



**UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO**

**FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL**

**Aislamiento e Identificación de Bacterias Halófilas Para la  
Biorremediación de Suelos Salinos**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:  
INGENIERO AMBIENTAL

**AUTOR:**

Guevara Ordoñez, Irving Adderly (ORCID: 0000-0002-1058-755X)

**ASESORES:**

Dr. Lloclla Gonzales, Herry (ORCID: 0000-0002-0821-7621)

Ing. Ponce Ayala, José Elías (ORCID: 0000-0002-0190-3143)

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:**

Calidad y gestión de los recursos naturales

**CHICLAYO – PERÚ**

**2021**

## **Dedicatoria**

A mi padre, Jorge Guevara Villanueva, por todas las lecciones de vida y porque aún sigo aprendiendo de él.

A mi hermano, Jorge, por ser un soporte y un segundo padre.

A mi madre, Norma Ordoñez Perez, por su amor incondicional.

A mis hermanas, Eneida y Karol, que son sinónimo de amor sublime y sincero.

A mis sobrinas: Gia, Arianna, Gabriella, Kennia, Mía y Belén; porque serán unas mujeres maravilla.

Los amo a todos.

***Irving Adderly***

## **Agradecimiento**

A mi hermano Jorge, por el apoyo que hizo posible terminar mi carrera.

A mi padre, porque me enseñó de persistencia y autenticidad.

A mi asesor Herry Lloclla, porque desde un principio vio el potencial de esta investigación y creyó en ella.

A mi amigo Gabriel Zúñiga, quien con su profesionalismo hizo posible que desarrollemos esta investigación.

***Irving Adderly***

## Índice de contenidos

Carátula .....	i
Dedicatoria.....	ii
Agradecimiento .....	iii
Índice de contenidos .....	iv
Índice de tablas.....	v
Índice de figuras.....	v
Resumen .....	vii
Abstract.....	viii
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>3</b>
<b>III. METODOLOGÍA.....</b>	<b>11</b>
3.1. Tipo y diseño de investigación .....	11
3.2. Variables y operacionalización .....	11
3.3. Población, muestra y muestreo .....	12
3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos .....	12
3.5. Procedimientos .....	13
3.6. Método de análisis de datos.....	16
3.7. Aspectos éticos.....	17
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>19</b>
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>23</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>25</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>26</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>27</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>32</b>

## Índice de tablas

<b>Tabla 1:</b> <i>Características del agar lactosa carbonato de calcio al rojo neutro</i> .....	15
<b>Tabla 2:</b> <i>Características diferenciales de Bacillus spp.</i> .....	19
<b>Tabla 3:</b> <i>Selección de Bacillus spp. con la mayor producción de acidez</i> .....	22

## Índice de figuras

<i>Figura 1:</i> Clasificación de suelos con sales disueltas.....	13
<i>Figura 2:</i> Flujograma de las fases del proyecto .....	18
<i>Figura 3:</i> Frecuencia de especies de <i>Bacillus</i> spp. identificados en suelos salinos Eten. ....	21

## Resumen

La salinidad es un grave problema de degradación que afecta a los suelos vulnerables por las malas prácticas agrícolas. En el Valle Chancay Lambayeque más del 50 % de las 120 mil hectáreas se encuentran con esta problemática, amenazando la agricultura y su sostenibilidad. La fitorremediación y la usurpación del sodio por un catión alternativo, son los métodos convencionales para contrarrestar este problema y aun siendo eficientes, ambos métodos recuperan parcial y eventualmente el suelo contaminado. El objetivo de la presente investigación es aislar especies de *Bacillus* halotolerantes, comprobar su potencial biorrecuperador *in vitro* y generar una alternativa más eficaz para la recuperación de suelos salinos. Se obtuvieron 103 cultivos puros de bacterias pertenecientes al género *Bacillus* identificándose *B. brevis* (35,92%), *B. megaterium* (30,09%), *B. subtilis* (27,18%) y *B. cereus* (6.80%). Se seleccionaron 10 cultivos por formación de halo y se cuantificó la acidez, empleando el método de Mann; obteniéndose un rango de acidez desde 0.090 a 0.014%. La comprobación del efecto biorrecuperador fue a través de la inoculación de estas cepas en suelos salinos con variadas concentraciones. El evidente potencial de *Bacillus* ha demostrado que existe posibilidad de aplicaciones para la recuperación de suelos salinos.

**Palabras Claves:** Biorrecuperación, *bacillus*, suelos salinos, acidez, halotolerantes.

## Abstract

Salinity is a serious degradation problem that affects vulnerable soils due to poor agricultural practices. In the Chancay Lambayeque Valley, more than 50% of the 120 thousand hectares encounter this problem, threatening agriculture and its sustainability. Phytoremediation and the usurpation of sodium by an alternative cation are the conventional methods to counteract this problem and even being efficient, both methods partially and eventually recover the contaminated soil. The objective of the present investigation is to isolate halotolerant *Bacillus* species, check their biorecovery potential in vitro and generate a more effective alternative for the recovery of saline soils. 103 pure cultures of bacteria belonging to the genus *Bacillus* were obtained, identifying *B. brevis* (35.92%), *B. megaterium* (30.09%), *B. subtilis* (27.18%) and *B. cereus* (6.80%). 10 cultures were selected per halo formation and acidity was quantified, using the Mann method; obtaining a range of acidity from 0.090 to 0.014%. The biorecuperative effect was checked through the inoculation of these strains in saline soils with varying concentrations. The obvious *Bacillus* bioremediator potential has shown that there is a possibility of applications for the recovery of saline soils.

**Keywords:** Biorecovery, *bacillus*, saline soils, acidity, halotolerants.

## I. INTRODUCCIÓN

Desde que el hombre adoptó la agricultura como una de sus principales actividades para su desarrollo, era necesario entender y manipular el suelo con la finalidad de obtener sustento. Con el tiempo, esta práctica sigue siendo pilar fundamental para el progreso de la sociedad, aunque con ciertos efectos colaterales; siendo uno de ellos, la salinización de suelos.

En Lambayeque, siendo la principal actividad económica la agroindustria. Para producir alimentos en masa, actualmente se aplica una variedad de métodos y tecnologías; lo que conlleva a una mayor eficiencia. Pero, por otro lado, estas prácticas tienen efectos colaterales si de impactar en el ambiente se trata.

La cantidad de área afectada por salinización de suelos aumentó drásticamente en los últimos años, a la actualidad no existe estadística que determine con exactitud cuál es el área de afectación a nivel mundial, sin embargo, las estimaciones más recientes de 2011 fueron de unos 1128 millones de hectáreas.

A nivel nacional la realidad es también preocupante pues existen casi medio millón de hectáreas con problemas de salinidad que son de uso agrícola, mientras que en Lambayeque nos enfrentamos a un aumento significativo en la última década de 30 mil hectáreas con problemas a salinidad de suelos a más de 60 mil hectáreas; lo que equivale a más del 50% de las 120 mil hectáreas que comprende el Valle Chancay Lambayeque.

Dado el hecho de que los métodos más utilizados para recuperar los suelos son: la utilización de las enmiendas y el lixiviado de los suelos, estos procesos llegarán a ser obsoletos y poco favorables, ya que a largo plazo terminan por desestructurar el suelo original. La presente investigación pretende comprobar la capacidad de las bacterias halófilas nativas como potenciales biorremediadores a través de un bioensayo y de tal manera promover una alternativa más eficiente frente a esta problemática.

Las cepas halófilas que se aislaron de ambientes específicos con agar nutritivo modificado con NaCl y posteriormente se seleccionaron los *Bacillus* spp gran positivos, se modificó un agar simulando un suelo salino y se inocularon junto a un

indicador de acidez para determinar su capacidad de desplazamiento de sales debido a la reacción ácido-base, después se seleccionaron las cepas más eficientes y finalmente se sometieron a un estudio de cuantificación de acidez para comprobar su eficiencia biorremediadora.

¿Las bacterias halófilas aisladas tendrán eficiencia en la biorremediación de suelos salinos de Lambayeque?

La presente investigación se realizó bajo la necesidad de generar una solución divergente ante la problemática de suelos salinos que crece de modo exponencial y amenaza con ser uno de los mayores problemas para el desarrollo sostenible a futuro. Esta investigación pretende juntar las bases ambientales y el conocimiento científico para lograr así un método alternativo, a través de la utilización de bacterias halófilas aisladas como agentes biorremediadores para recuperar los suelos salinos; de la misma manera, lograr conocimientos base para futuras investigaciones sobre microorganismos halófilos, considerando que estos tienen un gran potencial biotecnológico que abarca un amplio espectro para la investigación nacional y mundial.

Por lo tanto, se tiene como objetivo principal el determinar el potencial biorremediador *in vitro* de las bacterias halófilas en los suelos salinos de Lambayeque.

Y como objetivos específicos: aislar cepas halófilas nativas de Lambayeque, identificar bioquímicamente las cepas aisladas y calcular la producción de acidez de las cepas.

La hipótesis que se planteó es que las bacterias halófilas aisladas tendrían eficiencia *in vitro* para la aplicación de la biorremediación de suelos salinos en Lambayeque

## II. MARCO TEÓRICO

(Liliana Castro, 2011) En su trabajo de investigación “Aislamiento y caracterización de microorganismos halófilos de suelos salinos de cuatro Ciénegas”, concluye que los suelos El Mezquite 1 y 2 presentan el mayor contenido de cloruro de sodio, por lo tanto, un hábitat adecuado para lograr el aislamiento de microorganismos halófilos moderados. Los medios de cultivo caldo nutritivo modificado, agar nutritivo modificado y HALO permitieron el aislamiento de bacterias halófilas, sin mostrar crecimiento de levaduras u hongos.

La morfología bacteriana más común para los halófilos encontrados correspondió a bacilos y cocos, las cuales han sido reportadas anteriormente por diversos autores para halófilos. Finalmente, las características metabólicas de las cepas evaluadas fueron similares a las reportadas para halófilas moderadas del género *Halomonas*, el cual es empleado en la degradación de materiales derivados de almidón, por lo que las cepas aisladas en el presente estudio podrían ser usadas con fines de biorremediación.

De manera análoga a la publicación científica, los microorganismos aislados fueron estudiados gracias al buen método de muestreo y modificación del medio de cultivo que utilizaron, ya que gracias a ello los agentes que proliferaron en la siembra fueron únicamente los halófilos, siendo una característica favorable para el proceso de análisis. La metodología utilizada en la investigación sirvió de base para el desarrollo del presente proyecto de investigación.

(Vivian Garzón, 2015) En su investigación “Aislamiento e identificación de bacterias halófilas con potencial bioactivo, aisladas de las salinas de Zipaquitrá”, en la cual busca aislar la mayor variedad de bacterias halófilas posibles, realizando procedimientos microbiológicos característicos para este tipo de bacterias extremófilas. En que se aislaron cepas de bacterias halófilas de las cuales 13 son especies nuevas ya que presentaron un porcentaje de identidad menor a 98,7%, siendo un aporte para la biodiversidad de microorganismos en ambientes extremos colombianos y que la salinidad presente en la zona de recolección es un factor decisivo para el aislamiento de las diferentes especies de bacterias halófilas, encontrando que las halófilas extremas se agruparon principalmente en la zona IV,

de acuerdo con los parámetros fisicoquímicos de la zona, ya que presenta un alto contenido de NaCl.

Se resalta de la tesis que es muy crucial el escoger los lugares de muestreo pues las concentraciones de sal presentes en el suelo son decisivas en cuanto a la cantidad microbiana a obtenerse, y que, de realizarse en el lugar adecuado, las bacterias halófilas aisladas pueden ser especies nuevas.

(Siddiquee, 2011) investigaron la eficiencia de bacterias halotolerantes para mejorar la tolerancia a las sales en *Capsicum annuum* L. "pimiento". Se cuantificó la actividad ACC y se evaluó la eficiencia de las bacterias para reducir la producción de etileno y promover el crecimiento en almácigos con 100, 150 y 250 mM NaCl. Se identificaron y seleccionaron *Brevibacterium iodinum*, *Bacillus licheniformis* y *Zhihenglinella alba*. La exposición a 100-200 mM NaCl incrementó la producción de etileno en las plántulas no inoculadas y se redujo en las plantas inoculadas. Con 150 mM NaCl las bacterias incrementaron la altura de planta, longitud de la raíz, biomasa aérea y radicular e índice de tolerancia a la salinidad. Se demostró que las bacterias con actividad ACC desaminasa pueden mitigar el estrés por altas concentraciones de sales en las plantas.

(Martinez,2013) realizaron una investigación donde aislaron cuatro cultivos de rizobacterias de *Solanum esculentum* "tomate", se caracterizaron en sus propiedades bioquímicas relacionadas con la promoción del desarrollo vegetal y se investigó su efecto en el crecimiento de plantas de tomate y *Capsicum annuum* "pimiento". Se realizó la identificación molecular, se investigó la actividad ACC desaminasa y se determinó el resultado de la inoculación a través del desarrollo y la germinación de las plántulas por 30 días (tomate) y 60 días (pimiento) en condiciones de invernadero. La secuencia del gen 16 S ARNr identificó *Bacillus subtilis* (1), *B. megaterium* (2) y *Bacillus* sp. El 100% de cepas presentó actividad ACC desaminasa, solubilización de fosfatos y producción de índoles.

Las bacterias incrementaron la germinación, altura, diámetro del tallo, peso de la biomasa fresca, radicular y área seca, destacando *B. subtilis* en tomate y pimiento. Esta cepa bacteriana presentó potencial para constituir un biofertilizante en los cultivos de tomate y pimiento.

(Carlos Bachon, 2014) En su trabajo de investigación “Biorremediación de aguas residuales con alta salinidad mediante bacterias halófilas aisladas de perfiles costeros de Ecuador”. En el cual realiza un tratamiento de aguas residuales pesqueras con concentraciones de sal (NaCl) 2%, mediante la utilización de bacterias halófilas. Concluyendo que se definió un aislamiento adecuado de bacterias y un medio que brindó mejor crecimiento, ya que realizaron distintas pruebas, variando las concentraciones de sal en los medios de cultivo y así determinando el mejor. Este trabajo aporta significativamente al presente proyecto en aplicar la variación de concentraciones de NaCl y el tiempo que se invertiría para atinar con el medio correcto y eficiente que permita el crecimiento de cepas halófilas, pues las escasas investigaciones locales, no contribuyen en este aspecto.

(Carlos Calderón, 2015) En su trabajo de investigación “Estudio del efecto de inoculación de bacterias en un suelo extremadamente salino”. En el cual analizan el efecto que tiene la inoculación de las bacterias en un suelo salino, dirigiéndose a la variación de la concentración de sales presentes. Donde concluyen que la reducción de salinidad en la 4ta y 5ta semana probablemente implicó la entrada en acción del metabolismo de bioadsorción de sales por parte del microbiota nativo del suelo. No obstante, sugieren que la investigación se aplase a más, pues el tiempo en determinación fue hasta la 5ta semana, en donde probablemente la acción microbiana estuvo en cúspide.

La aportación de esta investigación en cuanto al tiempo de análisis fisicoquímico del suelo para verificar la reducción de sales es crucial pues nos sugieren que la acción microbiana no es pronta.

(Mónica Rodríguez, 2015) En su investigación “Aislamiento e identificación fisiológica de bacterias halófilas nativas para determinar su potencial en la recuperación de suelos salinos”. En el cual determinan el potencial biorremediador que tienen las bacterias halófilas con los suelos salinos. Concluyendo que las bacterias halófilas nativas que se han aislado y seleccionado presentan características con alto potencial para la recuperación de suelos salinos en el país.

Asimismo, en los ambientes hipersalinos se pueden obtener microorganismos nativos de gran interés. Los resultados mostrados en esta publicación científica

generan gran interés por utilizar un método alternativo como principal agente para la biorremediación de los suelos, contribuyendo con un gran pilar de conocimiento, que a la vez abre una posibilidad divergente para lograr un método eficaz e innovador.

Los microorganismos halófilos, pueden tolerar una alta concentración de sal, que sería letal para la gran mayoría de microorganismos, pero los halotolerantes o halófilos pueden crecer en ambientes hipersalinos, requieren específicamente al menos 0,2 moles de sal para su crecimiento en laboratorio. Los microorganismos halotolerantes solo pueden tolerar medios que contengan <0,2 moles de sal (Yoo et al. 2019).

El suelo es un hábitat importante para muchos microorganismos, ya que estos se pueden encontrar como células individuales o formando colonias que juegan un papel importante, es decir, se encuentran dando una conservación y restauración de los biotopos.

Las diferentes ramas que agrupan a las bacterias como las halófilas son las bacterias Gram positivas (Firmicutes), halófilos que se encuentran dentro de las ramas aeróbicas *Bacillus* y organismos relacionados (Wang et al. 2014). Varias especies de *Bacillus* alcalifílicas que han sido aisladas demostraron tener capacidad halófila como *Bacillus krulwichiae*, un anaerobio facultativo, estos tienen la capacidad de utilizar la enzima benzoato o m-hidroxibenzoato como única fuente de carbono (Li et al. 2015).

La halotolerancia es una adaptación dada por los organismos vivos que están en condiciones de alta salinidad, cuentan con mecanismos que no les permite perder agua en el medio externo; así pues, estos microorganismos responden al aumento de la osmolaridad acumulando en su citosol agua la cual los protege de la deshidratación citoplasmática (Margesin y Schinner 2001).

La membrana biológica es crucial para su permeabilidad del agua, por lo tanto, todo microorganismo debe mantener su citoplasma al menos isosmótico con su entorno para evitar la pérdida de agua celular; cuando la presión de turgencia debe mantenerse, el citoplasma debe ser ligeramente hiperosmótico.

La adaptación a condiciones de alta salinidad significa una evolución prebiótica ya que la osmofilia está relacionada con los aspectos osmóticos de la vida a altas concentraciones de sal, especialmente al precio de turgencia, la deshidratación celular y la desecación.

Los microorganismos del suelo son fundamentales para equilibrio de los ecosistemas desérticos, ya que estos generan relaciones benéficas con las plantas, contribuyendo a su supervivencia, nutrición y crecimiento en estos ambientes adversos (Dastgheib et al. 2015).

Las PGPR habitan la rizosfera o región del suelo influenciada por los exudados de la raíz: aminoácidos, ácidos grasos, nucleótidos, ácidos orgánicos, fenoles, reguladores de crecimiento, esteroides, azúcares y vitaminas.

Suelo salino es aquel que contiene sales solubles y su causa es tanto natural como antropogénica. La manera natural de salinización de suelo es cuando influye la geografía; si es el caso de una llanura es por inundación y, por otro lado, cuando la napa freática está cerca de la superficie de la tierra; por lo que el agua con sales disueltas sube por capilaridad. Estos suelos particulares afectan a la producción agrícola y el ecosistema.

La salinidad se determina con la conductividad eléctrica (CE) o concentración total de sales que se encuentran en la solución del suelo, expresada como extracto de saturación del suelo. Así pues, tenemos que las plantas son sensibles a la salinidad siendo afectadas por una conductividad eléctrica de  $2 \text{ dSm}^{-1}$  ya que no soportan sus raíces la gran cantidad de sales restringiéndolas de la absorción de agua ocasionado un desecamiento fisiológico dando la muerte de la planta.

El estrés en un organismo es el conjunto de respuestas bioquímicas o fisiológicas diferentes a las observados bajo condiciones óptimas.

El estrés puede ser ambiental, fisiológico y bioquímico (Dastgheib et al. 2011). El estrés ambiental corresponde a las condiciones desfavorables, como el estrés, por alta y baja temperatura, sequía e inundación, salinidad, nutrientes y por toxicidad de metales pesados.

La sequía, salinidad y temperaturas extremas son los principales tipos de estrés que afectan el desarrollo y productividad en la agricultura (Martínez et al. 2013).

El estrés salino es consecuencia de la elevada concentración de sales en el suelo. Por ende, la presión osmótica en el suelo es menor que el de la planta y el agua sale de la planta hacia el suelo, causando deshidratación de forma similar al estrés por la falta de agua.

El sodio, en mayores concentraciones, altera el metabolismo, generando un déficit de absorción y movimiento de potasio y calcio dentro de la planta (Chávez-Ambríz et al. 2016). De tal manera, los iones sodio (Na<sup>+</sup>) y cloro (Cl<sup>-</sup>) en exceso causan toxicidad en la mayoría de las plantas cultivables.

La presencia de alta osmosidad, toxicidad iónica y condiciones físicas desfavorables para el suelo causan una limitación para muchos organismos y por lo tanto un efecto en los ecosistemas por la sal en los eco tonos especializados (Arora, Singh y Sahni 2017).

Como consecuencia del estrés causado por la salinidad, se acelera en forma significativa la síntesis, liberación y difusión del etileno, se detiene la elongación de la raíz, se acelera la senescencia de flores, se promueve la abscisión de flores y frutos y la muerte de las plantas (Esquivel-cote et al. 2015).

El etileno es una hormona vegetal que induce la ruptura de la dormancia, diferenciación de raíces y tallos, formación de raíces adventicias, abscisión de hojas y frutos, inducción de florecimiento, senescencia de hojas y flores y madurez de frutos (Esquivel et al., 2015).

Los niveles de etileno en las plantas se incrementan como respuesta al estrés provocado por la temperatura, escasez de agua, salinidad y ataques de patógenos, entre otros. Altas concentraciones de etileno inhiben el crecimiento de las plantas, inducen marchitamiento, abscisión, senescencia y clorosis foliar, caída de flores, disminución del rendimiento y muerte prematura (Vardharajula et al. 2015).

La salinidad del suelo, de forma natural, es resultado de la acumulación de sales en la superficie debido al movimiento de las aguas freáticas hacia ella (Zhou, Zhao y Tian 2017). Sin embargo, se sabe también que la acumulación de sales en el suelo se debe mayormente al déficit de drenaje de los suelos y a las malas prácticas agrícolas como: El monocultivo, aplicación excesiva de productos químicos, la inundación de las parcelas, etc.

Este tipo de suelo tiene un bajo contenido de sales, pero posee una concentración de sodio intercambiable, capaz de afectar a los cultivos drásticamente y al suelo en su estructura y función. Los parámetros que se relacionan con la sociedad son el RAS que es el extracto de saturación del suelo y el PSI que es el porcentaje de sodio intercambiable.

Los ambientes naturales salinos son acuáticos o terrestres, estos tienen capacidad de poseer una microflora nativa, la cual es clave en los ecosistemas, además estos ambientes salinos poseen una diversidad de grupos bacterianos, los cuales se adaptan evolutivamente en su plano fisiológico y estructural, esto les permite sobrevivir a estas condiciones de salinidad. Las bacterias catalogadas como halófilas pueden desarrollarse en altas concentraciones de sal y tolerar también temperaturas altas, ya que es en ambientes cálidos donde se desarrollan estos tipos de suelos.

Las especies de *Bacillus* tienen forma de bastoncillo, forman endosporas aeróbicas o facultativamente anaeróbicas, Bacterias Gram positivas; en algunos casos, con la edad, algunos cultivos se vuelven gramnegativos. Numerosas especies del género cuenta con habilidades fisiológicas con las que sobreviven en diversos entornos naturales.

Cada célula contiene una Endospora, las cuales suelen ser resistentes ambientes radicales como: el calor, frío, radiación, deshidratación, etc. La producción de enzimas de los *Bacillus*, es por lo general aprovechada por las industrias. Algunos '*Bacillus*' pueden formar inclusiones intracelulares de polihidroxialcanoatos en condiciones adversas, bajo carencia de elementos como oxígeno, nitrógeno o fósforo, combinado con un suministro excesivo de fuentes de carbono.

El género *Bacillus* tiene la particularidad de ser un control biológico de fitopatógenos, esto debido a su diversidad metabólica, por lo que el rubro académico e industrial ha llevado su interés a la formulación de maneras en las que se pueda aplicar en el campo.

El género *Bacillus* incluye especies caracterizadas como PGPR, porque producen índoles, solubilizan fosfatos, fijan nitrógeno, producen sideróforos, presentan actividad ACC desaminasa (Manoharan, Lee y Lee 2017), inducen resistencia sistémica, RSI, son muy eficientes en el control de Fito patógenos y promueven el desarrollo de los cultivos agrícolas.

La biorremediación es un método que actualmente se emplea para eliminar la contaminación, mediante el uso de organismos (bacterias, hongos, levaduras y plantas). Este procedimiento permite transformar los compuestos y sustancias tóxicas de tal manera que disminuya su efecto en la salud y el ambiente; como también puede lograr neutralizarlos.

Los bioinoculantes basados en consorcios han ganado importancia recientemente porque al involucrar diversos microbios no solo se puede manejar el estrés de salinidad, sino que también se pueden controlar los fitopatógenos y asimilar los nutrientes simultáneamente (Woo y Pepe 2018). En la actualidad se carece de productos a base de bacterias para uso específico en agroecosistemas salinos y los bioinoculantes disponibles no funcionan en tales condiciones. Esto hace que el usuario final sea escéptico sobre el uso de alternativas biológicas. El uso de metabolitos como EPS ya ha sido sugerido y explorado en algunos bioproductos más recientes. El EPS se puede producir a bajo costo a nivel de laboratorio e industrial y se puede agregar a bioinoculantes preparados para suelos salinos. Este metabolito puede actuar como protector tanto del PGPR inoculado como de la planta. De manera similar, también se pueden explorar otros metabolitos y portadores para el desarrollo de bioformulaciones hechas a medida para suelos salinos.

Se han investigado que la comprensión de las redes reguladoras de para inducir la tolerancia a la sal en las plantas podría servir como una medida prometedora para aliviar el estrés por sal y mejorar la producción mundial de alimentos. Kim et al.,

(2019) sugirió que la identificación de la microflora indígena dominante del suelo altamente salino y sus posibles mecanismos de adaptación pueden proporcionar una mejor comprensión para explorar las respuestas ecológicas y evolutivas en los ecosistemas.

El papel de los enfoques metagenómico y metabolómico se vuelve muy importante en el caso de aprovechar e identificar el nuevo conjunto de bacterias tolerantes a la sal, junto con los genes y metabolitos clave involucrados en la tolerancia a la sal, también abordaron que se debe preferir el uso de cepas autóctonas en el desarrollo de bioinoculantes, ya que pueden adaptarse fácilmente a las condiciones del campo local.

De manera similar, el desarrollo de bioinoculante basado en un diseño exclusivamente para suelos salinos podría ser un enfoque más eficiente en el manejo de la pérdida de productividad en varios cultivos (Mishra, Fatima y Arora 2018). Considerando que también deben explorarse las perspectivas de la investigación futura del desarrollo de nuevos bioinoculantes que proporcionen metabolitos (osmolitos, biosurfactantes, precursores de fitohormonas y enzimas de estrés) junto con cepas eficientes (incluidos los consorcios).

La reacción ácida – base es la reacción de neutralización de una “sal” o base con un ácido orgánico. Generalmente esta reacción se da de manera exotérmica, dependiendo calor en el proceso. La neutralización se considera en sí porque al reaccionar ambos compuestos, estos neutralizan sus propiedades mutuamente.

### **III. METODOLOGÍA**

#### **3.1. Tipo y diseño de investigación**

Investigación aplicada

Diseño cuasi experimental, longitudinal de carácter comparativo.

#### **3.2. Variables y operacionalización**

V1: Bacterias halófilas

V2: Suelos salinos.

### **3.3. Población, muestra y muestreo**

Población:

Los suelos con altas concentraciones de sal en la región de Lambayeque.

Muestra:

La unidad de muestreo fue de 56 muestras de 1Kg c/u de suelo aproximadamente.

Muestreo:

El muestreo se realizó de manera no probabilística por conveniencia, dado que, para obtener muestras significativas y uniformes, se tomaron muestras con la finalidad de obtener la mayor cantidad de cepas halófilas, con 1 kg de cada muestra y posteriormente se homogenizó.

Ubicación:

El Distrito de Puerto Eten, ubicada en el Departamento de Lambayeque, es uno de los veinte distritos de la Provincia de Chiclayo. Limita por el norte, este y sur, con el Distrito de Eten; y, por el oeste con el Océano Pacífico. Está ubicado a orillas del mar Peruano, y rodeado por el Distrito de Eten; a 20 km de la ciudad de Chiclayo. Su territorio se encuentra en la región chala y frente a las costas del mar.

### **3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos**

Técnicas

Inicialmente se analizó dónde podría ser el lugar para realizar el muestreo de suelo que no contenga una elevada concentración de sales solubles para evitar así a los halófilos extremos en el caso de concentraciones mayores a 8 mmhos, por otro lado, evitar las bajas concentraciones y que no sea posible aislar bacterias halófilas; por lo que se recurrió a un mapa cartográfico facilitado por la Autoridad Local del Agua (Figura 11), y se decidió por un

lugar donde las concentraciones varían entre 4 a 6 mmhos, in situ se escogió parcelas donde la siembra prospera, pese a las condiciones arenosas y áridas.

<b>Clasificación</b>	<b>pH</b>	<b>CE (dS m<sup>-1</sup>)</b>	<b>PSI (%)</b>	<b>Proceso</b>
Salinos	<8.5	>4	<15	Salinización
Sódicos	>8.5	<4	>15	Sodificación
Salinos- Sódicos	>8.5	>4	>15	Salinización- Sodificación

*Figura 1:* Clasificación de suelos con sales disueltas.

Inicialmente se tomaron las muestras aplicando la técnica de Zigzag, la que consiste en realizar muestreo en forma de zigzag para obtener una mayor variabilidad, con la ayuda de una pala, a profundidad de 10 a 20 cm se tomó 1Kg de muestra aproximadamente en una bolsa hermética y se rotuló cada bolsa. Cada punto que se tomó, se anotaban las coordenadas respectivas. Las muestras de suelo se llevaron a laboratorio y se procedió a la homogenización y secado de las mismas.

Se preparó el medio de cultivo, agar nutritivo, modificado con NaCl en concentraciones entre el 5% al 10%, se adicionó antimicótico para evitar la proliferación de hongos presentes en el suelo.

Se calibró el instrumento con una solución, buffer de pH conocido. Posteriormente se realizó la medición de pH empleando un potenciómetro y así se obtuvo un análisis preciso

Las UFC se identificaron morfológicamente, las cuales fueron seleccionadas y se volvieron a sembrar en viales con las características del medio de cultivo en el cual prosperaron.

### 3.5. Procedimientos

#### 3.5.1. Fases del proyecto

a) Muestreo

Para la obtención de las muestras se retiró el suelo hasta una profundidad de 0,60 m y se recolectó 1 kg de suelo, se depositaron las muestras en bolsas de polietileno debidamente identificadas y se transportaron en una caja térmica ( $10 \pm 1^\circ\text{C}$ ) hacia el laboratorio. En simultáneo al muestreo de suelo rizosférico para el aislamiento de *Bacillus spp.*, se colectó una muestra representativa de 2kg de suelo para realizar el análisis fisicoquímico en el laboratorio.

b) Rotulado

Las muestras se rotularon con la ubicación, fecha y hora de muestra.

c) Transporte y almacenamiento

Las muestras se trasladaron en una caja térmica del campo al laboratorio.

d) Análisis

Se ejecutaron los siguientes análisis: Según los resultados, el suelo es salino-sódico (conductividad eléctrica,  $\text{CE} = 23,68 \text{ dSm}^{-1}$  y porcentaje de sodio intercambiable,  $\text{PSI} = 24,65\%$ ).

e) Aislamiento de *Bacillus spp.*

Para el aislamiento de *Bacillus spp.* (Baig et al. 2012), las muestras de suelo rizosférico se deshidrataron bajo sombra durante 72 horas, aleatoriamente se tomaron 10g de suelo, se depositaron en frascos de 250mL de capacidad con 90mL de solución salina esterilizada, NaCl 0,85%, p/v y se agitaron durante 10 minutos. Las diluciones ( $10^{-1}$ ) se llevaron a tratamiento térmico, a  $80^\circ\text{C}$ , durante 10 minutos y se enfriaron rápidamente con agua de caño (Ríos y Zúñiga 2012).

Después del enfriamiento, se tomaron alícuotas de las diluciones de suelo tratadas, se sembraron mediante la técnica de agotamiento y estría sobre la

superficie de agar nutritivo (con 5% de NaCl en placas de Petri) y se incubaron en aerobiosis, a 30°C hasta por 120 horas.

Con las bacterias de las colonias desarrolladas a las 48 y 120 horas se realizaron tinciones de Gram y los bacilos Gram positivos, esporulados, móviles, catalasa y oxidasa positivos (Sánchez-Bautista et al. 2018), se cultivaron en Agar Tripticasa Soya (TSA) con 5% NaCl en aerobiosis, constituyendo los cultivos de *Bacillus* spp. que se guardaron en refrigeración (8°C).

f) Técnica de simulación de suelo salino

Después de obtener los cultivos puros, se procedió a modificar un medio de cultivo llamado Agar Lactosa Carbonato De Calcio Al Rojo Neutro con el indicador. El cual tuvo las siguientes propiedades:

**Tabla 1:** Características del agar lactosa carbonato de calcio al rojo neutro

Componente	g/L
Lactosa	10 g
Peptona	3 g
Extracto de carne	3 g
Extracto de levadura	3 g
Carbonato de calcio	15 g
Agar agar	15 g
Solución acuosa al rojo neutro al 1%	5 mL
Agua destilada	1 L
pH	6.8

Donde se procedió a sembrar cada cultivo obtenido con una variación de NaCl del 5 y 10 % x 100 ml.

g) Selección de *Bacillus* según su actividad acidificante

Sembrar cada una de las colonias en agar lactosa carbonato de calcio rojo neutro durante 24 horas. Obtener una suspensión celular en solución salina

estéril y estandarizar su concentración celular hasta  $3 \times 10^8$  (tubo 1 del nefelómetro de Mc Farland).

Tomar 5 mL del contenido de cada uno de los matraces cultivados con *Bacillus* y determinar el porcentaje de acidez titulable mediante el método acidimétrico de Mann.

Tomar 5 mL del contenido del matraz cultivado con *Bacillus* spp. y determinar la formación de diacetilo a través de la prueba de Voges Proskauer modificada (adicionar dos gotas de KOH y dos gotas de alfa naftol y anotar la rapidez e intensidad de color de la reacción a partir de los 15 minutos hasta después de los 45 minutos de iniciada la prueba).

Sembrar un fragmento de 1 cm de la colonia de *Bacillus* spp. productora de acidez en un matraz con 50 mL de medio de fermentación. Determinar la acidez inicial (método acidimétrico de Mann). Incubar a temperatura ambiente (30 °C) durante 5 días.

Determinar la acidez final (método acidimétrico de Mann).

Factor para ácido cítrico: 0,007005

Cálculo de acidez

Volumen titulado: 5 ml

Gasto de NaOH: 7,5 ml

Factor para ácido: 0,007005

% acidez: 
$$\frac{7,5\text{mL} \times 0,007005 \times 100}{5\text{mL}}$$

Acidez: 1,05075 % de acidez expresada como ácido láctico.

### 3.6. Método de análisis de datos

Los datos en esta investigación serán interpretados en el programa EXCEL.

### **3.7. Aspectos éticos**

El presente trabajo de investigación se determina por ser imparcial, dará una solución para tratar las aguas residuales con la aplicación de diferentes dosis de microorganismos eficaces.

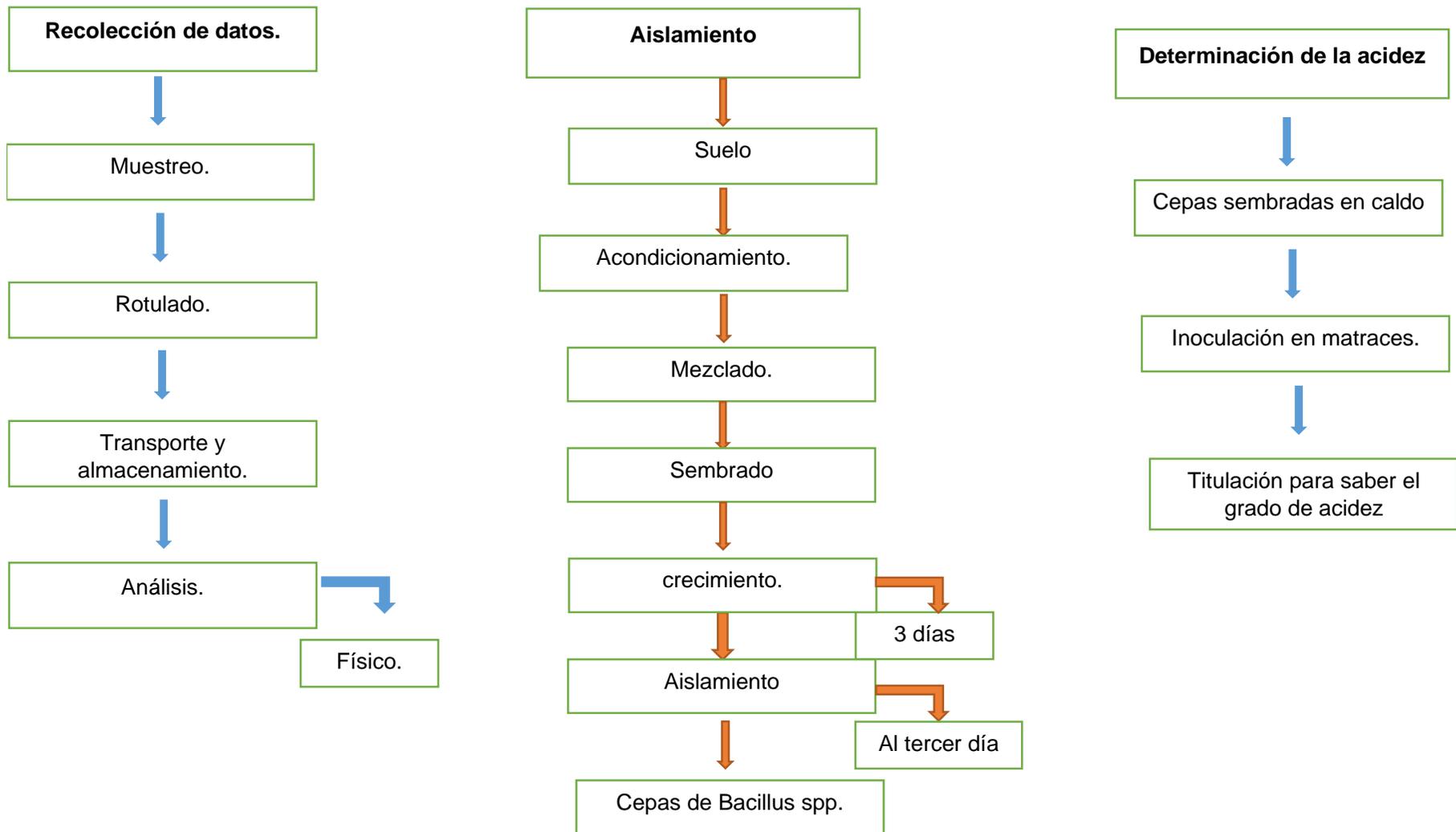


Figura 2: Flujograma de las fases del proyecto

## IV. RESULTADOS

Bacterias halófilas nativas aisladas e identificadas procedentes de muestras de suelo de Puerto Eten en Lambayeque

### 4.1. Aislamiento

De las 54 muestras recolectadas en Eten el 100% resulto positivo para el aislamiento de 325 bacterias halófilas, cada bacteria fue primeramente aislada en medio TSA con 5% de cloruro de sodio, para después separar cada colonia aislada por morfotipos, color y textura, encontrando así un 60% de colonias con forma irregular color blanco y textura cremosa el 40% fueron colonias entre amarillas y rojas de aspecto brillantes y pastosas. Posteriormente se realizaron tinciones de Gram a cada colonia encontrándose que 100 bacterias halófilas fueron *Bacillus* Gram positivos y 225 fueron cocos Gram positivos, *Bacillus* Gram negativo, cocobacilos Gram negativos y cocos en racimos gram positivos.

Se tomaron los 114 *Bacillus* Gram positivos por ser reportadas como bacterias capaces de tolerar gran cantidad de salinidad y ayudar a la promoción del crecimiento vegetal. Estos fueron sometidos a diferentes pruebas bioquímicas fenotípicamente.

**Tabla 2:** Características diferenciales de *Bacillus* spp.

Características	<i>B. brevis</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>
Coloración de Gram	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+
Glucosa	+	+	+	+
Manitol	-	-	V	-
Xilosa	-	-	V	-
Arginina	-	-	V	-
Reducción de nitratos	-	-	+	+
Urea	+	+	-	-
Lecitina	-	-	-	+
Hidrólisis de almidón	-	+	V	V

Voges-Proskauer	+	-	V	V
Citrato	-	-	-	-

Fuente: Elaboración propia

#### 4.1.1. Identificación

Para la identificación de las bacterias halófilas seleccionadas se utilizaron diferentes pruebas bioquímicas como la Catalasa sienta está considerada para ver la capacidad de las bacterias de tener poder oxidante, además de los azúcares como la Xilosa, glucosa, Arabinosa y Manitol este último es indispensable para ver la capacidad de estos microorganismos de asimilar el manitol cabe resaltar que cada tipo de prueba bioquímica se le adiciono 5% de cloruro de sodio para ver la capacidad y adaptación de estos microorganismos con diferentes sustratos.

El Voges Proskauer evaluar la capacidad de estos microorganismos de utilizar otras vías alternas para poder adaptarse a medios especiales al igual que en el Citrato, el medio con Yema de huevo permite ver la capacidad de los microorganismos para determinar la producción de lecitinasa y, además, la actividad de lipasa esto permite en la agricultura ver la capacidad que tienen estos microorganismos aplicados en el suelo para ayudar a la promoción y nutrición de las plantas a fines. Almidón Nitrato Urea estos dos últimos evalúan la capacidad de los microorganismos de degradar los nitratos que también se encuentran presente en algunos suelos para finalmente producir amonio al igual que la urea esto sirve para dar la fuente de nitrógeno para la planta y las bacterias se alimente de sustancias como glucosa que les permite sobrevivir y adaptarse a este medio con salinidad.

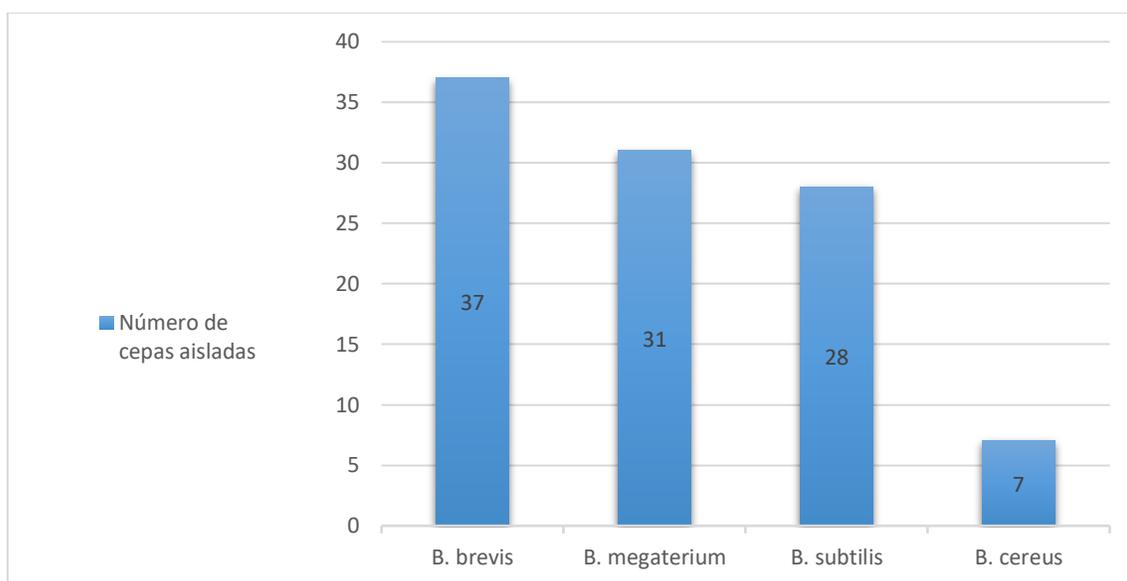


Figura 3: Frecuencia de especies de *Bacillus* spp. identificados en suelos salinos Eten.

#### 4.1.2. Potencial biorremediador *in vitro* de los *Bacillus* sp. con la mayor producción de acidez

Para la evaluación del potencial biorremediador de cada *Bacillus* spp. aislado e identificado, se determinó la capacidad de producción de acidez de cada microorganismos este parámetro es uno de los tanto a tomar en cuenta para la remediación de suelo salino al sembrar cada bacteria en agar carbonato de calcio rojo neutro permite evidenciar mediante un halo alrededor de la colonia bacteriana la capacidad de degradar ciertos minerales *in vitro* semejante a lo que pasa en suelo salino donde los minerales están compactados con otros elementos como el sodio haciendo el suelo salino, estos microorganismos mediante la acidez producida eliminan radicales que permiten liberar estos elementos, asumiendo así que las bacterias recuperan un suelo salino, lo que se conoce como la reacción ácido – base.

Los resultados del diámetro del halo formado en el medio de cultivo están en el Anexo N° 8

**Tabla 3:** Selección de *Bacillus* spp. con la mayor producción de acidez.

<i>Bacillus</i> spp.	Acidez (%)
<i>B. brevis</i> 22.1	0.090
<i>B. subtilis</i> 54.1(-2)	0.087
<i>B. subtilis</i> 42.2(-2)	0.079
<i>B. megaterium</i> 12.1	0.076
<i>B. cereus</i> 20.2	0.071
<i>B. brevis</i> 51.1(-2)	0.070
<i>B. megaterium</i> 42.6(-2)	0.069
<i>B. brevis</i> 54.2(-2)	0.065
<i>B. subtilis</i> 30.1	0.047
<i>B. subtilis</i> 8.2	0.035

Fuente: Elaboración propia

Se evaluó el potencial para la producción de acidez de cada *Bacillus* spp. siendo la especie *brevis* la que mayor poder de acidificación tubo demostrando tener los mayores halos de solubilización y la mayor producción de acidez media la técnica de Mann.

## V. DISCUSIÓN

El microorganismo con mayor potencial en para la recuperación de suelo salino fue *Bacillus Brevis* al igual que Song et al. (2017) que demostraron aislar este microorganismos de un campo salino que previamente era utilizado para sembrar arroz; el cultivo de arroz demanda mayor cantidad de agua para poder desarrollarse, en este sentido se genera un impacto ambiental a través del tiempo, una salinidad excesiva, dejando al suelo sin la característica óptima proveer nutrientes necesarios para el crecimiento de las plantas.(Vimal, Gupta y Singh 2018).

La identificación bioquímica realizada, nos da una indicación de la variedad de *Bacillus* que se encuentran en el suelo con concentraciones de sal de 4 a 8 dSm<sup>-1</sup>. De acuerdo con el mapa de salinidad y drenaje del ANA.

El medio de cultivo utilizado para la simulación de suelo con concentraciones de sal de 5% y 10%. Agar Lactosa Carbonato de Calcio al Rojo Neutro, se modificó tomando en cuenta las características en las que se aisló para que no sufrieran estrés, del mismo modo se agregó lactosa para que fuera su fuente de energía.

El halo formado es una representación de que la cepa tomó la lactosa como fuente de energía y el resultado de ese proceso de desarrollo celular es un ácido orgánico, tomando en cuenta que las cepas hicieron que el medio se tornase de color blanco, o variables colores de rosa; lo que significa que usaron la lactosa y hay presencia de ácido.

El ácido orgánico al entrar en contacto con la sal, la desplaza. Es decir, genera una reacción ácido-base.

Rajput et al., (2013 y Upadhyay et al., (2009) demostraron que la mayoría de sus aislamientos toleraron hasta un 8% de NaCl y la mayoría de estos pertenecía a los genero *Bacillus*. La diversidad de bacilos tolerantes a la sal también ha sido reportada en suelo de llanuras de la india según (Sharma et al. 2015), aislando una gran cantidad

de bacterias que entre ella destacaron los géneros *Bacillus* tolerando hasta 4% de NaCl y entre otras que toleraron hasta 10% NaCl (Pushpavalli et al. 2016).

La presente investigación promueve un aporte en la naturaleza generando una alternativa de prevención y recuperación de suelos salinos, aunque claro está que está en etapa *in vitro*, se trabaja en generar un proceso para la recuperación de suelos salinizados mediante los mecanismos que tiene estas bacterias que directa o indirectamente participan en la mejora al estrés causado por la salinidad en las plantas cultivadas (Egamberdieva, Jabborova y Berg 2016). Estas bacterias son capaces de producir varios tipos de mecanismos como la producción de fitohormonas, la síntesis de ACC desaminasa una enzima capaz de darle resistencia a la planta en un suelo con salinidad coadyuvado por un microorganismos en nuestro caso el *Bacillus* (Glick et al. 2007).

Hoy en día, varios investigadores están comprometidos enérgicamente para mejorar la eficacia y aplicabilidad de los bioinoculantes que contienen bacterias son aplicados en condiciones de campo. Además, una parte importante de la investigación se enfoca a mejorar los problemas relacionados con el desarrollo de formulaciones, mejorar la productividad de los suelos salinos no solo ayudará a lograr la seguridad alimentaria, sino que también dará como resultado un mejor contenido y calidad de la materia orgánica del suelo en estos agrosistemas nutricionalmente pobres. Esto puede ayudar a reducir la huella de carbono y también a combatir el cambio climático.

## VI. CONCLUSIONES

- 1) En la presente investigación se logró aislar 114 cultivos puros de *Bacillus spp halotolerantes*, los cuales se lograron por las modificaciones con NaCl en concentraciones del 5% al 10% y el uso de antimicótico para evitar la propagación de hongos que también se encuentran presentes en el suelo.
- 2) La identificación dio un resultado predominante de *B. Brevis* con un resultado del 37% frente a los demás.
- 3) El medio modificado, Agar Lactosa Carbonato de Calcio al Rojo Neutro, permitió confirmar la hipótesis gracias a los halos que se formaron alrededor de las colonias de *Bacillus* que lograron producir acidez, lo que se traduce en una reacción de desplazamiento de sales.
- 4) Al utilizar el método de Mann para cuantificar la acidez, después de seleccionar 10 cultivos con los halos más prominentes, se identificó a *Bacillus Brevis* como la especie que más acidez producía, por lo que se estima que esta especie sea la que tenga mayor potencial biorremediador.
- 5) El campo de la biotecnología para la remediación de suelos tiene mucho por explorar, sin embargo, la presente investigación es un paso más para las prometedoras investigaciones venideras.

## **VII. RECOMENDACIONES**

De acuerdo con la investigación realizada, se recomienda lo siguiente:

- 1)** Al aislar microorganismos halófilos, aplicar variaciones de 5% de NaCl hasta 15%, acompañado de un antimicótico para evitar proliferación de hongos y obtener así mayor cantidad de bacterias halófilas y halotolerantes.
  
- 2)** La primera propuesta es utilizar los resultados de la presente investigación para generar un consorcio microbiano con cepas que posean capacidades variadas para biorremediar el suelo, y darle una dirección de promoción de crecimiento a las plantas.
  
- 3)** La segunda propuesta es utilizar la ingeniería genética con el fin de analizar específicamente la capacidad biorremediadora de las cepas aisladas y repotenciar sus características, aplicándolo después en una escala mayor; comparando con los métodos convencionales.
  
- 4)** La tercera propuesta es promover la presente investigación como un camino para formular un posible biofertilizante, utilizando estos microorganismos con un sustrato y que tenga el potencial de complementar en el proceso agrícola.

## REFERENCIAS

ARORA, S., SINGH, A.K. y SAHNI, D., 2017. Bioremediation of salt-affected soils: Challenges and opportunities. *Bioremediation of Salt Affected Soils: An Indian Perspective*. S.I.: Springer International Publishing, pp. 275-301. ISBN 9783319482576.

CHÁVEZ-AMBRIZ, L.A., HERNÁNDEZ-MORALES, A., CABRERA-LUNA, J.A., LUNA-MARTÍNEZ, L. y PACHECO-AGUILAR, J.R., 2016. Aislados de *Bacillus* provenientes de la rizósfera de cactus incrementan la germinación y la floración en *Mammillaria* spp. (Cactaceae). *Revista Argentina de Microbiología*, vol. 48, no. 4, pp. 333-341. ISSN 03257541. DOI 10.1016/j.ram.2016.09.001.

DASTGHEIB, S.M.M., AMOOZEGAR, M.A., KHAJEH, K. y VENTOSA, A., 2014. A halotolerant *Alcanivorax* sp. strain with potential application in saline soil remediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 90, no. 1, pp. 305-312. ISSN 01757598. DOI 10.1007/s00253-010-3049-6.

EGAMBERDIEVA, D., JABBOROVA, D. y BERG, G., 2016. Synergistic interactions between *Bradyrhizobium japonicum* and the endophyte *Stenotrophomonas rhizophila* and their effects on growth, and nodulation of soybean under salt stress. *Plant and Soil*, vol. 405, no. 1-2, pp. 35-45. ISSN 15735036. DOI 10.1007/s11104-015-2661-8.

EGAMBERDIEVA, D., WIRTH, S., BELLINGRATH-KIMURA, S.D., MISHRA, J. y ARORA, N.K., 2019. *Salt-Tolerant Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Enhancing Crop Productivity of Saline Soils*. 18 diciembre 2019. S.I.: Frontiers Media S.A.

ESQUIVEL-COTE, R., GAVILANES-RUIZ, M., CRUZ-ORTEGA, R. y HUANTE, P., 2013. Importancia Agrobiotecnológica De La Enzima Acc Desaminasa En Rizobacterias , Una Revisión Agrobiotechnological Importance of the Acc Deaminase in Rhizobacteria , a Review. , vol. 36, no. 3, pp. 251-258.

FAO, 2014. *World reference base for soil resources 2014. International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps*. S.l.: s.n. ISBN 9789251083697.

JI, H., PARDO, J.M., BATELLI, G., VAN OOSTEN, M.J., BRESSAN, R.A. y LI, X., 2014. *The salt overly sensitive (SOS) pathway: Established and emerging roles*. 2014. S.l.: Oxford University Press.

KIM, K., SAMADDAR, S., CHATTERJEE, P., KRISHNAMOORTHY, R., JEON, S. y SA, T., 2019. Structural and functional responses of microbial community with respect to salinity levels in a coastal reclamation land. *Applied Soil Ecology*, vol. 137, pp. 96-105. ISSN 09291393. DOI 10.1016/j.apsoil.2019.02.011.

LI, Q., WANG, M., FENG, J., ZHANG, W., WANG, Y., GU, Y., SONG, C. y WANG, S., 2014. Treatment of high-salinity chemical wastewater by indigenous bacteria - bioaugmented contact oxidation. *Bioresource Technology*, vol. 144, pp. 380-386. ISSN 18732976. DOI 10.1016/j.biortech.2013.07.004.

MANOHARAN, R.K., LEE, J.H. y LEE, J., 2017. Antibiofilm and antihyphal activities of cedar leaf essential oil, camphor, and fenchone derivatives against *Candida albicans*. *Frontiers in Microbiology*, vol. 8, no. AUG, pp. 1476. ISSN 1664302X. DOI 10.3389/fmicb.2017.01476.

MARTÍNEZ, L.L., PENICHE, R.A.M., ITURRIAGA, M.H., MEDRANO, S.M.A. y PACHECO AGUILAR, J.R., 2013. Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. *Revista Fitotecnia Mexicana*, vol. 36, no. 1, pp. 63-69. ISSN 01877380.

MISHRA, J., FATIMA, T. y ARORA, N., 2018. Plant Microbiome: Stress Response. ,

MONTANARELLA, L., BADRAOUI, M., ... V.C.-E.S. y 2015, U., [sin fecha]. Status of the world's soil resources: main report. *alice.cnptia.embrapa.br*,

NIU, X., SONG, L., XIAO, Y. y GE, W., 2018. Drought-tolerant plant growth-promoting

rhizobacteria associated with foxtail millet in a semi-arid and their potential in alleviating drought stress. *Frontiers in Microbiology*, vol. 8, no. JAN. ISSN 1664302X. DOI 10.3389/fmicb.2017.02580.

PARK, H.J., KIM, W.Y. y YUN, D.J., 2014. A role for GIGANTEA: Keeping the balance between flowering and salinity stress tolerance. *Plant Signaling and Behavior*, vol. 8, no. 7. ISSN 15592316. DOI 10.4161/psb.24820.

PUSHPAVALLI, R., QUEALY, J., COLMER, T.D., TURNER, N.C., SIDDIQUE, K.H.M., RAO, M. V. y VADEZ, V., 2016. Salt Stress Delayed Flowering and Reduced Reproductive Success of Chickpea (*Cicer arietinum* L.), A Response Associated with Na<sup>+</sup> Accumulation in Leaves. *Journal of Agronomy and Crop Science*, vol. 202, no. 2, pp. 125-138. ISSN 1439037X. DOI 10.1111/jac.12128.

QIN, S., ZHANG, Y.J., YUAN, B., XU, P.Y., XING, K., WANG, J. y JIANG, J.H., 2014. Isolation of ACC deaminase-producing habitat-adapted symbiotic bacteria associated with halophyte *Limonium sinense* (Girard) Kuntze and evaluating their plant growth-promoting activity under salt stress. *Plant and Soil*, vol. 374, no. 1-2, pp. 753-766. ISSN 0032079X. DOI 10.1007/s11104-013-1918-3.

RAJPUT, L., IMRAN, A., MUBEEN, F. y HAFEEZ, F.Y., 2013. Salt-tolerant PGPR strain *Planococcus rifietoensis* promotes the growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivated in saline soil. *Pakistan Journal of Botany*, vol. 45, no. 6, pp. 1955-1962. ISSN 05563321.

RÍOS, P. y ZÚÑIGA, L., 2014. *Bacillus* spp. aisladas de rizósfera de *Lycopersicon esculentum* Mill. "tomate" en Lambayeque y su potencial coimo promotoras del crecimiento de plantas. ,

RYU, J.Y., LEE, H.J., SEO, P.J., JUNG, J.H., AHN, J.H. y PARK, C.M., 2014. The arabidopsis floral repressor BFT delays flowering by competing with FT for FD binding under high salinity. *Molecular Plant*, vol. 7, no. 2, pp. 377-387. ISSN 17529867. DOI 10.1093/mp/sst114.

SÁNCHEZ-BAUTISTA, A., DE LEÓN-GARCÍA DE ALBA, C., ARANDA-OCAMPO, S., ZAVALETA-MEJÍA, E., NAVA-DÍAZ, C., GOODWIN, P.H. y LEYVA-MIR, S.G., 2018. Bacterias endófitas de la raíz en líneas de maíces tolerantes y susceptibles a sequía. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, vol. 36, no. 1, pp. 35-55. ISSN 2007-8080. DOI 10.18781/r.mex.fit.1710-3.

SHARMA, A., SINGH, P., KUMAR, S., KASHYAP, P.L., SRIVASTAVA, A.K., CHAKDAR, H., SINGH, R.N., KAUSHIK, R., SAXENA, A.K. y SHARMA, A.K., 2015. Deciphering Diversity of Salt-Tolerant Bacilli from Saline Soils of Eastern Indo-gangetic Plains of India. *Geomicrobiology Journal*, vol. 32, no. 2, pp. 170-180. ISSN 15210529. DOI 10.1080/01490451.2014.938205.

SIDDIKEE, M.A., GLICK, B.R., CHAUHAN, P.S., YIM, W. jong y SA, T., 2017. Enhancement of growth and salt tolerance of red pepper seedlings (*Capsicum annuum* L.) by regulating stress ethylene synthesis with halotolerant bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase activity. *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 49, no. 4, pp. 427-434. ISSN 09819428. DOI 10.1016/j.plaphy.2011.01.015.

SONG, J., WANG, Y., SONG, Y., ZHAO, B., WANG, H., ZHOU, S., KONG, D., GUO, X., LI, Y., HE, M., MA, K., RUAN, Z. y YAN, Y., 2017. *Brevibacillus halotolerans* sp. nov., isolated from saline soil of a paddy field. 1 abril 2017. S.I.: Microbiology Society.

TAMBEKAR, D.H., KALIKAR, M. V, SHINDE, R.S., VANJARI, L.B. y PAWAR, R.G., 2015. Isolation and Characterization of Multiple Enzyme Producer Bacillus Species from Saline Belt of Purna River. *Journal of Applied Sciences Research*. S.I.:

VARDHARAJULA, S., ALI, S.Z., GROVER, M., REDDY, G. y BANDI, V., 2018. Drought-tolerant plant growth promoting bacillus spp.: Effect on growth, osmol ytes, and antioxidant status of maize under drought stress. *Journal of Plant Interactions*, vol. 6, no. 1, pp. 1-14. ISSN 17429145. DOI 10.1080/17429145.2010.535178.

VIMAL, S.R., GUPTA, J. y SINGH, J.S., 2018. Effect of salt tolerant Bacillus sp. and

*Pseudomonas* sp. on wheat (*Triticum aestivum* L.) growth under soil salinity: A comparative study. *Microbiology Research*, vol. 9, no. 1. ISSN 2036-7473. DOI 10.4081/mr.2018.7462.

WANG, Y.F., WANG, X.L., LI, H., LIN, K.F., WANG, P., YANG, J., LIU, Y. Di, SUN, Z.Y., FAN, L.H. y WU, Z.M., 2014. Treatment of high salinity phenol-laden wastewater using a sequencing batch reactor containing halophilic bacterial community. *International Biodeterioration and Biodegradation*, vol. 93, pp. 138-144. ISSN 09648305. DOI 10.1016/j.ibiod.2014.04.010.

WOO, S.L. y PEPE, O., 2018. Microbial consortia: Promising probiotics as plant biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, vol. 9. ISSN 1664462X. DOI 10.3389/fpls.2018.01801.

YOO, S.J., WEON, H.Y., SONG, J. y SANG, M.K., 2019. Induced tolerance to salinity stress by halotolerant bacteria bacillus aryabhattai H19-1 and B. Mesonae H20-5 in tomato plants. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 29, no. 7, pp. 1124-1136. ISSN 17388872. DOI 10.4014/jmb.1904.04026.

ZHANG, S., FAN, C., WANG, Y., XIA, Y., XIAO, W. y CUI, X., 2018. Salt-tolerant and plant-growth-promoting bacteria isolated from high-yield paddy soil. *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 64, no. 12, pp. 968-978. ISSN 14803275. DOI 10.1139/cjm-2017-0571.

ZHOU, N., ZHAO, S. y TIAN, C.Y., 2017. Effect of halotolerant rhizobacteria isolated from halophytes on the growth of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) under salt stress. *FEMS Microbiology Letters*, vol. 364, no. 11, pp. 1-8. ISSN 15746968. DOI 10.1093/femsle/fnx091.

## ANEXOS



Localización de la zona de muestreo

## Operacionalización de variables

Aislamiento e identificación de bacterias halófilas para la biorremediación de suelos salinos

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Indicadores	Escala
Bacterias Halófilas	Son microorganismos que tienen la capacidad de tolerar concentraciones de sal superiores a otras de su mismo género o especie.	Las bacterias halófilas se aislaron en medios con sal para mantener su viabilidad además se tomó en cuenta la producción de acidez vista in vitro.	Acidez: (Ecuación de Mann)  Inoculación (Días)	3.2 – 3.8  0 - 3 D
Suelos salinos	Son los suelos que contienen sales disueltas en altas concentraciones y su causa es natural o antropogénica.	El proceso de muestreo del suelo inicialmente se basó en un mapa cartográfico donde se eligió una concentración superior a 4 mmhos y no mayor a 8mmhos; se realizó en zonas estratégicas aisladas, donde existían cultivos pese a las condiciones geográficas.	Alcalinidad (pH)  Conductividad eléctrica ( $\sigma$ )	6 – 8.5  4mmhos – 8mmhos

Fuente: Elaboración propia

## **Instrumentos de recolección de datos.**

Materiales de campo:

- Bolsas de polietileno para el muestreo (Rotulados).
- Plantilla de registro (Cadena de custodia).
- Cooler para transportar la muestra.
- GPS.
- Limpieza o eliminación de impurezas.
- Agua destilada.
- Papel toalla.
- Equipo de protección personal (EPP).
- Mandil Blanco.
- Mascarilla.
- Gantes.

## **Medios de cultivo**

- 700 mL de Agar TSA al 5% de NaCl.
- 700 mL de Agar TSA al 10% de NaCl.
- 700 mL de Agar TSA.
- 300 mL de caldo nutritivo al 5% de NaCl.
- 300 mL de caldo nutritivo al 10% de Na Cl.
- Medio para identificación de *Bacillus* spp.
- Caldo Glucosado.
- Agar Citrato.
- Agar Yema de Huevo.
- Agar Almidón.
- Caldo glucosa (Con indicador).
- Caldo arabinosa (Con indicador).
- Caldo manitol (Con indicador).
- Caldo xilosa (Con indicador).

- Reactivo: alfa-naftol y KOH.
- Colorantes de batería Gram: Cristal violeta, safranina, lugol, alcohol acetona.
- Fenolftaldehina.

## **Materiales de laboratorio**

### Materiales de vidrio

- 54 botellas.
- 130 placas de Petri.
- 130 tubos de dilución.
- Viales (Según las cepas que se aíslen).
- 100 tubos de ensayo 13x100.
- 100 tubos bioquímicos
- 2 mecheros de Ron de quemar.
- 2 caja de porta objetos.

### **Materiales de Metal**

- Asa bacteriológica de aro y punta.
- 1 gradilla (de 48 tubos).
- Otros Materiales
- 5 litros y medio de Solución Salina Estéril.
- 3 L de ron de quemar.
- 1 L de alcohol.
- 500 g de algodón.
- 10 capsulas de fluconazol (atimicotico)
- 54 bolsas con cierre hermético.
- 1 pomo de agua oxigenada.
- Guantes.
- 02 marcadores.
- 54 tuberculinas.

Pruebas bioquímicas para la identificación fenotípica de *Bacillus* spp.

Código de <i>Bacillus</i>	Catalasa	Xilosa	Manitol	Glucosa	Arabinsa	V P	Citrato	Yema	Almidón	Nitrato	Urea
26.6	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
22.1	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
42.2(-)	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
51.7	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
37.3	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
47.1	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
13.2	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
46.4	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
52.3	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
17.4	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-
46.1	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
42.6(-)	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
29.4	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
26.3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
30.2	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
42.3	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
21.3	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
32.3	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
52.2(-)	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
31.2	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
36.3	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+
29.3	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
12.1	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
4.2	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
50.2	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+
29.2	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
35.6	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-

9.3	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
43.1	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
12.4	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
46.3	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
53.2(-)	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
18.4	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
33.3	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
6.1	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
22.5	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
15.3	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
42.3(-)	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
35.1	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
31.3	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
18.3	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
26.1	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
27.3	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
9.1	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
32.2	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
54.1(-)	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
46.8	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
28.1(-)	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
33.2	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
42.2	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
49.1	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
10.5	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
51.1	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-
20.1	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-
30.1	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
42.4(-)	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-

44.2	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
43.2	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
16.2	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-
6.4	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
3.2	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
21.4	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
5.2	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
89.2	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
40.2	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
44.3	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
47.4	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
21.5	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
46.10	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
27.2	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
54.2(-)	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+
5.3	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
35.5	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
8.2	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
6.3	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
51.2	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
11.3	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
44.5	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
36.2	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
37.2	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
9.2	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
17.1	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
10.1	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
46.2L	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
33.1	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+

26.4	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
46.9	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
16.1	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
13.1	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
49.2	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
5.1	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
18.5	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
22.4	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
8.3	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
26.5	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
35.3	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
47.1(-)	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
10.1(-)	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
32.1	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
24.3	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
22.6	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
45.4	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
19.1	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+

Diámetro de halos de solubilización de sales por *Bacillus spp.*, en el Agar Lactosa Carbonato De Calcio Al Rojo Neutro.

<b><i>Bacillus spp.</i></b>	<b>Halo (mm)</b>
<i>B. brevis</i> 26.6	3 mm
<i>B. brevis</i> 22.1	29 mm
<i>B.subtilis</i> 42.2(-)	25 mm
<i>B. brevis</i> 51.7	2 mm
<i>B.subtilis</i> 37.3	6 mm
<i>B.subtilis</i> 47.1	4 mm
<i>B. megaterium</i> 13.2	13 mm
<i>B.subtilis</i> 46.4	0 mm

<i>B. brevis</i> 52.3	5 mm
<i>B.subtilis</i> 17.4	2 mm
<i>B. megaterium</i> 46.1	14 mm
<i>B. megaterium</i> 42.6(-)	24 mm
<i>B. brevis</i> 29.4	0 mm
<i>B.subtilis</i> 26.3	0 mm
<i>B. brevis</i> 20.2	25 mm
<i>B.subtilis</i> 42.3	7 mm
<i>B. megaterium</i> 21.3	14 mm
<i>B. cereus</i> 32.3	0 mm
<i>B. megaterium</i> 52.2(-)	11 mm
<i>B.subtilis</i> 31.2	0 mm
<i>B. brevis</i> 36.3	11 mm
<i>B. megaterium</i> 29.3	8 mm
<i>B. megaterium</i> 12.1	26 mm
<i>B.subtilis</i> 4.2	0 mm
<i>B. brevis</i> 50.2	0 mm
<i>B. megaterium</i> 29.2	3 mm
<i>B.subtilis</i> 35.6	4 mm
<i>B. megaterium</i> 9.3	0 mm
<i>B.subtilis</i> 43.1	10 mm
<i>B. brevis</i> 12.4	4 mm
<i>B. megaterium</i> 46.3	9 mm
<i>B. brevis</i> 53.2(-)	0 mm
<i>B. brevis</i> 18.4	12 mm
<i>B. megaterium</i> 33.3	17 mm
<i>B. brevis</i> 6.1	15 mm
<i>B. brevis</i> 22.5	0 mm
<i>B.subtilis</i> 15.3	0 mm
<i>B. megaterium</i> 42.3(-)	5 mm
<i>B. megaterium</i> 35.1	3 mm
<i>B.subtilis</i> 31.3	0 mm
<i>B.brevis</i> 18.3	10 mm
<i>B. brevis</i> 26.1	5 mm
<i>B. megaterium</i> 27.3	0 mm
<i>B. cereus</i> 9.1	7 mm
<i>B. megaterium</i> 32.2	0 mm
<i>B.subtilis</i> 54.1(-)	28 mm
<i>B. brevis</i> 46.8	13 mm
<i>B. megaterium</i> 28.1(-)	11 mm

<i>B.subtilis</i> 33.2	6 mm
<i>B.subtilis</i> 42.2	0 mm
<i>B. brevis</i> 49.1	0 mm
<i>B. megaterium</i> 10.5	13 mm
<i>B. cereus</i> 51.1	5 mm
<i>B. cereus</i> 20.1	7 mm
<i>B.subtilis</i> 30.1	23 mm
<i>B.subtilis</i> 42.4(-)	12 mm
<i>B. megaterium</i> 44.2	9 mm
<i>B.subtilis</i> 43.2	0 mm
<i>B. cereus</i> 16.2	0 mm
<i>B.subtilis</i> 6.4	15 mm
<i>B. brevis</i> 3.2	12 mm
<i>B. brevis</i> 21.4	0 mm
<i>B. megaterium</i> 5.2	0 mm
<i>B. brevis</i> 39.2	0 mm
<i>B.subtilis</i> 40.2	6 mm
<i>B. brevis</i> 44.3	5 mm
<i>B. megaterium</i> 47.4	0 mm
<i>B. cereus</i> 21.5	0 mm
<i>B.subtilis</i> 46.10	8 mm
<i>B. megaterium</i> 27.2	14 mm
<i>B. brevis</i> 54.2(-)	24 mm
<i>B. brevis</i> 5.3	7 mm
<i>B. brevis</i> 35.5	7 mm
<i>B.subtilis</i> 8.2	24 mm
<i>B. megaterium</i> 6.3	13 mm
<i>B. brevis</i> 51.1(-)	25 mm
<i>B. brevis</i> 11.3	9 mm
<i>B. brevis</i> 44.5	7 mm
<i>B. brevis</i> 36.2	5 mm
<i>B.subtilis</i> 37.2	8 mm
<i>B. megaterium</i> 9.2	0 mm
<i>B. megaterium</i> 17.1	0 mm
<i>B. brevis</i> 10.1	13 mm
<i>B. megaterium</i> 46.5	4 mm
<i>B. brevis</i> 33.1	0 mm
<i>B. brevis</i> 26.4	7 mm
<i>B. megaterium</i> 46.9	6 mm
<i>B. brevis</i> 16.1	0 mm

<i>B.subtilis</i> 13.1	10 mm
<i>B. brevis</i> 49.2	23 mm
<i>B.subtilis</i> 5.1	5 mm
<i>B. megaterium</i> 18.5	16 mm
<i>B. brevis</i> 22.4	12 mm
<i>B. brevis</i> 8.3	0 mm
<i>B. cereus</i> 26.5	9 mm
<i>B. brevis</i> 35.3	7 mm
<i>B. megaterium</i> 47.1(-)	4 mm
<i>B. brevis</i> 10.1(-)	14 mm
<i>B. brevis</i> 32.1	0 mm
<i>B. megaterium</i> 24.3	7 mm
<i>B.subtilis</i> 22.6	13 mm
<i>B. megaterium</i> 45.4	5 mm
<i>B. megaterium</i> 19.1	6 mm

## Muestreo y análisis de conductividad



Parcela de muestreo



Puntos de muestreo



Toma de muestra



Análisis de conductividad

## Muestreo y análisis de conductividad



Viales con agar modificado al 5% de NaCl para el aislamiento de bacterias halófilas para el aislamiento de bacterias halófilas

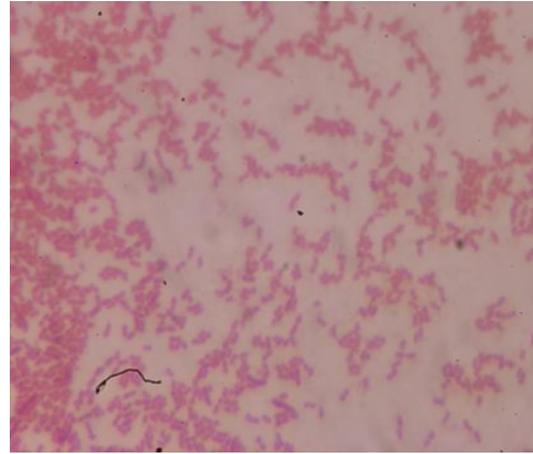
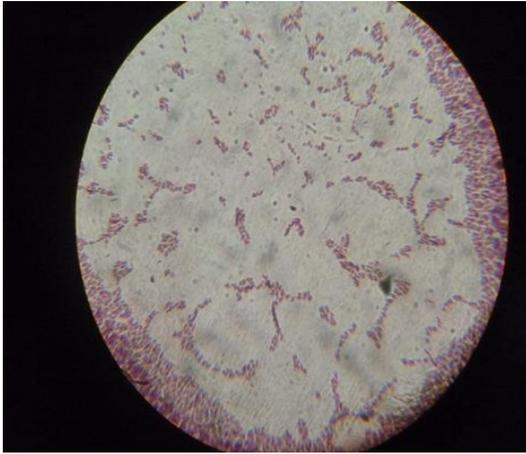


Placas Petri con medio TSA, antimicótico y variación de NaCl del 5 y 10 %, se observan formaciones de colonias.



Separación morfológica de colonias formadas en el medio TSA con antimicótico y variación de NaCl del 5 y 10

## Aislamiento de bacterias halófilas

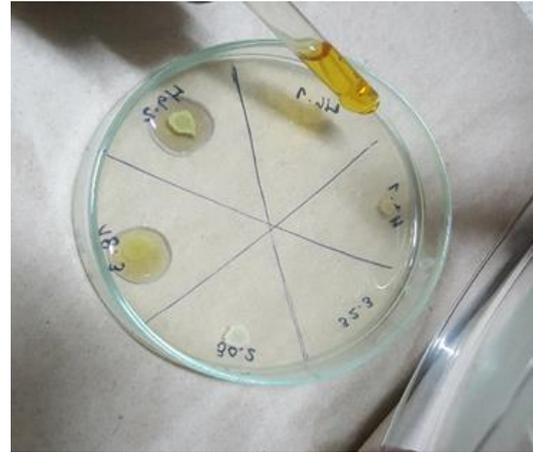


Tinción Gram para la separación de *Bacillus* gran positivos

## Tinción Gram



Prueba de catalasa



Prueba almidón



Medio con yema de huevo



Prueba de nitrato



Prueba de citrato de Simons



Prueba dexilosa, glucosa, arabinosa y manitol

## Identificación de *Bacillus* spp



Agar lactosa carbonato de calcio al rojo neutro



Cambio de color por proliferación de colonias en el Agar lactosa carbonato de calcio al rojo neutro



Formación de halo en agar modificado



Formación de halo, diferenciado en diámetro en el agar modificado

## Cuantificación de Acidez

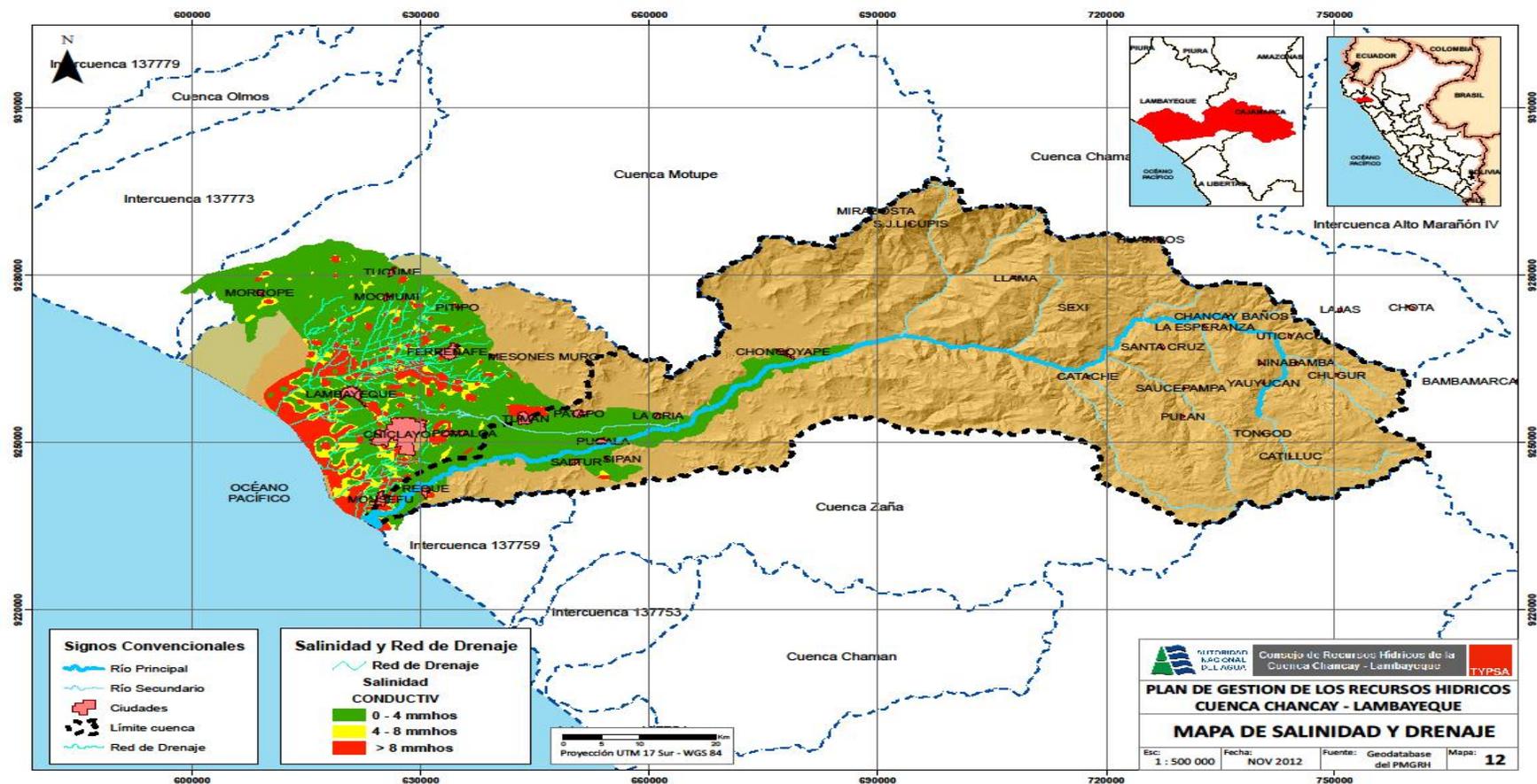


10 tubos de ensayo con Prueba de Mann después de la titulación, el color indica que hay presencia de acidez.

## Coordenadas de muestreo

<b>Muestra 1</b>	<b>-6.90778, -79.87516</b>
<b>Muestra 2</b>	<b>6.90789, -79.87506</b>
<b>Muestra 3</b>	<b>-6.90775, -79.87499</b>
<b>Muestra 4</b>	<b>-6.90787, -79.87486</b>
<b>Muestra 5</b>	<b>-6.90774, -79.87476</b>
<b>Muestra 6</b>	<b>-6.90787, -79.87467</b>
<b>Muestra 7</b>	<b>-6.90774, -79.87457</b>
<b>Muestra 8</b>	<b>-6.90789, -79.87449</b>
<b>Muestra 9</b>	<b>-6.90779, -79.87436</b>
<b>Muestra 10</b>	<b>-6.90797, -79.87426</b>
<b>Muestra 11</b>	<b>-6.90785, -79.87413</b>
<b>Muestra 12</b>	<b>-6.90801, -79.87403</b>
<b>Muestra 13</b>	<b>-6.90788, -79.87388</b>
<b>Muestra 14</b>	<b>-6.90807, -79.87505</b>
<b>Muestra 15</b>	<b>-6.90824, -79.87491</b>
<b>Muestra 16</b>	<b>-6.90807, -79.8748</b>
<b>Muestra 17</b>	<b>-6.90825, -79.87467</b>
<b>Muestra 18</b>	<b>-6.90808, -79.87459</b>
<b>Muestra 19</b>	<b>-6.90828, -79.87445</b>

<b>Muestra 20</b>	-6.90812, -79.87434
<b>Muestra 21</b>	-6.90829, -79.87424
<b>Muestra 22</b>	-6.90815, -79.87414
<b>Muestra 23</b>	-6.90833, -79.87405
<b>Muestra 24</b>	-6.9082, -79.87393
<b>Muestra 25</b>	-6.90841, -79.87476
<b>Muestra 26</b>	-6.90855, -79.87461
<b>Muestra 27</b>	-6.90843, -79.87452
<b>Muestra 28</b>	-6.90856, -79.87442
<b>Muestra 29</b>	-6.90843, -79.87433
<b>Muestra 30</b>	-6.90854, -79.87424
<b>Muestra 31</b>	-6.90847, -79.87411
<b>Muestra 32</b>	-6.90861, -79.87407
<b>Muestra 33</b>	-6.90848, -79.87392
<b>Muestra 34</b>	-6.90859, -79.87387
<b>Muestra 35</b>	-6.90866, -79.87448
<b>Muestra 36</b>	-6.90877, -79.8744
<b>Muestra 37</b>	-6.90865, -79.87431
<b>Muestra 38</b>	-6.90876, -79.87426
<b>Muestra 39</b>	-6.90869, -79.87415
<b>Muestra 40</b>	-6.90879, -79.87407
<b>Muestra 41</b>	-6.9087, -79.87397
<b>Muestra 42</b>	-6.9088, -79.8739
<b>Muestra 43</b>	-6.90889, -79.87434
<b>Muestra 44</b>	-6.90901, -79.87425
<b>Muestra 45</b>	-6.90887, -79.87416
<b>Muestra 46</b>	-6.90899, -79.87407
<b>Muestra 47</b>	-6.90887, -79.874
<b>Muestra 48</b>	-6.90898, -79.87388
<b>Muestra 49</b>	-6.90916, -79.87417
<b>Muestra 50</b>	-6.90927, -79.87404
<b>Muestra 51</b>	-6.90915, -79.87392
<b>Muestra 52</b>	-6.9094, -79.87406
<b>Muestra 53</b>	-6.90949, -79.87395
<b>Muestra 54</b>	-6.90961, -79.87405



Mapa de salinidad y drenaje