Dota de agua al sector agrícola y también se la utiliza para potabilización, beneficiando al sector productivo y a los pobladores del cantón Chone (SENAGUA, 2015).

Un análisis previo a la construcción de la PPMCH, concluyó que el agua del sistema hidrográfico de la cuenca del Río Grande no representaba un peligro para su uso múltiple, siendo apta para el riego y en base a la conductividad eléctrica (CE) que los suelos no son salinos (Briones, 2015). Sin embargo, un estudio reciente determinó que existen problemas de salinidad en los suelos cercanos a la presa Simbocal, ya que las muestras aledañas a ésta presentaron valores elevados de CE de acuerdo a la Norma Técnica Ambiental Ecuatoriana (2017), donde se expresa que el valor máximo permitido de CE en suelo es de 2 dS/m, por lo que se infiere que podría darse el mismo comportamiento en los suelos cercanos a la PPMCH en el futuro (Lara & Carrera, 2019).

La operación de presas puede generar impactos y afectaciones negativas en su entorno, entre los principales están la destrucción de hábitats, pérdida de ecosistemas, eutrofización y como consecuencia cambios en la composición de los suelos aledaños (Romero, 2014).

La elevada salinidad afecta de forma negativa a los suelos agrícolas y se espera que más del 50% de las tierras cultivables se salinicen para 2050, poniendo en eminente riesgo la seguridad alimentaria, el equilibrio y salud ambiental (Jamil et al., 2012).

Anteriormente se han empleado enmiendas químicas para el tratamiento de suelos salinos y sódicos, sin embargo, estos tratamientos han sido vetados por la implicación de elevados costos y perjuicios ambientales a largo plazo. Además, este tipo de mejora de suelo salino necesita cantidades excesivas de agua de buena calidad para lavar las sales, por lo que en zonas áridas y semiáridas donde la lluvia es escasa y no se dispone de agua de buena calidad, este método de recuperación no es factible (Arora et al., 2017).

Por otro lado, los métodos biológicos como plantar vegetación tolerante a la sal o incorporar al suelo microorganismos halófilos, donde estos organismos absorban las sales y las eliminen del suelo o se intercambien a través de procesos biológicos; son considerados como alternativas prometedoras de biorremediación dadas las bajas inversiones iniciales, su enfoque ecológico y la eficiente mejora la calidad del suelo y la producción del cultivo (Arora et al., 2017).

Se ha confirmado la posibilidad de utilizar microorganismos halófilos en la recuperación de suelos afectados por sales y sostener la producción agrícola en tierras degradadas (Anees et al., 2020). Además, se han observado los efectos beneficiosos del uso de microorganismos halófilos aislados de suelos salados nativos para mejorar la producción de cultivos en condiciones de estrés salino. Para el área agrícola, se han preparado bioformulaciones constituidas por cepas eficientes y se ha demostrado que su

aplicación ha mejorado el rendimiento de diversos cultivos como el arroz, trigo, mostaza, hortalizas y forrajes (M. Kumar et al., 2020).

Planteamiento del problema

La elevada salinidad del suelo es considerada una amenaza para la producción agrícola y consecuentemente se ven en riesgo la seguridad alimentaria y la salud medio ambiental (Arora et al., 2017). De acuerdo a los datos recopilados por Lara & Carrera (2019), la salinidad del suelo tras la operación de la presa Simbocal sobrepasa los valores máximos permitidos, llegando a registrar valores de hasta 7 dS/m y se especula que la salinidad se extienda tierras adentro.

Entre los propósitos de las presas se incluían el abastecimiento de agua de riego para las actividades agrícolas y la potabilización de agua para el cantón Chone, pero contrariamente a lo planificado, el aumento de las actividades de piscicultura, demandan agua del estuario y agua dulce del río, por tanto, la distribución de la salinidad en los suelos cercanos a las presas y a los ríos es incierta, así como también la forma en la que se debe mitigar el impacto negativo que causa la salinidad en el suelo (Yordanis et al., 2011).

Las altas concentraciones de sales afectan a la vegetación en cuanto a su desarrollo y producción, por consiguiente, disminuye la eficiencia a la hora de cosechar y consecuentemente se pone en riesgo la actividad agrícola (FAO, 2020). Siendo la agricultura una de las principales actividades económicas del cantón Chone, es importante identificar zonas en las que el suelo presente alta salinidad y proponer alternativas viables de mitigación y remediación.

Justificación del problema

El presente trabajo aporta a los objetivos de desarrollo sostenible (13) Acción por el clima, (14 y 15) Vida submarina y de ecosistemas terrestres, en beneficio de las naciones y

su bienestar (ONU, 2015). A escala local, el presente proyecto, se alinea con las intenciones del Plan Nacional de Desarrollo (2017-2021), el cual indica que el país asumirá la protección del medio ambiente manejando responsablemente los recursos naturales, protegiendo la diversidad biológica, previniendo de la degradación del suelo e implementando respuestas y acciones frente al cambio climático. Asimismo, se apuesta por el desarrollo de las capacidades productivas para lograr la soberanía alimentaria y el desarrollo rural integral. Todo esto con el fin de lograr el beneficio colectivo de toda sociedad (Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo (SENPLADES), 2017).

Además, en la actual Constitución de la República del Ecuador en el Art. 28 señala que uno de los objetivos de la política económica es la de asegurar la soberanía alimentaria, incentivando, en iguales condiciones, la producción convencional y la producción agroecológica de la Agricultura Familiar Campesina, a través de la redistribución de factores de producción (Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo (SENPLADES), 2017).

Estos objetivos solamente pueden lograrse si se tiene una visión clara de la problemática de la salinización de suelos en el territorio nacional y considerar alternativas para frenar y revertir dicho proceso.

Tratar el suelo afectado por la elevada concentración de sales puede contribuir a un aumento en la producción de alimentos de hasta 57% para el año 2050. Es así que, una de las alternativas de remediación son los microorganismos halófilos, éstos tienen la capacidad de crecer de manera óptima en presencia de altas concentraciones de sales y, además, contribuyen a la recuperación de suelos afectados por elevada salinidad, apoyando directamente el establecimiento y crecimiento de la vegetación (Arora & Vanza, 2018).

Considerando un posible escenario en el que se prevé un aumento paulatino de la concentración de sales en los suelos aledaños a las presas del cantón Chone, se presenta la necesidad de evaluar posibles alternativas biológicas para enfrentar tales problemas.

Hipótesis

H0: El proceso de bioaumentación, empleando un consorcio de microorganismos halófilos (CMH), en muestras de suelo con elevada salinidad del cantón Chone, no reduce la concentración de sales.

H1: El proceso de bioaumentación, empleando un consorcio de microorganismos halófilos (CMH), en muestras de suelo con elevada salinidad del cantón Chone, reduce la concentración de sales.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar un Consorcio de Microorganismos Halófilos (CMH) para la recuperación de suelos salinos de Chone.

Objetivos específicos

- Obtener una muestra de suelo naturalmente salino (SNS) procedente del estuario del Río Chone en donde se puedan encontrar microorganismos halófilos.
- Aislar un CMH a partir de una muestra de SNS empleando técnicas microbiológicas.
- Elaborar bioensayos a nivel laboratorio, enfocados a determinar la efectividad del CMH para modificar la salinidad en muestras de suelos de Chone.
- Elaborar bioensayos a nivel laboratorio, enfocados a analizar la germinación de semillas en muestras de suelos de Chone para determinar el efecto de la aplicación de microorganismos halófilos.

Capítulo 2: Marco teórico

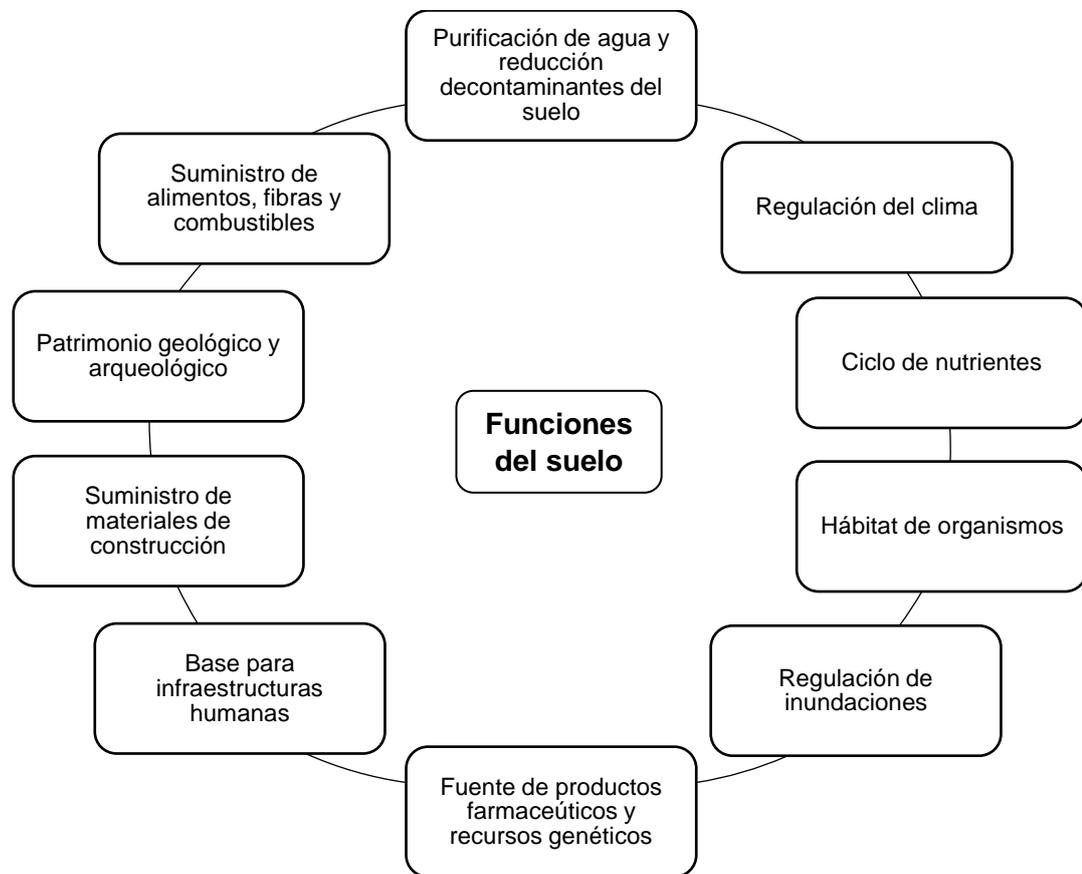
Suelo

El suelo puede ser considerado como un organismo vivo, una capa delgada donde ocurren eventos físicos, químicos y biológicos. Está compuesto por minerales, materia orgánica (MO), aire, agua, organismos vegetales y animales, tanto macro como microscópicos y pertenecientes a todos los dominios de la naturaleza; todos ellos, interactuando complejamente entre sí. Su formación se da a través de siglos debido a la desintegración de las rocas superficiales por la acción de distintos factores como el agua, cambios de temperatura y viento. Los suelos son de gran importancia para la vida y de su calidad depende la naturaleza de los ecosistemas así como su capacidad para mantener la vida vegetal y animal (FAO, 2020).

Entre los servicios ecosistémicos del suelo están:

Figura 1

Principales Funciones del Suelo.



Fuente: FAO, 2015.

Propiedades del suelo

Las propiedades de un suelo dependen de su historia de la formación y pueden ser modificadas por la intervención humana (Delgado & Gómez, 2016). Algunas propiedades del suelo que se utilizan para evaluar su calidad se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 1

Propiedades Físicas, Químicas y Biológicas del Suelo.

Físicas	Químicas	Biológicas
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Textura ▪ Estructura ▪ Densidad ▪ Porosidad ▪ Retención de agua ▪ Color 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Conductividad eléctrica ▪ pH ▪ Capacidad de intercambio catiónico (CIC) ▪ Concentración de carbono orgánico 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Respiración del suelo ▪ Presencia de lombrices de tierra ▪ Biodiversidad microbiana

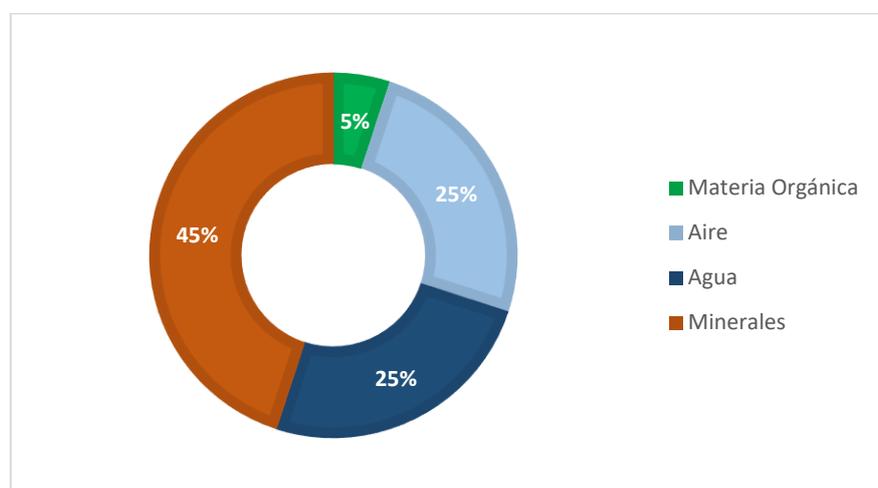
Fuente: Delgado & Gómez, 2016.

Composición del suelo

Los principales componentes del suelo son minerales, aire, agua y MO. En términos generales, estos componentes se encuentran en los porcentajes indicados en la Figura 2, sin embargo, pueden variar de acuerdo con las distintas propiedades físicas, químicas y biológicas de suelo en un lugar y tiempo determinados (FAO, 1996).

Figura 2

Composición del Suelo.

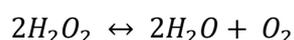


Fuente: FAO, 1996.

Particularmente, la materia orgánica del suelo (MOS) es responsable del rendimiento de los cultivos y del mantenimiento de la calidad y salud del suelo. El contenido de MOS está relacionado con otras propiedades y procesos físicos, químicos y biológicos. En el contexto de la productividad agronómica, son dos propiedades clave afectadas por el contenido de MOS, (1) la capacidad de agua disponible de la planta (PAWC) y (2) los nutrientes esenciales disponibles de la planta, especialmente el nitrógeno (N) (Lal, 2020).

La MOS puede clasificarse como viva (<4%) y no viva (>90%). La primera incluye biomasa macro y microbiana, así como material vegetal como raíces de plantas. La segunda se refiere a MO transformada (sustancias húmicas y no húmicas) y MO fresca (Rosell, 1982; Wood, 1995).

Existen pruebas cuantitativas enfocadas en la determinación de MOS no viva y cualitativas enfocadas en MOS viva. La prueba cualitativa más comúnmente utilizada con el fin de establecer MOS viva es el uso de peróxido de hidrógeno cuyo fundamento se sostiene en el accionar de la enzima catalasa y su capacidad para descomponer el H_2O_2 (FAO, 1996). Esta enzima está presente en organismos aerobios y cataliza la reacción:



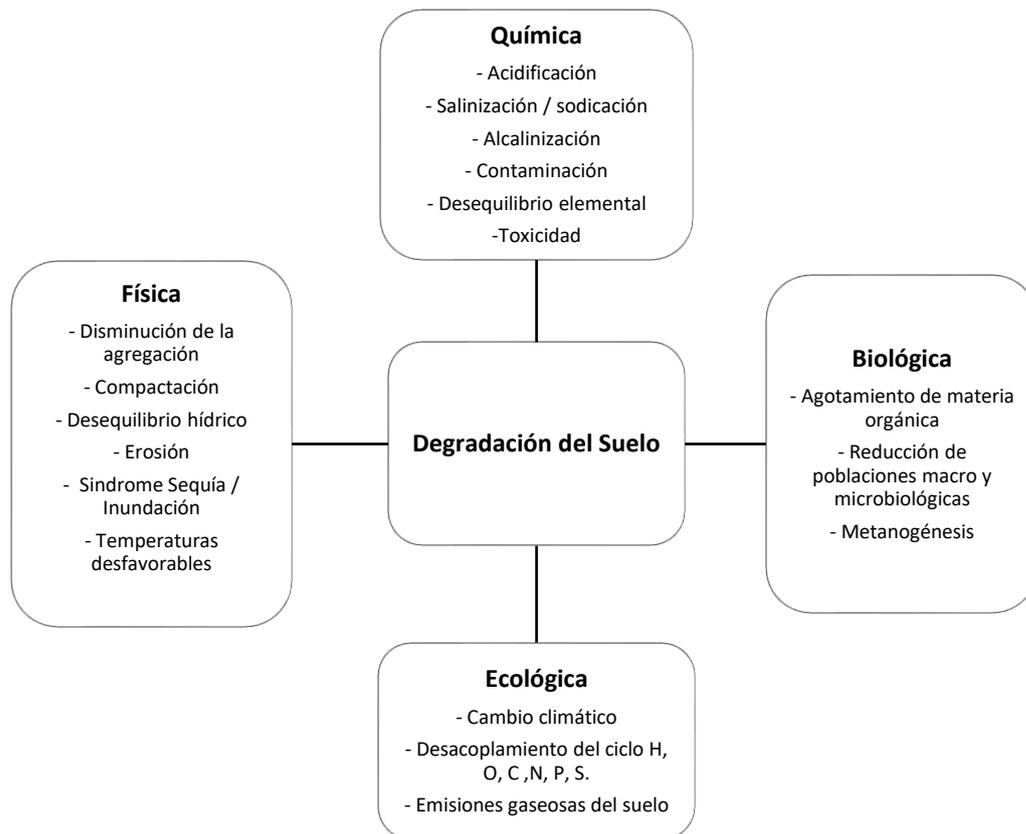
Degradación del suelo

La degradación del suelo y la reducción de superficie agrícola pueden perjudicar de forma directa la soberanía alimentaria de un país. La erosión, disminución de fertilidad, acidificación, alcalinización, elevada salinidad, anegamiento, entre otros; son considerados como procesos que degradan el suelo. Las causas de la degradación pueden ser de origen natural pero en mayor medida, de origen antrópico como por ejemplo: malas prácticas agrícolas, deforestación, bloqueo de vías de drenaje, descarga de contaminantes; en términos generales, mal uso del recurso suelo (Nayakekorale, 2020).

Existen diferentes tipos de degradación del suelo:

Figura 3

Tipos de Degradación del Suelo.



Fuente: Lal, 2020.

Salinidad del suelo

La salinidad de los suelos ocurre debido al aumento del contenido de sales como resultado del bloqueo de las vías de drenaje y el aumento del nivel freático más cerca de la superficie del suelo. Se ha informado de salinidad en suelos de zonas costeras originado a partir de sales de agua de mar. Tierra adentro, los suelos se vuelven salinos cuando el agua acumulada en zonas bajas se evapora, en áreas irrigadas de las llanuras, cuando las capas

freáticas son poco profundas, en el fondo de los valles donde el drenaje está impedido o existe un drenaje ineficiente por el manejo inadecuado del agua (Nayakekorale, 2020).

Clasificación de suelos de acuerdo con su salinidad y sodicidad

Rueda y colaboradores (2009), han considerado los parámetros de CE en extracto saturado (CE_e), pH y el porcentaje de sodio intercambiable (PSI), para clasificar suelos afectados por salinidad en tres tipos, a saber:

Tabla 2

Tipos de Suelos de Acuerdo con su Salinidad y Sodicidad.

Tipo de suelo	CE_e (dS/m)	pH	PSI (%)
Salino	> 4	<8.5	<15
Salino sódico	> 4	<8.5	> 15
Sódico	<4	> 8.5	> 15

Fuente: Rueda et al., 2009.

De acuerdo con el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) (1999), para una suspensión de suelo:agua de 1:1, un suelo puede clasificarse de acuerdo a los siguientes valores:

Tabla 3*Clase de Salinidad del Suelo (CE_{1:1}).*

CE_{1:1} (dS/m)	Clase de salinidad	Afectación a cultivos	Afectación microbiana
0.0 – 0.98	No salino	Afectación despreciable	Microorganismos no afectados
0.98 – 1.71	Muy ligeramente salino	Reducción de rendimiento de cultivos muy sensibles	Alteración de algunos procesos microbianos
1.71 – 3.16	Ligeramente salino	Reducción de rendimiento de la mayoría de cultivos	Alteración de principales procesos microbianos
3.16 – 6.07	Moderadamente salino	Solamente cultivos tolerantes tienen un rendimiento satisfactorio	Únicamente sobreviven organismos tolerantes
> 6.07	Fuertemente salino	Solamente cultivos muy tolerantes tienen un rendimiento satisfactorio	Únicamente sobreviven organismos halófilos

Fuente: Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), 1999.

Relación de la salinidad y sodicidad del suelo y la vegetación

Cualquier cultivo puede estar expuesto a tensiones ambientales bióticas y abióticas que afectan de forma negativa la productividad y la calidad de este. La salinización del suelo, el pH alcalino, la acidificación, la sequía y la temperatura representan estrés abiótico para las plantas. En particular, la salinidad y sodicidad, representan un problema para la

agricultura porque la alta concentración de sal conlleva a la improductividad (Choudhary et al., 2017).

Característicamente, la acumulación excesiva de sales de sodio (Na^+) destruye la estructura del suelo, deteriora las propiedades hidráulicas, aumenta el pH y reduce la infiltración del agua y la aireación; lo que conduce a la compactación y, por lo tanto, aumenta la erosión y una mayor escorrentía del agua (Ladeiro, 2012).

Las sales presentes en el suelo afectan negativamente a la vegetación dada la inherente toxicidad de algunos iones y el aumento de la presión osmótica que dificulta la normal absorción de agua por parte de las raíces de la planta. De acuerdo al valor de CE del suelo, se puede predecir el efecto sobre la vegetación (Rueda et al., 2009; Goykovic et al., 2014).

Tabla 4

Efecto de la CE en la Vegetación.

CE_e (dS/m)	Grado de salinidad	Efecto en la vegetación
0 – 2	Nula	Ninguno
2 – 4	Escasa	Afectación en cultivos muy sensibles
4 – 8	Moderada	Únicamente se desarrollan plantas tolerantes
8 – 16	Alta	Únicamente y con dificultad se desarrollan plantas muy tolerantes
> 16	Excesiva	Únicamente se desarrolla vegetación halófila

Fuente: Rueda et al., 2009.

Si bien no todas las plantas son sensibles a elevadas concentraciones de cationes, como el calcio, todas lo son a elevadas concentraciones de sodio. El sodio provoca un aumento de pH superior al que provoca el calcio, por lo tanto, se considera que un $\text{pH} > 8.5$ es un indicador de sodicidad. Sin embargo, la elevada CE y el pH alcalino son parámetros no siempre relacionados ya que a un $\text{pH} < 8.5$, se da la solubilización de sales alumínicas,

provocando un elevado valor de CE sin tratarse de un caso de suelo sódico sino salino o salino-sódico (Rueda et al., 2009).

Bajo condiciones de salinidad, los cultivos agrícolas pueden responder disminuyendo su rendimiento y productividad debido a interacciones entre procesos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos como la absorción limitada de agua y nutrientes, afectando así a todas las etapas de desarrollo de la planta de cultivo con estrés osmótico y oxidativo, deficiencia de nutrientes (N, Ca, K, P, Fe y Zn) y toxicidad de iones (M. Kumar et al., 2020).

Los efectos principales y directos que provoca la salinidad en la vegetación son:

Tabla 5

Efectos de la Salinidad en la Vegetación.

Efectos morfológicos y anatómicos	<p>Limita el desarrollo, reducida altura y producción de materia seca.</p> <p>50mM de NaCl inhibe el crecimiento de vegetación glicófito y retardan el crecimiento de vegetación halófila.</p>
Efectos fisiológicos y en el desarrollo	<p><i>Modelo de aprovechamiento de agua:</i> Las sales solubles reducen la energía libre del agua provocando sequía fisiológica. La elevada concentración de solutos aumenta el potencial osmótico y consecuentemente la planta se deshidrata al no poder extraer agua del suelo.</p> <p><i>Modelo de ajuste osmótico:</i> La planta pretende lograr una diferencia de presión osmótica favorable ajustando su contenido de solutos. Este esfuerzo conlleva gasto de energía y disminución del desarrollo. La tolerancia a la salinidad puede definirse como el grado de ajuste osmótico que la planta puede desempeñar, sin que se vea afectado su desarrollo.</p>

Modelo de toxicidad específica: La elevada concentración de iones provoca cambios en la actividad metabólica. Estos iones pueden actuar como antimetabolitos, fijando o precipitando los metabolitos. La tolerancia a la alta salinidad puede lograrse mediante mecanismos de alta selectividad en la absorción de iones, limitando el nivel de iones tóxicos.

Fuente: Rueda et al., 2009.

Efecto de la salinidad en la germinación de semillas

Las fases del proceso de germinación de una semilla son tres:

Tabla 6

Fases de la Germinación.

Fase I	Fase II	Fase III
<ul style="list-style-type: none"> Absorción de agua. por imbibición Hinchamiento. Ruptura de testa. 	<ul style="list-style-type: none"> Actividad enzimática. Metabolismo respiratorio. Translocación y asimilación de reservas alimentarias para el crecimiento del embrión. 	<ul style="list-style-type: none"> Crecimiento y división celular. Emergencia de radícula. Emergencia de plúmula.

Fuente: Martínez et al., 2015.

Normalmente, las semillas de plantas que se desarrollan en ambientes áridos, semiáridos y salinos se han adaptado a estas condiciones y presentan adaptaciones morfológicas como cámaras internas de aire cuya función es evitar la exposición directa del embrión a temperaturas extremas; adaptaciones fisiológicas como baja humedad para evitar

su deterioro, rapidez de germinación y capacidad dormancia o letargo; las semillas que no presenten estas características, fácilmente pueden no llegar a germinar y morir (Sánchez et al., 2015).

La disminución del potencial hídrico en el medio a causa de la elevada salinidad del suelo impide la absorción de agua por parte de la semilla durante el periodo de germinación. En determinadas condiciones de salinidad, el proceso de germinación puede verse inhibido o retardado, considerando que semillas no podrían hidratarse, truncando así el inicio de la primera fase e impidiendo el desarrollo de las siguientes (Goykovic et al., 2014).

Consortios microbianos

Se puede definir a un consorcio microbiano como dos o más grupos de microorganismos que conviven simbióticamente e incluyen relaciones de mutualismo y comensalismo, parasitarias o de tipo depredador-presa. Se encuentran dentro de diversos hábitats naturales, por ejemplo: intestinos de mamíferos, algunos alimentos, suelos, cuerpos de agua y desechos. Se considera que los consorcios tienen varias ventajas como eficiencia, robustez y modularidad respecto a especies individuales. Estas características hacen que los consorcios sean vigorosos y fácilmente adaptables (Harish & Jagadeesh, 2016).

Aplicaciones de los consorcios microbianos

En la naturaleza, la mayoría de los microorganismos viven en comunidades y aun siendo pequeños consorcios, tienen diversas aplicaciones como: mejorar las cascadas de señalización de defensa en las plantas, son empleados como biofertilizantes, agentes de biocontrol, contribuyen en la digestión de animales, biorremediación y recuperación de suelos y en la degradación efectiva de residuos orgánicos (Harish & Jagadeesh, 2016).

Dadas las múltiples aplicaciones de los consorcios microbianos, se han desarrollado de forma sintética, sin embargo, no se han mostrado los efectos esperados; tales resultados pueden atribuirse a la incompatibilidad de los microbios en la mezcla y de ahí la importancia de la detección de microorganismos compatibles con efecto sinérgico o de simbiosis. Por lo tanto, el estudio de las comunidades microbianas en la rizosfera natural contribuye al desarrollo de mejores consorcios microbianos capaces de adaptarse a determinadas condiciones ambientales (Harish & Jagadeesh, 2016; Padmaperuma et al., 2018).

Comunicación dentro de un consorcio microbiano

De acuerdo a la investigación realizada por Scott & Hasty (2016), los microorganismos mantienen mecanismos de comunicación con la finalidad de ejercer acciones conjuntas que favorezcan el desarrollo de toda la población. El resultado de su comunicación se puede ver reflejado en la resistencia de los consorcios cuando se enfrentan a condiciones adversas y su capacidad de resistir a la invasión de otras especies. La comunicación y la división del trabajo son puntos clave que les permite superar desafíos y consecuentemente las poblaciones dentro de la matriz crecen, evolucionan y afirman sus roles.

Se ha establecido que la comunicación microbiana se realiza a través de metabolitos, fundamentales en el establecimiento de relaciones, protección, selección de socios, evolución y división del trabajo. Las poblaciones microbianas liberan metabolitos reguladores y metabolitos secundarios encargados de facilitar las interacciones externas. Además, la competencia equilibrada dentro del consorcio impide el ingreso de otros microorganismos que puedan "saquear" los nutrientes disponibles (Padmaperuma et al., 2018).

Organismos extremófilos

Se definen como condiciones fisiológicas o condiciones normales a aquellas que comprenden una temperatura entre 10 y 37°C, presión ~ 1 atm, pH alrededor de la neutralidad (~ 7), salinidad entre 0.15 y 0.5 M NaCl y la suficiente disponibilidad de agua en el entorno. Por otro lado, los ambientes extremos están lejos de ajustarse a estas condiciones y presentan condiciones como temperaturas extremadamente elevadas o extremadamente bajas, ambientes hipersalinos, alcalinos, ácidos, etc (Daoud & Ben Ali, 2020).

Un grupo de organismos, aún poco estudiados y de los que se dispone de poca información, son capaces de desarrollarse y prosperar en ambientes hostiles y poco favorables para el progreso de la vida; tales organismos pueden ser denominados como extremófilos y extremotolerantes. Los primeros requieren de tales circunstancias extremas para sobrevivir, es decir, son dependientes de ellas, y los segundos pueden adaptarse y tolerar ambientes extremos pero su prosperidad y desarrollo es óptimo en condiciones fisiológicas (Orellana et al., 2018).

Los extremófilos pueden clasificarse de la siguiente manera:

Tabla 7

Clasificación de Organismos Extremófilos.

Parámetro ambiental	Condiciones	Extremófilo
Temperatura	> 80°C	Hipertermófilo
	45 – 80°C	Termófilo
	≤ 10°C	Psicrófilo
pH	< 5	Acidófilo
	≥ 9	Alcalófilo
Salinidad	200 – 5900 mM de NaCl	Halófilo

Parámetro ambiental	Condiciones	Extremófilo
Presión	500 – 600 atm	Barófilos
Radiación UV	40 a 400 nm	Radorresistente
Agua	Actividad de agua < 0.7	Tolerante a la deshidratación

Fuente: Orellana et al., 2018.

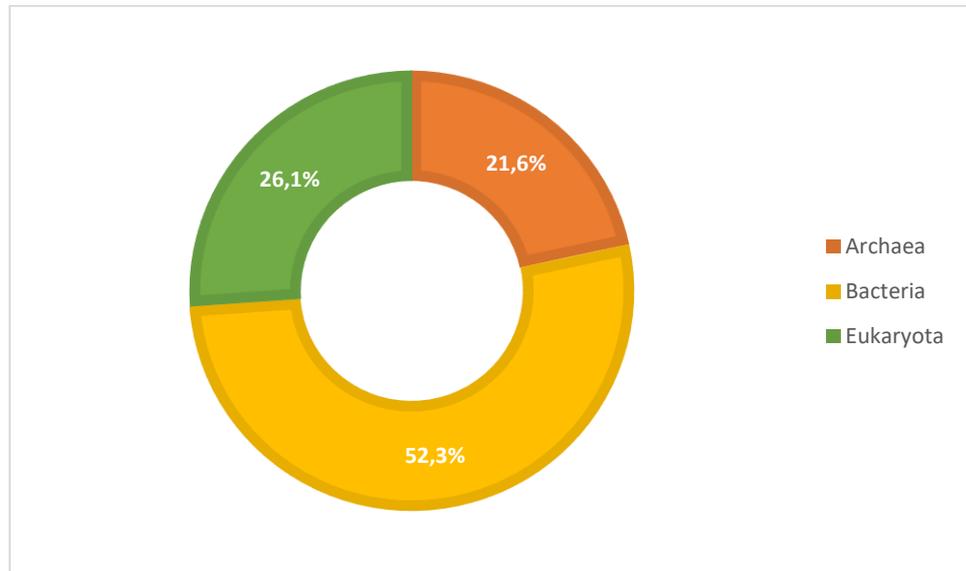
Organismos halófilos

Los organismos halófilos se encuentran en ambientes salinos e hipersalinos, condición dada por la elevada concentración de distintas sales como NaCl, KCl, MgSO₄, CaSO₄ y MgCl₂; pueden sobrevivir y prosperar en estos ambientes y se encuentran distribuidos en los tres dominios de la vida, a saber: Archaea, Bacteria y Eukaryota (Daoud & Ben Ali, 2020; Kumar et al., 2020).

A partir del año 2018, las especies halófilas documentadas, se compilaron en una base de datos denominada HaloDom. De acuerdo a esta base de datos existen más de 1000 especies halófilas: 21,6% de Archaea, el 52,3% de las bacterias y el 26,1% de los eucariotas (Loukas et al., 2018).

Figura 4

Distribución de Organismos Halófilos en los Tres Dominios de la Vida.

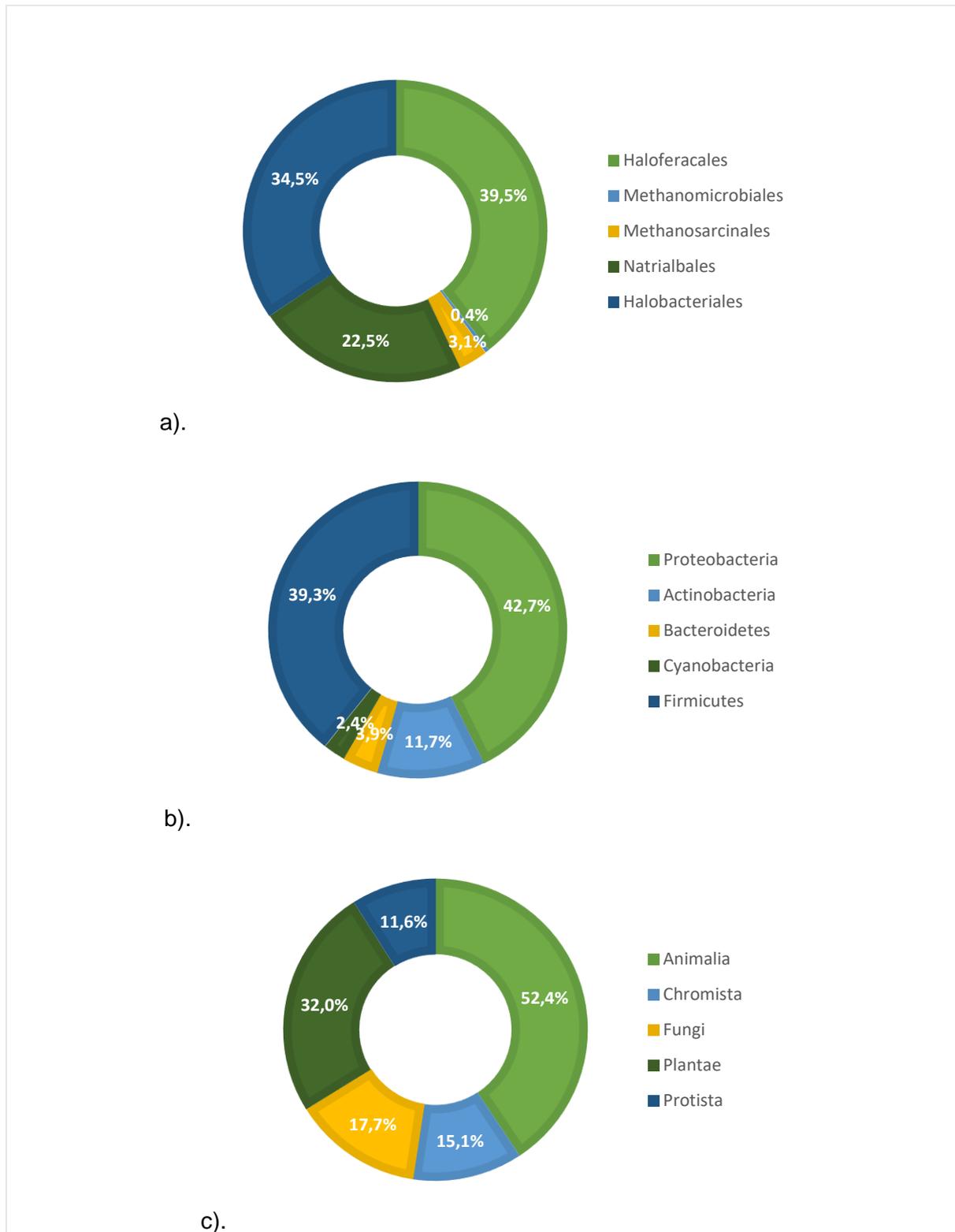


Fuente: *HaloDom*, n.d.

A continuación, y de forma más detallada, se muestra la distribución porcentual de organismos halófilos en cada uno de los dominios anteriormente mencionados.

Figura 5

Distribución de Organismos Halófilos en los Reinos: a). Archaea. b). Bacteria. c). Animalia, Chromista, Fungi, Plantae, Protista.



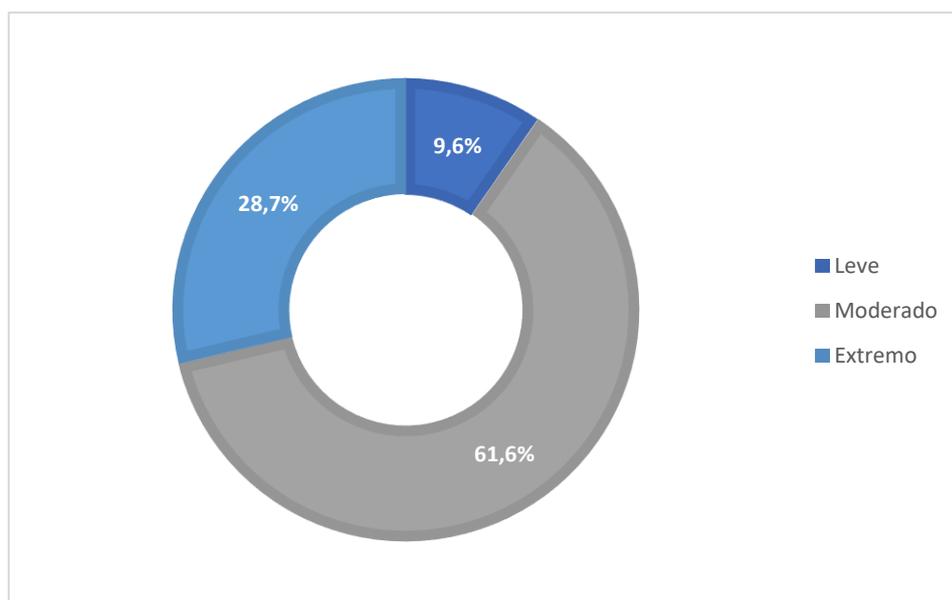
Fuente: HaloDom, n.d.

Clasificación de los organismos halófilos

Los organismos halófilos están más dispersos en los árboles filogenéticos de procariontas, es decir, Archaea y Bacteria. Son escasos aquellos que tienen la capacidad de crecer en un amplio rango de salinidad. Se realizó una primera clasificación donde se consideran halófilos leves si requieren de 3% a 5% de sal, moderados si proliferan en ambientes con concentraciones de 6% a 15% y extremos si demandan más del 15% hasta 30% de sal o hasta alcanzar niveles de saturación, como es el caso de *Halomonas elongata* (Edbeib et al., 2016).

Figura 6

Distribución de Organismos Halófilos Leves, Moderados y Extremos.



Fuente: *HaloDom*, n.d.

Generalmente existe un rango restringido de salinidad en la que un microorganismo puede desarrollarse; es así que, hay casos en los que puede crecer a altas concentraciones de sales, 10-15% o incluso más, pero su desarrollo óptimo se da en entornos con ausencia de sal, es decir, son un grupo de organismos denominados halotolerantes, como por ejemplo algunas especies de *Staphylococcus* (Daoud & Ben Ali, 2020).

La clasificación y rangos de concentraciones de NaCl, fue refinada por Kushner entre los años 1978 y 1985; siendo ahora la más aceptada y se detalla a continuación:

Tabla 8

Clasificación de Microorganismos de Acuerdo con su Tolerancia a la Salinidad.

Clasificación	NaCl (g/L)	
	Rango	Óptimo
No halófilas	0 – 60	< 10
Débilmente halófilo	10 – 115	10 – 30
Moderadamente halófilo	25 – 200	30 – 115
Límite extremadamente halófilo	80 – 230	115 – 175
Extremadamente halófilo	115 – 300	> 175
Halotolerantes	0 - > 60	< 10
Haloversátil	0 - > 175	10 – 30

Fuente: Daoud & Ben Ali, 2020.

Mecanismos de tolerancia a salinidad u osmorregulación

Los organismos halófilos han desarrollado varios mecanismos moleculares y celulares para responder a la condición de estrés salino. Las diferentes estrategias osmoadaptativas que se han observado se denominan Salt-In y Salt-Out (Waditee et al., 2016).

Salt-In

La estrategia de Salt-In consiste en la acumulación de compuestos iónicos u osmolitos inorgánicos en el citoplasma, como K^+ y Cl^- ; tal acopio de sales en su interior requiere que proteínas, enzimas y demás componentes celulares toleren, se adapten o requieran de altas concentraciones de salinidad. Es el principal mecanismo de equilibrio osmótico evidenciado en Arqueas y *Haloanaerobiales* como *Halobacteriaceaea*,

Natranaerobiaceae, *Haloarchaea* (Muntyan et al., 2015). Dada la descripción de este mecanismo, los organismos tienen una limitada capacidad de adaptarse a ambientes en los que la salinidad no sea elevada (Ramírez et al., 2004).

Salt-Out

Por el contrario, la estrategia de Salt-Out es empleada por organismos tanto halófilos como no halófilos ya que es un sistema flexible que permite la adaptación a variaciones de presión osmótica (Muntyan et al., 2015). Radica en mantener una baja concentración de sales intracelulares y acumulación de osmolitos orgánicos (compuestos no iónicos) de bajo peso molecular como glicina, betaína, ectoína, etc., también denominados solutos compatibles, capaces de mantener el equilibrio osmótico y no interferir en el metabolismo celular. Tales compuestos pueden encontrarse en el exterior y transportarse hacia el interior o sintetizarse de *novo*, siendo este último el favorito por las células dado que se ahorra energía. Además, se conoce que existen canales que funcionan como válvulas de seguridad y permiten la expulsión de osmolitos almacenados en caso de presentarse un choque hipo-osmótico (Ramírez et al., 2004).

Este es el principal mecanismo osmoadaptativo en natronófilos aeróbicos y es secundario en *haloarchaea* y *natranaerobiaceae* anaerobios. Algunos solutos compatibles que se sintetizan de *novo* son 2-sulfotrehalosa en *haloarchaea* alcalifílica y glicina betaína, ectoína, entre otras, en haloalcalifilos y natronófilos. (Muntyan et al., 2015). La base molecular de la halotolerancia de proteínas y la adaptación de las enzimas halófilas a una salinidad elevada es el aumento de un número sustancial de cargas de proteínas y una mayor hidrofobicidad (Waditee et al., 2016).

Relación entre microorganismos halófilos y la vegetación

Los organismos halotolerantes y halófilos tienen la capacidad mitigar el estrés salino y consecuentemente mejorar el crecimiento y la producción agrícola en los suelos afectados

por elevadas concentraciones de sal. Estos microorganismos influyen en el crecimiento de las plantas mediante la fijación de nitrógeno atmosférico, solubilización de nutrientes y secreción de fitoreguladores como ácido indolacético, giberelinas y cinetinas además de la producción de la enzima ácido aminociclopropano carboxílico o ACC desaminasa, responsable de la regulación del etileno y de la reducción de estrés de la planta (M. Kumar et al., 2020).

Aislamiento y detección de halófilos

Se han cultivado y aislado microorganismos halófilos para aplicaciones industriales y biotecnológicas. Se ha realizado el aislamiento de colonias puras en caso de microorganismos cultivables y análisis metagenómico para organismos no cultivables como arqueas. En la mayoría de los casos, el aislamiento de halófilos a partir de muestras de ambientes salinos se lleva a cabo en presencia de una gran cantidad de NaCl en el medio (100-200 g /L) junto con fuentes de carbono y nitrógeno. En el caso de la búsqueda de enzimas hidrolíticas como amilasa, proteasa, lipasa, celulasa, xilanasa, inulinasa, pululanasa y pectinasa. Para el cribado específico de enzimas halófilas se emplea medios que se complementan con sus respectivos sustratos (Kumar et al., 2012).

Inicialmente se pueden realizar diluciones en serie de muestras de suelo o agua para aislar colonias individuales de diferentes cepas. En ocasiones el pH del suelo o del agua que se toma para el aislamiento difiere en gran medida de la neutralidad por lo que se debe ajustar el pH del medio de aislamiento al igual que la temperatura, esto con el fin de que las condiciones de aislamiento sean lo más cercanas a las del ambiente nativo para evitar la pérdida de los microbios (Giri & Varma, 2019).

Un problema recurrente durante el aislamiento de cultivos puros es la gran diversidad de organismos que no pueden ser cultivados debido a la imposibilidad de replicar el entorno de vida natural o debido a la ausencia de moléculas de señalización. Además,

muchos organismos genotípicamente distintos, pero fenotípicamente similares pueden no distinguirse o identificarse mediante métodos bioquímicos convencionales. Además, se considera que solo el 1% de las cepas bacterianas de muestras ambientales se puede cultivar *in vitro*; es en estos casos que se emplean técnicas metagenómicas para estudiar la diversidad filogenética y metabólica (Giri & Varma, 2019).

Sin el aislamiento de colonias puras, es imposible caracterizar por completo propiedades fisiológicas y patológicas individuales de los organismos de interés (Giri & Varma, 2019). Por ello, se desarrollan nuevos métodos de cultivo diferentes a los convencionales. Por ejemplo, se cree que los medios de cultivo ricos en nutrientes favorecen a especies de crecimiento rápido a expensas de las de crecimiento lento, por lo que se propone el uso de medios con menor cantidad de nutrientes; situación que han tenido éxito en organismos no cultivables de ambientes marinos. Otros métodos incluyen extender el tiempo de incubación, complementar el medio con nutrientes específicos o agregar moléculas de señalización, entre otros. Tales acciones han permitido el descubrimiento e investigación de la diversidad microbiana de ambientes salinos (Kumar et al., 2012).

Capítulo 3: Materiales y métodos

La población considerada para este proyecto implicó el suelo del área de influencia de presas en el Cantón Chone, Provincia de Manabí, incluyendo el estuario del Río Chone. Para los bioensayos en suelo y de germinación se seleccionaron muestras cuyas características se adapten a los requerimientos de cada bioensayo. Para el aislamiento del CMH, se seleccionó la Isla Corazón, constituida por diversas especies de mangles y rodeada de agua salobre.

El proyecto tuvo un nivel de investigación explicativa. Una investigación de este tipo tiene como objetivo intentar aclarar por qué y cómo existe una relación entre aspectos de una situación o fenómeno (Hernández, 2017). Al inicio se estudia la influencia de la presa Simbocal y de actividades camaroneras sobre la salinidad del suelo próximo. Posteriormente se evalúa el efecto que tiene un CMH en la CE del suelo y finalmente, la relación entre la salinidad y la germinación de semillas.

Además, se empleó un diseño de investigación de campo y experimental. En campo, se observan y se recolectan datos en el lugar mismo donde ocurre el fenómeno y no se manipulan ni controlan variables. Por el contrario, en una investigación experimental es aquella en la que se manipulan intencionalmente variables independientes y se determina el efecto que tienen sobre variables dependientes (Hernández, 2017). Tal escenario se vio reflejado en el bioensayo en suelo donde se inocularon diferentes concentraciones del CMH (variable independiente) y se valoró su efecto sobre la CE y el pH (variables dependientes). Por otro lado, en el bioensayo de germinación se estudia el efecto de la CE (variable independiente) sobre el índice de germinación de las semillas (variable dependiente).

El proyecto de investigación constó de dos fases: fase de campo (recolección de muestras en Chone - Manabí) y fase de laboratorio (Quito - Pichincha), las cuales se detallan a continuación:

Fase de campo

Inicialmente se determinó el tipo de muestreo y la ubicación de puntos de muestreo correspondientes a suelo afectado (SA) y suelo no afectado (SNA) considerando los datos obtenidos por Lara & Carrera (2019). Los criterios que se tomaron en cuenta para seleccionar el SA fueron: $CE \geq 4$ dS/m, $pH \leq 8.5$, densidad, PSI, textura; mientras que, los criterios que se tuvieron presentes para seleccionar el SNA fueron: $CE \leq 2$ dS/m, pH entre 6.5 y 7.5, densidad, PSI, textura.

Para obtener el CMH se seleccionó una zona en la que el suelo tenga naturalmente elevada salinidad, mantenga vegetación y un ecosistema no alterado, en equilibrio y poca o ninguna intervención antropogénica; dichas características las reúne la Isla Corazón, ubicada en el Estuario del Río Chone. Para el traslado hacia la isla y la posterior recolección de la muestra de SNS, se contó con la ayuda de un guía turístico de la zona.

El Plan de Muestreo (Anexo 1), refleja los datos recopilados y considerados para la elección cada muestra de suelo (SA, SNA Y SNS) y los puntos seleccionados para realizar el respectivo muestreo.

Fase de Laboratorio

Aislamiento del consorcio halófilo

La metodología detallada a continuación supone una muestra de SNS y una muestra de SA. El protocolo propuesto estuvo basado en el protocolo empleado por Aristizabal y colaboradores (2019) y Sánchez & Arguello (2006) con ciertas modificaciones.

Recuento y cultivo primario

A partir de la muestra de SNS, se realizó el aislamiento y recuperación de los microorganismos halófilos. Se realizó la técnica de diluciones seriadas para lo que se pesaron 10 g de suelo y se colocaron en 90 mL de agua peptonada. Posteriormente se

trasladó 1 mL de esta dilución a un tubo con 9 mL de agua peptonada y de éste al siguiente hasta obtener una dilución de $1/10^6$. Un mililitro de cada tubo se inóculo en cajas Petri con agar nutritivo (AN) modificado con 2% NaCl (tres repeticiones por cada dilución), con el fin de recuperar la mayor cantidad de microorganismos halófilos e impedir el crecimiento de otros. Las condiciones de crecimiento correspondieron a las condiciones de su lugar de origen, en este caso, 25°C por 4 días. Posteriormente se realizó un lavado de las colonias y se inoculó en un tubo de ensayo con 20 mL de caldo nutritivo (CN) con 2% NaCl y se incubó nuevamente a 25°C por 2 días.

Determinación de tolerancia a distintas concentraciones de NaCl

Se ejecutó la siembra del CMH aislado en AN con diferentes concentraciones de NaCl: 2%, 6%, 12% y 18%; este procedimiento se realizó con el fin de determinar la concentración de sal en la que la mayoría de las cepas microbianas puedan proliferar y para determinar si se trata de halófilos leves, moderados o extremos. Las condiciones de crecimiento correspondieron a las condiciones de su lugar de origen, 25°C por 2 días.

Preparación de inóculos

De acuerdo con el resultado anterior, se realizó un lavado de las colonias presentes en la caja Petri seleccionada (x% NaCl), con 10 µL de solución salina y se incorporó a un tubo de ensayo con 20 mL de CN modificado con x% NaCl, lo que constituyó un pre-inóculo. Se incubó a 25°C por 2 días.

Posteriormente, se inoculó 10 mL del pre-inóculo en un frasco autoclavable con 1000 mL de CN modificado con x% NaCl y se incubó hasta alcanzar una concentración $\geq 10^8$ UFC/mL.

Con el fin de determinar la concentración de microorganismos adecuada para obtener mejores resultados respecto a la reducción de la salinidad del suelo, se empleó

concentraciones de 0% como control negativo (CN), 25%, 50%, 75% y 100% v/v, a partir de la solución de cultivo de microorganismos halófilos. Dichos porcentajes se propusieron considerando un aumento gradual de la concentración desde 25 a 100% con el fin de determinar la concentración más baja a la que se pueden obtener resultados favorables.

Tabla 9

Preparación de Soluciones a Distintas Concentraciones.

Fuente	Concentración (%)	Solución
Cultivo Consorcio de microorganismos halófilos (CMH)	0	50 mL de agua destilada
	25	12.5 mL de cultivo en 37.5 mL de agua destilada
	50	25 mL de cultivo en 25 mL de agua destilada
	75	37.5 mL de cultivo en 12.5 mL de agua destilada
	100	50 mL de cultivo en 0 mL de agua destilada

Bioensayos

Bioensayo en suelo

El bioensayo se realizó en dos fases, la primera tuvo como objetivo evaluar la respuesta del suelo al tratamiento con el CMH, para lo cual se empleó un sistema cerrado con 0.5 Kg de SA, al que se le aplicó las distintas concentraciones del CMH. Este bioensayo se desarrolló por medio del diseño experimental siguiente:

Tabla 10*Diseño Experimental para Bioensayo en Suelo.*

Consortio Halófilo (X%)				
Control negativo	TRATAMIENTOS			
	T1	T2	T3	T4
0%	25%	50%	75%	100%
CN1	R1T1	R1T2	R1T3	R1T4
CN2	R2T1	R2T2	R2T3	R2T4
CN3	R3T1	R3T2	R3T3	R3T4
CN4	R4T1	R4T2	R4T3	R4T4
CN5	R5T1	R5T2	R5T3	R5T4

En este punto, se deseó determinar la concentración que logra reducir la CE_e , en el menor tiempo, hasta valores en los que se considere un suelo no salino (0.0 – 2.0 dS/m) o muy ligeramente salino (2.0 – 4.0 dS/m) o, de acuerdo con el valor de $CE_{1:1}$, suelo no salino (0.0 – 0.98 dS/m) y muy ligeramente salino (0.98 – 1.71 dS/m) También se tomará en cuenta el valor de pH de cada repetición.

Bioensayo de germinación

Para la segunda fase del bioensayo, se seleccionó el o los tratamientos que lleguen a valores ideales en cuanto a CE_e para la producción agrícola (< 4 dS/m), en el menor tiempo. Se incorporó al suelo semillas de maíz, considerando que esta planta es sensible a elevada CE y que es uno de los cultivos transitorios de mayor producción en la provincia de Manabí. Se tomó en cuenta un CN (suelo no tratado), control positivo (CP) (suelo no afectado) y el respectivo tratamiento (suelo tratado con CMH).

Tabla 11

Diseño Experimental para Bioensayo de Germinación.

Consortio Halófilo (X%)		
Control negativo	Control Positivo	TX
CN1	CP1	R1TX
CN2	CP2	R2TX
CN3	CP3	R3TX
CN4	CP4	R4TX
CN5	CP5	R5TX

En este punto se procura determinar qué concentración de CMH logra no solo reducir la salinidad del suelo sino también mejorar su capacidad de propiciar la germinación y de mantener vegetación a futuro.

Determinación de CE, pH y evaluación de la germinación de semillas

Las mediciones de la CE fueron tomadas directamente con un conductímetro en la solución suelo:agua 1:1. De igual manera, se determinó el valor de pH se empleando un pHmetro. Se determinó la CE y pH de cada repetición cada cuatro días.

Para el bioensayo de germinación se incorporaron semillas de maíz (*Zea mays*) certificadas de acuerdo al protocolo empleado por Hernández y colaboradores (2017), con ciertas modificaciones. Este ensayo tuvo la finalidad de determinar los efectos de la salinidad del suelo en la germinación y elongación de la radícula de las semillas al cabo de siete días, periodo de tiempo establecido de acuerdo a los métodos de ensayos de germinación de semillas agrícolas (The International Seed Testing Association (ISTA), 2016).

El bioensayo se llevó a cabo en condiciones de invernadero buscando mantener una temperatura similar al área de la que proceden las muestras de suelo. Para cada repetición de cada tratamiento, se colocaron cuatro semillas espaciadas pertinentemente. Al término del bioensayo, se registró el número de semillas que germinaron, considerando como criterio de germinación el surgimiento de radícula, de longitud mayor o igual a 2 mm y el cálculo del índice de germinación se determinó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$IG = \frac{Gt * Lrt}{Gc * Lrc} * 100 \quad (1)$$

Donde:

- **IG:** Índice de germinación.
- **Gt:** Número promedio de semillas germinadas en un tratamiento determinado.
- **Gc:** Número promedio de semillas germinadas en el tratamiento control (suelo no salino).
- **Lrt:** Longitud promedio de la radícula en plántulas de un tratamiento determinado.
- **Lrc:** Longitud promedio de la radícula en plántulas de un tratamiento control (suelo no salino).

Análisis estadístico de resultados

La validación de análisis de resultados se realizó con la ayuda un programa estadístico XLSTAT. Para el bioensayo de suelo, se aplicó un diseño experimental completamente aleatorizado (5 x 5) con cinco tratamientos (cuatro concentraciones diferentes del consorcio halófilo y uno control negativo) y cinco repeticiones para cada una. Se rechazó la hipótesis nula tras el análisis de varianza ANOVA y posteriormente se aplicó la Prueba de Tukey con la finalidad de comparar las medias individuales resultantes lo que nos permitió decidir y determinar que las diferencias de resultados entre tratamientos tienen valores promedio significativamente distintos.

Capítulo 4: Resultados

Fase de campo

El muestreo del P23 se realizó sin dificultad y de acuerdo con lo establecido en el Plan de Muestreo, los detalles y condiciones de este procedimiento se reflejan en la respectiva Ficha de Muestreo (Anexo 2). El muestreo de P31 no se llevó a cabo de acuerdo con lo planificado pues, de acuerdo con el testimonio del técnico, este punto fue muestreado en una piscina camaronera vacía y en esta ocasión se encontraba llena. Por este motivo, el punto de muestreo P31, se trasladó aproximadamente 100 m a la redonda. Los detalles y condiciones se reflejan en las respectivas Fichas de Muestreo (Anexo 2).

Las mediciones realizadas en campo se reflejan en las Tablas 12, 13 y 14.

Tabla 12

Datos Determinados en Campo de la Muestra P23, SNA.

Muestra	P23	T (°C) muest.	pH _{1:1} corr.	CE _{1:1} corr. (µS/cm)	CE _{1:1} (dS/m)
Simple	P23-1		7,36	68,182	0,07
Simple	P23-2		7,56	83,126	0,08
Simple	P23-3	28,3	7,62	90,598	0,09
Simple	P23-4		7,24	98,07	0,10
Simple	P23-5		7,09	73,786	0,07
Promedio			7,36		0,09

De acuerdo con los datos medidos en campo, para P23, el promedio de pH y de CE_{1:1} son 7,36 y 0,08 dS/m respectivamente.

Tabla 13

Datos Determinados en Campo de la Muestra P31, SA.

Muestra	P31	T (°C) muest.	pH_{1:1} corr.	CE_{1:1} corr. (µS/cm)	CE_{1:1} (dS/m)
Simple	P31-1		7,37	2472,65	2,47
Simple	P31-2		7,35	2325,6	2,33
Simple	P31-3	32,5	7,34	2504,1	2,50
Simple	P31-4		7,18	2425,9	2,43
Simple	P31-5		7,42	2536,4	2,54
Promedio			7,34		2,45

De acuerdo con los datos medidos en campo, para P31, el promedio de pH y de CE_{1:1} son 7,34 y 2,45 dS/m respectivamente.

Para el muestreo de SNS se emplearon recipientes estériles y se recolectaron dos muestras, una de ellas destinada exclusivamente para aislar el CMH (SNS1) y la segunda (SNS2) para determinar pH, CE, temperatura, humedad, MO. Los detalles y condiciones del muestreo se reflejan en la respectiva Ficha de Muestreo (Anexo 4). Estos resultados se reflejan en la Tabla 14.

Tabla 14

Datos Determinados en Campo de la Muestra SNS.

Muestra	SNS	T (°C) muest.	pH_{1:1} corr.	CE_{1:1} corr. (µS/cm)	CE_{1:1} (dS/m)
Simple	SNS1		—	—	—
Simple	SNS2	25,1	7,07	9974,01	9,97

La prueba cualitativa MOS se realizó empleando aproximadamente 20 g de suelo de cada muestra y agregando 10 mL de H₂O₂. Se observó y anotó el nivel de efervescencia

(ninguna, leve, modera y fuerte), producto de la reacción química entre H_2O_2 y la MOS. Los resultados de este ensayo realizado en campo se reflejan en la Tabla 15.

Tabla 15

Resultados de Prueba Cualitativa de MOS.

Muestra	Reacción con H_2O_2
P23	Efervescencia fuerte
P31	Efervescencia moderada
SNS2	Efervescencia leve

Fase de laboratorio

Esta fase se realizó en las instalaciones de un laboratorio de microbiología externo ubicado en la ciudad de Quito.

Aislamiento del consorcio halófilo

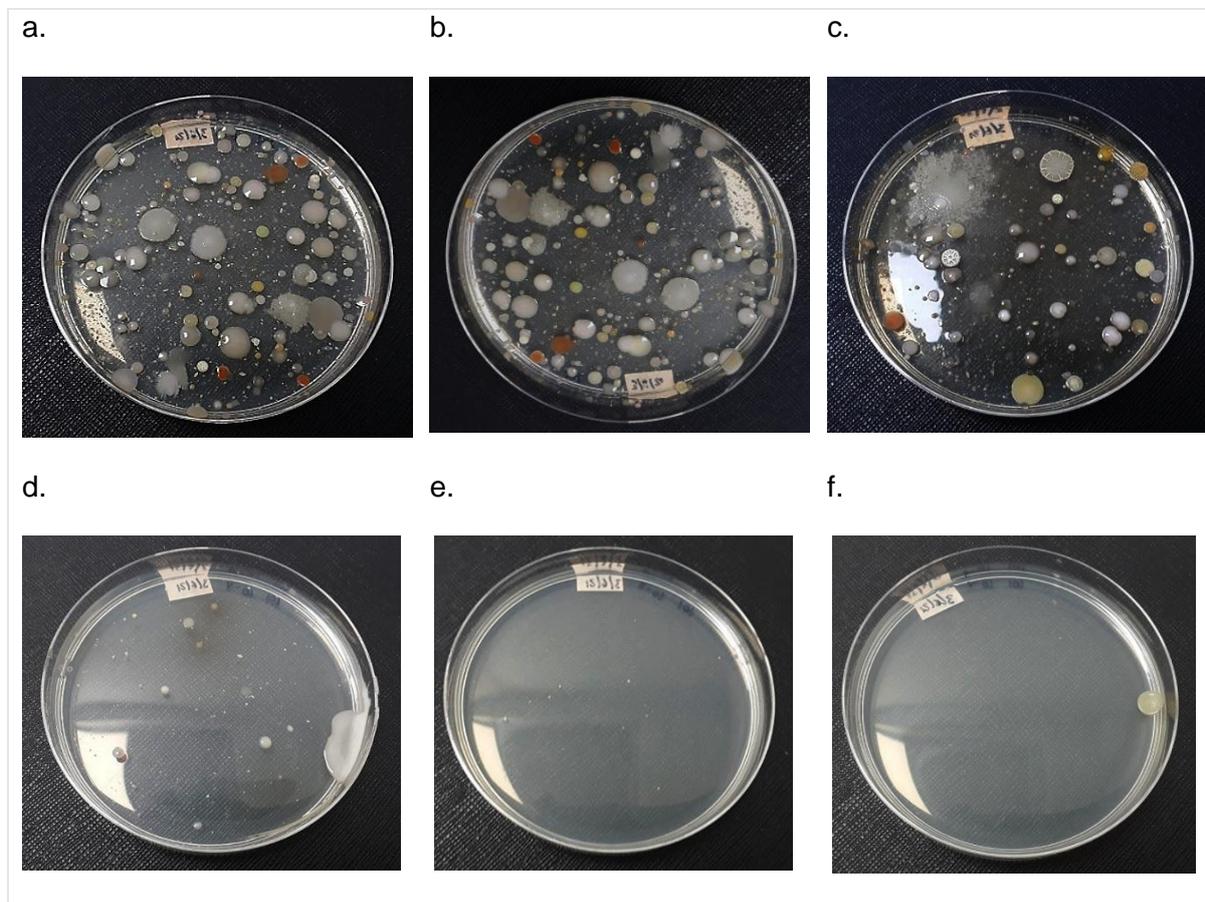
A partir de la muestra SNS1 obtenida en el Estuario del Río Chone, en la Isla Corazón; se realizó el aislamiento del CMH de acuerdo con la metodología anteriormente mencionada.

Recuento y cultivo primario

A partir de la muestra SNS1, se realizaron diluciones seriadas y posteriormente se sembró en AN modificado con 2% NaCl y se incubó a 25°C por 96 horas. Los resultados obtenidos se evidencian en la siguiente figura:

Figura 7

Resultado de Siembra en Cajas Petri con AN 2% NaCl. a). Dilución 10^{-1} . b). Dilución 10^{-2} . c). Dilución 10^{-3} . d). Dilución 10^{-4} . e). Dilución 10^{-5} . f). Dilución 10^{-6} .



El recuento de microorganismos se realizó a partir de la dilución 10^{-4} ya que estas cajas presentaron de entre 30 y 300 colonias. En la primera caja se contabilizaron 170 colonias, en la segunda 175 y en la tercera 174, dando un promedio de 173 colonias.

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{N^{\circ} \text{ colonias} * \text{Factor de dilución}}{\text{Vol. de siembra}} = \frac{173 * 10^4}{1 mL} = 1.7 \times 10^6 \frac{UFC}{mL} \quad (2)$$

Determinación de tolerancia a distintas concentraciones de NaCl

Se realizó la siembra del CMH aislado inicialmente, en AN con diferentes concentraciones de NaCl: 2%, 6%, 12 y 18%. Se incubó a 25°C por 48 horas. Los resultados de tolerancia a tales concentraciones se observan en la Figuras 5.

Figura 8

Resultado de Siembra en AN a). 2, b). 6, c). 12 y d). 18% NaCl.

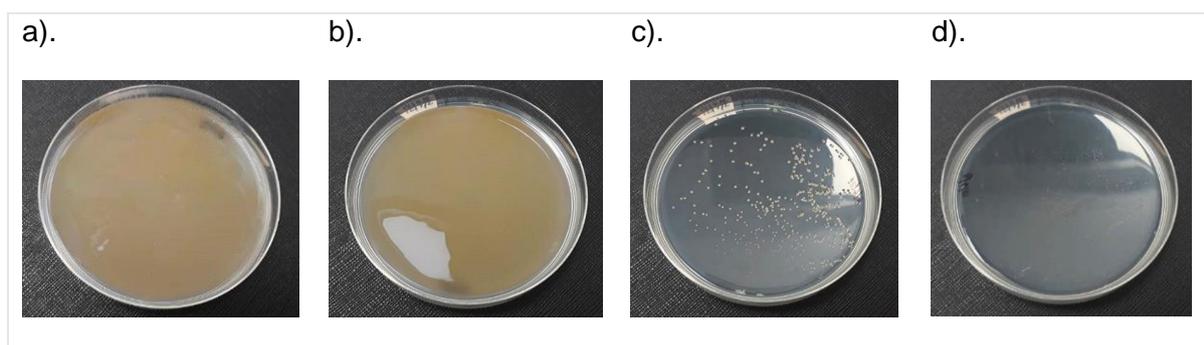


Tabla 16

Clasificación de Microorganismos Halófilos de Acuerdo con su Tolerancia a Distintas Concentraciones de NaCl.

% NaCl	Crecimiento observado	Clasificación de Macroorganismos Halófilos
2	Muy alto	Débilmente halófilos
6	Muy alto	Moderadamente halófilos
12	Medio	Límite extremadamente halófilos
18	Bajo	Extremadamente halófilos

Nota: Muy alto: crecimiento masivo, Alto: > 300 colonias, Medio: entre 30 y 300 colonias, Bajo: < 30 colonias, Ninguno: 0 colonias.

Preparación de inóculos

De acuerdo con el resultado obtenido de tolerancia a distintas concentraciones de NaCl, se realizó un lavado de las colonias presentes en el medio modificado con 2% NaCl. Se utilizó 10 µL de solución salina y se incorporó a un tubo de ensayo con 20 mL de CN modificado con 2% NaCl, lo que constituyó un pre-inóculo. Se incubó a 25°C por 2 días.

Finalmente, con el fin de mantener dentro del CMH la mayor diversidad de microorganismos, el inóculo final se preparó con 2% NaCl inoculando 10 mL del pre-inóculo en un frasco autoclavable con 1000 mL de CN modificado con 2% NaCl y se incubó hasta alcanzar una concentración $\geq 10^8$ UFC/mL. Se realizó un recuento por método pour plate y se obtuvo un resultado de $2,5 \times 10^8$.

A partir de este cultivo de microorganismos halófilos, se prepararon los inóculos finales a las distintas concentraciones, 0% como control negativo (CN), 25%, 50%, 75% y 100% v/v. Se prosiguió de acuerdo con lo detallado en la Tabla 7.

Bioensayos

Bioensayo en suelo

Se empleó un sistema cerrado con 0.5 Kg de SA al que se le aplicaron las distintas concentraciones del CMH. La temperatura en el interior del invernadero varió en un rango de 18 – 28°C y la humedad entre 40 – 70%. Los resultados promedio de CE_e en este bioensayo, al cabo de 32 días, se muestran en la Tabla 17 y su representación gráfica se evidencia en la Figuras 9.

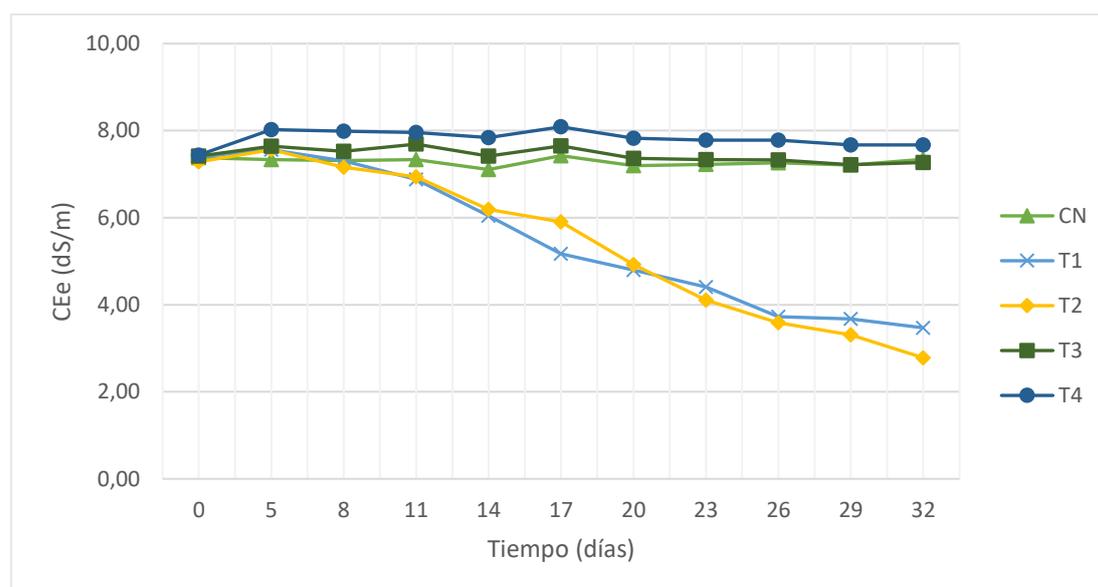
Tabla 17

Valores de CE_e Registrados en los Distintos Tratamientos Durante el Bioensayo en Suelo.

Medición	T°C	CN	T1	T2	T3	T4
M0	20,1	7,381	7,399	7,280	7,415	7,439
M1	20,3	7,334	7,560	7,562	7,642	8,027
M2	21,1	7,314	7,305	7,159	7,522	7,986
M3	22,6	7,333	6,879	6,938	7,690	7,959
M4	22,6	7,106	6,043	6,188	7,415	7,839
M5	22,5	7,424	5,171	5,905	7,647	8,087
M6	22,6	7,191	4,797	4,923	7,366	7,826
M7	22,5	7,222	4,406	4,110	7,332	7,784
M8	22,6	7,258	3,724	3,584	7,325	7,783
M9	22,3	7,210	3,675	3,305	7,217	7,669
M10	21,1	7,341	3,471	2,782	7,268	7,675

Figura 9.

CE_e de Cada Tratamiento vs. Tiempo.



Los valores de CEE de los tratamientos 1 y 2 disminuyeron considerablemente respecto a los demás tratamientos. Tras confirmar la distribución normal de los datos mediante la prueba de Shapiro Wilks, se procedió a realizar un análisis de varianza. El análisis estadístico ANOVA ($\alpha = 0,05$) refleja que existe diferencia significativa entre las medias de los tratamientos ($F_{obs} > F_{\alpha}$) (Tabla 18) respecto al tiempo y a la concentración del inóculo. Dado este resultado, se prosiguió con la prueba de Tukey.

Tabla 18

Análisis de Varianza de Dos Factores con Una Sola Muestra por Grupo.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	25,557	10	2,556	3,213	0,004	2,077
Columnas	57,418	4	14,355	18,047	1,528E-08	2,606
Error	31,816	40	0,795			
Total	114,791	54				

Los resultados de la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) indicaron que, de acuerdo con la comparación de medias (Tabla 19), existen diferencias significativas entre los tratamientos T1 y T2 y el resto de los tratamientos (CN, T3 y T4) y que entre T1 y T2 no existe diferencia. El detalle de los resultados de esta prueba estadística se adjunta en el Anexo 3.

Tabla 19

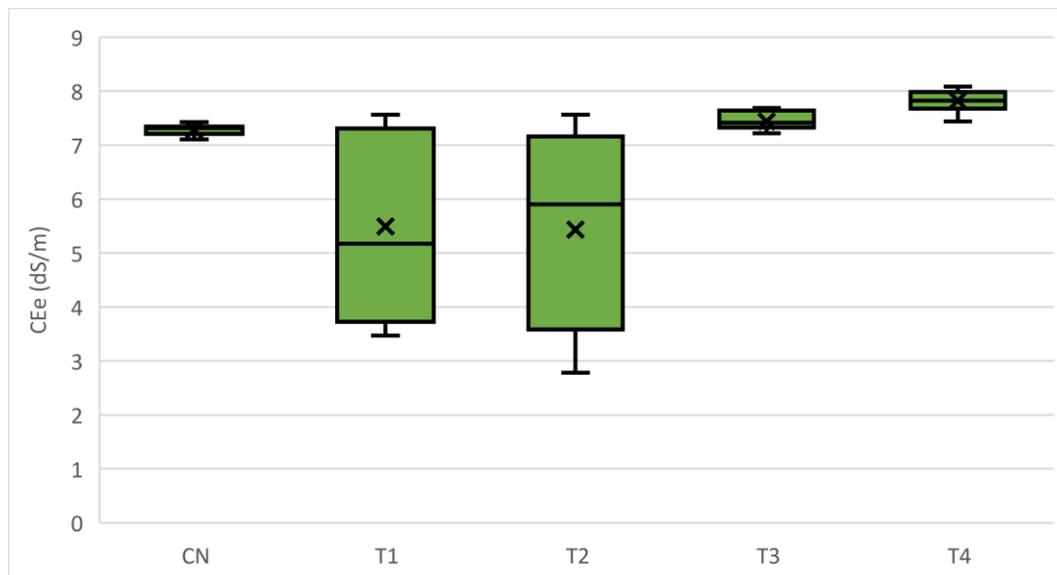
Medias de los Tratamientos.

Tratamiento	Medias
CN	7,283
T1	5,494
T2	5,431
T3	7,440
T4	7,825

Por otro lado, los resultados obtenidos para CN, T3 y T4 son estadísticamente iguales. La Figura 10 es la representación gráfica de esta prueba.

Figura 10

Comparación de Medias de Cada Tratamiento.



Los resultados promedio de pH en este bioensayo, al cabo de 32 días, se muestran en la Tabla 20 y su representación gráfica se evidencia en la Figuras 11.

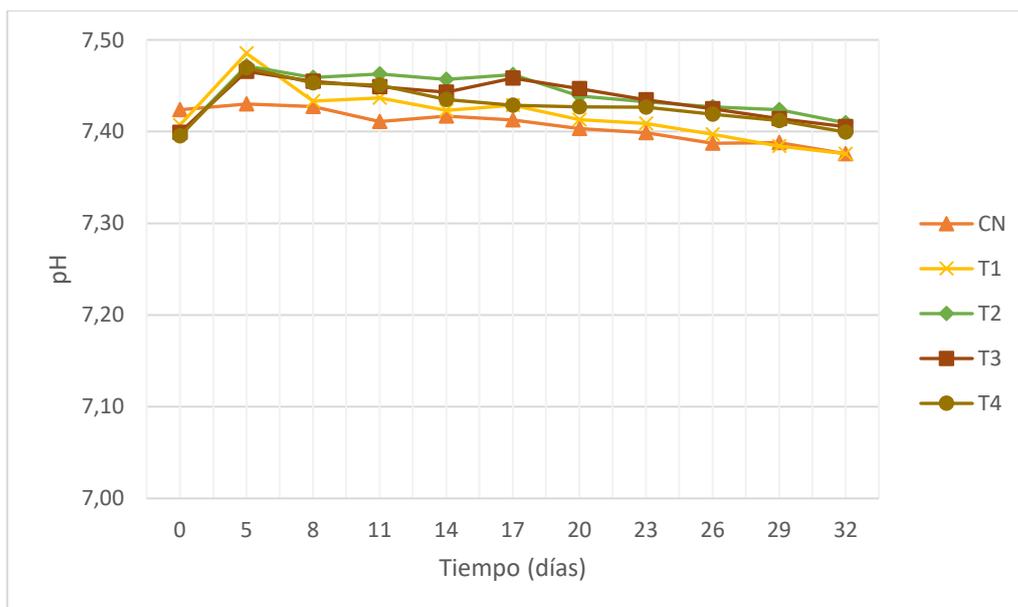
Tabla 20

Valores de pH Registrados en los Distintos Tratamientos Durante el Bioensayo en Suelo.

Medición	T°C	CN	T1	T2	T3	T4
M0	20,1	7,42	7,41	7,40	7,40	7,40
M1	20,3	7,43	7,49	7,47	7,47	7,47
M2	21,1	7,43	7,43	7,46	7,45	7,45
M3	22,6	7,41	7,44	7,46	7,45	7,45
M4	22,6	7,42	7,42	7,46	7,44	7,43
M5	22,5	7,41	7,43	7,46	7,46	7,43
M6	22,6	7,40	7,41	7,44	7,45	7,43
M7	22,5	7,40	7,41	7,43	7,43	7,43
M8	22,6	7,39	7,40	7,43	7,42	7,42
M9	22,3	7,39	7,38	7,42	7,41	7,41
M10	21,1	7,38	7,38	7,41	7,41	7,40

Figura 11

pH_{1:1} de Cada Tratamiento vs. Tiempo.



Puede evidenciarse que el pH no varió en gran medida respecto al tiempo en ninguno de los tratamientos y como puede observarse, existe una ligera tendencia a disminuir conforme transcurre el tiempo.

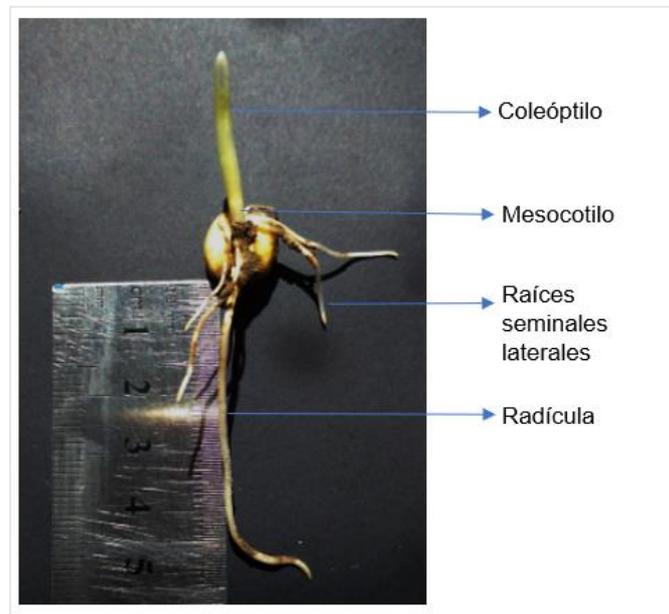
Bioensayo de germinación

Los tratamientos T1 y T2, a los cuales se había incorporado 25% y 50% del cultivo CMH, tardaron 32 días en llegar a valores de CE_e inferiores a 4 dS/m. Tomando en cuenta que los tratamientos T3 y T4 no registraron valores de CE_e inferiores a 4 dS/m, no fueron considerados para este bioensayo. En T1 y T2 se incorporaron semillas de maíz certificadas, específicamente semillas de Maíz Duro, variedad INIAP-543 QPM, procedente de la estación INIAP Portoviejo. Se consideraron: CN (suelo no tratado), CP (suelo no afectado, P23) y los tratamientos T1 y T2 (suelo tratado con CMH).

El bioensayo se llevó a cabo en condiciones de invernadero en donde se registró una temperatura mínima de 18°C y máxima de 28°C. Se colocaron cuatro semillas de maíz espaciadas pertinentemente, en cada una de las repeticiones. Al cabo de siete días, se registró el número de semillas que germinaron, se midió la longitud de la radícula y se realizó el cálculo del IG.

Figura 12

Semilla de Maíz Germinada.



El detalle de los resultados recopilados en este ensayo se refleja en la Tabla 21.

Tabla 21

Resultados del Bioensayo de Germinación.

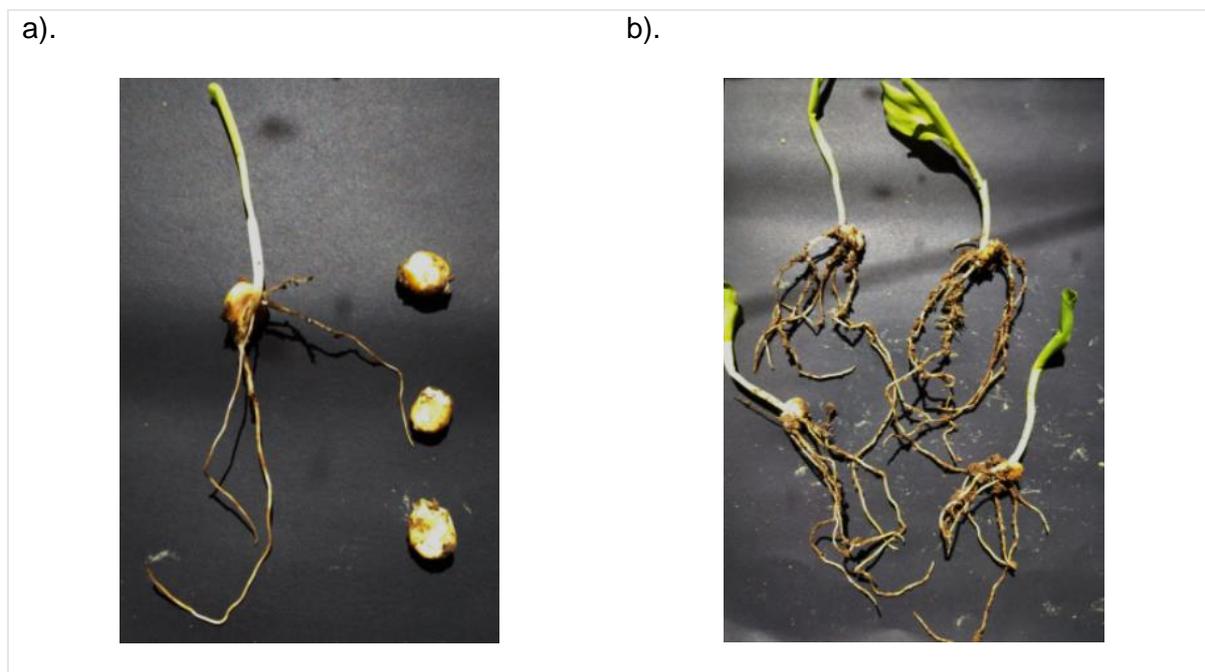
Tratamiento	N° semillas germinadas	Long. Radícula	Promedio	Tratamiento	N° semillas germinadas	Long. Radícula	Promedio	Tratamiento	N° semillas germinadas	Long. Radícula	Promedio	Tratamiento	N° semillas germinadas	Long. Radícula	Promedio
CN1	2	6	6,75	T1R1	4	4,5	9,75	T2R1	4	19	17,875	CP1	4	21	18,88
		21				12				19,5				15,5	
		0				11				16				18	
		0				11,5				17				21	
CN2	0	0	0,00	T1R2	3	11	8,25	T2R2	4	12	11,125	CP2	4	10	11,88
		0				12,5				12,5				14	
		0				9,5				7,5				8,5	
		0				0				12,5				15	
CN3	1	11,5	2,88	T1R3	2	14,5	7,00	T2R3	4	17	12	CP3	4	20	18,25
		0				13,5				15				15	
		0				0				11,5				20	
		0				0				4,5				18	

Tratamiento	N° semillas germinadas	Long. Radícula	Promedio	Tratamiento	N° semillas germinadas	Long. Radícula	Promedio	Tratamiento	N° semillas germinadas	Long. Radícula	Promedio	Tratamiento	N° semillas germinadas	Long. Radícula	Promedio
CN4	1	9	2,25	T1R4	4	8,5	10,38	T2R4	3	12	9,25	CP4	4	26	17,13
		0				13,5				12				17	
		0				8				13				14	
		0				11,5				0				11,5	
CN5	1	14	3,50	T1R5	4	10,5	9,50	T2R5	4	12	12,5	CP5	4	11,5	15,13
		0				11				11,5				6	
		0				10				11				19	
		0				6,5				15,5				24	
Promedio semillas germinadas:	1	Promedio long. radícula:	3,08	Promedio semillas germinadas:	3,40	Promedio long. radícula:	8,98	Promedio semillas germinadas:	3,80	Promedio long. radícula:	12,55	Promedio semillas germinadas:	4,00	Promedio long. radícula:	16,25

El promedio más alto de semillas germinadas corresponde al CP, al igual que el promedio más alto de longitud de radícula. Por otro lado, los valores más bajos de ambos parámetros corresponden al CN.

Figura 13

Comparación de Semillas de Maíz Germinadas. a). Control Negativo. b). Control Positivo.

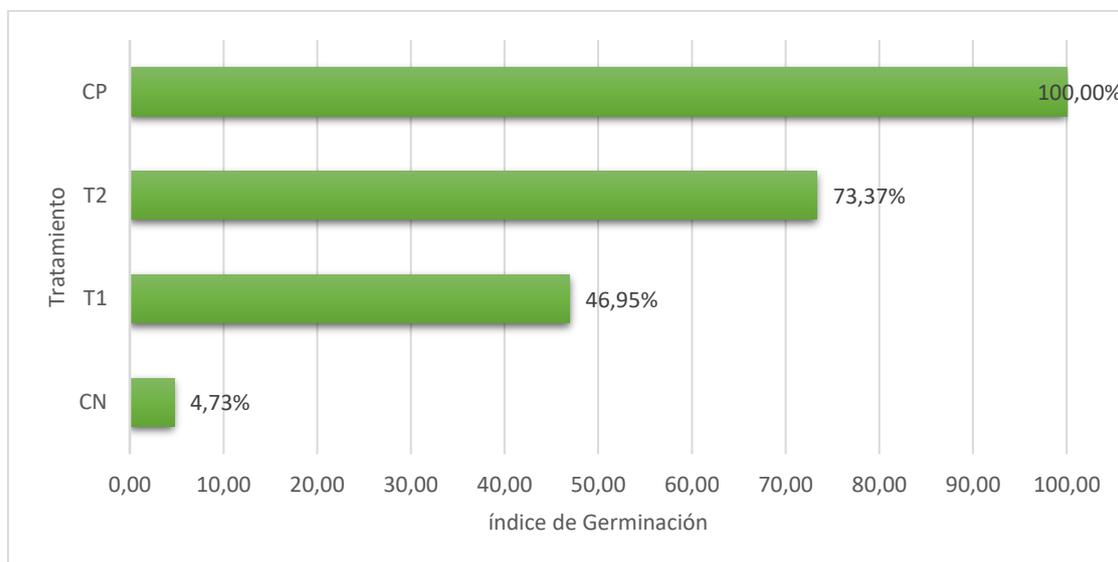


Como puede observarse en la Figura 13, la germinación de semillas en el CN fue escasa y en ocasiones nula, contraria a la germinación que se observó en el CP donde a más del un mayor desarrollo del sistema radicular, en el mismo periodo de tiempo, se observó el crecimiento de primera y segunda hoja en algunos casos.

Los IG calculados de acuerdo con la fórmula (1) fueron 4,73%, 46,95%, 73,37% y 100,00% para CN, T1, T2 y CP respectivamente.

Figura 14

Índices de Germinación de CP, T2, T1 y CN.



La Figura 14 muestra la evidente diferencia entre los IGs calculados para cada tratamiento, incluidos los controles negativo y positivo.

Capítulo 5: Discusión

Fase de campo

Los valores de pH y $CE_{1:1}$ de un suelo no salino se encuentran entre 6,5 - 7,5 y 0,0 – 0,98 dS/m respectivamente, en la solución suelo:agua 1:1 (USDA, 1999). El mismo autor denomina como suelo muy ligeramente salino si la $CE_{1:1}$ 0,98 – 1,71 dS/m, suelo ligeramente salino si la $CE_{1:1}$ 1,71 – 3,16 dS/m, suelo moderadamente salino si la $CE_{1:1}$ 3,16 – 6,07 dS/m y suelo fuertemente salino si $CE_{1:1} > 6,07$ dS/m. Considerando esta clasificación, P23 con promedios de pH = 7,36 y CE = 0,08 dS/m, puede ser considerado un suelo sin problemas de salinidad. Por otro lado, P31 con promedios de pH = 7,39 y $CE_{1:1} = 2,35$ dS/m, puede ser considerado un suelo ligeramente salino. La muestra de SNS tomada de la Isla Corazón, se clasifica como suelo fuertemente salino al presentar un pH = 7,07 y $CE_{1:1} = 9,97$ dS/m.

Además, tomando en cuenta que los valores de pH no supera 8,5 en ningún caso, se puede dejar de lado la posibilidad de que se trate de suelos clasificados como sódicos o salino-sódicos (Rueda et al., 2009).

Estos resultados son consecuentes con el sitio en el que se tomaron las distintas muestras. El punto de muestreo P23 corresponde a una zona agrícola cercana a un río y lo suficientemente alejado de las presas y de actividades camaroneras, tanto como para no verse afectado por las éstas. Por el contrario, el punto de muestreo P31 se encuentra cerca de la presa Simbocal y es una zona en la que existen piscinas camaroneras, siendo ambas las presuntas razones por la que el suelo de la zona presenta elevada salinidad ya que una presa contribuye a la acumulación de sales a causa del bloqueo de las vías de drenaje natural del suelo y aumento del nivel freático en la zona (Nayakekorale, 2020). Por otro lado, acuicultores aplican grandes cantidades de cal con el fin de aumentar el pH y consecuentemente desinfectar fondos y agua del estanque (Boyde, 2017).

La razón por la que la muestra P31 presenta valores de pH < 7.5 a pesar de encontrarse en el área de piscinas camaroneras puede deberse a su textura, pues los

suelos arcillosos presentan un fuerte poder buffer, es decir, son resistentes a modificar su pH. Entonces, considerando que el suelo del punto P31 posee arcillas de tipo 2:1 y un moderado porcentaje de MO (de acuerdo con la prueba cualitativa de MOS), se puede inferir que ambas características confieren a este suelo una elevada capacidad de amortiguar cambios de pH (Bennardi et al., 2018).

La elevada CE de la muestra SNS, tomada en el Estuario del Río Chone, en la Isla Corazón, esta relaciona al hecho de que el agua del estuario es una mezcla entre agua dulce procedente del Río Chone y agua salada procedente del Océano Pacífico, en otras palabras, se trata de una isla rodeada de agua salobre y suelo fangoso en el que se desarrollan diferentes especies de mangle, manteniendo un ecosistema de manglar equilibrado, biodiverso y protegido por las comunidades ribereñas del sector (Ministero del Ambiente, 2015).

La MOS, está relacionada con propiedades físicas, químicas y biológicas. Un bajo contenido de MOS es indicador de un suelo con mala salud, disfuncional e incapaz de suministrar servicios ecosistémicos (Lal, 2020). De acuerdo con Wood (1995), la MOS puede clasificarse en viva (<4%) y no viva (>90%); la primera incluye raíces, biomasa macro y microbiana, la segunda incluye MO transformada y MO fresca. Se considera que la prueba cualitativa de MO con H_2O_2 , refleja solamente la MO viva ya que son los organismos vivos quienes sintetizan la enzima catalasa capaz de descomponer el H_2O_2 en H_2O y O_2 , reacción puede observarse como efervescencia en la muestra (FAO, 1996).

En campo, la prueba cualitativa de MOS reflejó que P23, cuya reacción con H_2O_2 dio como resultado abundante efervescencia, tiene un alto contenido de MO viva (Wood, 1995), lo que es congruente y respalda el hecho de que se seleccionara este punto como SNA y apto para ser empleado como control positivo en el bioensayo de germinación. Por otro lado, P31 tuvo una reacción de efervescencia moderada respecto a la reacción observada en P23. Tal resultado indica que a pesar de éste tener una elevada concentración de sales, posee un buen porcentaje de MO viva.

Por último, la reacción de efervescencia de la muestra SNS2 fue leve en comparación a la reacción observada en P23. La salinización afecta directamente a los procesos fisiológicos y bioquímicos de los seres vivos del entorno afectado (Aristizabal et al., 2019); considerando que SNS2 es un suelo fuertemente salino por su elevada $CE_{1:1}$ (9.97 dS/m), es de esperarse que este suelo tenga una limitada cantidad de MO viva y que solamente ciertos organismos adaptados a tales condiciones de salinidad, sobrevivan y proliferen.

Fase de laboratorio

Las diferentes técnicas microbiológicas existentes para el cultivo y recuento microbiano de una muestra de suelo no garantizan que todos los organismos proliferen. Existen microorganismos no cultivables los cuales no se han podido desarrollar en condiciones de laboratorio. Además, otros organismos como algas y hongos solamente logran proliferar en medios específicos (Kumar et al., 2012). En este caso, la técnica empleada para aislar el CMH garantiza el desarrollo de células viables, aerobias y halófilas o halotolerantes (Ramos, 2004, Kumar et al., 2012); obteniendo como resultado del recuento microbiano: 1.7×10^6 UFC/ g de suelo.

Según Daoud & Ben Ali (2020), los microorganismos halófilos pueden ser clasificados de acuerdo a su tolerancia a distintas concentraciones de salinidad (Tabla 8). Para determinar qué clase de microorganismos halófilos se pudieron cultivar en el laboratorio, se sometieron a concentraciones de 2, 6, 12 y 18% NaCl. Los resultados de este ensayo indicaron que en el CMH aislado están presentes microorganismos halófilos débiles y moderados, correspondientes a concentraciones de NaCl de 2 y 6%, donde se observó crecimiento masivo al cabo de 48 horas. En el mismo intervalo de tiempo, en las concentraciones 12% hubo crecimiento medio o moderado (entre 30 y 300 colonias) y en la concentración de 18% se evidenció crecimiento bajo (< 30 colonias), confirmando la presencia de microorganismos halófilos extremos.

Bioensayos

Bioensayo en suelo

De acuerdo con Ramos & Zúñiga (2008), la actividad de los microorganismos está influenciada por factores de su entorno como pH, temperatura, humedad, disponibilidad de nutrientes y oxígeno, en caso de aerobios. Durante el bioensayo en suelo el pH se mantuvo sin mayores variaciones (7,38 – 7,49) al igual que la humedad (40 – 60%), en todos los tratamientos incluyendo el control. Por otro lado, la temperatura mínima registrada en el interior del invernadero fue de 19°C y la más alta fue de 28°C. Además, la temperatura promedio mínima registrada en cada medición fue de 20,1°C y la máxima fue de 22,6°C. Los valores más altos de temperatura coinciden con disminuciones más grandes de CE mientras que las más bajas reflejan lenta o poca disminución de CE. Considerando tales resultados, se puede constatar que efectivamente la variación de temperatura influye en la actividad microbiana.

La selección de la concentración de NaCl del inoculo final se realizó de acuerdo con el grado de afectación del SA ($CE_{1:1} = 2,97$ dS/m, $CE_e = 7,48$ dS/m), suelo levemente salino (USDA, 1999), y, considerando que 2% NaCl se encuentra dentro del rango de salinidad leve y abarca la posibilidad de crecimiento de bacterias halófilas leves, moderadas y halotolerantes (Daoud & Ben Ali, 2020); 2% de NaCl fue el porcentaje elegido para la preparación del inóculo a aplicarse en el suelo.

Anteriores estudios han confirmado la capacidad de las bacterias halófilas para capturar Na^+ a nivel *in vitro*, lo que ha puesto a consideración prácticas de biorremediación empleando estos microorganismos. Se sabe que los organismos halófilos son capaces de adaptarse a condiciones de elevada salinidad gracias a los mecanismos Salt-In (acumulación de sales) y Salt-Out (acumulación de solutos orgánicos). El primero, constituye una adaptación propia de halófilos extremos y algunos halófilos moderados, mientras que, la segunda adaptación, ha sido descrita en halófilos leves, moderados y organismos halotolerantes. Puesto que en el bioensayo se empleó un inoculo con 2% de

NaCl, se puede suponer que los microorganismos que conforman dicho consorcio son halófilos leves, moderados y halotolerantes, con poca o ninguna posibilidad de la presencia de halófilos extremos.

Entre las sales predominantes que pueden encontrarse en un suelo salino está: Na_2SO_4 , NaCl, CaCO_3 , CaSO_4 , NaHCO_3 . Además, regularmente la salinidad en el suelo se presenta en climas áridos, semiáridos y subhúmedos, en áreas con periodos prolongados de sequía y particularmente en zonas costeras (Courel, 2019), aspectos que coinciden con el suelo problema empleado en este ensayo y que se suman a las causas de salinidad secundaria o antrópica anteriormente mencionada.

Los resultados reportados por Lara & Carrera (2019), revelan que P31 presenta una elevada $\text{CE}_{1:1}$ (7,45 dS/m), CE_e (19,80 dS/m), relacionada con la presencia de los iones tales como Na^+ (22,00 meq/L), Ca^{2+} (30,00 meq/L), Mg^{2+} (19,00 meq/L) y K^+ (2,82 meq/L). Se ha informado que ciertos halófilos requieren de altas concentraciones de iones Mg^{2+} y que los requerimientos de K^+ son solamente un poco más altos que los que se han reportado para otros organismos además que, Na^+ , K^+ y Cl^- son componentes mayoritarios de la sal interna de microorganismos halófilos (Larsen, 1967; Sánchez & Arguello, 2006; Muntyan et al., 2015). Es decir, la reducción de la CE en el suelo, específicamente en los tratamientos T1 y T2, puede deberse a fenómeno de absorción de las sales presentes en el suelo por parte de los microorganismos que conforman el CMH aislado.

Además, estudios realizados por Oren (2008), Müller & Saum (2005) y Faraj y sus colaboradores (2016), reportan que el crecimiento de ciertos organismos halófilos es dependiente de Na^+ y que son capaces de absorberlo y utilizarlo para realizar diversas reacciones energéticas, es decir, el Na^+ se moviliza constantemente y el equilibrio osmótico se logra mantener mediante el transporte activo primario o secundario (como se citó en Aristizabal et al., 2019). Por ende, al agregar un CMH en un suelo con elevada concentración de sales, como lo es el SA empleado en este estudio, es de esperarse que tales microorganismos sean los responsables de reducir gradualmente los valores de CE.

Al cabo de 32 días, T1 y T2, partiendo de CE_e 7,40 dS/m y 7,28 dS/m, llegaron a valores de CE_e de 3,47 dS/m y 2,78 dS/m respectivamente, cifras que, al tratarse estadísticamente, reflejan diferencias significativas entre estos tratamientos y el CN, es decir, la hipótesis de que el proceso de bioaumentación, empleando un CMH, en muestras de suelo con elevada salinidad del cantón Chone, reduce la concentración de sales, es aceptada ($F_{obs} > F_{\alpha}$). Al ser ambos resultados menores a 4 dS/m, se puede anunciar que fue posible disminuir la CE al punto de concluir que se pasó de un suelo ligeramente salino a uno muy ligeramente salino de acuerdo con el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) (1999), para el cual se ha descrito una reducción de rendimiento únicamente de cultivos muy sensibles a salinidad.

Courel (2019), menciona que la acumulación de sales otorga al suelo una buena fertilidad física al favorecer la formación de agregados y mejorar así la estructura del suelo. Sin embargo, químicamente hablando, estas sales pueden propiciar un cambio de pH, mismo que interferiría en la disponibilidad de nutrientes, la cual es mayor en suelos ligeramente ácidos (6,0 – 7,0). Tales afirmaciones explicarían el hecho de que el suelo inoculado con CMH, específicamente de los tratamientos T1 y T2, mostraron un poco apreciable cambio en su estructura ya que, al inicio, los agregados eran visualmente evidentes y conforme el paso del tiempo, se observó desfloculación. Por otro lado, y a favor, la leve tendencia del pH a disminuir respalda la eficacia de los microorganismos incorporados al suelo.

Bioensayo de germinación

Para el bioensayo de germinación se emplearon semillas de maíz certificadas procedentes de la estación INIAP Portoviejo a fin de garantizar su viabilidad y la germinación homogénea. El maíz se considera como un cultivo moderadamente sensible a la salinidad del suelo, teniendo un rendimiento máximo (100%) a $CE_e = 1,1 - 1,7$ dS/m, este rendimiento se reduce a la mitad (50%) a $CE_e = 3,9$ dS/m (Torres & Acevedo, 2008). Por

tanto, las semillas de maíz se consideraron como idóneas para evaluar su germinación en un suelo salino (CN), un suelo no salino (CP) y un suelo inoculado con un CMH (T1 y T2).

La primera fase del proceso de germinación consiste en la absorción de agua por parte de la semilla, hinchamiento y ruptura de la testa. En la segunda fase se desenlaza la actividad enzimática, el metabolismo respiratorio y la translocación y asimilación de reservas alimenticias para el desarrollo del embrión. La última fase consiste en la división celular, emergencia de la radícula y posteriormente de la plúmula (Martínez et al., 2015).

En el bioensayo de germinación la CEe del CN fue 7,3 dS/m (suelo salino), para el CP se registró una CEe de 0,44 dS/m (suelo no salino) y para T1 y T2 3,5 y 2,7 dS/m (suelo muy ligeramente salino) respectivamente. Los IG calculados y reflejados en la Figura 14, indican que se registró el menor IG para el CN (4,73 %), seguido de T1 (46,95 %) y T2 (73,37 %), todos éstos comparados con el CP, el cual obtuvo un IG de 100 %. Tales resultados pueden explicarse a razón de que la elevada salinidad repercute sobre el suelo y la vegetación alterando aspectos como las relaciones hídricas, balances energéticos y nutrición (Ladeiro, 2012). Además, de acuerdo con Goykovic y sus colaboradores (2014), la disminución del potencial hídrico a causa de la elevada salinidad del suelo impide la absorción de agua por parte de la semilla durante la primera fase de la germinación y en ocasiones, este proceso se ve inhibido o retardado ya que las semillas no podrían hidratarse.

Capítulo 6: Conclusiones

La muestra de suelo aledaña a la presa Simbocal, P31, presentó valores de CE superiores a los aceptables y suficientes para ser clasificado como un suelo afectado por elevada concentración de sales. Por el contrario, P23, al ser una muestra obtenida lejos de la influencia de presas y donde no existen actividades camaroneras, resultó acoplarse a valores admisibles de pH y CE y ser idóneo para considerar un CP en el bioensayo de germinación.

Se obtuvo un CMH a partir de la muestra de suelo recolectada en el ecosistema de manglar ubicado en el estuario del Río Chone - Isla Corazón. De acuerdo con los resultados de apreciación de tolerancia a distintas concentraciones de NaCl, se determinó que el CMH aislado estaba conformado por halófilos débiles, moderados y extremos; llegando a proliferar en concentración de NaCl > 17,5%.

Se logró la disminución de los valores de CE en el suelo al que se inoculó el CMH aislado a partir de una muestra de SNS obtenida en Manabí - Isla Corazón. Sin embargo, se observó que la concentración de dicho inóculo juega un papel importante ya que únicamente se redujo la CE en los tratamientos T1 y T2, inoculados con concentraciones de 25 y 50% de CMH. Diferentes fueron los resultados para T3 y T4, inoculados con 75 y 100% de CMH, tratamientos en los que la CE aumentó y a pesar de que, al cabo del bioensayo en suelo, se evidenció una ligera tendencia a reducir, no llegaron a valores de CE inferiores a 4 dS/m.

Se realizó un bioensayo de germinación cuyos resultados reflejan la eficacia de emplear microorganismos halófilos para tratar suelos afectados por elevada salinidad. Los IGs calculados demostraron un mayor porcentaje de germinación en los tratamientos T1(46,95 %) y T2 (73,37 %), tratamientos que, en el bioensayo en suelo, registraron los valores más bajos de CE.

Los resultados obtenidos al finalizar este proyecto sugieren que un CMH tiene potencial para la recuperación de suelos de Chone afectados por altas concentraciones de sales. Tras poner a prueba la funcionalidad de dicho CMH aislado a partir de una muestra de SNS, es correcta la hipótesis de que al incorporar estos microorganismos en muestras suelo afectado es posible la reducción de la salinidad del suelo y el mejoramiento de sus propiedades para fines agrícolas.

En términos generales, es viable recuperar un CMH de un suelo naturalmente salino e inocularlos a un suelo afectado por elevada salinidad y obtener resultados favorables, sin la necesidad de identificar los microorganismos que conforman el consorcio, evaluando únicamente su funcionalidad.

Capítulo 7: Recomendaciones

Se recomienda realizar bioensayos similares a los de este proyecto, en la localidad de la cual proceden las muestras, con el fin de que la temperatura y de presión atmosférica no varíe drásticamente.

Con el fin de conocer hasta que valores de CE se puede llegar al inocular un CMH en el suelo, es recomendable extender el tiempo de toma de mediciones de este parámetro, así como de pH.

Es necesario que a continuación de un bioensayo de germinación se continúe evaluando el crecimiento y desarrollo de las plantas ya que, si bien los resultados obtenidos son favorables, la germinación solamente es una pequeña parte de la vida de un cultivo. A futuro pueden considerarse variables agronómicas y porcentajes de productividad.

Considerando los resultados de funcionalidad del CMH, se podría realizar un estudio taxonómico de los microorganismos presentes en el consorcio, evaluar su estabilidad en el tiempo y bajo diferentes condiciones. Para ello se pueden emplear técnicas moleculares no dependientes del cultivo microbiológico, con lo cual se tendría una visión más amplia de toda la población de organismos que coexisten en el ecosistema de manglar y que potencialmente podrías ser utilizados en la biorremediación de suelos salinos.

Finalmente, se recomienda emprender un estudio *in situ* y evaluar y recopilar datos, a corto y largo plazo, del accionar de este CMH aislado a partir de una muestra de SNS de la zona.

Capítulo 8. Bibliografía

- Aristizabal, A., Mora, C., & Corredor, W. (2019). Bacterias halófilas con potencial para la recuperación de suelos salinizados en Sáchica-Boyacá, Colombia. *Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol. ISSN, 67(3)*, 621–632.
- Arora, S., Singh, A. K., & Singh, Y. P. (2017). Bioremediation of salt affected soils: An Indian perspective. *Bioremediation of Salt Affected Soils: An Indian Perspective*, 1–313.
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-48257-6>
- Arora, S., & Vanza, M. J. (2018). *Halophilic Microbial Ecology for Agricultural Production in Salt Affected Lands*. 203–229. https://doi.org/10.1007/978-3-319-99076-7_7
- Bennardi, D., Gorostegui, A., Pellegrini, A., Vázquez, M., & Luciano, J. (2018). Evaluación de la Capacidad Buffer de Suelos ácidos de la Región Pampeana. *Ciencia Del Suelo*, 36(1), 124–137.
http://repositorio.inta.gob.ar/bitstream/handle/20.500.12123/3813/INTA_CIRN_Instituto deSuelos_Behrends Kraemer_F_Análisis_de_la_erosividad_de_las_lluvias.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Boyde, C. (2017). *La cal desempeña un papel crucial en el manejo de estanques acuícolas* « *Global Aquaculture Advocate*. https://www.aquaculturealliance.org/advocate/la-cal-desempena-un-papel-crucial-en-el-manejo-de-estanques-acuicolas/?fbclid=IwAR2pHO5_TlfaMfs7Hzj90Ho-7E3JRMd7cbgAosR50kq2vMMyn3rPqSHdrCc
- Briones, M. A. (2015). *Determinación de la salinidad del agua y suelos del proyecto propósito múltiple Chone, Manabí - Ecuador*. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Matriz Sangolquí.
- Choudhary, D. K., Varma, A., & Tuteja, N. (2017). Plant-Microbe Interaction: An Approach to Sustainable Agriculture. In *Plant-Microbe Interaction: An Approach to Sustainable Agriculture* (Issue December). <https://doi.org/10.1007/978-981-10-2854-0>
- Courel, G. (2019). Suelos Salinos y Sódicos. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9, pp. 1689–1699).
- Daoud, L., & Ben Ali, M. (2020). Halophilic microorganisms: Interesting group of extremophiles with important applications in biotechnology and environment. In *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles*. INC.
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818322-9.00005-8>

- Delgado, A., & Gómez, J. (2016). Principles of Agronomy for Sustainable Agriculture. In *Principles of Agronomy for Sustainable Agriculture*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-46116-8>
- Edbeib, M. F., Wahab, R. A., & Huyop, F. (2016). Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(8), 1–23. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2081-9>
- FAO. (1996). *Ecología y enseñanza rural : nociones ambientales básicas para profesores rurales y extensionistas*.
- FAO. (2015). *Las funciones del suelo*.
<http://www.fao.org/resources/infographics/infographics-details/es/c/294325/>
- FAO. (2020). *El Manejo de Suelos Afectados por Salinidad*. Portal de Suelos de La FAO.
- Giri, B., & Varma, A. (2019). *Microorganisms in Saline Environments: Strategies and Functions* (Issue May 2020). <https://doi.org/10.1007/978-3-030-18975-4>
- Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal del Cantón Chone. (2014). *PLAN DE DESARROLLO Y ORDENAMIENTO TERRITORIAL DEL CANTÓN CHONE 2014-2019*.
- Goykovic, V., Nina, P., & Calle, M. (2014). Efecto de la Salinidad Sobre la Germinación y Crecimiento Vegetativo de Plantas de Tomate Silvestre y Cultivadas. *Interciencia*, 39, 511–517.
- HaloDom*. (n.d.). Retrieved June 27, 2021, from <http://halodom.bio.auth.gr/?view=home>
- Harish, K., & Jagadeesh, K. (2016). Microbial Consortia-Mediated Plant Defense against Phytopathogens and Growth Benefits. *South Indian Journal of Biological Sciences*, 2(4), 395. <https://doi.org/10.22205/sijbs/2016/v2/i4/103445>
- Hernández, I., Lárez, L. M., & García, J. V. (2017). Evaluación de la toxicidad de un suelo contaminado con diferentes tipos de crudos sobre la germinación de dos pastos tropicales. *Bioagro*, 29(2), 73–82.
- Hernández, R. (2017). *Metodología de la Investigación* (6ta Edició).
- Jamil, M., Bashir, S., Anwar, S., Bibi, S., Bangash, A., Ullah, F., & Rha, E. S. (2012). Effect of salinity on physiological and biochemical characteristics of different varieties of rice. *Pakistan Journal of Botany*, 44(SPL.ISS.1), 7–13.
- Kumar, M., Kumar, V., & Prasad, R. (2020). *Phyto-Microbiome in Stress Regulation*.

<https://doi.org/10.1007/978-981-15-2576-6>

- Kumar, S., Karan, R., Kapoor, S., Singh, S. P., & Khare, S. K. (2012). Screening and isolation of halophilic bacteria producing industrially important enzymes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1595–1603. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400044>
- Ladeiro, B. (2012). Saline Agriculture in the 21st Century: Using Salt Contaminated Resources to Cope Food Requirements. *Journal of Botany*, 2012, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2012/310705>
- Lal, R. (2020). Soil organic matter content and crop yield. *Journal of Soil and Water Conservation*, 75(2), 27–32. <https://doi.org/10.2489/JSWC.75.2.27A>
- Lara, M., & Carrera, D. (2019). Salinidad y fertilidad de los suelos después de la operación de las presas Proyecto Propósito Múltiple Chone y Simbocal. In *Universidad Central del Ecuador*.
- Larsen, H. (1967). Biochemical Aspects of Extreme Halophilism. *Advances in Microbial Physiology*, 1(C), 97–132. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60251-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60251-9)
- Loukas, A., Kappas, I., & Abatzopoulos, T. J. (2018). HaloDom: A new database of halophiles across all life domains. *Journal of Biological Research (Greece)*, 25(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s40709-017-0072-0>
- Martínez, A., Morales, J. L., & Guillén, S. (2015). Aspectos sobre manejo y conservación de Agaves mezcaleros en Michoacán. *ResearchGate*, February 2016, 177.
- Ministerio del Ambiente y Agua del Ecuador. (2017). *Texto unificado de Legislación Secundaria de Medio Ambiente. Norma de calidad ambiental del recurso suelo y criterios de remediación para suelos contaminados. Libro VI Anexo 2.* (p. 18).
- Ministero del Ambiente. (2015). *Refugio de Vida Silvestre Islas Corazón y Fragatas | Sistema Nacional de Áreas Protegidas del Ecuador.*
<http://areasprotegidas.ambiente.gob.ec/es/areas-protegidas/refugio-de-vida-silvestre-islas-corazon-y-fragatas>
- Muntyan, M., Babu, M., Munt, M., Galinski, E. A., Banciu, H. L., & Muntyan, M. S. (2015). Adaptive strategies in the double- extremophilic prokaryotes inhabiting soda lakes. *Current Opinion in Microbiology*, 25,73-79. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2015.05.003>
- Nayakekorale, H. B. (2020). Soil Degradation. *The World Soils Book Series*, 103–118. <http://www.springer.com/series/8915>

- ONU. (2015). *Objetivos de desarrollo sostenible*. Organización de Las Naciones Unidas.
- Orellana, R., Macaya, C., Bravo, G., Dorochesi, F., Cumsille, A., Valencia, R., Rojas, C., & Seeger, M. (2018). Living at the Frontiers of Life: Extremophiles in Chile and Their Potential for Bioremediation. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02309>
- Padmaperuma, G., Kapoore, R., Gilmour, D., & Vaidyanathan, S. (2018). Microbial consortia: a critical look at microalgae co-cultures for enhanced biomanufacturing. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(5), 690–703. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1390728>
- Ramírez, N., Sandoval, A., & Serrano, J. (2004). Las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 24(1–2), 12–23. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562004000100004&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Ramos, E., & Zúñiga, D. (2008). Efecto de la humedad, temperatura y pH del suelo en la actividad microbiana a nivel de laboratorio. *Ecología Aplicada*, 7, 123–130. <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:>
- Ramos, J. A. (2004). Microorganismos del Suelo. In *Técnicas de Muestreo para Manejadores de Recursos Naturales* (pp. 185–210).
- Romero, H. (2014). Ecología política y represas: Elementos para el análisis del Proyecto HidroAysén en la Patagonia Chilena. *Revista de Geografía Norte Grande*, 57(57), 161–175. <https://doi.org/10.4067/s0718-34022014000100011>
- Rosell, R. (1982). *Transformación de la materia orgánica en el suelo*. Zehnder.
- Rueda, E., Barrón, J., Rangel, P., López, G., Murillo, B., García, J. L., Tarazón, M. A., & Troyo, E. (2009). *La salinidad: ¿un problema o una opción para la agricultura?* Plaza y Valdés, S.A. de C.V. <https://elibro.net/es/lc/espe/titulos/38874?prev=bf>
- Sánchez, J., Muro, G., Flores, J., Jurado, E., & Sáenz, J. (2015). *Los bancos de semillas y su germinación en ambientes semiáridos*. 73, 69–76.
- Sánchez, L., & Arguello, H. (2006). Capacidad de bacterias halófilas para capturar sodio in Vitro y su posible aplicación en bioremediación en suelos salinos-sódicos. *Nova*, 4(6), 19. <https://doi.org/10.22490/24629448.357>
- Scott, S., & Hasty, J. (2016). Quorum Sensing Communication Modules for Microbial Consortia Graphical Abstract HHS Public Access. *ACS Synth Biol*, 5(9), 969–977.

<https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00286>

- Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo (SENPLADES). (2017). Toda una vida contigo. Plan Nacional de Desarrollo 2017-2021 (pp. 1–148). <http://seat-mediacentre.es/controller-es-HQ/fbi/47452%5Cnhttp://www.lacasa.es/toda-una-vida-contigo>
- SENAGUA. (2015). *MULTIPROPÓSITO CHONE: Mitigará los impactos del Fenómeno del Niño*. Secretaría Del Agua.
- Sumba, M. (1983). *El desarrollo de la Cuenca de los ríos Carrizal y Chone. - su influencia en el desarrollo de la provincia de Manabí*. Instituto de Altos Estudios Nacionales.
- The International Seed Testing Association (ISTA). (2016). *Reglas Internacionales para el Análisis de las Semillas*. 192. <https://doi.org/10.15258/istarules.2016.F>
- Torres, A. H., & Acevedo, E. H. (2008). El problema de salinidad en los recursos suelo y agua que afectan el riego y cultivos en los valles de Lluta y Azapa en el Norte de Chile. *Idesia*, 26(3), 31–44. <https://doi.org/10.4067/s0718-34292008000300004>
- United States Of Department Agriculture, & (USDA). (1999). *Soil Quality Test Kit Guide. Guía para la Evaluación de la Calidad y Salud del Suelo*. 88. https://efotg.sc.egov.usda.gov/references/public/WI/Soil_Quality_Test_Kit_Guide.pdf
- Waditee, R., Kageyama, H., & Takabe, T. (2016). Halophilic microorganism resources and their applications in industrial and environmental biotechnology. *AIMS Microbiology*, 2(1), 42–54. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2016.1.42>
- Wood, M. (1995). *Environmental Soil Biology*. [https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=G_EkBAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=Wood,+M.+\(1995\).+Environmental+Soil+Biology.+Londres:+Blakie+Academic+and+professional+.&ots=agYeMEIDtV&sig=mKmiqCTsmgM26tWBxSnSOdBTu-o&redir_esc=y#v=onepage&q=Wood%2C M. \(1995\).](https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=G_EkBAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=Wood,+M.+(1995).+Environmental+Soil+Biology.+Londres:+Blakie+Academic+and+professional+.&ots=agYeMEIDtV&sig=mKmiqCTsmgM26tWBxSnSOdBTu-o&redir_esc=y#v=onepage&q=Wood%2C M. (1995).)
- Yordanis, G., Domínguez, A., & Macías, M. (2011). *Sistema de indicadores para evaluar el impacto ambiental de la actividad antrópica en la cuenca hidrográfica Carrizal-Chone*. Universidad De Pinar del Río.

Capítulo 9. Anexos