

MEJORAMIENTO DE SUELOS AFECTADOS POR INCENDIOS FORESTALES USANDO MICROBIOTA DE SUELOS NATIVOS

Johanna Alexandra Pule Mejía¹, Santiago Xavier Mafla Andrade¹, Paola Alexandra Chávez Guerrero¹

Autor para correspondencia: Santiago Xavier Mafla Andrade, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Sede Ibarra. Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales. e-mail sxmafla@pucesi.edu.ec

¹ Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales.

Manuscrito recibido el 23 de marzo de 2016 Aprobado tras revisión el 2 de diciembre de 2017

RESUMEN

Los incendios forestales afectan las características vegetales y edáficas de los sitios donde sucede el siniestro. Un lugar que ha sufrido múltiples incendios desde el 2002 es el Bosque Protector "Loma de Guayabillas". Esta investigación tuvo como objetivo evaluar la aplicación de extracto microbiano de suelos nativos sobre suelos impactados por incendios forestales. Se empezó determinando las áreas afectadas por el último incendio forestal ocurrido en la "Loma de Guayabillas" en el año 2014; luego se caracterizaron los suelos considerando los siguientes parámetros: fósforo, potasio, nitritos, amonio, nitratos, conductividad eléctrica, materia orgánica y microorganismos. Para la caracterización de las comunidades microbianas se extrajo el ADN, el cual que fue amplificado mediante la técnica PCR y electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE). Se extrajo la microbiota de los suelos nativos y se implantó el inóculo según los cuatro tratamientos: (T1) Suelo Nativo, (T2) Suelo Quemado, (T3) Suelo quemado con extracto nativo, (T4) Suelo quemado esterilizado con extracto nativo y se llevó a macetas con una profundidad de 20 cm de manera que se pueda simular el hábitat de los microorganismos. Se sembró fréjol y se evaluó: el porcentaje de germinación que fue mayor en suelo nativo con 98,33% al igual que la biomasa radicular con 45,39%, biomasa foliar con 27,08% en suelo quemado con extracto nativo y el tamaño total de la planta que presentó los mayores valores en este mismo tratamiento. Se evidenció que los suelos del Bosque Protector presentan escasa materia orgánica, fosfatos, nitrógeno total debido a las quemaduras sufridas durante años. El tratamiento donde hubo mayor actividad bacteriana fue el T4 Suelo quemado esterilizado con extracto nativo y se pudo desarrollar normalmente este inóculo, aumentando así la cantidad de nitrógeno, fosfatos, manteniendo al suelo en un pH neutro, permitió mejorar las características del suelo afectado por el incendio.

Palabras claves: Quemado, recuperación forestal, microorganismos, suelo

ABSTRACT

Forest fires affect the vegetal and edaphic characteristics of the sites where the accident occurs. A place that has suffered multiple fires since 2002 is the Protected Forest "Loma de Guayabillas". The objective of this research was to evaluate the application of microbial extract from native soils on soils impacted by forest fires. First of all, the areas affected by

the last forest fire that occurred in the "Loma de Guayabillas" in 2014 were determined, then, the soils were characterized considering the following parameters: phosphorus, potassium, nitrites, ammonium, nitrates, electrical conductivity, organic matter and microorganisms. For the characterization of the microbial communities, the DNA was extracted, which was amplified using the PCR technique and gel electrophoresis with denaturing gradient (DGGE). The microbiota was extracted from the native soils and the inoculum was implanted according to the four treatments: (T1) Native soil, (T2) Burned soil, (T3) Burned soil with native extract, (T4) Burned soil sterilized with native extract and carried pots with a depth of 20 cm so that the habitat of microorganisms can be simulated. Bean was planted and evaluated: the percentage of germination was higher in native soil with 98.33% as well as the root biomass with 45.39%, foliar biomass with 27.08% in soil burned with native extract and the size total of the plant presented the highest values in this same treatment. It was evidenced that the soils of the Protective Forest present little organic matter, phosphates, total nitrogen due to the burnings suffered during years. The treatment with the highest bacterial activity was T4 Burned soil sterilized with native extract and this inoculum could be normally developed, thus increasing the amount of nitrogen, phosphates, keeping the soil at a neutral pH, allowing to improve the characteristics of the soil affected by the fire.

Keywords: Burning, forest recovery, microorganisms, soil

INTRODUCCIÓN

El Bosque Protector "Loma de Guayabillas" es un lugar de gran valor ecológico que contiene una gran diversidad de especies vegetativas, por lo que es considerado como el pulmón de la ciudad de Ibarra (Terán y Herrera, 2012) y es un lugar de recreación y esparcimiento para los pobladores de esta ciudad. Pese a esto, el sitio es susceptible a perturbaciones de origen antrópicas, lo que ocasiona que sea vulnerable a quemas, ya sea por la falta de precaución de visitantes o la acción de personas "inescrupulosas" que aprovechan las épocas secas del año para provocar grandes incendios forestales (Fontúrbel *et al.*, 2011).

Desde el año 2002 hasta el año 2014 el Bosque Protector de la Loma de Guayabillas ha sufrido varios incendios, teniendo como resultado la contaminación del aire, pérdida de la biodiversidad, la alteración de la calidad paisajística de todo el entorno y en especial el deterioro del recurso suelo (Terán y Herrera, 2012). El fuego aumenta el riesgo de erosión y deslizamientos de tierra debido a la pérdida de cobertura vegetal, además de la volatilización de nutrientes del suelo durante la combustión (Sang *et al.*, 2013).

Debido a estas perturbaciones que se producen por las quemas forestales se planteó mejorar los suelos afectados por incendios forestales en el Bosque Protector "Loma de Guayabillas", usando microorganismos de suelos nativos, de manera que se pueda recuperar el recurso edáfico, mejorando las condiciones de repoblación de microorganismos en los suelos afectados (Pedraza *et al.*, 2013).

La presente investigación se enfocó en describir las características físico-químicas y microbiológicas del suelo afectado por incendios forestales. Además, se realizaron inóculos con los microorganismos encontrados en los suelos nativos, los mismos que fueron implantados en suelos afectados por incendios; de esta manera se pudo evaluar cómo actúa este microbioma sobre las características del suelo y en el crecimiento de plantas de fréjol como un indicador de los cambios los nutrientes en los suelos sometidos a diferentes tratamientos.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Bosque Protector “Loma de Guayabillas” ubicado en el cantón Ibarra, provincia de Imbabura, en la zona interandina del Ecuador a una altitud de 2 378 m.s.n.m. con las coordenadas 00°21′50″ N y 78°06′40″ O. Para iniciar este trabajo se determinaron los puntos más afectados por los incendios forestales del año 2014 que perturbaron un área de 8,9 hectáreas que fueron georreferenciadas usando el software especializado ArcGIS® 10.1. Posteriormente se tomaron muestras siguiendo la metodología de muestreo compuesto de cada uno de los puntos del suelo nativo y suelo quemado en 2014.

Luego de haber tomado las muestras, se procedió a implementar el ensayo en la Granja Experimental de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCE-SI)

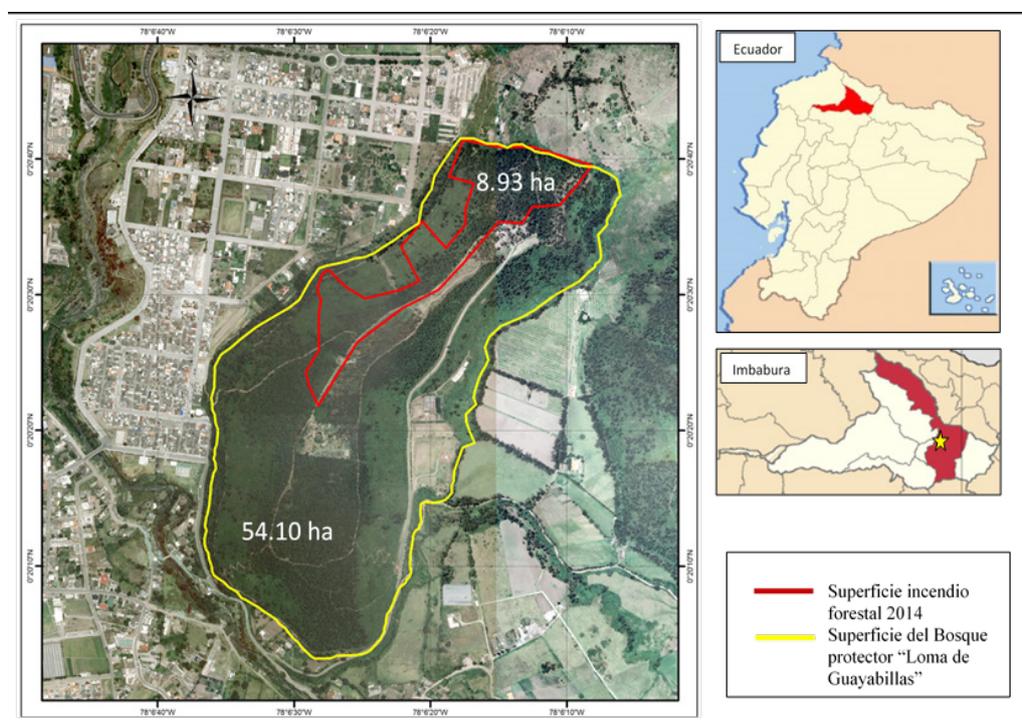


Figura 1
Ubicación del
área de estudio

Fuente:

Chávez, P. *Regeneración natural en un bosque interandino Eucalyptus globulus Labill afectado por incendios forestales*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, 2016.

Se aplicó el diseño experimental de bloques completamente al azar con 12 unidades experimentales, 4 tratamientos y 3 bloques. Para determinar diferencias entre tratamientos se utilizó la prueba ANOVA en cada unidad experimental, se sembró fréjol y se registraron datos de crecimiento del cultivo pasando un día, durante un mes, donde se evaluaron las variables de unidades formadores de colonias (UFC), caracterización de microbiota, porcentaje de germinación y biomasa radicular.

Las unidades experimentales median 20 cm profundidad, 60 cm de ancho por 60 cm de largo. Para evaluar el efecto de las bacterias se sembraron 20 plantas de fréjol, en cada unidad distanciadas 10 cm entre ellas. En el ensayo se establecieron cuatro tratamientos: T1 Suelo nativo, T2 Suelo quemado, T3 Suelo quemado con extracto nativo y T4 Suelo quemado esterilizado con extracto nativo. Por cada tratamiento se obtuvieron un total de tres repeticiones, dando un total de doce unidades experimentales. Para evaluar el efecto de las bacterias se sembraron 20 plantas de fréjol en cada unidad.

Para determinar si las variables ensayadas presentan diferencias significativas, se realizó el análisis estadístico ANOVA de una sola vía con nivel de significancia de 0,05. Los datos fueron analizados en el software GraphPad Prism[®] con un intervalo de confianza del 95%.

Variables dependientes por evaluar

Unidades Formadoras de colonias

Se contaron las unidades formadoras de colonias del suelo quemado y suelo nativo mediante cultivos bacterianos en agar LB Miller.

Biomasa Radicular

Se pesó la biomasa del sistema radicular fresca, luego se sometieron las muestras a la estufa a 40 durante un día. Posterior a esto se pesaron las raíces y se tabularon haciendo una relación porcentual al peso fresco frente al seco.

Preparación de inóculo para la implementación del ensayo

Extracción de cultivo de microorganismos procedentes del suelo nativo

Se agregaron 25 g de tierra en 250 ml de agua destilada previamente esterilizada, se agitó por 5 minutos y se dejó sedimentar. Se tomó 1 ml de esta mezcla tratando de no tomar el sedimento, el cual se introdujo en el caldo Miller LB. Se incubó durante dos días a una temperatura de 27,5 durante dos días.

Se centrifugó 35 ml del caldo en tubos tipo Falcon durante 10 minutos a 6000 rpm (revoluciones por minuto) de esta manera se extrajo el inóculo de bacterias.

Se llevaron los tubos tipo Falcon a la cámara de flujo, se extrajo el sobrenadante, se añadieron 15 ml de agua por cada tubo y se llevó durante un minuto al Agitador vórtex.

Se tomó 1 ml del inóculo extraído de bacterias y se agregó a los tubos de ensayo con 9 ml de agua esterilizada para luego hacer diluciones: Se procedió a realizar placas con agar Miller LB donde se colocó 1ml por cada dilución, luego se incubó a 35 por 48 horas, además de evaluar el inóculo haciendo un conteo en la cámara de Neubauer.

Se obtuvo un valor aproximado de con el cual se determinó que se debía añadir 190 ml en un 1000 ml de agua destilada. Dando un total de 167 ml de solución en cada una de las repeticiones de los tratamientos 3 y 4 (suelos quemados con extracto nativo y suelo quemado esterilizado con extracto nativo respectivamente).

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN de los microorganismos del suelo se utilizó UltraClean[®] Microbial DNA Isolation Kit (Mo Bio[®] laboratories Inc.). Para ello se añadieron 0,25 g de suelo de cada uno de los tratamientos en los Power Bead Tubes que contienen un buffer que ayudará a dispersar las partículas del suelo y se agitó en el vórtex durante un minuto. Se añadió 60 µL de la solución C1 y se llevó al Agitador vórtex por 10 segundos. En una placa se aseguraron los PowerBead Tubes y se llevó al Agitador vórtex durante 10 minutos a la máxima velocidad del equipo. Se llevaron a la centrífuga los tubos a una velocidad de 10 000 rpm (revoluciones por minuto) por 30 segundos a temperatura ambiente. Se transfirieron aproximadamente 400 a 500 µL del sobrenadante a los tubos 2ml Collection tube. Se añadieron 250 µL de solución C2 para posteriormente ser llevados al agitador vórtex por 5 segundos y luego se incubó a una temperatura de 4 °C durante

5 minutos. La solución C2 contiene un reactivo que precipita los compuestos orgánicos, materiales inorgánicos (restos celulares y proteínas) para eliminar la contaminación e impurezas del ADN. Los tubos fueron centrifugados durante un minuto a una velocidad de 10 000 rpm. Se transfirieron aproximadamente 600 µL del sobrenadante en los tubos 2ml Collection tube. Se añadieron 200 µL de la solución C3, se agitó en el vórtex por un minuto y se llevó a incubar a una temperatura de 4 °C durante 5 minutos. Para que la solución C3 actúe como un segundo reactivo para eliminar la contaminación y no perjudicar la pureza del ADN y sus aplicaciones del material genético.

Se centrifugaron los tubos a 10 000 rpm, para luego transferir hasta 750 µL del sobrenadante en los tubos 2ml Collection tube. Antes de utilizar, se agitó la solución C4, se añadieron 1200 µL al sobrenadante en los 2ml Collection tube y se agitó. Se cargaron aproximadamente 675 µL sobre Spin Filter y se centrifugó durante 1 minuto a 10 000 rpm. Se cargó el sobrenadante restante en el filtro de centrifugado. Se añadieron 500 µL de Solución C5 y se centrifugaron durante 30 segundos a 10 000 rpm. La Solución C5 es un etanol usado para limpiar aún más el ADN, elimina la sal residual, el ácido húmico, y otros contaminantes al tiempo que permite al ADN alojarse la membrana de sílice. Se desechó la parte líquida donde se encuentran todo tipo de contaminantes que perjudican la pureza del ADN. Se centrifugó durante 1 minuto a una velocidad de 10 000 rpm a temperatura ambiente para eliminar todos los restos de solución de lavado. Cuidadosamente se guardó el Spin Filter en un tube 2ml collection tube y se añadió la Solución C5 dentro de Spin Filter. Se añadió 100 µL de la solución C6 hasta el centro del filtro de la membrana blanca. Se descartó el filtro y se guardó el ADN a una temperatura de -20°C.

Amplificación de ADNr 16s: PCR

Una vez extraído el ADN se procedió a su amplificación, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizaron 6,5 µL Nuclease- Free Water, posteriormente se añadió 1 µL del partidor, luego se agregó 1 µL del partidor P3. Se tomó 12,5 µL de Master Mix y finalmente 5 µL de la muestra de ADN.

Partidores	Secuencia	Tamaño esperado	Referencia
907r	5'-AGT TTG ATC MTG GCT CAG-3'	926 pb	Muyzer, Waal y Uitterlinden (1993)
P3	5'-40 GC+TAG GGG AGG CAG CAG-3'	193 pb	Wang Garrity, Tiedje, y Cole, J. (2002)

La amplificación mediante PCR se realizó en las siguientes condiciones: denaturación inicial a 94°C en el transcurso de 5 minutos; luego 35 ciclos de denaturación a 94°C durante 30 segundos, alineamiento a 55,6°C por 45 segundos y elongación a 72°C por 90 segundos y una extensión final a 72°C durante 10 minutos (Fernández y Borgne, 2012)

Tabla 1

Secuencias de partidores utilizados para la amplificación de ADN

Electroforesis en gel con gradiente denaturante (DGGE)

Electroforesis en gel con gradiente denaturante (DGGE) se realizó con soluciones Stok bajo un gradiente de desnaturalización del 10% y 60%. El equipo DGGEK-1001 (C.B.S Scientific Company®) se calibró a 85 V, 500 mA por 666 minutos a una temperatura de 60°C.

Tabla 2

Preparación de soluciones stock para elaboración de DGGE con concentración 10/60 [%] aforadas en 100 ml

Secuencia	10%	60%
40% (Acrilamida/Bis ml)	18	18.8
Buffer TAE 40X (ml)	2.5	2.5
Formamida (ml)	4	24
Urea (g)	4,2	25,4

Resultados y Discusión

Unidades formadoras de colonias [UFC] encontradas en los nódulos en cada tratamiento.

Al finalizar el ensayo se extrajeron los nódulos de las raíces y se añadió en un tubo de ensayo con 9 ml de agua esterilizada la cantidad de 1g de nódulos machacados, posteriormente se realizó un cultivo con el agar LB Miller, al cabo de 24 horas se realizó el conteo de UFC, donde el T1 Suelo nativo tuvo 1.71×10^8 UFC, T2 Suelo quemado 1.79×10^7 UFC, T3 Suelo quemado con extracto nativo $1,96 \times 10^9$ UFC, T4 Suelo quemado esterilizado con extracto nativo $2,33 \times 10^9$ UFC.

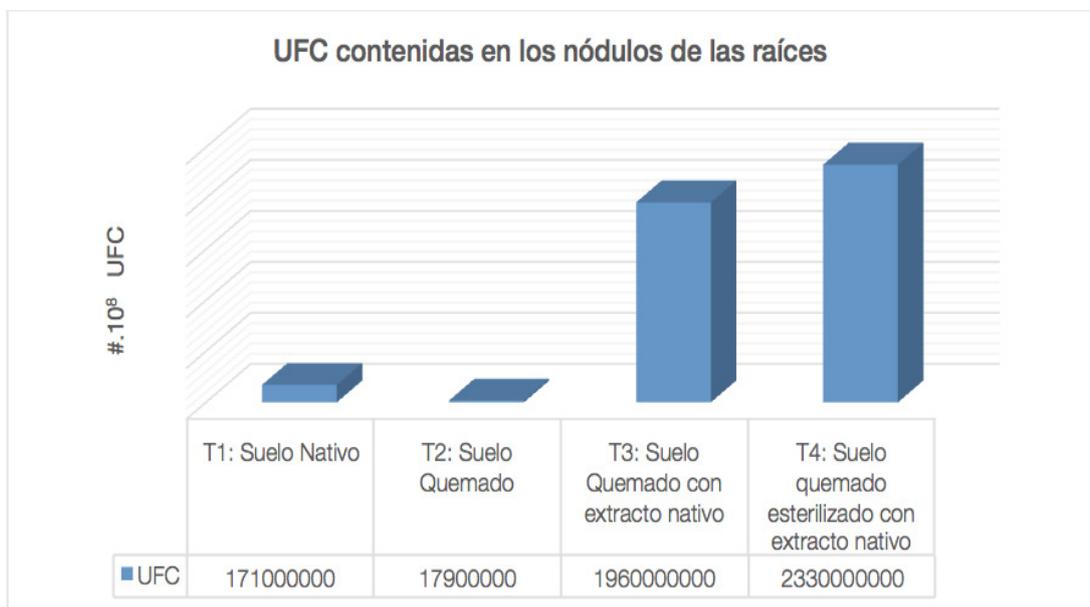


Figura 2

Contenido de UFC perteneciente a los nódulos de los diferentes tratamientos.

En el T1 Suelo Nativo los nódulos fueron pequeños con un tamaño aproximado entre 1mm a 2mm de diámetro, T2 Suelo quemado Nódulos con un tamaño aproximado entre 1mm a 3mm de diámetro, T3 Suelo quemado esterilizado con extracto bacteriano Nódulos con tamaño aproximado entre 2 mm a 4 mm de diámetro, T4 Suelo quemado con extracto bacteriano Nódulos con tamaño aproximado entre 2 mm a 5 mm de diámetro.



Figura 3
Descripción de Nódulos pertenecientes a las raíces de cada tratamiento

El T4 suelo quemado esterilizado con extracto bacteriano obtuvo mayor número de nódulos en peso y tamaño procedentes de la simbiosis de las bacterias conocidas como rizobios en raíces de plantas. Los rizobios aportan a la fijación de nitrógeno en el suelo, las especies de *Rhizobium* encontradas son *R. etli*, *R. fredii*, *R. galegae*, *R. haukuii*, *R. loti*, *R. meliloti*, *R. tropici* (Coyne, 2000).

Unidades Formadoras de Colonias [UFC] encontradas en los diferentes tratamientos

El T1 Suelo nativo obtuvo $2,44 \times 10^5$ UFC, T2 Suelo quemado: $22,4 \times 10^5$ UFC, T3 Suelo quemado con extracto nativo: $28,1 \times 10^5$ UFC y T4 Suelo quemado esterilizado con extracto nativo: $1,67 \times 10^5$ UFC; al final del ensayo T1 Suelo nativo tuvo $1,72 \times 10^8$ UFC, T2 Suelo quemado $3,12 \times 10^8$, T3 Suelo quemado con extracto nativo 27×10^{10} UFC, T4 Suelo quemado esterilizado con extracto nativo 39×10^{10} UFC como se indica en la (Figura 4).



Figura 4
UFC contenidas al inicio y al final del ensayo en los cuatro tratamientos

Los tratamientos T3 y T4 obtuvieron mayor número de UFC. Cabe destacar que se esterilizó a este sustrato, provocando que los microorganismos inoculados se desarrollen en mayor cantidad puesto que desapareció la competencia entre especies microbiológicas; como lo afirma Xue, Qiujiing y Hongyue, (2014) en su investigación quienes pudieron identificar que estos nuevos microorganismos colonizadores atraen un mayor aporte a la recuperación del suelo que se veía limitada por la microbiota normal que poseía el sustrato antes de ser esterilizado.

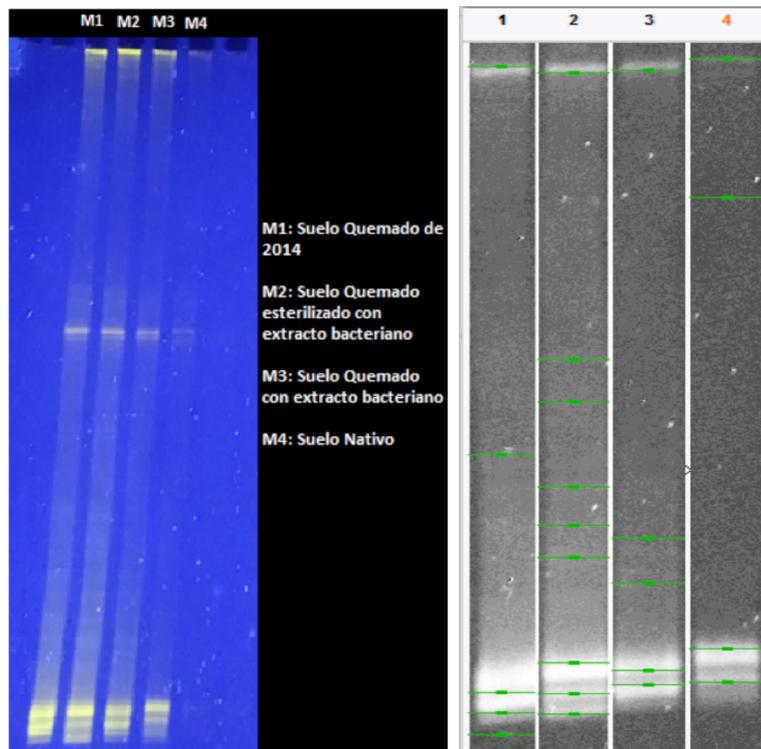


Figura 5

A) Gel de poliacrilamida indicando las bandas del ensayo de DGGE, B) imagen digitalizada del gel de DGGE con las especies bacterianas de los cuatro tratamientos

Una vez realizado el ensayo de DGGE y digitalizada la imagen del gel, se pudo observar mayor número de bandas OTU's para M2 Suelo quemado esterilizado con extracto bacteriano. Kisand y Kikner (2003) indican que la presencia de estas bandas, amplificadas con primers universales, del análisis DGGE puede ser comparada con la población microbiana, demostrando que a mayor presencia de bandas amplificadas mayor variabilidad de especies bacterianas se pueden encontrar en las muestras como indica la figura 5.

El análisis de similitud representado por el dendograma con base a la matriz binaria procedente de las bandas OTU's (Figura 6) indica que existe un 85% de similitud entre las muestras M1y M4, mientras que para M2 y M3 existe un porcentaje de similitud menor del 75 %. Además, en el análisis de relación existe entre todas las muestras un 20% de similitud.

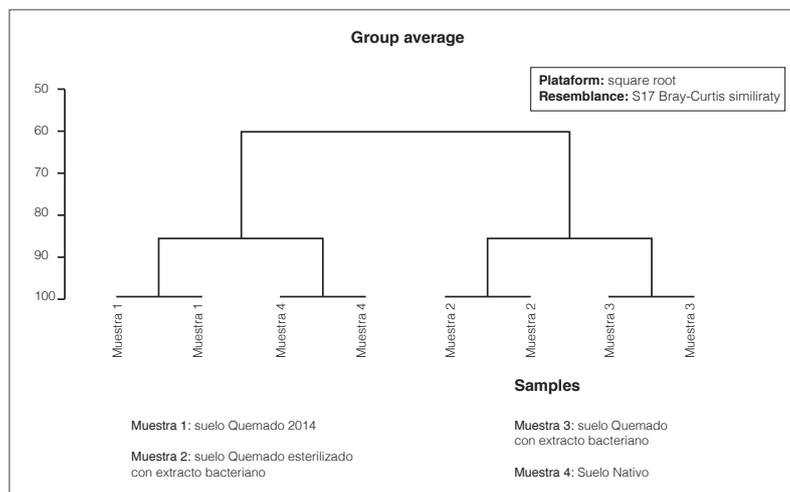


Figura 6

Dendograma de similaridad de los cuatro tratamientos

Índices de diversidad

El análisis para los índices de diversidad (Tabla 3) se realizó mediante el análisis de la matriz binaria procedente de las bandas OTU's de cada muestra, obteniendo para el T4 mayor riqueza de microorganismos seguido por T3, indicando que está relacionado con el Índice Shannon, razón por la cual T2 y T3 poseen alta biodiversidad (Paredes *et al.*, s.f).

El índice de Pielou dependerá de la riqueza y la abundancia de especies (Martella *et al.*, 2012) lo que indica que en los cuatro tratamientos del ensayo todas las especies de microorganismos son igualmente abundantes.

MUESTRAS	TRATAMIENTOS	Índice de Pielou J'	d	Índice Shannon H'	Riqueza
1	T2: Suelo Quemado	1	1,82	1,099	3
2	T4: Suelo quemado esterilizado con extracto nativo	1	3,641	2,197	9
3	T3: Suelo Quemado con extracto nativo	1	2,791	1,792	6
4	T1 :Suelo Nativo	1	2,164	1,386	4

Tabla 3
Índices de diversidad

Porcentaje de Germinación

El análisis estadístico ANOVA refleja que no existen diferencias significativas entre T1, T2, T3 y T4 (Tabla 4), es decir, que no hay diferencia entre los tratamientos en cuanto el porcentaje de germinación.

ANOVA	
Valor (P)	0,4521
Significancia	ns
¿Son las diferencias entre las medias estadísticamente diferentes? (P < 0.05)	NO
R cuadrado	0,2672

Tabla 4
Análisis ANOVA para el porcentaje de germinación.

ns: Diferencia estadística no significativa

*: Diferencia estadística significativa

***: Diferencia estadística altamente significativa entre los datos.

El porcentaje de germinación en el T1 Suelo Nativo tuvo 98,33% de plantas germinadas, T2 Suelo quemado 93,33%, T3 Suelo Quemado con extracto nativo 91,67%, Suelo quemado esterilizado con extracto 95% (Figura 7). Varela (2007) indica que los tratamientos realizados a las plantas denotaron una diferencia significativa en la germinación de las plantas indicando que la concentración de nutrientes por la quema y aumento en la microbiota afecta al desarrollo de la misma.

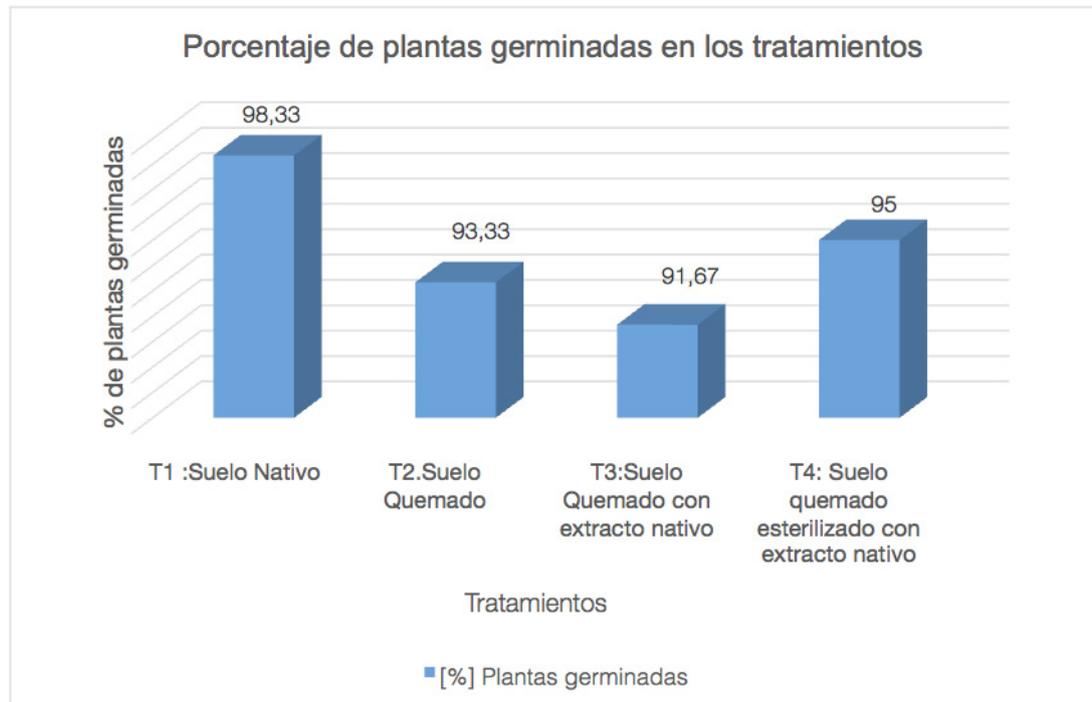


Figura 7

Porcentaje de Germinación de los cuatro tratamientos.

Biomasa Radicular

El análisis estadístico ANOVA refleja que existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados (Tabla 5) para la biomasa radicular resultante, es decir, que fue evidente el crecimiento y desarrollo de las raíces en especial en T4.

ANOVA	
Valor (P)	0,0108
Significancia	*
¿Son las diferencias entre las medias estadísticamente diferentes? ($P < 0.05$)	Yes
R cuadrado	0,7347

Tabla 5

Análisis ANOVA para biomasa radicular

ns: Diferencia estadística no significativa

*: Diferencia estadística significativa

***: Diferencia estadística altamente significativa entre los datos.

El porcentaje de Biomasa radicular en el T1 Suelo Nativo tuvo 45,39%, T2 Suelo quemado 31,25%, T3 Suelo Quemado con extracto nativo 25,34%, T4 Suelo quemado esterilizado con extracto nativo 55,61% (Figura 8). (Jardel *et al.*, 2003) demostraron que posteriormente a una

quema forestal el porcentaje de biomasa radicular puede ser afectado en tamaño y cantidad, lo que se demostró en el presente estudio. Pero al momento de tratar este suelo, el porcentaje de biomasa radicular se beneficia aumentando de manera significativa, como lo demuestra la Figura 8.

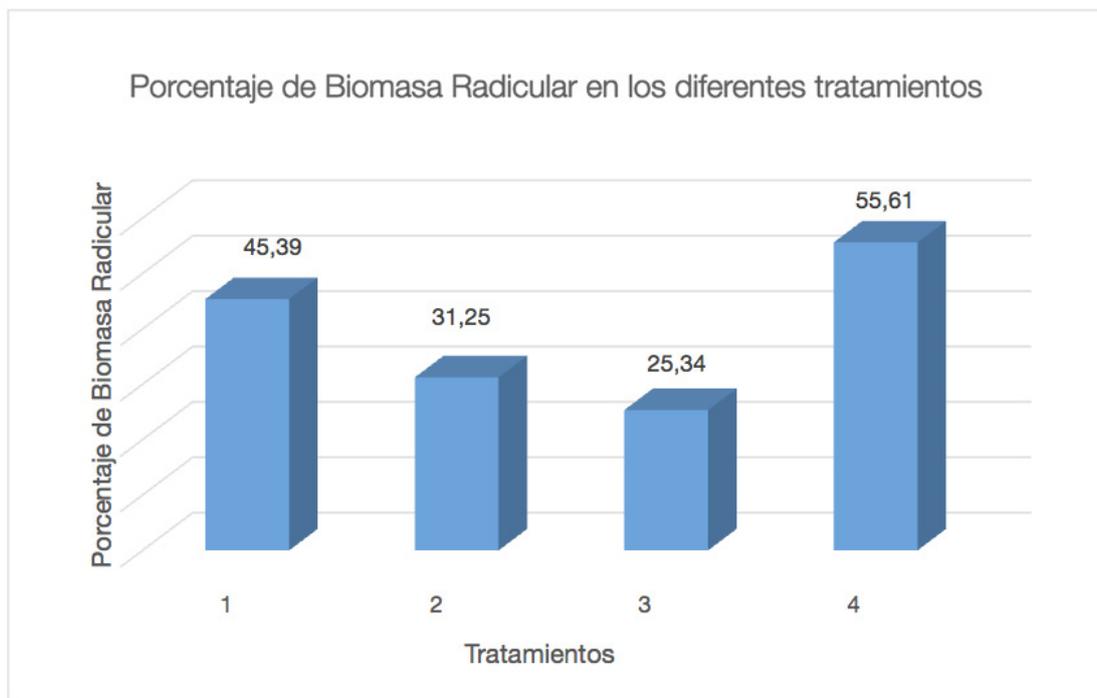


Figura 8
Porcentaje de biomasa radicular en los tratamientos

La longitud de las raíces del T1 Suelo Nativo fue de 22,40 cm, T2 Suelo quemado 20,72 cm T3 Suelo Quemado con extracto nativo 22,07cm y T4 Suelo quemado esterilizado con extracto nativo 21,52 cm (Figura 9).

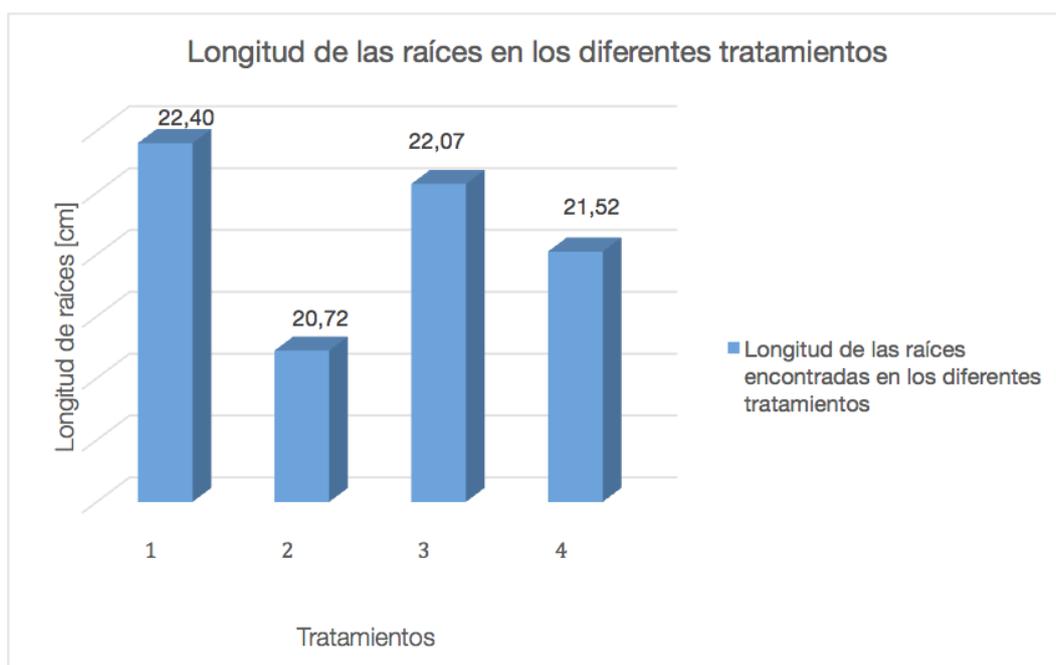


Figura 9
Tamaño de la raíz en los cuatro tratamientos

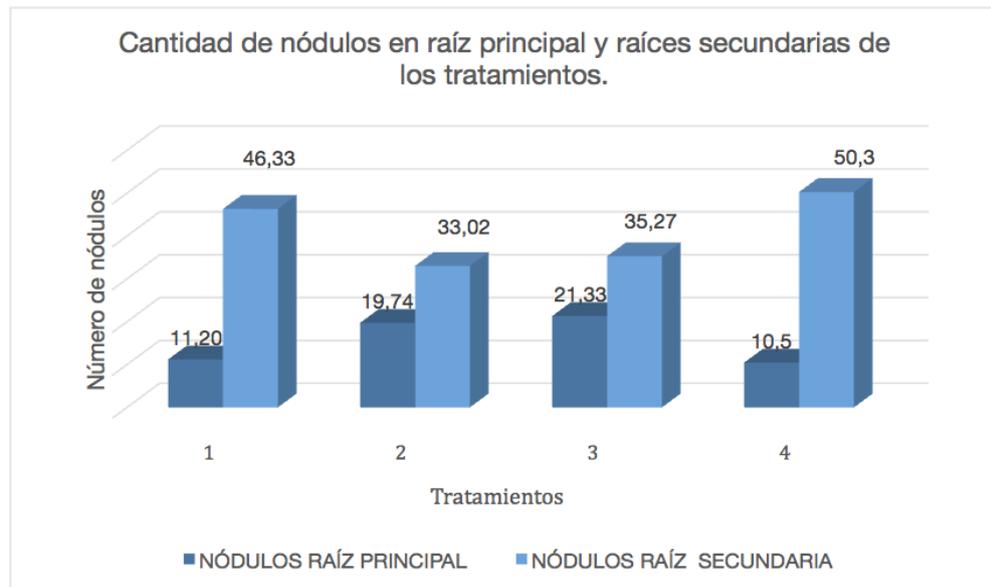


Figura 10

Cantidad de nódulos en raíz y raíces secundarias

El análisis estadístico ANOVA refleja que existen diferencias significativas entre T1, T2, T3 y T4 (Tabla 6), es decir, que existen diferencias en cuanto al número de nódulos situados en la raíz secundaria. Siendo mayor la cantidad de nódulos en T4.

Valor (P)	0,0162
Significancia	*
¿Son las diferencias entre las medias estadísticamente diferentes? (P < 0.05)	Yes
R cuadrado	0,1666

Tabla 6

Análisis ANOVA para nódulos de la raíz secundaria

ns: Diferencia estadística no significativa

*: Diferencia estadística significativa

***: Diferencia estadística altamente significativa entre los datos.

El contenido de nódulos en las raíces secundarias tuvo un promedio de 50,3 nódulos para T4, seguido por T1 con una cantidad de 46,33 nódulos. En cuanto el contenido de nódulos en las raíces secundarias tuvo un valor superior a comparación del resto de los tratamientos con 21, 33 nódulos correspondiente a T3 (Figura 11). (Nannipieri *et al.*, 2003) de igual forma indican que al existir una alta variabilidad microbiana, como lo demostrado en este estudio, la formación de nódulos y la eficiencia en la propagación de las raíces es directamente proporcional al tipo de microbiota que se encuentra en simbiosis entre suelo y planta.

Figura 11

Raíces en los tratamientos: T1 Suelo nativo, T2 Suelo quemado, T3 Suelo quemado con extracto nativo y T4 Suelo quemado esterilizado con extracto nativo



El T4 presentó en mayor abundancia y tamaño estructuras sumamente especializadas llamadas nódulos, formada por bacterias en la raíz de plantas de la familia leguminosa, las mismas que contienen bacterias rizosféricas pertenecientes a la familia Rizobiaceas, con la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y reducirlo a forma amoniacal (Pedraza *et al.*, 2010).

CONCLUSIONES

El ensayo microbiológico del suelo reveló que las unidades formadoras de colonias (UFC's) se desarrollan mejor en T4 Suelo quemado esterilizado con extracto nativo (39×10^{10} UFC's); en este medio, las bacterias inoculadas se proliferaron a gran escala ya que no existía competitividad por parte de otros microorganismos. Seguido por T3 Suelo Quemado con extracto nativo (27×10^{10} UFC's), T2 Suelo Quemado 3.12×10^8 UFC T1 Suelo Nativo tuvo $1,72 \times 10^8$, este último presentó menor cantidad de microorganismos.

El porcentaje de Biomasa radicular en el T1 Suelo Nativo tuvo 45,39%, T2 Suelo quemado 31,25%, T3 Suelo Quemado con extracto nativo 25,34%, T4 Suelo quemado esterilizado con extracto nativo 55,61%. En este último tratamiento existió mayor desarrollo radicular debido a la existencia de una mayor cantidad de microorganismos.

El porcentaje de germinación no tuvo gran variación en el T1 Suelo Nativo tuvo 98,33% de plantas germinadas, T2 Suelo quemado 93,33%, T3 Suelo Quemado con extracto nativo 91,67%, T4 Suelo quemado esterilizado con extracto 95%; al analizar los ensayos individualmente, los ensayos T3 y T4 obtuvieron los mejores resultados para porcentaje de germinación (91,65% y 95% respectivamente) y para biomasa radicular (27,08% y 16,49% respectivamente). Finalmente, se puede indicar que la restauración de suelos quemados por medio de la bioaumentación y rescate de la microbiota, es factible realizando un pretratamiento de solarización el cual nos ayudará a que las nuevas cepas puedan integrarse de mejor manera.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chávez, P. (2016). *Regeneración natural en un bosque interandino de Eucalyptus globulus Labill. afectado por incendios forestales*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito. Ecuador
- Coyne M. (2000). *Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio*. Madrid, España: Paraninfo
- Fernández M. y Borgne S. (2012). DGGE: electroforesis en gel con gradiente desnaturante. Universidad Nacional Autónoma de México. México. Recuperado de <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/710/dgge.pdf>
- Fontúrbel M.T., Barreiro A., Vega J.A., Martín A., Jiménez E., Carballas T., Fernández C., Díaz-Raviña M. (2011). Effects of an experimental fire and post-fire stabilization treatments on soil microbial communities. *Geoderma*. 191, 51-60.
- Jardel E., Ramírez R., Saldaña A., Castillo F., Chacón J., Zuloaga S., Balcázar O., Quiñones H. & Aragón A. (2003). Restauración de áreas afectadas por incendios forestales en la Reserva de la Biosfera Sierra de Manantlán. Recuperado de <http://www.fire.uni-freiburg.de/GlobalNetworks/MesoAmerica/Manantlan%20Biosphere%20Res%20Fire%20lan.pdf>
- Martella M., Trumper E., Bellis L., Renison D. Giordano P., Bazzano G. y Gleiser R. (2012). Manual de Ecología Evaluación de la biodiversidad. *Reduca. Biología*. 5 (1). 71-11

- Muyzer, G., Waal, E., Uitterlinden, A. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 59 (3), 695-700.
- Nannipieri P., Ascher J., Ceccherini M., Landi L., Pietramellara G. & Renella G. (2003). Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*. 54, 655–670. doi: 10.1046/j.1365-2389.2003.00556.x
- Paredes J., Arias M., Flowers W., Medina M., Herrera P.y E. Peralta. (s.f). Medición de la Biodiversidad Alfa de Insectos en el Bosque “Cruz del Hueso” de Bucay, Guayas-Ecuador. Escuela Superior Politécnica del Litoral.
- Pedraza R., Teixeira K., Fernández A., García I., Baca B., Azcón R., Vera L. y Bonilla R. (2010). Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. *Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 11(2), 155-164
- Sang Y., Ryoul S., Lim J., Hwa Ch., Hwan J., Choi W., Lee B., Jeong H., Wan K., & Seo J. (2013). Effects of forest fires on forest ecosystems in eastern coastal areas of Korea and an overview of restoration projects. *Landscape and Ecological Engineering and Springer*. 10, 229–237. doi: 10.1007/s11355-013-0212-0
- Solera, J. M. (1999). Alteraciones físicas, químicas y biológicas en suelos afectados por incendios forestales. Contribución a su conservación y regeneración (Tesis de Doctorado). Universidad de Alicante, Alicante, España.
- Terán F. y Herrera R. (2012). Actualización del plan de manejo integral del bosque y vegetación protectora “Loma de Guayabillas” Cantón Ibarra, Provincia de Imbabura (Tesis de pregrado). Universidad Técnica del Norte, Ibarra, Ecuador.
- Varela M. (2007). Efectos de los incendios forestales en la degradación física de los suelos de Galicia. (Tesis de doctorado). Universidad de Vigo. Recuperado de: <http://www.cesam.ua.pt/files/TESIS%20M.E.%20VARELA.pdf>
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2002). Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (16), 5261–5267. <http://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
- Xue L., Qiuqing L. y Hongyue Ch. (2014). Effects of a Wildfire on Selected Physical, Chemical and Biochemical Soil Properties in a Pinus massoniana Forest in South China. *Forests*. 5, 2947-2966