

Bacterias halófilas con potencial para la recuperación de suelos salinizados en Sáchica-Boyacá, Colombia

Mónica Alejandra Rodríguez Aristizabal^{1*} Nubia Carolina Higuera Mora²
& Danny Wilson Sanjuanelo Corredor³

1. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A. Campus Sur - Bogotá, Colombia; monica.alrodriguez@udca.edu.co
2. Docente Facultad de Ingeniería. Corporación Universitaria Minuto de Dios UNIMINUTO – Bogotá, Colombia; nchiguera@gmail.com
3. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A. Campus Sur - Bogotá, Colombia; dsanjuanelo@udca.edu.co

Recibido 19-VII-2018. Corregido 25-IV-2019. Aceptado 06-V-2019.

Abstract: Halophilic bacteria with potential for the recovery of salinated soils in Sáchica-Boyacá, Colombia. It is possible to use halophilic bacteria isolated from saline environments as a possible alternative for the rehabilitation of salinated soils for agricultural and agricultural production. Six halophilic bacteria were evaluated to determine their potential in the reduction of the electrical conductivity (Ce) of moderately saline soil in the municipality of Sáchica-Boyacá (Colombia). The bacteria were isolated on nutritive agar with different concentrations of NaCl, then inoculated in the soil (3 kg placed in pots) to perform a bioassay in the greenhouse for 2 months. Two phases were carried out, the first until obtaining a value of 2 ds / m (Ce) in order to plant tomato plants in the second phase. Weekly measurements of the (Ce) were made throughout the bioassay and only in phase 2 were determined weekly qualitative variables of tomato growth (height, number of leaves, foliar area, wilting and chlorosis). The results showed a direct effect of the halophilic bacteria in the decrease of the (Ce) of the soil, going from 5.2 to 0.8 ds / m (T1), 0.7 ds / m (T2), 0.8 ds / m (T3), 0.6 ds / m (T4), 0.7 ds / m (T5), 0.7 ds / m (T6), 3.0 ds / m (Control), values that correspond to very light salinity (< 2 ds / m). Regarding the agronomic variables, improvements were observed in the characteristics evaluated in comparison with the absolute control, especially in height and number of leaves of the plants. For the absolute control 80 % of the experimental units were lost, while in the soil with the different treatments only in some cases 20 % was lost. Accordingly, it is evident that the halophilic bacteria used in this research have potential for the rehabilitation of salinated soils.

Key words: halophilic bacteria; bioassay; electrical conductivity; saline soils; salinization.

Rodríguez Aristizabal, M. A., Higuera Mora, N. C. & Sanjuanelo Corredor, D. W. (2019). Bacterias halófilas con potencial para la recuperación de suelos salinizados en Sáchica-Boyacá, Colombia. *Revista de Biología Tropical*, 67(3), 621-632.

La degradación química del suelo por salinización afecta aproximadamente 1 180 millones ha de suelo en el mundo; de estas, el 84 % se encuentra en Latinoamérica (Wicke et al., 2011) y 5.6 % pertenecen Colombia, según la cifra reportada más reciente (Otero, Gómez, & Sánchez, 2002). En este país, durante el 2002,

se realizó la zonificación de suelos salinos, donde se determinaron cuatro categorías relacionadas con la intensidad de la salinización. Se encontró que el 5.59 % de suelos eran salino/sódicos, 2.81 % tenían intensidad alta de salinización, 2.34 % intensidad moderada y el 89.27 % intensidad baja a nula (Otero, Gómez,

& Sánchez, 2002). Esta tipificación sirvió para identificar áreas con mayor riesgo de presentar procesos irreversibles de salinización; por ejemplo, los departamentos de Bolívar, La Guajira, Sucre, Tolima, Córdoba, César, Antioquia, Valle del Cauca, Magdalena, Cundinamarca, Santander, Huila, Norte de Santander, Cauca, Atlántico y Boyacá, es decir, una gran parte del territorio nacional (Otero, Gómez, & Sánchez, 2002).

En el 2005, se publicó el mapa de amenaza por salinización, donde se reitera que en los departamentos mencionados sigue aumentando el riesgo de presentar degradación del suelo por altas concentraciones de sal. Para el 2017, el mapa de susceptibilidad a la salinización confirma que estas zonas pueden ser gravemente afectadas (IDEAM, & IGAC, 2005; IDEAM, CAR, & U.D.C.A, 2017). No existe una cifra actualizada del total de suelos afectados por este proceso de degradación, debido a la dinámica de las sales en el suelo y su dispersión. Sin embargo, ya se tienen bien identificadas las regiones con alta amenaza y susceptibilidad a la salinización y las áreas zonificadas con la mayor cantidad de suelos salinos, por lo cual es indispensable generar información que permita tomar decisiones en torno a esta problemática y que sea de utilidad para las zonas afectadas en el país. Para ello, es necesario determinar la concentración de sales en el suelo, la cual puede ser estimada en el extracto saturado al determinar su conductividad eléctrica (C_e), un parámetro que mide la capacidad de una solución de transmitir la electricidad, relacionado directamente con el contenido de sales (Porta, López, Acevedo, & Poch, 2014).

La salinización puede afectar de forma indirecta la estructura, permeabilidad, aireación e infiltración en el suelo y, de manera directa, puede alterar los procesos fisiológicos y bioquímicos de plantas y microorganismos del suelo (Lamz & González, 2013; Yan, Marschner, Cao, Zuoa, & Qin, 2015). Por ejemplo, puede ocasionar problemas relacionados con la disponibilidad de alimentos, la fertilidad del suelo, la pérdida de ecosistemas y de biodiversidad (Lamz & González, 2013; IDEAM,

CAR & U.D.C.A, 2017). Se han usado diversas técnicas para tratar esta problemática, como el lavado de sales, la aplicación de cal agrícola y enmiendas químicas, el arado mecánico de la capa superficial y otras prácticas. No obstante, estas tienden a ser costosas y de difícil aplicación e incluso, a largo plazo, pueden generar pérdida o degradación de la estructura y propiedades del suelo (Mesa, 2003; Perla Marando, Irisarri, & Sagardoy, 2004; Sánchez & Arguello, 2006).

En los últimos años, se han venido probando alternativas, como la fitorremediación y la biorremediación con microorganismos, orientadas a la recuperación de suelos degradados por salinización con el fin de disminuir la pérdida del potencial agrícola del suelo y obtener beneficios económicos y ambientales (Ramírez, Serrano, & Sandoval, 2006; Le Borgne, Paniagua, & Vázquez, 2008; Castillo & Barragán, 2011; Ladeiro, 2012). Dentro de los posibles microorganismos utilizados para estos fines, se ha demostrado que las bacterias halófilas tienen un alto potencial para capturar sodio *in vitro*. Esto abre la posibilidad a orientar los estudios de biorremediación de aguas y suelos con el fin de mitigar el efecto de la salinización (Ramírez, Sandoval & Serrano, 2004; Sánchez & Arguello 2006; Flores, Zavaleta, Zambrano, Cervantes, & Izaguirre, 2010; Faraj, Abdul, & Huyop, 2016).

Las bacterias halófilas se clasifican como halotolerantes, moderadamente halófilas y halófilas extremas, dependiendo de su requerimiento de sal (Oren, 2008; Kanekar, Kanekar, Kelkar, & Dhakephalkar, 2011; Faraj et al., 2016). Tienen dos mecanismos de adaptación a las altas concentraciones salinas: *la estrategia de sal en el citoplasma*, basada en la acumulación de sal en el interior de la célula y en la adaptación de todos los sistemas a las altas concentraciones salinas (Kunte, 2005; Kanekar et al., 2011; Faraj et al., 2016); y *la estrategia de solutos orgánicos* (dependiente de concentraciones de NaCl), relacionada con la acumulación de compuestos orgánicos, como azúcares, polioles, aminoácidos y/o derivados de estos que no alteran el metabolismo celular

ni siquiera en concentraciones citoplasmáticas altas compatibles (Kunte, 2005; Faraj et al., 2016). Teniendo esto en cuenta, la investigación propone el uso de bacterias halófilas aisladas de dos ambientes salinos en Colombia como una posible alternativa de rehabilitación de suelos salinizados para la producción agrícola y agropecuaria. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial de las bacterias halófilas seleccionadas sobre la disminución de la conductividad eléctrica de un suelo moderadamente salino y el crecimiento de plantas de tomate, un cultivo altamente susceptible.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de bacterias halófilas: A partir de los mapas de amenaza y susceptibilidad a la salinización en Colombia (IDEAM, & IGAC, 2005; IDEAM, CAR, & U.D.C.A, 2017), se identificaron y seleccionaron dos zonas para tomar muestras de suelo: cuatro áreas de la Zona 1/ Manaure (arena de playa y suelo salinizado) y tres de la Zona 2/ SÁCHICA (suelos salinizados de invernaderos). Las muestras fueron recolectadas a una profundidad de 20 cm, con aproximadamente 500 g por muestra y almacenadas a 4 °C hasta ser procesadas en el laboratorio. Para la recolección se siguió el protocolo para muestreo de suelo y abonos orgánicos del IDEAM (2008).

Con el fin de recuperar la mayor cantidad de bacterias halófilas e impedir el crecimiento de microorganismos que no fueran de interés, el aislamiento de las cepas bacterianas se realizó en agar nutritivo modificado con 1.5 % de NaCl a partir de diluciones seriadas. Las condiciones de crecimiento fueron 37 °C durante 24 horas de incubación (Sánchez & Arguello, 2006; Castro et al., 2011; Rojas, Moreno, Pardo, Obando, & Rivera, 2012). Posteriormente, se realizaron siembras de las cepas bacterianas recuperadas en agar nutritivo con diferentes concentraciones de NaCl al 3, 6, 9 y 12 %. Se seleccionaron las cepas que crecieron en la mayor concentración - a 37 °C, durante 24 horas - como las que mayor potencial podrían tener para disminuir la *Ce*. Finalmente, se realizó una clasificación con

base en las características morfológicas a nivel macroscópico teniendo en cuenta la forma, color, borde, elevación y superficie de las colonias; y, a nivel microscópico, considerando su forma y afinidad por la tinción de Gram.

Preparación de inóculos: Se realizaron siembras de las cepas seleccionadas en agar nutritivo con 6 % de NaCl para inhibir el crecimiento de contaminantes y se incubaron durante 24 h a 37 °C. A partir de estos crecimientos, se prepararon pre-inóculos recolectando el contenido de las cajas de Petri con las bacterias en 10 µl de solución salina, los cuales fueron diluidos posteriormente hasta conseguir una concentración de 10⁶ UFC/ml. Los inóculos utilizados para el bioensayo se obtuvieron a partir de una solución de cada cepa bacteriana. Después de 24 horas de incubación a 37 °C y 120 rpm se tomó 1 ml de los pre-inóculos de cada cepa proveniente del caldo nutritivo (6 % NaCl) para obtener los inóculos finales que se usaron en el bioensayo. La concentración final fue de 10⁸ UFC/ml, verificada con espectrofotometría a 600 nm para cada una de las cepas bacterianas. (McFarland, 1907; Pérez, Ramírez & Escalante, 2012; Sánchez, Gómez-Vargas, Garrido Rubiano, & Bonilla Buitrago, 2012).

Bioensayo en invernadero: Se siguió un diseño experimental completamente aleatorizado (7 x 5) con siete tratamientos (seis cepas bacterianas y un testigo) y cinco repeticiones para cada uno. Estos fueron aplicados en maderas de 25 cm con bolsas (sistema cerrado para evitar lavado de sales) de 3 kg con suelo moderadamente salino (5.2 ds/m *Ce*) recolectado en SÁCHICA-Boyacá (muestra compuesta, técnica en zigzag - 25 cm profundidad) siguiendo el protocolo para muestreo de suelo y abonos orgánicos del IDEAM (2008). Este fue esterilizado en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, con el fin de disminuir la carga microbiana del suelo y favorecer el crecimiento de las bacterias halófilas.

El bioensayo se dividió en dos fases: en la primera, cada madera fue inoculada con 5 ml

de una solución bacteriana [10^8 UFC/ml] de cada una de las cepas halófilas - a excepción del testigo absoluto que fue inoculado con 5 ml de caldo nutritivo sin bacterias - procedimiento que se repitió luego de 15 d; en la fase dos, luego de disminuir la conductividad eléctrica del suelo a 2.0 ds/m un mes después de iniciar el bioensayo, se sembraron plántulas de tomate y se realizaron inoculaciones cada 15 d con las bacterias halófilas en las materas, a excepción del testigo, y se agregaron cinco materas con suelo no salino como control positivo únicamente para el crecimiento de la planta de tomate. Seguidamente, se determinaron las variables agronómicas asociadas a la salinización del suelo semanalmente. En total se realizaron 10 mediciones de C_e con un conductímetro *Handylab* multiparamétrico siguiendo la metodología propuesta por el Instituto Geográfico Agustín Codazzi (IGAC) (IGAC, 2006).

A las plantas de tomate, se les determinó semanalmente altura de la planta y número de hojas. También se observó clorosis y marchitez durante este tiempo (Barraza & Cardona, 2004; Barrera, Suárez, & Melgarejo, 2010). Finalmente, cada 15 d se determinó el área foliar por métodos directos no destructivos, calculando el área por planimetría en el programa *Image J 2016* (Brito, Romero, Casen, Alonso, & Digonzelli, 2007). Asimismo, se realizaron recuentos bacterianos cada 15 d para verificar la presencia de las bacterias halófilas y establecer una posible relación con la disminución de la conductividad eléctrica. La técnica de recuento usada fue el conteo de UFC en placa (UFC x factor de dilución/gr de suelo) (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark, 2009; Corral-Lugo et al., 2012). El medio de cultivo utilizado fue agar nutritivo modificado con 6 % de NaCl para garantizar que los microorganismos aislados fueran halófilos y para disminuir el riesgo de contaminación. Se realizaron tres repeticiones de recuentos por tratamiento incluyendo el testigo.

Análisis estadístico: Los datos de las variables colectadas del bioensayo fueron

procesados con el lenguaje de programación R (R Core Team, 2016). La evaluación del efecto de los tratamientos sobre la respuesta de las variables cuantitativas se realizó a través de un anova previo cumplimiento de supuestos de normalidad de residuales y homogeneidad de varianzas, asociado con la prueba de comparación de Tukey. Además, se realizó una prueba de medidas repetidas para aislar el efecto del tiempo sobre las mediciones. Por otro lado, las variables cualitativas fueron procesadas por medio de la prueba de asociación χ^2 (χ^2), realizada a través de tablas de contingencia probadas con un nivel de significancia (alfa) del 5 %.

RESULTADOS

Aislamiento de bacterias halófilas: Se obtuvieron 18 cepas bacterianas a partir de las muestras de suelo del municipio de Manaure y 20 cepas bacterianas de las muestras de suelo del municipio de Sáchica. De estas, se seleccionaron 6 con base en el crecimiento que presentaron en agar nutritivo modificado con diferentes concentraciones de NaCl (3, 6, 9 y 12 %): el crecimiento fue abundante para las 6 cepas en menos de 24 horas a 37 °C. La caracterización morfológica macroscópica y microscópica de las cepas bacterianas halófilas se presenta en la Tabla 1.

Bioensayo en invernadero: Se observó la disminución de la conductividad eléctrica del suelo en todos los tratamientos desde la primera semana (Fig. 1). En la Tabla 2, se pueden observar los valores de la C_e para cada tratamiento durante las 10 semanas que duró el bioensayo. En todos los tratamientos se presentó una disminución de este parámetro salvo los valores obtenidos para la semana siete donde hubo un aumento en la C_e , principalmente en el tratamiento con la Cepa 1 (Tabla 2). El testigo negativo también presentó disminución en la conductividad eléctrica en relación con los tratamientos evaluados. Durante la semana 10,

TABLA 1
Características morfológicas de las cepas halófilas seleccionadas (Colonias en agar Nutritivo 6 % NaCl)

TABLE 1
Morphological characteristics of the selected halophilic strains (Colonies on Nutritive agar 6 % NaCl)

Zona	Cepa	Aislamiento % Na Cl	Muestra	Morfología	Gram	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Consistencia	Pigmento	Salado Manitol
1M	C1	3-6-9-12%	Suelo	Bacilos	Negativos	Puntiforme	Convexa	Irregular-redondeado	Lisa	Cremosa	Rosa	V/A
2M	C2	3-6-9-12%	Suelo	Bacilos	Negativos	Plana	Convexa	Irregular-redondeado	Lisa	Mucoide	Crema	N/V
2S	C3	3-6-9-12%	Suelo	Bacilos	Positivos	Plana	Convexa	Irregular-redondeado	Lisa	Cremosa	Crema	V/A
2S	C4	3-6-9-12%	Suelo	Bacilos	Positivos	Puntiforme	Convexa	Irregular-redondeado	Lisa	Cremosa	Crema	V/A
2S	C5	3-6-9-12%	Suelo	Bacilos	Positivos	Puntiforme	Convexa	Irregular-redondeado	Lisa	Mucoide	Crema	V/A
2S	C5	3-6-9-12%	Suelo	Bacilos	Positivos	Puntiforme	Convexa	Irregular-redondeado	Lisa	Cremosa	Crema	V/A

*1/A viro a amarillo, fermentación de manitol, y N/V, no hay fermentación de manitol.

se observó que todos los tratamientos muestran valores de $C_e < 2$ ds/m, valor que está clasificado en el rango de salinidad muy ligera.

El análisis de varianza y prueba de comparación de Tukey permitieron establecer que, en todos los tratamientos con las cepas bacterianas halófilas, hubo un efecto directo en la disminución de la conductividad eléctrica del suelo ($P < 0.05$), lo que indica que sí hay influencia de los tratamientos sobre el suelo. Adicionalmente, los resultados del análisis de medidas repetidas confirmaron que no existen diferencias significativas entre cepas. Con base en estos resultados y debido al sistema cerrado que se manejó en el bioensayo, se puede interpretar que la disminución en la C_e se debe a los tratamientos con las cepas que fueron aplicadas y/o a la absorción de sales realizada por las plantas, reflejada en los efectos de toxicidad observados en las variables agronómicas cualitativas determinadas (Fig. 1).

Para los recuentos de bacterias halófilas, los resultados obtenidos por medio de la técnica de recuento en placa demostraron la presencia de bacterias halófilas en el suelo para todos los tratamientos, así como en el suelo usado como testigo (suelo con salinidad moderada 5.2 ds/m), donde no se aplicó ninguna cepa bacteriana (carga microbiana inicial del suelo 2.8×10^3 UFC/gr). También se evidenció crecimiento de microorganismos halófilos. Los recuentos obtenidos para los tratamientos estuvieron por encima de 10^6 UFCg⁻¹ suelo, con excepción del testigo absoluto que mostró recuentos $< 10^4$ UFCg⁻¹ suelo. Por último, el análisis de varianza y la prueba de Tukey permitieron establecer que, en el primer recuento, no hubo diferencias significativas ($F = 2.68$, $P > 0.05$) entre los tratamientos. En cambio, en el segundo recuento se observaron diferencias entre los tratamientos T3 y T5 con respecto a los demás y el testigo ($F = 7.13$, $P < 0.05$). Adicionalmente, el tercer recuento evidenció diferencias de T1 y T5 con los demás tratamientos ($F = 5.49$, $P < 0.05$); para el recuento final, 58 d después del montaje, se determinó una diferencia marcada entre el T1 y los demás tratamientos incluyendo el testigo. ($F = 9.52$, $P < 0.05$) (Tabla 3).

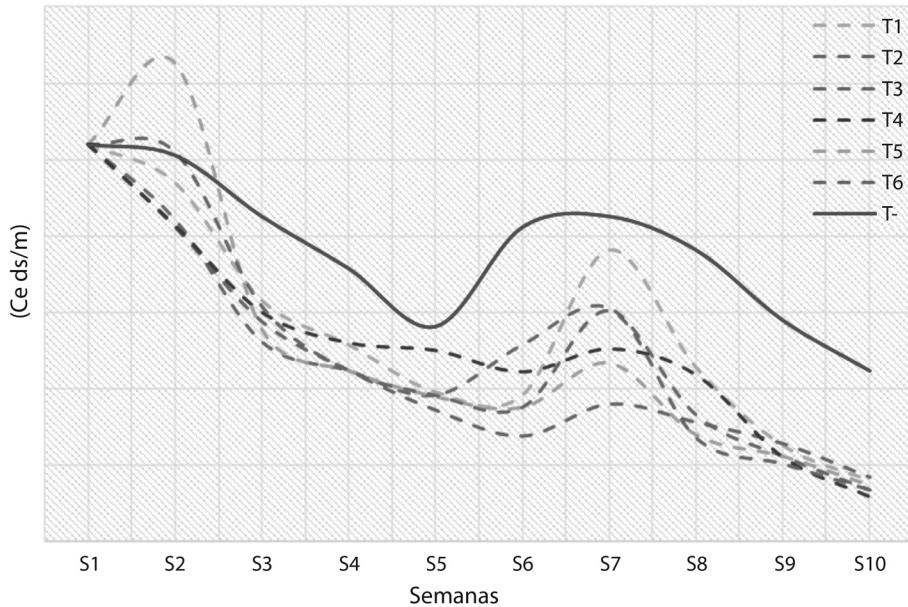


Fig. 1. Comparación de los tratamientos con respecto a los valores de conductividad eléctrica (Ce ds/m) para cada semana de medición (T= Tratamientos, S= Semanas).

Fig. 1. Comparison of the treatments with respect to the values of electrical conductivity (Ce ds/m) for each week of measurement (T= Treatments, S= Weeks).

TABLA 2

Valores de conductividad eléctrica por semanas (se resalta el aumento de la conductividad eléctrica)

TABLE 2

Electric conductivity values per week (the increase in electrical conductivity is highlighted)

Tratamientos	Semanas										
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	
T1 Cepa 1	(a) 5.2	(a) 4.7	(ab) 3.2	(a) 2.6	(a) 1.9	(a) 1.9	(ab) 3.8	(a) 2.3	(a) 1.2	(a) 0.8	
T2 Cepa 2	(a) 5.2	(a) 4.2	(a) 2.6	(a) 2.2	(a) 1.9	(a) 2.6	(ab) 3.1	(a) 1.7	(a) 1.1	(a) 0.7	
T3 Cepa 3	(a) 5.2	(a) 4.1	(a) 2.9	(a) 2.2	(a) 1.7	(a) 1.4	(a) 1.8	(a) 1.5	(a) 1.3	(a) 0.8	
T4 Cepa 4	(a) 5.2	(a) 4.1	(ab) 3.0	(a) 2.6	(a) 2.5	(a) 2.2	(ab) 2.5	(a) 2.2	(a) 1.1	(a) 0.6	
T5 Cepa 5	(a) 5.2	(c) 6.2	(a) 2.8	(a) 2.2	(a) 1.9	(a) 1.8	(ab) 2.3	(a) 1.4	(a) 1.1	(a) 0.7	
T6 Cepa 6	(a) 5.2	(ab) 5.1	(ab) 3.1	(a) 2.2	(a) 1.9	(a) 1.8	(ab) 3.0	(a) 1.4	(a) 1.0	(a) 0.7	
T- Testigo	(a) 5.2	(ab) 5.1	(c) 4.3	(b) 3.6	(b) 3.7	(b) 4.1	(b) 4.3	(b) 3.8	(b) 3.5	(b) 3.0	

*Abreviaturas usadas en la tabla 2: Ce ds/m Conductividad eléctrica (desisemens/metro).

**Letras diferentes representan diferencias significativas ($P < 0.05$). S =semanas.

Variables agronómicas en plantas de tomate: Todos los tratamientos permitieron el crecimiento de las plantas de tomate, sembradas luego de conseguir una Ce igual o menor a 2 ds/m. El crecimiento se vio reflejado en

el aumento semanal de la altura y número de hojas, a diferencia de lo observado en el testigo absoluto que presentó pérdida de hojas, marchitez y clorosis desde la segunda semana: incluso, llegó a perder el 80 % de las plantas (Fig. 2, Fig. 3). Sin embargo, con respecto al

TABLA 3

Recuento de microorganismos expresado en unidades formadoras de colonia por gramo de suelo (UFCg⁻¹ suelo)

TABLE 3

Microorganism count expressed in colony forming units per gram of soil (CFUg⁻¹ soil)

	S1	S2	S3	S4
T-	(a) 1.6 x 10e5	(a) 4.9x 10e5	(a) 5.9x 10e5	(a) 4.4 x 10e5
T1	(a) 1.5 x 10e7	(a) 9.1 x 10e7	(a) 1.2 x 10e8	(ab) 2.4 x 10e8
T2	(a) 3.8 x 10e6	(ab) 5.3 x 10e6	(a) 1.1 x 10e8	(abc) 1.4 x 10e8
T3	(a) 7.9 x 10e7	(ab) 1.3 x 10e8	(ab) 5.6 x 10e7	(abcd) 6.0 x 10e8
T4	(a) 1.1 x 10e8	(b) 4.4 x 10e7	(ab) 2.5 x 10e6	(bcd) 3.3 x 10e7
T5	(a) 1.2 x 10e8	(b) 1.1 x 10e8	(b) 1.5 x 10e8	(cd) 1.9 x 10e8
T6	(a) 1.4 x 10e8	(b) 2.0 x 10e6	(b) 1.0 x 10e8	(d) 1.0 x 10e8

T = Tratamiento, T- = testigo, S= Semana. Las unidades de los recuentos son UFCg⁻¹ suelo. Letras diferentes representan diferencias significativas, análisis estadístico de varianza y prueba de comparación de Tukey, programa R core team (2016).
 T = Treatment, T- = witness, S = Week * The units of the counts are UFCg⁻¹ ground. Different letters represent significant differences, statistical analysis of variance and Tukey comparison test, R core team program (2016).

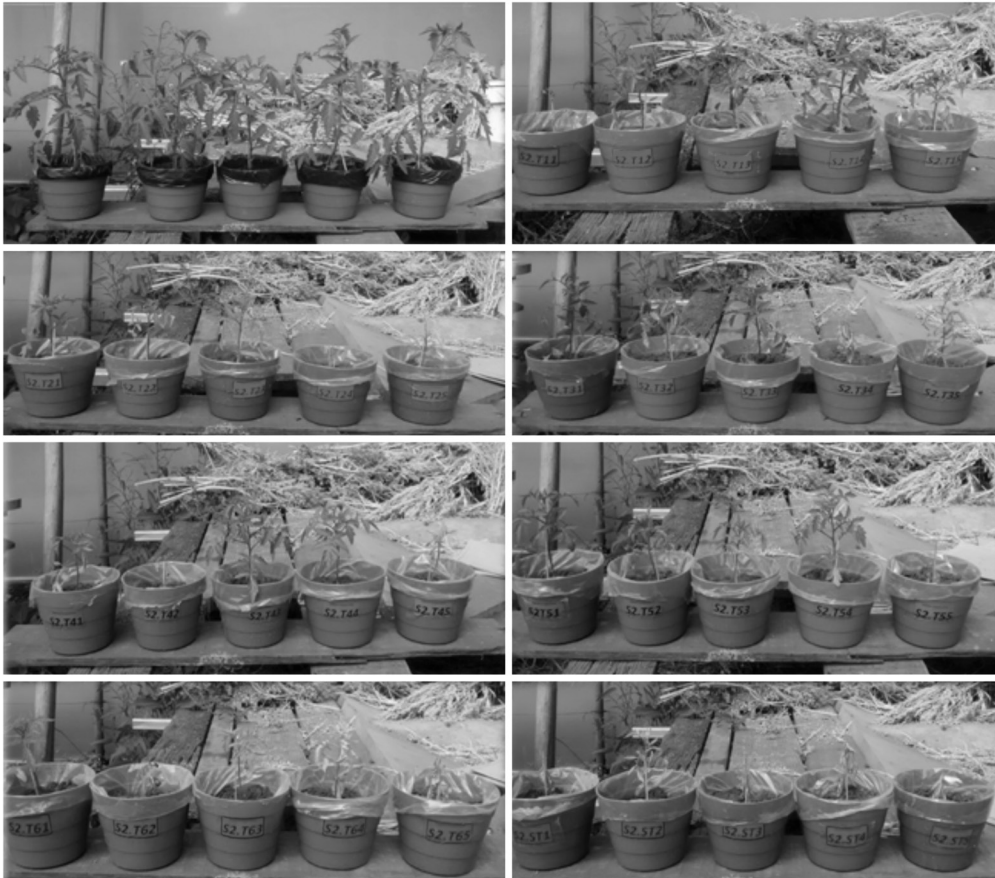


Fig. 2. Plantas de tomate control y evaluadas con los tratamientos: T1, T2, T3, T4, T5, T6 y el testigo absoluto.
Fig. 2. Control tomato plants evaluated with the treatments: T1, T2, T3, T4, T5, T6 and the absolute control.

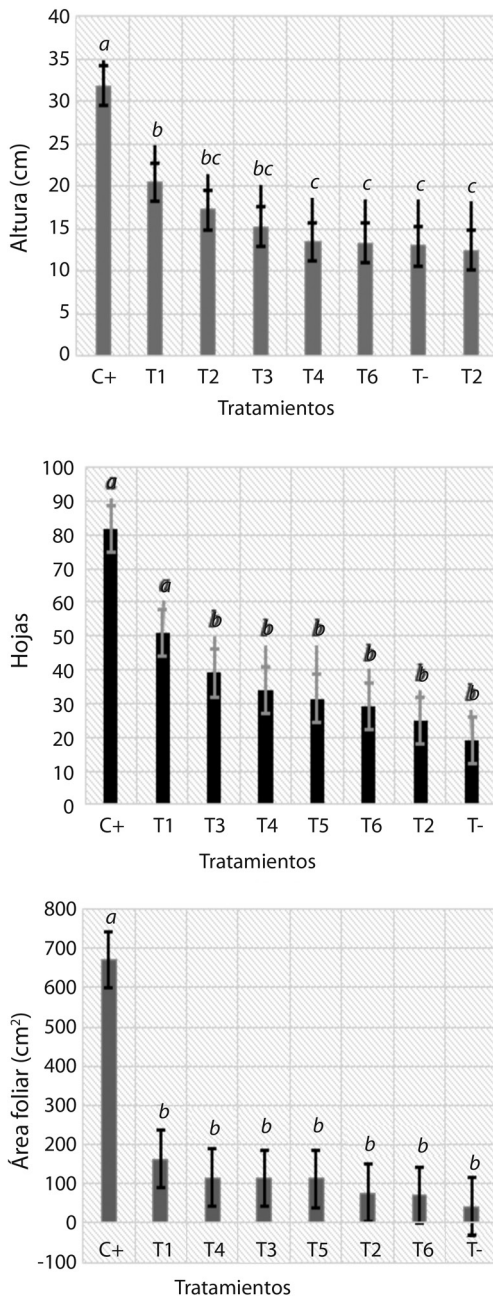


Fig. 3. Variables agronómicas determinadas: **A.** Altura, **B.** Número de hojas, **C.** Área foliar. Letras diferentes muestran diferencias significativas. (T1: cepa 1, T2: cepa 2, T3: cepa 3, T4: cepa 4, T5: cepa 5, T6: cepa 6, ST: sin tratamiento o testigo absoluto, C+: control positivo). Análisis estadístico de varianza y prueba de comparación de Tukey, programa R Core team (2016) con barras de error típico.

Fig. 3. Certain agronomic variables: **A.** Height, **B.** Number of leaves, **C.** Foliar area. Different letters show significant differences (T1: strain 1, T2: strain 2, T3: strain 3, T4: strain 4, T5: strain 5, T6: strain 6, ST: no treatment or absolute control, C+: positive control). Statistical analysis of variance and Tukey comparison test, R Core team program (2016) with typical error bars.

control positivo de crecimiento para las plantas de tomate, (sembradas en suelo sin salinidad), se presentaron diferencias significativas en todas las variables agronómicas determinadas [Fig. 3A ($F = 7.76$, $P < 0.05$), Fig. 3B ($F = 8.86$, $P < 0.05$), Fig. 3C ($F = 32.63$, $P < 0.05$)]. Se evidenció una menor altura y menor número de hojas y algunos síntomas de toxicidad reflejados en la clorosis y marchitez de algunas plantas.

El análisis estadístico indicó que los tratamientos no tenían efecto directo sobre las variables agronómicas de la altura y número de hojas: la toxicidad de las sales pudo haber afectado algunas plantas. Por otra parte, los resultados para las variables de clorosis y marchitez que fueron analizados por medio de una prueba de χ^2 mostraron que, en general, cuando hay clorosis se presenta marchitez. Finalmente, con respecto al área foliar, también se evidenció que ninguno de los tratamientos tuvo efecto directo sobre esta variable (Fig. 2, Fig. 3).

DISCUSIÓN

A partir de las muestras de ambientes salinos en Manaure y Sáchica, se aislaron microorganismos bacterianos moderadamente halófilos con alto potencial para la captura y movilización de sodio en suelos salinizados, identificados macroscópicamente y microscópicamente como bacilos gram negativos y bacilos gram positivos (Tabla 1). Esto comprueba la existencia de una alta diversidad de microorganismos extremófilos en ambientes con condiciones adversas como las zonas ya mencionadas. Las bacterias halófilas usadas en esa investigación no fueron identificadas ni bioquímica ni molecularmente; sin embargo, pueden ser comparadas con géneros conocidos y reportados en la literatura

como *Salinivibrio* sp., *Pseudomonas halofila* y/o *Falvobacterium* sp. para el caso de las cepas 1 y 2 (Oren, 2008; Kanekar et al., 2011) y *Bacillus* sp., *Marinococcus* sp., y *Salinococcus* sp., para el caso de las cepas 3, 4, 5 y 6 (Oren, 2008; Kanekar et al., 2011), teniendo en cuenta las características descritas en la Tabla 1.

En relación con el mecanismo de adaptación a condiciones salinas y según los resultados y la literatura, es posible determinar que las bacterias halófilas usadas en el bioensayo emplean la estrategia de solutos compatibles, la cual permite un alto grado de adaptabilidad de las células a cambios en la concentración de sal de su entorno (Oren, 2008; Shivanand & Mugeraya, 2011; Faraj et al., 2016). Esta diferencia de la estrategia de adaptación de sal en el citoplasma, la cual restringe únicamente a bacterias extremadamente halófilas y, con algunas excepciones, a bacterias fermentativas anaerobias (Halanaerobiales) que crecen exclusivamente en presencia de altas concentraciones de sal. Por lo cual, no se habrían desarrollado en el agar nutritivo con las concentraciones de sal usadas en este estudio (Oren, 2008; Shivanand & Mugeraya, 2011).

De acuerdo con lo anterior y conociendo la clasificación de los microorganismos halófilos con respecto a su requerimiento de sal (Kanekar et al., 2011; Faraj et al., 2016), es posible confirmar que las cepas usadas en este estudio pertenecen al grupo de bacterias moderadamente halófilas, ya que pueden tolerar un amplio rango de concentraciones de sal, evidenciado en su crecimiento en diferentes concentraciones de NaCl (Tabla 1) (Litchfield & Gillevet, 2002; Kanekar et al., 2011; Faraj et al., 2016).

En cuanto al bioensayo en invernadero, se observó que todas las cepas bacterianas halófilas evaluadas mostraron la capacidad de capturar sodio y movilizarlo. Se conoce que el crecimiento de ellas es dependiente de sodio (Na^+) y lo utilizan para diversas reacciones bioenergéticas, por lo cual se está movilizando constantemente por la célula para mantener un gradiente de iones sodio a través de sus membranas citoplasmáticas mediante sistemas de

transporte primario y secundario (Oren, 2008; Müller & Saum, 2005; Faraj et al., 2016). La movilización del sodio se evidenció por la disminución en la conductividad eléctrica del suelo evaluado, pasando de 5.2 ds/m - que corresponde a salinidad moderada - a valores menores que < 1.0 ds/m - que corresponden a salinidad muy ligera; sin embargo, dentro de los resultados obtenidos se encontró en la semana siete que la conductividad eléctrica aumentó para todos los tratamientos, comportamiento que fue más evidente en el T1 (cepa 1), esto posiblemente se relacione con el número de bacterias que ya han cumplido su ciclo de vida y mueren en el suelo liberando el sodio al medio externo luego de que ha sido movilizado y usado para los diversos procesos intracelulares (Oren, 2008; Müller & Saum, 2005). Es importante resaltar que, con base en lo anterior, este estudio encontró que debe garantizarse un inóculo activo de microorganismos para que se dé dicha movilización de sodio, algo que debe estudiarse con más detalle.

Con respecto a las variables agronómicas evaluadas, se observó que la sal presente en el suelo pudo haber afectado a algunas de las plantas en los tratamientos T4, T6, T2, ya que el tomate es una planta altamente sensible a los efectos de la toxicidad por sales. Esto se evidenció en la disminución de la altura de la planta, el número de hojas, la presencia de clorosis, necrosis o marchitez y en la disminución del área foliar (Fig. 2). Las plantas cultivadas en suelo salino o con aguas salinas sufren alteraciones en todo su metabolismo y lo reflejan macroscópicamente cuando se comparan con plantas cultivadas sin estrés salino (Casierra, Arias, & Pachón, 2013). Asimismo, diferentes estudios han reportado que, además, hay una disminución en la germinación, un menor peso de los frutos, entre otros efectos fisiológicos, morfológicos y bioquímicos (Gojkovic & Saavedra, 2007; Casierra, Arias, & Pachón, 2013; Sanjuán Lara et al., 2015).

Los altibajos en la concentración de sales mostraron incidencia en las variables agronómicas evaluadas, que resultaron significativamente diferentes del control positivo de

crecimiento para el tomate. No obstante, estos resultados indican que, a pesar de las diferencias con el control positivo, las plantas sembradas en el suelo con tratamientos evidencian mejoras en el crecimiento del tomate en comparación con el testigo absoluto. Además, según el análisis estadístico, no hay diferencias significativas entre los tratamientos (cepas) usados, ya que todos inciden en la disminución de la C_e ; sin embargo, es posible estimar que el T1 es el tratamiento que podría tener un mayor potencial para rehabilitar suelos salinos debido a los valores de la C_e obtenidos y a los resultados observados con respecto a las variables agronómicas que, en comparación con los otros tratamientos, fueron mejores. Esto fue evidente en un 80 % de las unidades experimentales presentes hasta el final del bioensayo.

En Colombia, se han realizado investigaciones que orientan el trabajo con microorganismos para recuperar las características de los suelos. La mayoría se han realizado en condiciones de laboratorio (Sánchez & Arguello, 2006) y muy pocos en condiciones de invernadero (Escobar, Saravia, Guependo, & Ospina, 2011). Otras investigaciones con bacterias halófilas y halotolerantes también muestran el potencial de estos microorganismos como promotores de crecimiento vegetal y fijadores de nitrógeno, esto representa un beneficio adicional para las plantas (Rojas et al., 2012). Por esta razón, es de gran valor seguir realizando estudios que permitan encontrar una alternativa biológica para mitigar los efectos de los procesos de salinización en los suelos con vocación agrícola, sobre todo en un país como Colombia que ya cuenta con 14 millones de ha (12.3 %) afectadas por esta condición y donde se han identificado 11 009 018 ha (9.6 %) como suelos cultivables (repartidos entre los departamentos de Atlántico, Sucre, Magdalena, Quindío, Cundinamarca, Bolívar y Antioquia), muchos de los cuales ya presentan grandes áreas degradadas o con algún grado de susceptibilidad a esta problemática (IDEAM, CAR, & U.D.C.A, 2017).

Finalmente, se resalta que este ensayo podría ser replicado en suelos con diferentes

concentraciones de sal en otras zonas afectadas por salinización del país con el fin de determinar los efectos en otros tipos de suelos, pero teniendo en cuenta, no solo la salinidad, sino también otras características físico-químicas y microbiológicas. Esto permitirá consolidar a largo plazo una estrategia alternativa viable para la rehabilitación de suelos afectados por la problemática de la salinización en Colombia usando bacterias halófilas.

AGRADECIMIENTOS

Este artículo es producto del trabajo denominado “*Aportes desde el enfoque Agroecológico para el manejo de la salinización del suelo con bacterias halófilas en Sáchica-Boyacá*” (Colombia). Los autores agradecen especialmente a la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (UDCA) por el apoyo durante el desarrollo de esta investigación, a los docentes de la Facultad de Ciencias Ambientales e Ingenierías por sus conocimientos aportados y a la Comunidad local del municipio de Sáchica en Boyacá por la colaboración en este proyecto.

Declaración de ética: los autores declaran que todos están de acuerdo con esta publicación y que han hecho aportes que justifican su autoría; que no hay conflicto de interés de ningún tipo; y que han cumplido con todos los requisitos y procedimientos éticos y legales pertinentes. Todas las fuentes de financiamiento se detallan plena y claramente en la sección de agradecimientos. El respectivo documento legal firmado se encuentra en los archivos de la revista.

RESUMEN

Es posible usar bacterias halófilas aisladas de ambientes salinos como una posible alternativa de rehabilitación de suelos salinizados para la producción agrícola y agropecuaria. En este estudio se evaluaron seis bacterias halófilas para determinar su potencial en la disminución de la conductividad eléctrica (C_e) de suelo moderadamente salino del municipio de Sáchica- Boyacá (Colombia). Las bacterias se aislaron en agar nutritivo con diferentes concentraciones de NaCl, luego fueron inoculadas en el

suelo (3 kg puesto en materas) para realizar un bioensayo en invernadero durante 2 meses. Se realizaron dos fases, la primera hasta conseguir un valor de 2 ds/m (Ce) con el fin de sembrar plantas de tomate en la segunda fase. Se realizaron mediciones semanales de la (Ce) durante todo el bioensayo y solo en la fase 2 se determinaron semanalmente variables cualitativas de crecimiento de tomate (altura, número de hojas, área foliar, marchitez y clorosis). Los resultados mostraron un efecto directo de las bacterias halófilas en la disminución de la (Ce) del suelo, pasando de 5.2 a 0.8 ds/m (T1), 0.7 ds/m (T2), 0.8 ds/m (T3), 0.6 ds/m (T4), 0.7 ds/m (T5), 0.7 ds/m (T6), 3.0 ds/m (testigo), valores que corresponden a salinidad muy ligera (< 2 ds/m). En relación con las variables agronómicas, se evidenciaron mejoras en las características evaluadas en comparación con el testigo absoluto, sobre todo en altura y número de hojas de las plantas. Para el testigo absoluto se perdieron 80 % de las unidades experimentales, mientras que en el suelo con los diferentes tratamientos solo en algunos casos se perdió el 20 %. De acuerdo con esto, se evidencia que las bacterias halófilas utilizadas en esta investigación tienen potencial para la rehabilitación de suelos salinizados.

Palabras clave: bacterias halófilas; bioensayo; conductividad eléctrica; suelos salinos; salinización.

REFERENCIAS

- Barraza, F. V., & Cardona, C. E. (2004). Estudio del proceso de crecimiento del cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el Valle del Sinú medio. *Agronomía Colombiana*, 22(1), 81-90.
- Barrera, J., Suárez, D., & Melgarejo, L. M. (2010). Análisis de crecimiento en plantas. En L. M. Melgarejo (Ed.), *Experimentos en fisiología y bioquímica vegetal* (pp. 25-38). Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Brito, E., Romero, E. R., Casen, S. D., Alonso, L. G., & Dignonzelli, P. A. (2007). Métodos no destructivos de estimación del área foliar por tallo en la variedad LCP 85-384 de caña de azúcar. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán*, 82(2), 29-32.
- Casierra Posada, F., Arias Aguirre, J. A., & Pachón, A. C. (2013). Efecto de la salinidad por NaCl en híbridos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller). *Orinoquia*, 17(1), 23-29.
- Castillo, C. L., & Barragán, H. B. (2011). Aplicaciones biotecnológicas de microorganismos halófilos. *Revista Sistemas Ambientales*, 4(2), 45-54.
- Castro, P. L., Flores, G. A., Rodríguez, V. A., Aguilar, G. M., Aguilar, G. C., & Rodríguez, H. R. (2011). Aislamiento y caracterización de microorganismos halófilos de suelos salinos de cuatro Ciénegas Coahuila, México. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 3(5), 33-43.
- Corral-Lugo, A., Morales-García, Y., Pazos-Rojas, L., Ramírez-Valverde, A., Martínez-Contreras, R., & Muñoz-Rojas, J. (2012). Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de "goteo en placa por sellado (o estampado) masivo". *Revista Colombiana de Biotecnología*, XIV(2), 147-156.
- Escobar, O. Z., Saravia, J. C., Guependo, R. C., & Ospina, J. A. (2011). Evaluación de tecnologías para la recuperación de suelos degradados por salinidad. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*, 64(1), 5769-5779.
- Faraj Edbeib, M., Abdul Wahab, R. & Huyop, F. (2016). Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 32(135), 1-24.
- Flores, M. L., Zavaleta, A. I., Zambrano, Y., Cervantes, L., & Izaguirre, V. (2010). Bacterias halófilas moderadas productoras de hidrolasas de interés biotecnológico. *Ciencia e Investigación*, 13(1), 42-46.
- Goykovic, C. V., & Saavedra del Real, G. (2007). Algunos efectos de la salinidad en el cultivo del tomate y prácticas agronómicas de su manejo. *IDESIA*, 25(3), 47-58.
- IDEAM & IGAC. (2005). Mapa amenaza por salinización (escala 1: 1 500.000) [Mapa]. Obtenido del Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales Bogotá.
- IDEAM. (2008). *Protocolo muestreo de suelos y abonos orgánicos*. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. Bogotá, Colombia: Bernier Laboratorio Ltda.
- IDEAM, CAR, U.D.C.A. (2017). Protocolo para la identificación y evaluación de la degradación de suelos por salinización. Bogotá, Colombia: IDEAM.
- IDEAM, CAR, U.D.C.A (2017). Mapa Susceptibilidad a la Salinización (escala 1: 1200.000) [Mapa]. Recuperado del Protocolo para la identificación y evaluación de la degradación de suelos por salinización (p. 76). Bogotá, Colombia: IDEAM.
- IGAC. (2006). *Métodos analíticos del laboratorio de suelos* (6 ed.). Bogotá, Colombia: Instituto Geográfico Agustín Codazzi.
- Kanekar, P., Kanekar, S., Kelkar, A., & Dhakephalkar, P. (2011). Halophiles - taxonomy, diversity, physiology and applications. En T. Satyanarayana, B. Narain, & J. A. Prakash (Eds.), *Microorganisms in Environmental Management* (pp. 1-34). New York, USA: Springer.
- Kunte, H. J. (2005). K⁺ transport and its role for osmoregulation in a halophilic member of the Bacteria domain: characterization of the K⁺ uptake systems from Halomonas elongate. En N. Gunde-Cimerman, A. Oren, & A. Plemenitas, *Adaptation to life at*

- high salt concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya Section III Bacteria* (pp. 287-300). Nueva York, USA: Springer.
- Ladeiro, B. (2012). Saline agriculture in the 21-st century: using salt contaminated resources to cope food requirements. *Journal of Botany*, 7, 1-8.
- Lamz Piedra, A., & González Cepero, M. (2013). Salinity as a problem in agriculture: plant breeding an immediate solution. *Cultivos Tropicales*, 34(4), 31-42.
- Le Borgne, S., Paniagua, D., & Vazquez-Duhalt, R. (2008). Biodegradation of organic pollutants by halophilic bacteria and archaea. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 15, 74-92.
- Litchfield, C., & Gillevet, P. (2002). Microbial diversity and complexity in hypersaline environments: a preliminary assessment. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28, 48-55.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., & Clark, D. P. (2009). Unidad 1 Principios de Microbiología - Capitulo 6 Crecimiento microbiano. En T. D. Brock (Ed.), *Biología de los Microorganismos* (pp. 167-170). Boston, Estados Unidos: Pearson Addison Wesley.
- McFarland, J. (1907). The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *JAMA*, XLIX(14), 1176-1178.
- Mesa, D. (2003). Obtención de plantas resistentes a la salinidad para los suelos salinos cubanos. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 37(3), 217-226.
- Müller, V., & Saum, S. H. (2005). The chloride regulon of *Halobacillus halophilus*: a novel regulatory network for salt perception and signal transduction in bacteria. En N. Gunde-Cimerman, A. Oren, & A. Plemenitas (Eds.), *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya* (pp. 301-310). New York, USA: Springer.
- Oren, A. (2008). Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity in saline systems. *Saline Systems*, 4(2), 1-13.
- Otero, G. J., Gómez, C., & Sánchez, R. (2002). *Zonificación de los procesos de salinización de los suelos de Colombia*. Bogotá, Colombia: IDEAM - Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales.
- Pérez Montero, S., Ramírez Díaz, I. J. & Escalante Espinosa, E. (2012). Aplicación y beneficios de los inóculos bacterianos para mejorar la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Revista de Divulgación Kukulkab'*, XVII(35), 39-44.
- Perla, G. S., Marando, I. G., Irisarri, E. J., & Sagardoy, R. M. (2004). Efecto de las técnicas de lavado y fertilización sobre la salinidad en suelos del Alto Valle de Río Negro y Neuquén, Argentina. *Agricultura Técnica*, 64(3), 295-304.
- Porta, J., López-Acevedo, M., & Poch, M. R. (2014) *Edafología. Uso y protección de los suelos*. Cataluña, España: Ediciones Mundi Prens.
- Ramírez, N., Sandoval, N. H., & Serrano, J. A. (2004). Las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 24, 12-23.
- Ramírez, N., Serrano, J., & Sandoval, H. (2006). Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(3), 56-71.
- Rojas, T. D., Moreno, G. A., Pardo, D. S., Obando, M., & Rivera, D. (2012). Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). *Applied Soil Ecology*, 61, 264-272.
- Sánchez López, D. B., Gómez-Vargas, R. M., Garrido Rubiano, M. F., & Bonilla Buitrago, R. R. (2012). Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(7), 1401-1415.
- Sánchez Leal, L., & Arguello, A. H. (2006). Capacidad de bacterias halófilas para capturar sodio *in vitro* y su posible aplicación en biorremediación en suelos salinos-sódicos. *Revista Nova*, 4, 19-32.
- Sanjuán Lara, F., Ramírez Vallejo, P., Sánchez García, P., Sandoval Villa, M., Livera Muñoz, M., Rodríguez, C., ... Perales Segovia, C. (2015). Tolerancia de líneas nativas de tomate (*Solanum lycopersicum L.*) a la salinidad con NaCl. *Interciencia*, 40(10), 704-710.
- Shivanand, P., & Mugeraya, G. (2011). Halophilic bacteria and their compatible solutes-osmoregulation and potential applications. *Current Science*, 100(10), 1516-1521.
- Wicke, B., Smeets, E., Dornburg, V., Vashev, B., Gaiser, T., Turkenburga, W., & Faaija, A. (2011). The global technical and economic potential of bioenergy from salt-affected soils. *Energy & Environmental Science*, 4, 2669-2681.
- Yan, N., Marschner, P., Cao, W., Zuoa, C., & Qin, W. (2015). Influence of salinity and water content on soil microorganisms. *International Soil and Water Conservation Research*, 3, 316-323.