



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Centro de Estudios de Postgrado

BIOCORTEZAS DE CIANOBACTERIAS: UNA ALTERNATIVA DE CONTROL DE EROSIÓN EN OLIVARES DE PENDIENTE

Alumno: Guillermo Anaya Ponce

Director/a

Tutor/a: Hikmate Abriouel Hayani
Dpto.: Ciencias de la Salud

**Fecha: 30 de
junio de 2023**



Hikmate Abriouel Hayani, Vicerrectora de Enseñanzas Oficiales de la Universidad de Jaén.

Como **Directora y/o Tutora** de D. Guillermo Anaya Ponce, en el Máster Universitario en Olivar y Aceite de Oliva, durante el curso 2022-2023.

INFORMA: Que el presente trabajo fin de máster, “Biocortezas de cianobacterias: una alternativa de control de erosión en olivares de pendiente” ha sido realizado por D./D^a. Guillermo Anaya Ponce, para la obtención del Título de Máster Universitario en Olivar y Aceite de Oliva por la Universidad de Jaén, bajo la dirección de la Dra. Dña. Hikmate Abriouel Hayani.

Jaén, a 30 de junio de 2023

Fdo.: Guillermo Anaya Ponce

Fdo.: Hikmate Abriouel Hayani

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo está dedicado a Dios y a mis ángeles en la tierra:

A mis amados padres que siempre me han apoyado y confiado en mí, sin ustedes no sería nadie. Mamita linda, gracias por ser tan amorosa y trabajadora. Papito querido, gracias por darme la mejor educación. No me alcanzará la vida para agradecerles tanto;

A mis muy queridos y talentosos hermanos. Mis niños, ustedes me motivan a ser una persona ejemplar. Beto y Dany, tienen mi eterna admiración por ser valientes y rebeldes, tengo tanto que aprender de ustedes;

A mis amistades. Gracias por ser mi círculo de apoyo, darme siempre ánimos y por confiar en mí incluso mucho más de lo que yo confío en mí mismo;

A mis profesores de máster por su compromiso con el mundo del olivar y por compartir conmigo con tanta pasión sus invaluable conocimientos;

A la Universidad de Jaén y a la Fundación Carolina por confiar en mis talentos y darme las facilidades de cursar este máster que tanto disfruté;

Larga vida a Jaén y a Andalucía, en estas preciosas tierras siempre me sentí como en casa;

Dios bendiga a todo aquel que me apoyó desinteresadamente en esta hermosa etapa de mi vida, en la que fui muy feliz.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	7
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	10
1. El suelo: características y amenazas	10
2. El olivar y su distribución geográfica	10
3. Erosión del suelo del olivar	11
3.1. Erosión del suelo en olivares de pendientes	13
3.2. Estrategias para mitigar la erosión	16
4. Biocortezas: nueva herramienta para mitigar la erosión	17
4.1. Cianobacterias	20
4.1.1. Inoculación de cianobacterias	20
4.2. Otros microorganismos.....	22
4.2.1. Líquenes	22
4.2.2. Musgos	23
JUSTIFICACIÓN	24
OBJETIVO.....	25
METODOLOGÍA.....	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
1. Selección de bibliografía.....	28
2. Posible uso de biocortezas de cianobacterias en olivares en pendiente.	29
3. Protocolo general de trabajo.....	33
3.1. Flujo de trabajo para la inoculación	34
3.1.1. Aislamiento y purificación de cepas.....	35
3.1.1.1. Recolección en campo	36

3.1.1.2. Enriquecimiento de cultivos	37
3.1.1.3. Aislamiento de cepas de cianobacterias y separación de aislados.....	38
3.1.1.4. Purificación de cultivos de cianobacterias	39
3.1.1.5. Identificación de las cepas.....	39
3.1.1.6. Selección de cepas.....	42
3.1.2. Producción de biomasa, inoculante y dispersión.....	43
3.1.2.1. Producción de biomasa	45
3.1.2.2. Recolección de biomasa.....	46
3.1.2.3. Inoculación en microcosmos	48
3.1.2.4. Evaluación de la formación de la biocorteza	50
3.1.2.5. Producción de biomasa a gran escala.....	50
3.1.2.6. Inoculación en suelo	51
4. Beneficios reportados	52
CONCLUSIONES	54
BIBLIOGRAFÍA.....	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de erosión y sus características	11
Tabla 2. Porcentaje de explotaciones y superficies dedicadas al olivar según diferentes intervalos de pendiente.....	13
Tabla 3. Criterios de inclusión	26
Tabla 4. Criterios de exclusión	26
Tabla 5. Ficha técnica descriptiva	27
Tabla 6. Número de artículos recuperados y seleccionados	28
Tabla 7. Descripción morfológica de las cinco cianobacterias más comunes de las comunidades biológicas de la corteza del suelo	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de las tasas de pérdida de suelo en la Unión Europea	15
Figura 2. Ejemplo de cubiertas vegetales.....	17
Figura 3. Las cortezas biológicas del suelo (biocortezas) forman ecosistemas en miniatura	19
Figura 4. Cianobacterias vistas bajo microscopia de luz, 3550 x	21
Figura 5. Resultados de búsqueda	29
Figura 6. Esquematización de los pasos básicos del flujo de trabajo para seleccionar y probar nuevos inoculantes de cianobacterias en el laboratorio.....	35
Figura 7. Esquematización de los pasos básicos del flujo de trabajo para el aislamiento y purificación de cepas	36
Figura 8. Esquematización de los pasos básicos del flujo de trabajo para la producción, recolección e inoculación de biomasa	44
Figura 9. Distintos patrones de dispersión de la biomasa de cianobacterias en suspensión líquida y sus respectivos desarrollos de biocorteza desde la inoculación hasta el día 15 de incubación	48
Figura 10. Imágenes del desarrollo de una biocorteza monitoreada a intervalos de 1 a 120 h desde la inoculación	50

RESUMEN

En la actualidad, la erosión del suelo por el agua es el problema más importante al que se enfrenta la olivicultura mediterránea. Este efecto se acentúa en zonas con fuertes pendientes, ya que la capacidad de arrastre del agua de escorrentía que transporta las partículas del suelo es mayor en este tipo de terrenos. Anualmente, la superficie de olivar andaluz pierde aproximadamente 50 Ton/ha, lo cual trae como consecuencia un efecto negativo sobre la producción del olivar a causa de la reducción paulatina de la fertilidad del suelo. En el presente trabajo, tras una revisión exhaustiva de las investigaciones del uso de biocortezas de cianobacterias como método de restauración de suelos con altos niveles de erosión y los casos de éxito que tuvieron éstas, se propone el uso de biocortezas de cianobacterias como posible método de control de erosión en olivares de pendiente. Adicionalmente, se establece un protocolo general de trabajo para llevar a cabo el procedimiento de cianobacterización desde su muestreo en campo hasta su inoculación a gran escala y se evalúan los resultados más relevantes de los distintos autores para conocer los beneficios que podría traer consigo la implementación de la inoculación de cianobacterias en los olivares de pendiente. Al considerar la técnica muy prometedora y presentar numerosas ventajas frente a otro tipo de técnicas de restauración, se sugiere realizar investigaciones experimentales a futuro con la finalidad de mejorar las condiciones de los suelos agrícolas y reducir los efectos de la erosión.

ABSTRACT

At present, soil erosion by water is the most important problem facing Mediterranean olive growing. This effect is accentuated in areas with steep slopes, as the carrying capacity of runoff water carrying soil particles is greater in this type of terrain. Annually, the area of Andalusian olive trees loses approximately 50 Ton/ha, which results in a negative effect on olive production due to the gradual reduction of soil fertility. In this review, based on success stories of studies using cyanobacterial biocrusts as a method of restoration on soils with high levels of erosion, the cyanobacterial biocrust technology is proposed as a possible erosion control method in olive orchards established on steep slopes. In addition, a general work procedure was established to carry out the cyanobacteria procedure from field sampling to large-scale inoculation, and the most relevant results of the different authors were evaluated to know the benefits that could lead the implementation of cyanobacteria inoculation in olive orchards established on steep slopes. Considering the technique very promising and presenting numerous advantages over other restoration techniques, it is suggested to conduct future experimental research with the aim of improving the conditions of agricultural soils and reducing the effects of erosion.

INTRODUCCIÓN

1. EL SUELO: CARACTERÍSTICAS Y AMENAZAS

El suelo es la capa superior de la superficie terrestre en la que ocurren actividades físicas y bioquímicas que son consecuencia de su interacción con organismos y elementos naturales. Está compuesto por minerales, materia orgánica e inorgánica, y tiene la capacidad de generar gases, almacenar agua y petróleo. (Valdez, Badii, Guillen, & Acuña, 2015). Las actividades humanas como lo son la industrial, la municipal y la agrícola afectan los suelos, lo que a menudo resulta en su degradación, pérdida o reducción de sus funciones (Vargas, 2009).

2. EL OLIVAR Y SU DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

El olivo es una especie resistente y altamente adaptable a condiciones adversas del medio, como la sequía. Debido a esta característica, puede establecerse en una amplia variedad de suelos con diferentes características. (Parra, Escobar, Navarro, & Arquero, 2002). Sin embargo, un suelo franco, ligero en la superficie siempre será idóneo debido a que las raíces se desarrollan con mayor facilidad bajo dichas características (Albiñana, 2018).

El olivo es nativo de una región que se extiende desde el sur del Cáucaso hasta las altiplanicies de Irán, Palestina y la costa de Siria. Posteriormente se propagó a través de Chipre hacia Anatolia y, desde Creta, llegó a Egipto, poblando finalmente todos los países mediterráneos. A partir del siglo XV, con los viajes de Colón, Magallanes y Elcano, se introdujo en el Nuevo Mundo. Actualmente se cultiva en Sudáfrica, China, Japón y Australia.

El olivo se encuentra principalmente en regiones climáticas del tipo Mediterráneo, tanto en el hemisferio norte como en el hemisferio sur, entre las latitudes 30° y 45°. En estas áreas, el clima se caracteriza por veranos secos y calurosos. En el hemisferio sur, el olivar también se encuentra en latitudes más tropicales, donde el clima puede ser modificado por la altitud.

El patrimonio oleícola actual se compone de alrededor de 1.000 millones de olivos, cubriendo una superficie de aproximadamente 10 millones de hectáreas. El 98% de

este total se encuentra en países de la Cuenca Mediterránea, mientras que el 1,2% se encuentra en el continente americano, el 0,4% en Asia Oriental y otro 0,4% en Oceanía (Barranco, Navero, & Romero, 2008).

3. EROSIÓN DEL SUELO DEL OLIVAR

Una de las principales amenazas que propician la degradación de suelo en todo el mundo es la erosión. Esta problemática se ha acentuado durante los últimos años debido al impacto del uso de la tierra y el cambio, lo que trae como consecuencia la degradación del suelo y el deterioro de las condiciones del suelo para la biodiversidad, además de influir negativamente en los ciclos biogeoquímicos. De acuerdo con varios estudios de cambio de clima y uso de la tierra, se reporta que la erosión del suelo está aumentando, lo que representa una gran amenaza para la fertilidad de la tierra y para los procesos ecológicos del suelo; como lo son la descomposición de la hojarasca, el ciclo de nutrientes, entre otros. La erosión del suelo puede ser provocada por diversos factores, entre los que podemos enunciar: erosión hídrica, erosión eólica, erosión por congelación y descongelación, erosión por gravedad; etc. (Guerra et al., 2020). Los tipos de erosión y las características de cada uno de los agentes erosivos se muestran en la Tabla 1 (Díaz, 2011).

Tabla 1. Tipos de erosión y sus características

Tipo de erosión	Características
Erosión por viento	El viento desprende, desplaza, transporta y deposita partículas de suelo mediante fuerzas de fricción y levantamiento.
Erosión por lluvia	Las gotas de agua pueden mover las partículas del suelo desnudo a distancias sorprendentes al impactar con él.
Erosión laminar	Las corrientes de agua pueden erosionar las capas superficiales del suelo, creando un proceso de erosión en capas que se profundiza..
Erosión en	La concentración del flujo en pequeños canales o rugosidades provoca la formación de surcos semiparalelos

Tipo de erosión	Características
surcos	que se profundizan con el tiempo.
Erosión por afloramiento de agua	El afloramiento del agua subterránea puede generar cárcavas o cavernas al desprender partículas del suelo subsuperficial.
Erosión interna	El flujo de agua en el suelo transporta partículas y forma cavernas subterráneas.
Erosión en cárcavas	Los surcos se pueden convertir en canales profundos y la concentración de una corriente de agua en un área específica puede originar cárcavas. Una vez iniciada la cárcava, detener el proceso erosivo resulta muy difícil.
Erosión en cauces de agua	También conocida como erosión lateral y profundización. La fuerza tractiva del agua en las corrientes y ríos produce ampliación lateral de los cauces, así como profundización y dinámica general de la corriente.
Erosión por oleaje	Las fuerzas de las olas al ascender y descender sobre el suelo provocan el desprendimiento y transporte de partículas.
Erosión en masa	El término "erosión" o "remoción en masa" se refiere a los movimientos significativos de grandes masas de suelo, conocidos comúnmente como deslizamientos.

Fuente: Tomado de (Díaz, 2011).

La erosión del suelo se encuentra en el octavo lugar de las amenazas al suelo según la Estrategia Temática del Suelo de la Comisión Europea (CE, 2006). En la última década, este problema ha sido parte de la agenda ambiental de la Unión Europea (UE) debido a sus impactos en la producción de alimentos, calidad del agua potable, servicios ecosistémicos, inundaciones, eutrofización, biodiversidad y disminución de las reservas de carbono (Panagos et al., 2015).

3.1. EROSIÓN DEL SUELO EN OLIVARES DE PENDIENTES

En la actualidad, la erosión del suelo por el agua es el principal desafío que enfrenta la olivicultura mediterránea. Esto se debe a las características propias del clima mediterráneo, que se caracteriza por lluvias irregulares y a menudo intensas. Las sequías marcadas durante el verano se combinan con aguaceros de alta energía, lo que crea condiciones propicias para la erosión hídrica. Además, estas precipitaciones son altamente variables tanto de un año a otro como dentro del mismo ciclo hidrológico (Durán, Rodríguez, Cuadros, & Francia, 2014).

Cada año se pierden millones de toneladas de suelo debido al arrastre causado por las aguas de escorrentía, lo cual tiene un impacto negativo en la producción del olivar debido a la reducción gradual de la fertilidad del suelo. Este efecto es más pronunciado en áreas con fuertes pendientes, ya que la capacidad de arrastre del agua de escorrentía que transporta las partículas del suelo está directamente relacionada con la inclinación y longitud de la pendiente. Estos factores aumentan la fluidez y velocidad del flujo, lo que incrementa el caudal de la escorrentía y su capacidad de arrastre, dando lugar a la erosión en surcos e incluso a la formación de cárcavas (Ramos, Feito, & Gil, 2008). Por esta razón, los olivares convencionales ubicados en áreas con cierta pendiente y que tienden a mantener una gran parte de su superficie sin cobertura vegetal, están experimentando graves problemas de hidrofobicidad, compactación y disminución del horizonte fértil del suelo (Rodrigo-Comino, Taguas, Seeger, & Ries, 2019).

Es importante destacar que, en la región mediterránea de España, en el año 2015, aproximadamente la mitad de las explotaciones de olivar se encontraban en pendientes superiores al 15% de inclinación. Estas explotaciones representaban el 42,8% de la superficie total de olivar en la región (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de explotaciones y superficies dedicadas al olivar según diferentes intervalos de pendiente

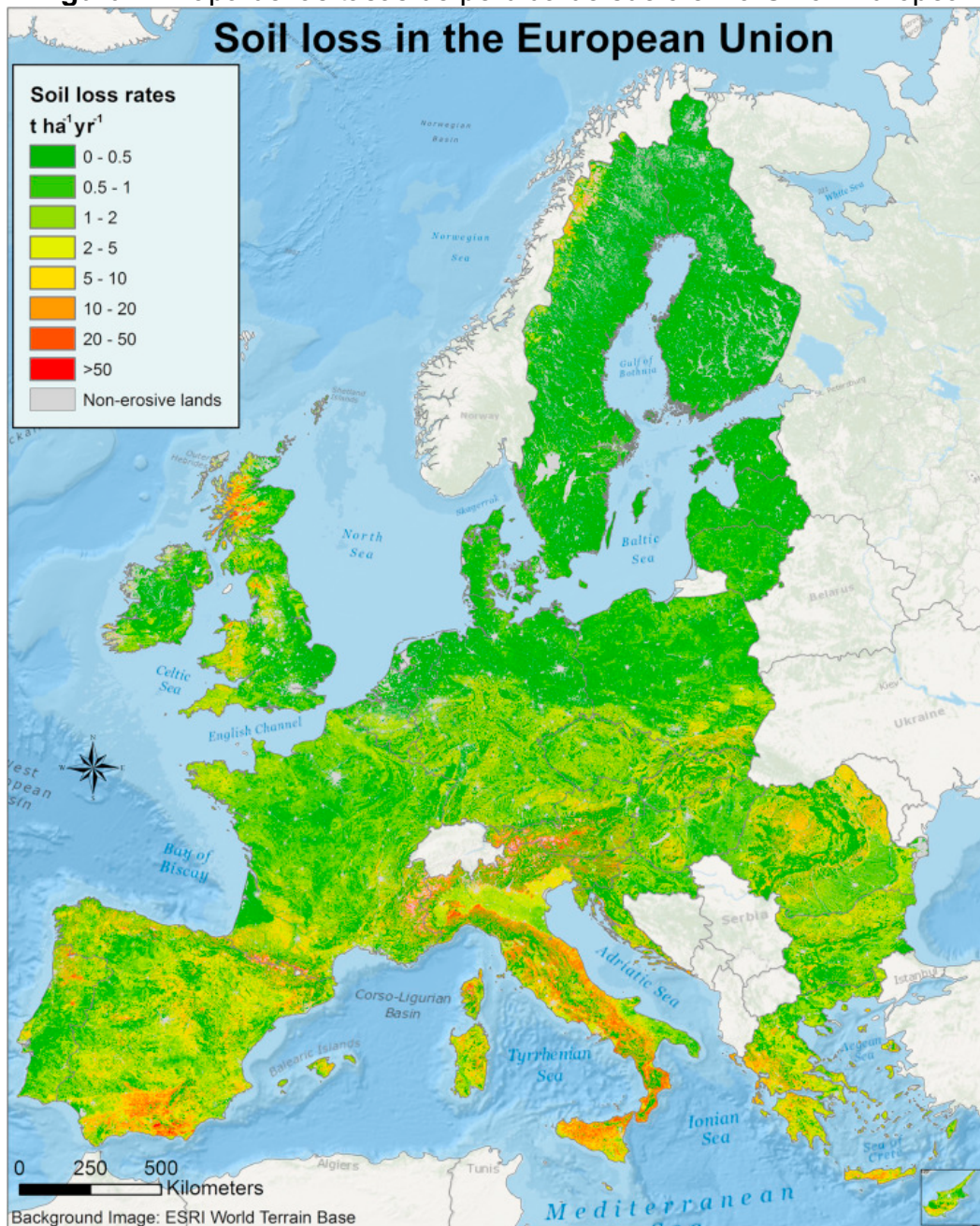
Pendiente	% Explotación	% Superficie
0 – 8 %	20,8 %	20,5 %

8 – 10 %	9,2 %	11,9 %
10 -15 %	20,8 %	24,7 %
15 – 20 %	16,5 %	16,2 %
20 -25 %	12,0 %	10,8 %
> 25 %	20, 7 %	15,8 %

Fuente: Tomado de (Sierra et al., 2018).

Las altas pendientes en los olivares generan importantes problemas ambientales; como la erosión del suelo en la Unión Europea, especialmente en la superficie de olivar andaluz. Se estima que las pérdidas de suelo en esta región superan las 50 toneladas por hectárea al año, como se muestra en la Figura 1.

Figura 1. Mapa de las tasas de pérdida de suelo en la Unión Europea



Fuente: Tomado de (Panagos et al., 2015).

La pérdida del horizonte superficial del suelo conlleva deficiencias de nutrientes y carbono orgánico, lo que afecta negativamente su calidad. Esto limita su capacidad para producir biomasa, que es fundamental para una buena producción agrícola. Además, el suelo desempeña un papel crucial como soporte del medio natural y es el primer eslabón de la cadena alimentaria (Sierra et al., 2018).

3.2. ESTRATEGIAS PARA MITIGAR LA EROSIÓN

El manejo adecuado del suelo puede ayudar a reducir las pérdidas de suelo por erosión. Por esta razón, se están implementando técnicas de no laboreo y el uso de cubiertas vegetales en los espacios entre las filas de olivos como medidas correctivas para mitigar la erosión del suelo en los olivares. Estas técnicas han demostrado obtener resultados prometedores.

Entre las cubiertas vegetales más utilizadas para el manejo de los cultivos de olivar se pueden destacar los siguientes tres tipos:

- a. Cubierta de especies espontáneas. Consiste en permitir el crecimiento de la vegetación natural en el suelo y eliminar selectivamente aquellas especies que puedan ser perjudiciales para el cultivo. Esto se logra mediante el uso de herbicidas selectivos o desbrozadoras, eliminando las hierbas de hoja ancha y conservando preferentemente las gramíneas de hoja estrecha.
- b. Cubierta de especies sembradas. Implica la siembra de plantas herbáceas anuales en los espacios entre las filas de olivos. Esta siembra se realiza durante el otoño, aprovechando las primeras lluvias. Algunas de las especies más adecuadas para esta técnica son:

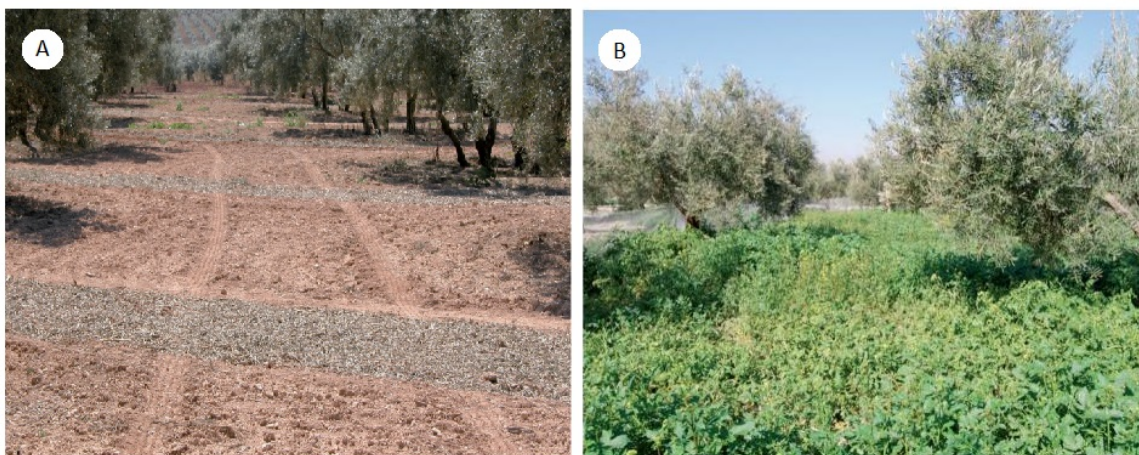
Gramíneas: *Hordeum vulgare* (cebada), *Avena sativa* (avena), *Triticum* spp. (trigo).

Leguminosas: *Vicia sativa* (veza), *Vicia ervilia* (yero), *Trifolium* sp. (trébol).

- c. Cubierta inerte. Consiste en utilizar los residuos generados por la propia explotación para realizar una cubierta. Normalmente se utilizan restos de poda previamente astillados, hojas de limpia, piedras, etc.

En la Figura 2 se ejemplifican algunas de las cubiertas vegetales más comunes.

Figura 2. Ejemplo de cubiertas vegetales. (A) Restos de poda picados formando un acolchado en las calles de un olivar (B) Implantación de cubierta vegetal de leguminosas en olivar convencional



Fuente: Tomado de (Barranco, Fernández, & Rallo, 2017).

A pesar de las ventajas que trae consigo el uso de cubiertas vegetales, es importante tener en cuenta que su uso puede generar competencia por nutrientes y agua con los olivos, especialmente en regiones donde la mayoría de los olivares son de secano. En Andalucía, por ejemplo, aproximadamente dos tercios de los olivares son de secano (495.593 ha regadío/1.521.821 ha totales), de las cuales 329.901 ha son de olivar en pendientes pronunciadas (inclinación > 20%), por lo que considerando la escasez de agua debida a las sequías actuales, el uso de cubiertas vegetales en este tipo de cultivos se considera poco viable, ya que se requiere riego para garantizar la disponibilidad de agua tanto para los olivos como para las cubiertas vegetales (Sierra et al., 2018).

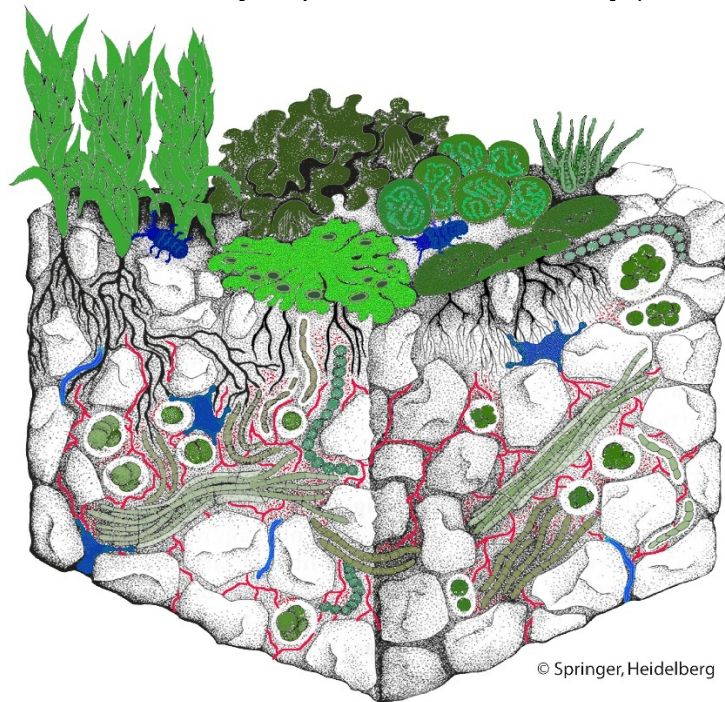
4. BIOCORTEZAS: NUEVA HERRAMIENTA PARA MITIGAR LA EROSIÓN

Durante mucho tiempo, la revegetación fue el enfoque principal para prevenir la erosión del suelo. Sin embargo, esta técnica presenta algunas deficiencias importantes, como un crecimiento lento, elevado costo, baja tolerancia al estrés, competencia con los cultivos y una alta tasa de fallas. Recientemente, se ha demostrado que el cultivo rápido de una cubierta viva alternativa utilizando las cortezas biológicas del suelo (biocortezas: una comunidad de criptógamas y/o microbios en la superficie del suelo), puede ofrecer una solución con un nuevo

enfoque de bajo costo y alta eficiencia para estabilizar el suelo, y mejorar la función en suelos dañados. Una de las ventajas de las biocortezas es su alta capacidad de dominio en las superficies del suelo, pues específicamente en las tierras secas se han reportado informes de coberturas de hasta un 70% o más.

Las comunidades de biocorteza están conformadas por una mezcla de organismos fotoautótrofos criptogámicos, entre los que podemos encontrar cianobacterias, algas, líquenes, musgos, hepáticas, entre otros. Estos organismos actúan junto con diferentes tipos de bacterias y hongos para crear una extensa capa superficial del suelo en hábitats de todo el mundo, sobre todo en aquellos que presentan restricciones ambientales donde el crecimiento de las plantas vasculares está limitado. Estos organismos forman comunidades competitivas en ambientes extremos como los desiertos cálidos y fríos del mundo, los hábitats alpinos y las regiones polares (Raggio, Green, Pintado, Sancho, & Büdel, 2021). Además de las criptógamas fotoautotróficas, las biocortezas albergan una gran diversidad de heterótrofos microbianos, como los hongos, bacterias y arqueas. Estos organismos pueden consumir los compuestos de carbono liberados por los fotoautótrofos durante los eventos de lluvia. Adicionalmente, las biocortezas favorecen la creación de un hábitat que está ocupado por microfauna como protozoos, nematodos, tardígrados, rotíferos y microartrópodos. Por lo tanto, las biocortezas forman redes alimentarias/ecosistemas completos, compuestos por productores fotoautótrofos y consumidores heterótrofos (Figura 3) (Weber et al., 2022).

Figura 3. Las cortezas biológicas del suelo (biocortezas) forman ecosistemas en miniatura. Están compuestos por productores fotoautótrofos (es decir, cianobacterias, algas, líquenes y briófitos; se muestran en verde), microfauna que actúa como consumidores (es decir, protozoos, nematodos, tardígrados, rotíferos y microartrópodos; se muestran en azul) y descomponedores (es decir, hongos, bacterias y arqueas; mostrado en rojo)



Fuente: Tomado de (Weber et al., 2022).

Las biocortezas influyen positivamente en las funciones del ecosistema, entre las que se incluyen la resistencia a la erosión del suelo, la construcción de la fertilidad del suelo, la influencia de la hidrología local y la interacción con otra biota (Bowker, Antoninka, & Chuckran, 2020). De manera adicional, la superficie microbiana formada por las biocortezas brinda servicios ecosistémicos importantes como protección contra la erosión provocada por el viento y el agua. Las biocortezas también contribuyen de manera positiva a la fertilidad del suelo al fijar carbono atmosférico y nitrógeno, gracias a su gran capacidad de exportar al suelo no solamente proporciones significativas tanto de C como de N, sino también de otros elementos; además de atrapar partículas de polvo (Giraldo-Silva, Nelson, Barger, & Garcia-Pichel, 2019).

4.1. CIANOBACTERIAS

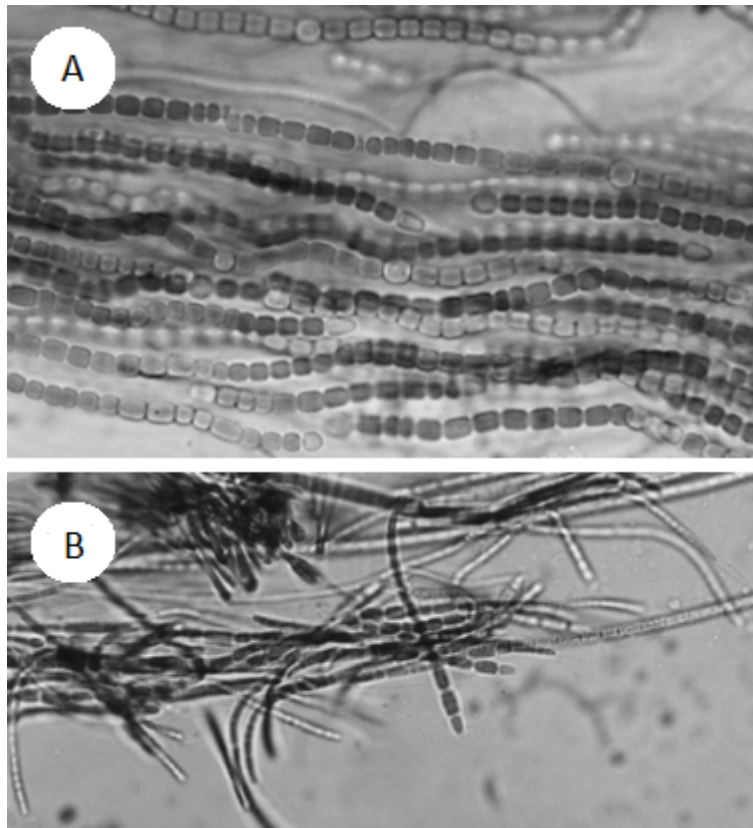
Las cianobacterias son organismos fotoautótrofos procarióticos que se encuentran presentes en casi todos los ambientes terrestres. Por lo regular son las primeras especies fotosintéticas que se hacen presentes en suelos perturbados y son capaces de sobrevivir en condiciones ambientales extremas, como alta temperatura, pH y salinidad, baja precipitación, fuerte irradiación y desecación. Como todo organismo procariótico, su reproducción unicelular ocurre por una simple división de la célula. La propagación vegetativa de las cianobacterias filamentosas a menudo tiene lugar mediante hormogonias y pseudohormogonias (Belnap, Weber, & Büdel, 2016).

Las cianobacterias juegan un papel importante en el suelo, pues le brindan estabilidad, secuestran carbono y fijan nitrógeno, y producen pigmentos protectores solares como la escitonemina. Gracias a su papel como colonizadores primarios de la biocorteza, sus grandes habilidades ecológicas, sus características biológicas y modos de reproducción vegetativos simples hacen que las cianobacterias sean organismos muy adecuados para la rehabilitación de la biocorteza, por lo cada vez son más utilizados en proyectos para promover biocortezas artificiales y mejorar las condiciones del suelo en tierras secas degradadas (Jiménez-González, Machado de Lima, Chilton, Almendros, & Muñoz-Rojas, 2022).

4.1.1. INOCULACIÓN DE CIANOBACTERIAS

La inoculación de cianobacterias (también conocida como cianobacterización) es una tecnología que se ha investigado ampliamente debido a sus efectos positivos sobre la fertilidad del suelo y el crecimiento de las plantas. De hecho, el uso de cianobacterias como “abono verde” en la agricultura es un tema que se ha documentado desde la década de 1950. Se ha demostrado que la siembra con géneros diazotróficos como *Nostoc* y *Calothrix* (Figura 4), solos o combinados, tuvieron efectos positivos en un número importante de cultivos, presentando mejoras en cuanto al número de labores productivas, altura de planta, altura de panoja, peso de rendimiento y paja, cosecha y el índice de granos, entre otros.

Figura 4. Cianobacterias vistas bajo microscopia de luz, 3550 x. (A) *Nostoc* y (B) *Calothrix*



Fuente: Tomado de (Tsavkelova, Lobakova, Kolomeitseva, Cherdyntseva, & Netrusov, 2003).

Por otro lado, la cianobacterización como alternativa para combatir los efectos de la desertificación es un tema de investigación más actual, con registros que datan de solo un par de años. Estudios recientes han demostrado que, si se emplean las cepas adecuadas y se logra realizar un proceso de inoculación exitoso, los efectos positivos en términos de fertilización y estabilización del suelo son rápidos y significativos, incluso cuando únicamente están presentes las cortezas de cianobacterias. Una inoculación exitosa es determinante para la formación de cortezas de cianobacterias, lo que daría pauta para el primer nivel de desarrollo de la biocorteza (Adessi, De Philippis, & Rossi, 2021).

Al colonizar con éxito la superficie del suelo, las cianobacterias mejoran la fertilidad del suelo a través de procesos de quelación de minerales, atrapamiento de polvo y la fijación de nutrientes; de esta manera las cianobacterias preparan los suelos para

el establecimiento de comunidades de biocortezas, plantas y animales más desarrollados. Además, varios estudios revelaron que al producir sustancias poliméricas extracelulares (Exopolisacáridos, EPS), las cianobacterias son capaces de unir las partículas del suelo, aumentar la estabilidad de los agregados y reducir los impactos erosivos del viento y el agua. Además, la actividad fisiológica de la cianobacterias propicia el aumento de materia orgánica, que a su vez aumenta la repelencia al agua y la adhesión entre las partículas del suelo, promoviendo así la resistencia de los agregados a la humectación y mejorando la estructura y la estabilidad de los mismos. Cabe mencionar que las cianobacterias contribuyen también a mejorar la distribución de tamaño de partícula del suelo, propiedad dinámica que determina la resistencia del mismo a las fuerzas erosivas y su capacidad para proporcionar funciones clave como la infiltración de agua (Sepehr, Hassanzadeh, & Rodriguez-Caballero, 2019).

4.2. OTROS MICROORGANISMOS

4.2.1. LÍQUENES

Los líquenes son una asociación simbiótica de una pareja de algas o cianobacterias (fotobionte) con un huésped fúngico (micobionte). Los líquenes crecen independientemente de los sustratos hospedantes, incluidas rocas, suelos, árboles y estructuras hechas por el hombre. Al carecer de un sistema de raíces, la absorción de nutrientes o contaminantes del liquen se realiza principalmente a través de aportes atmosféricos directos, principalmente como deposición húmeda y seca. Como los líquenes crecen en una gran variedad de ambientes y son resistentes en climas severos, están adaptados para capturar y retener nutrientes de fuentes en el aire (Anderson, Lévesque, Caron, Beckett, & Spiers, 2022).

La reproducción de líquenes puede involucrar a uno o ambos biontes y puede ser sexual o asexual. La reproducción sexual de los líquenes involucra solo el micobionte fúngico que produce un cuerpo fructífero que contiene y dispersa las esporas. La formación sexual de nuevos talos de liquen por esporas de micobiontes es extremadamente difícil debido al desafiante proceso de reliquenización. Se ha informado que la formación de un nuevo liquen talo a partir del micelio derivado de

ascosporas ocurre en aproximadamente uno de varios millones de casos (Honegger 2008). Sin embargo, varios modos de propagación vegetativa están bien desarrollados en los líquenes. La fragmentación es el método más simple y uno de los más comunes de reproducción vegetativa, mientras que isidia y soredia son propágulos vegetativos especializados de líquenes, que contienen tanto el micobionte como el fotobionte. Por lo tanto, al menos en teoría, debería ser factible restaurar las biocortezas con líquenes mediante su inoculación (Belnap, Weber, & Büdel, 2016)

4.2.2. MUSGOS

Los musgos son briófitos y pueden clasificarse como plantas compuestas de tallos y hojas pequeños y delgados que carecen de tejido vascular y raíces verdaderas. Los musgos tienen estructuras semejantes a raíces, tallos y hojas, pero no tienen verdaderos tejidos conductores de agua y nutrientes. La mayoría de los musgos se reproducen sexualmente por esporas (Rosentreter, 2020).

Los musgos son componentes comunes de las comunidades biológicas que habitan en la corteza del suelo (biocortezas) y brindan servicios ecosistémicos clave. Entre sus funciones principales se encuentran la estabilización del suelo, la retención de agua, la fijación de carbono y el alojamiento de cianobacterias fijadoras de N₂. Los musgos son capaces de sobrevivir largos períodos secos, responden velozmente a la precipitación y se reproducen vegetativamente. Estas características hacen de los musgos de tierras secas unos excelentes materiales de restauración de biocortezas. Sin embargo, debido a la naturaleza de su lento crecimiento, es necesario desarrollar métodos de cultivo ex situ para mejorar su utilidad (Antoninka, Bowker, Reed, & Doherty, 2016).

JUSTIFICACIÓN

La continua explotación de los suelos del mediterráneo, en especial debido al cultivo de olivar, el uso constante de técnicas de laboreo, las lluvias intermitentes, la sequía y los suelos desnudos han provocado la pérdida irreversible de suelos fértiles, por lo que se precisa de manera urgente formular y poner en marcha estrategias para mitigar, y de ser posible, recuperar la calidad de los suelos.

Existe mucha información bibliográfica sobre cubiertas vegetales como alternativa para mitigar el impacto de la pérdida de calidad del suelo; sin embargo, poco se habla sobre los microorganismos, que son la parte medular para el establecimiento de una cubierta viva. Además, su presencia en el suelo favorece las condiciones para la infiltración de agua, presencia de materia orgánica, formación de agregados en el suelo y demás propiedades que le brindan resistencia a las condiciones críticas de cambio climático, sequía y erosión.

La investigación de las biocortezas de cianobacterias es una propuesta innovadora que se ha estado desarrollando en la actualidad para mejorar las condiciones suelos deteriorados por erosión, desertificación o explotación desmedida por la actividad humana. Durante la consulta de la bibliografía no se encontró evidencia alguna de estudios de biocortezas de cianobacterias enfocados a los suelos de los olivares, lo cual fue determinante para la elección del tema de la presente investigación.

Considerando la problemática tan grave que representa la pérdida de la calidad del suelo y las medidas poco eficientes para su restauración, la opción de considerar como alternativa el uso de cianobacterias podría traer consigo una oportunidad para mejorar las condiciones de suelo de los olivares de pendiente, que son los más afectados. Con este trabajo se pretende realizar una exhaustiva revisión de las metodologías disponibles para proteger diversos suelos con biocortezas de cianobacterias, sus particularidades, su aplicación y sus resultados, buscando establecer una posible aplicación de las mismas en los suelos de los olivares de pendientes con la finalidad de inducir la formación natural de microhábitats capaces de mejorar las condiciones físicas y químicas del suelo y fomentar su resistencia ante la erosión.

Al tratarse de un tema de actualidad, la bibliografía disponible para consulta es limitada, pero muy sustancial. Esto representa un área de oportunidad para establecer de manera teórica un protocolo de acción y, por consiguiente, establecer las bases para futuros proyectos experimentales.

OBJETIVO

Revisar la información bibliográfica reportada para el uso de biocortezas de cianobacterias como medida correctiva para la degradación y pérdida de suelo, así como casos de éxito de propagación y cultivo de biocortezas para proponer una alternativa de uso en los olivares de pendiente para disminuir el impacto ambiental provocado por la erosión como una primera medida, considerando también la posibilidad de regeneración del suelo fértil y la mejora en la calidad y riqueza del suelo.

Comparar las características de suelo de las investigaciones revisadas contra las características de suelo que se presentan mayormente en las zonas de olivares de pendiente para tener una noción hipotética sobre el éxito que podría tener la propuesta en caso de llevarse a cabo de manera experimental.

Establecer un protocolo general de trabajo en el que se explique de manera detallada los pasos a seguir para llevar a cabo el proceso de establecimiento de una biocorteza de cianobacterias desde su muestreo en suelo hasta su inoculación en el mismo.

Evaluar los resultados obtenidos en la bibliografía consultada para poder concluir la efectividad que tiene la metodología propuesta, así como analizar los beneficios que trajo consigo la inoculación de las biocortezas de cianobacterias en cada proyecto revisado y determinar las ventajas que supone su uso frente a otras alternativas utilizadas para mitigar los efectos de la erosión y el desgaste del suelo.

METODOLOGÍA

Se realizó una búsqueda bibliográfica de artículos científicos publicados entre 2012 y 2023 tanto de trabajos escritos en español como en inglés. Para la consulta se analizaron todos aquellos trabajos cuyo título y resumen se adaptan a la temática de la revisión.

Las bases de datos consultadas fueron Dialnet, Pubmed y el buscador Google académico. Como criterios de búsqueda se ingresaron las palabras clave “suelo”, “degradación”, “erosión”, “biocorteza”, “cianobacteria”, “inoculación”, “olivo”.

Se establecieron criterios de inclusión y exclusión (Tablas 3, 4) para descartar toda bibliografía que no siguiera la línea de la revisión y seleccionar aquellos artículos con información relevante para su posterior lectura sistemática.

Tabla 3. Criterios de inclusión

Variables	Criterios de inclusión
Objetivos del artículo	Restauración de suelo
Tipo de microorganismo	Cianobacterias
Fecha de publicación	≥ 2018

Fuente: Elaboración propia

Tabla 4. Criterios de exclusión

Variables	Criterios de exclusión
Criterios de inclusión	El no cumplir con alguno de estos criterios
Duplicados	En distintas bases de datos

Fuente: Elaboración propia

Los artículos que cumplieron los criterios de inclusión fueron recuperados a texto completo a través de la biblioteca de la Universidad de Jaén.

Los artículos seleccionados se revisaron de manera independiente para corroborar su pertinencia, tomando como criterio las características del estudio, el objetivo, los procedimientos, los resultados y sus conclusiones. Todo esto se realizó con ayuda de una ficha técnica en la que desarrollaban las generalidades de los trabajos; de esta manera se descartaron aquellos artículos menos afines al objetivo del trabajo en cuestión (Tabla 5).

Tabla 5. Ficha técnica descriptiva

Ficha técnica	
Título del artículo:	
Autores:	
Objetivo de la investigación	
Año de la investigación:	
Lugar de la investigación:	
Año de publicación:	
Idioma:	
Año de publicación:	
Revista:	
Palabras clave:	

Fuente: Elaboración propia

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. SELECCIÓN DE BIBLIOGRAFÍA

Los artículos recuperados y seleccionados de cada una de las bases de datos tras realizar la búsqueda con ayuda de palabras clave y aplicar los criterios de inclusión se muestran en la Tabla 6.

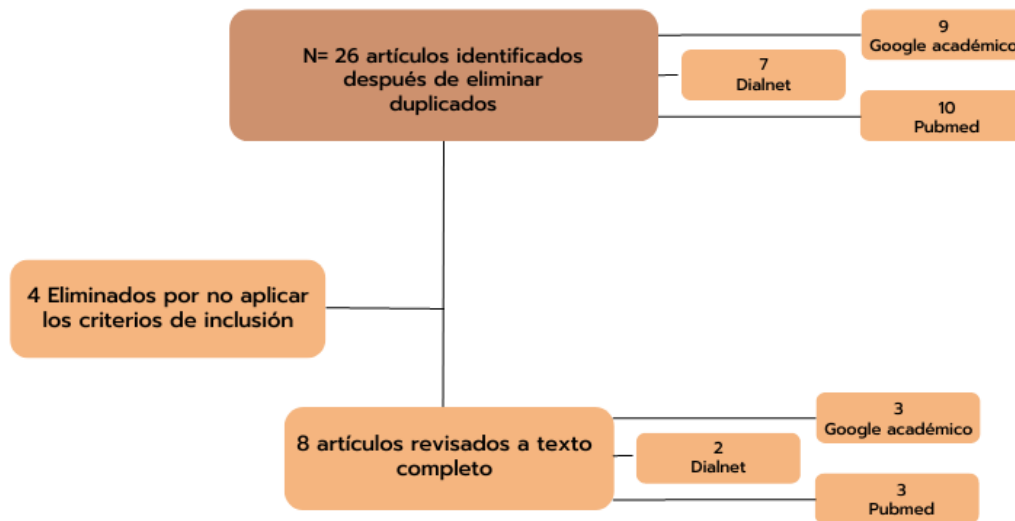
Tabla 6. Número de artículos recuperados y seleccionados

Base de datos	Artículos recuperados	Artículos seleccionados
Google académico	9	3
Dialnet	7	2
Pubmed	10	3

Fuente: Elaboración propia

Se recuperó un total de 26 referencias, de las cuales se descartaron 12 por no cumplir los criterios de inclusión establecidos. De las 12 referencias restantes se realizó la lectura sistemática y se descartaron 4 dado que los resultados de sus investigaciones no proporcionaban información relevante para la presente revisión. El número total de artículos seleccionados para la revisión fueron 8 según se esquematiza en la Figura 5.

Figura 5. Resultados de búsqueda



Fuente: Elaboración propia

2. POSIBLE USO DE BIOCORTEZAS DE CIANOBACTERIAS EN OLIVARES EN PENDIENTE.

De acuerdo con la bibliografía consultada, las investigaciones se realizaron en diversos tipos de suelo con altas deficiencias en fertilidad, nutrientes, textura y capacidad de retención de agua.

Karimi, Tahmourespour, & Hoodaji (2022) realizaron el estudio en siete tipos de suelo relativamente pobres en nutrientes ubicados en áreas agrícolas importantes. El primer suelo está clasificado como cambisol gleico, según la clasificación de la Base Mundial de Referencia para los Recursos del Suelo (WRB) (IUSS, 2014). En este tipo de suelo se había cultivado durante 15 años, siendo el arroz el cultivo habitual. El segundo suelo se había cultivado con maíz durante más de 35 años; este suelo fue clasificado como Lixisol rodi-profundo (WRB). El tercer suelo fue clasificado como Luvisol férrico (WRB) y se había cultivado con maíz en condiciones de secano. El cuarto suelo era un esquema de riego a pequeña escala que también había sido cultivado con maíz; este suelo fue definido como Luvisol háplico en la clasificación WRB. Los últimos tres tipos de suelo estaban sembrados con maíz de secano y representaban entornos de cultivos arenosos de baja fertilidad; estos

suelos fueron clasificados en la clasificación WRB como Lixisol Háptico, Luvisol Crómico y Lixisol Háptico, respectivamente.

Chamizo, Mugnai, Rossi, Certini, & De Philippis (2018) Recolectaron cuatro tipos de suelo con distribuciones de tamaño de partícula contrastantes de dos áreas semiáridas. Desde el más fino hasta el más grueso, estos suelos se clasificaron como: (1) franco limoso, (2) franco arenoso; (3) arena arcillosa y (4) arena.

El suelo franco limoso se recolectó de una zona caracterizada por suelos poco profundos con estructura pobre y bajo contenido de nitrógeno y materia orgánica. La precipitación media anual es de 235 mm y la temperatura media anual es de 18°C. Los otros tres tipos de suelo se recolectaron de tres sitios diferentes con una precipitación media anual de 200 mm y una temperatura media anual de 18°C. Las arenas francas y los suelos arenosos se recolectaron en un área de pastizal con topografía plana. El suelo franco arenoso se recogió de una zona de cultivo agrícola de secano. Los suelos franco arenoso y franco arenoso difieren en su estructura y composición química, siendo el suelo “agrícola” menos compacto debido a la labranza ocasional y con menos carbonato y mayor contenido de carbono y nitrógeno orgánico que el suelo franco arenoso.

Roncero-Ramos et al. (2019) trabajaron con suelos muestreados en sitios de clima mediterráneo semiárido.

El primer sitio cuenta con una temperatura media anual de 17,6 °C, una precipitación anual de 242 mm y una evapotranspiración potencial anual de 1225 mm. El tipo de suelo muestreado es Leptosol (WRB) con una textura del suelo franco arcillosa (34% arena, 31% limo y 35% arcilla).

El segundo sitio se caracteriza por una precipitación media anual de 235 mm, que cae principalmente en invierno, y con veranos largos y secos. La temperatura media anual es de 17,8 °C y la evapotranspiración potencial anual es de aproximadamente 1.500 mm. El tipo de suelo de esta región varía entre Leptosoles, Calcisoles, Cambisoles y Gypsisoles (WRB), y su textura es franco-limosa (30% arena, 59% limo y 11% arcilla). Esta zona cuenta con pendientes pronunciadas, por lo que hay

procesos erosivos activos y, por ende, poco desarrollo del suelo, por lo que está prácticamente desprovista de vegetación.

El tercer sitio cuenta con una temperatura media anual de 19 °C y una precipitación media anual de 200 mm. Los suelos de esta región se clasifican en Leptosoles y Calcisoles (WRB), y la textura del suelo es franco-arenosa (61% arena, 29% limo y 10% arcilla).

Roncero-Ramos et al. (2019) Recolectaron dos tipos de suelo de dos sitios experimentales con condiciones climáticas similares, pero diferencias en las características fisicoquímicas del suelo, la productividad y la intensificación del uso de la tierra, El clima de ambos sitios es mediterráneo semiárido.

El primer sitio cuenta con una temperatura media anual de 17,6 °C y una precipitación de 242 mm. Sus suelos se clasifican principalmente en leptosoles epilépticos y endolépticos y regosoles calcáricos. Tiene una textura franca (34% arena, 45% limo y 21% arcilla), una baja capacidad de retención de agua y un contenido de materia orgánica muy pobre. Debido al limitado desarrollo del suelo que conduce a una alta erosión del suelo y bajas capacidades de infiltración que restringen la humedad del suelo, la escasa cobertura vegetal y el predominio de fuertes pendientes, las tasas de erosión en este sitio es muy alta.

El segundo sitio cuenta una temperatura media anual de 17,8 °C y una precipitación de 235 mm. Sus suelos se clasifican principalmente como Regosoles epilépticos y endolépticos, Regosoles calcáricos , Calcisoles háplicos y Gipsisoles éutricos. La textura del suelo es principalmente franco-limosa (24 % arena, 57 % limo y 19 % arcilla) y la capacidad de retención de agua y los contenidos de CO y nitrógeno son más altos que el primer sitio.

Los suelos analizados en la bibliografía presentan claras similitudes con los suelos de los olivares en pendiente. En la investigación de (Karimi, Tahmourespour, & Hoodaji, 2022) se trabajó con suelos agrícolas explotados bajo el régimen de monocultivo de maíz. Este régimen se aplica en las fincas de olivar debido a la naturaleza arbórea de los olivos y desafortunadamente favorece el agotamiento y degradación del suelo, debido a que el cultivo reiterado de la misma especie acaba

agotando por completo los nutrientes requeridos por ella. Esto acaba provocando incluso erosión a largo plazo, y el suelo pasa a requerir la adición periódica de fertilizantes. En esta investigación además se trabajó con un suelo con cultivo de maíz de secano que también es muy utilizado en los olivares de pendiente debido a la poca accesibilidad de los terrenos para llevar a cabo actividades de riego.

En las investigaciones realizadas por Chamizo, Mugnai, Rossi, Certini, & De Philippis (2018) se trabajó con suelos con estructura pobre y bajo contenido de materia orgánica. Estas características son comunes en las fincas de olivar de pendiente debido a la escorrentía provocada por la lluvia, que provoca pérdidas importantes en la estructura y calidad del suelo.

Una de las similitudes más contundente corresponde a los suelos analizados por Roncero-Ramos et al. (2019), puesto que los sitios experimentales tienen un clima mediterráneo semiárido que es característico del sur de España, donde se encuentra la mayor cantidad de explotaciones de olivar en el país. De igual manera la precipitación de estos sitios es baja, como lo ha sido en los últimos años en la provincia de Jaén y en la península en general debido a la sequía. Uno de los suelos de esta investigación además viene de una zona con pendientes pronunciadas y procesos erosivos activos que es básicamente el objeto de estudio de esta revisión. También se habla de una escasa cobertura vegetal y baja capacidad de infiltración que es muy típica de las fincas en pendiente debido a la fuerte erosión que presentan.

Debido a las semejanzas encontradas entre los suelos estudiados y los suelos de los olivares en pendiente se propone el uso de biocortezas de cianobacterias como posible método de restauración en aquellas fincas que presenten altos niveles de erosión, porque a diferencia de otras técnicas de restauración, las biocortezas de cianobacterias podrían traer los siguientes beneficios:

Pueden modificar rápidamente las propiedades de los sustratos de suelo reconstruidos, por lo que son organismos con potencial para iniciar la recuperación de las funciones del suelo en sustratos de suelo infértiles y deficientes.

Tienen la capacidad para sintetizar y liberar grandes cantidades de EPS, incluso en condiciones climáticas desfavorables, pues su crecimiento no se ve estrictamente limitado por falta de agua ni altas temperaturas. Los EPS producidos por las cianobacterias mantienen la estructura de la biocorteza y unen las moléculas de agua, por lo que evitan la pérdida de agua y contribuyen a acelerar la recuperación de las actividades microbianas después de los períodos secos. Los EPS también favorecen la formación de macroagregados de sedimentos estables, brindando resistencia al suelo.

Forman grandes colonias en lapsos de tiempo muy cortos y su desarrollo se puede determinar de manera visible, por lo que no es necesario el uso de técnicas sofisticadas para su monitoreo. De igual manera, requieren poco o nulo mantenimiento, pues una vez inoculadas logran colonizar el sustrato a pesar de las condiciones climáticas.

Debido a su mínima demanda de agua y nutrientes no entran en competencia con los cultivos, por lo que pueden cohabitar de manera sinérgica. Además, debido a su naturaleza microbiana son capaces de proteger las plantas de patógenos y enfermedades y de prevenir el crecimiento de malezas.

Favorecen la creación de un hábitat al albergar una gran diversidad de hongos, bacterias y arqueas, que a su vez estimulan la aparición de por microfauna; por lo tanto, forman redes alimentarias/ecosistemas completos que favorecen el enriquecimiento del suelo.

Permiten siempre, incluso en ausencia de lluvias, proporcionar la fuente de agua esencial de la atmósfera (incluido el rocío, niebla y vapor de agua) al sustrato del suelo.

3. PROTOCOLO GENERAL DE TRABAJO

De la información bibliográfica de trabajo se analizaron las metodologías desarrolladas para la inoculación de cianobacterias en suelo con el objetivo de estimular la formación de biocortezas. De esta manera se estableció un flujo de trabajo, estructurando los pasos clave básicos utilizados por los diversos autores

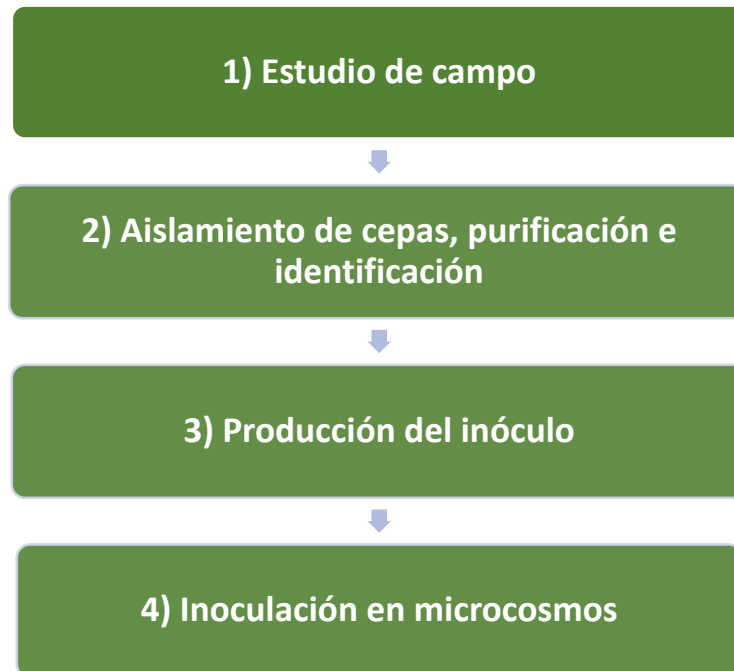
para los procesos de inoculación, aislamiento y purificación de las cepas de cianobacterias; así como producción de biomasa, inoculante y la dispersión de las colonias para la formación de biocortezas. El flujo de trabajo propuesto se detalla a continuación:

3.1. FLUJO DE TRABAJO PARA LA INOCULACIÓN

A grandes rasgos, el proceso de cultivo de biocortezas se puede simplificar en cuatro etapas principales: toma de la muestra de suelo del entorno a rehabilitar (1); aislamiento, purificación e identificación de la cianobacteriana cultivable (2); producción del inóculo (3), e inoculación en el suelo nativo en microcosmos para evaluar la capacidad de las cianobacterias de sobrevivir y convertirse en biocortezas (4) (Figura 6).

Para todo fin experimental es necesario aislar y purificar todas aquellas cianobacterias con potencial para desarrollar biocortezas de las muestras recolectadas en el campo de manera previa a la realización de pruebas fisiológicas; de esta manera se puede evaluar de manera más eficaz su capacidad de restablecimiento en el suelo nativo y de desarrollar biocortezas. La evaluación de las cepas se realiza a menudo en microcosmos y mesocosmos. Los microcosmos comúnmente se preparan en placas de Petri de plástico o bandejas de aluminio. Entre las ventajas del uso de microcosmos se encuentran la recreación de condiciones ambientales reales, y la facilidad para personalizar diseños experimentales, además, permiten realizar un análisis detallado de la modificación biótica y abiótica en el sustrato después de la inoculación de la cianobacteria. Adicionalmente, los microcosmos facilitan la evaluación de factores que pudieran interferir con el éxito de la inoculación.

Figura 6. Esquematización de los pasos básicos del flujo de trabajo para seleccionar y probar nuevos inoculantes de cianobacterias en el laboratorio.

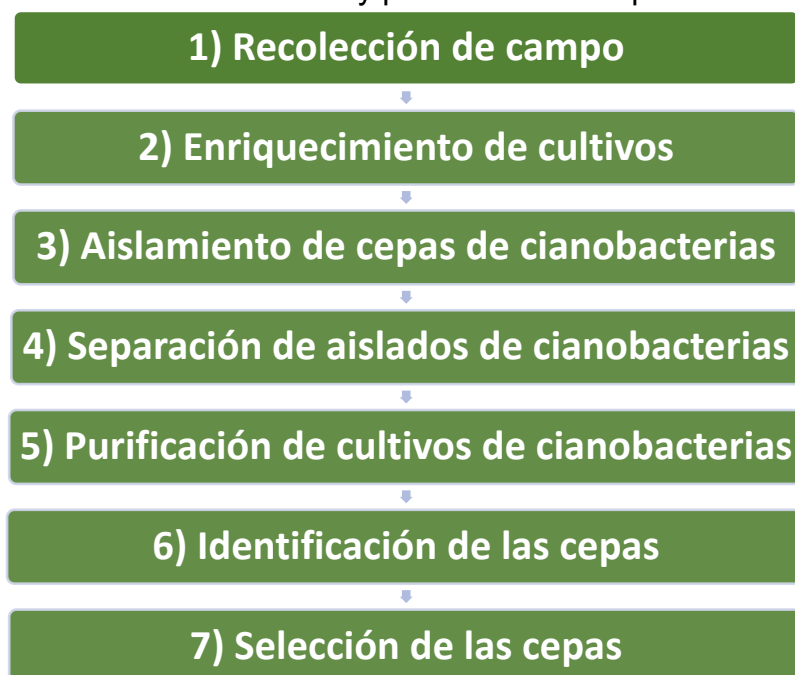


Fuente: Elaboración propia a partir de los datos tomados de (Rossi, Mugnai, & De Philippis, 2022)

3.1.1. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE CEPAS

Los pasos generales del procedimiento para aislar y purificar especies de cianobacterias se detallan en la Figura 7. En primera instancia, se realiza el muestreo de campo a tratar. Las especies de cianobacterias se obtienen cultivando en un medio de cultivo adecuado todas las bacterias contenidas en la muestra del suelo y luego se deben aislar las cianobacterias sembrando el cultivo mixto en el mismo medio de crecimiento hasta que se observe la formación de colonias verdes en las placas de agar. Es necesario emplear un medio de cultivo que promueva crecimiento de cianobacterias; el medio se elige en función del metabolismo y la fisiología de los géneros de cianobacterias a los que se dirige el procedimiento de aislamiento, y de las características del suelo que se está estudiando.

Figura 7. Esquematización de los pasos básicos del flujo de trabajo para el aislamiento y purificación de cepas



Fuente: Elaboración propia a partir de los datos tomados de (Rossi, Mugnai, & De Philippis, 2022)

3.1.1.1. RECOLECCIÓN EN CAMPO

La recolección en campo es el procedimiento más sencillo del flujo de trabajo. Consiste en seleccionar el suelo de interés y tomar una muestra superficial del mismo. Se puede realizar un tratamiento de tamización antes de someterlo a las pruebas siguientes.

Giraldo-Silva, Nelson, Barger, & Garcia-Pichel (2019) recolectaron muestras de dos desiertos climáticamente distintos y de dos tipos texturales de suelo en cada uno (arenoso y limoso) en placas de Petri de 1,5 × 9 cm de diámetro y las mantuvieron secas en la oscuridad hasta su posterior procesamiento. Su forma de muestreo fue tomar muestras de suelos a granel (0–10 cm de profundidad) de cada sitio para usar en la prueba de aptitud.

Karimi, Tahmourespour, & Hoodaji (2022) recolectaron las muestras de suelo de una zona semidesértica en tres lugares separados desde una profundidad de 0,5 cm con

una espátula y las almacenaron en una bolsa de plástico para después trasladarlas inmediatamente al laboratorio, secarlas al aire, mezclarlas y tamizarlas.

Muñoz-Rojas et al. (2018) recolectaron sustratos de suelo de 0–10 cm de profundidad en una zona semiárida; secaron las muestras al aire y las tamizaron a 2 mm.

Chamizo, Mugnai, Rossi, Certini, & De Philippis (2018) recolectaron cuatro tipos de suelo con distribuciones de tamaño de partícula contrastantes de dos áreas semiáridas desde el más fino hasta el más grueso, estos suelos se clasificaron como: franco limoso, franco arenoso; arena arcillosa y arena. Secaron los suelos muestreados al aire y los tamizaron a 2 mm, luego los esterilizaron en autoclave dos veces durante 20 minutos a 120°C para suprimir la actividad biológica.

3.1.1.2. ENRIQUECIMIENTO DE CULTIVOS

Los medios de cultivo más comunes para la inoculación de cianobacterias son BG₁₁ ("Blue Green medium") para cepas de suelo de ambientes no salinos, y agua de mar enriquecida o medio ASN III para cepas de ambientes salinos. BG₁₁ es el medio de cultivo más utilizado, junto con su variante BG₁₁ 0 que permite seleccionar aquellas cepas que son capaces de fijar nitrógeno. Es necesaria la obtención de cultivos puros, pues facilita la identificación de aislados por enfoques moleculares y la asignación de género y especie de nuevos candidatos a cianobacterias.

Giraldo-Silva, Nelson, Barger, & Garcia-Pichel (2019) colocaron pequeños fragmentos de biocorteza en medio líquido BG₁₁ 0, cuya única fuente de nitrógeno disponible era el N₂ atmosférico. Los medios fueron incubados a 4, 25 o 35°C, e iluminados con 150–200 μmol (fotón) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, durante un fotoperíodo de 14 horas, por al menos una semana. Separaron los grumos de biomasa utilizando fórceps y un microscopio de disección, para posteriormente sembrarlos en placas de Petri con agar BG₁₁ 0 solidificado al 1,5 % (p/v), e incubar los medios por más tiempo. Volvieron a sembrar colonias individuales en placas de agar frescas y repitieron el proceso.

Karimi, Tahmourespour, & Hoodaji (2022) mezclaron la muestra de suelo con BG₁₁ y prepararon diluciones en serie. Inocularon alícuotas de cada dilución (100 µL) en placas de agar BG₁₁ que contenían compuestos antifúngicos (anfotericina B y nistatina a razón de 50–100 ppm). Luego, incubaron las muestras a 25 °C en cámara de crecimiento de microalgas con una intensidad de luz de alrededor de 2800 lx y un período de luz de 14 h y 10 h de oscuridad durante 2 a 4 semanas.

Peng & Bruns (2019) utilizaron un medio BG₁₁ modificado sin N, MBG₁₁(N-), para el mantenimiento del cultivo. Cultivaron las muestras en placas de Petri con MBG₁₁(N-) sólido a 22-23°C bajo iluminación fluorescente continua ("luz natural") con una intensidad promedio de 4 µmol de fotones m⁻² s⁻¹. Luego cultivaron las muestras en matraces Erlenmeyer conteniendo medio líquido (1/5 del volumen del matraz) en las mismas condiciones con agitación rotatoria a 90 rpm (RPM). Una vez que obtuvieron la biomasa de cianobacterias, la transfirieron a medios nuevos (dilución quíntuple) después de períodos de crecimiento de 30 días.

3.1.1.3. AISLAMIENTO DE CEPAS DE CIANOBACTERIAS Y SEPARACIÓN DE AISLADOS

Para obtener monocultivos de cianobacterias, la suspensión verde obtenida debe ser espolvoreada repetidamente sobre medio nutritivo agarizado. Otras técnicas sugieren trabajar con diluciones en serie o centrifugaciones de un cultivo previamente homogeneizado, filtrar la suspensión celular a través de membranas con tamaños de poro conocidos o centrifugar por gradiente de densidad.

Los filamentos y grumos de cianobacterias desarrollados en medio de agar se pueden recolectar en condiciones asépticas bajo un microscopio óptico con ayuda de pinzas esterilizadas.

Para el aislamiento de cianobacterias, Giraldo-Silva, Nelson, Barger, & Garcia-Pichel (2019), primero humedecieron la biocorteza con la finalidad de permitir la migración de las cianobacterias hacia la superficie. Después de 30 minutos, recogieron las colonias directamente de la superficie de la biocorteza usando pinzas finas bajo el microscopio de disección.

Karimi, Tahmourespour, & Hoodaji (2022) observaron las placas al microscopio y recogieron las colonias que contenían cianobacterias con un diámetro de tricoma de más de 3 micras, ayudándose de una aguja estéril para transferirlas a una placa nueva. Para purificar, realizaron el método de rayado y lo repitieron varias veces para obtener un solo cultivo.

3.1.1.4. PURIFICACIÓN DE CULTIVOS DE CIANOBACTERIAS

Para purificar los cultivos se pueden realizar tratamientos antibióticos para eliminar contaminantes eucariotas y procariotas, seguido de Imipenem para eliminar bacterias heterótrofas.

Giraldo-Silva, Nelson, Barger, & Garcia-Pichel (2019) arrastraron las colonias sobre medio de Jaworski solidificado con agar al 2 % (p/v) para eliminar las partículas de suelo y las bacterias adheridas, y las transfirieron a placas de 96 pocillos que contenían líquido JM, incubado a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e iluminado con $20\text{--}30 \mu\text{mol (fotón)} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bajo un fotoperíodo de 14 horas. Cubrieron las placas de pocillos para disminuir la luz durante las primeras 24 horas de incubación. Después de una semana, añadieron gotas de medio fresco a los pocillos (donde el crecimiento era evidente) y finalmente, las transfirieron a recipientes más grandes (placas de 24 pocillos). Una vez que observaron suficiente biomasa allí, confirmaron el estado unialgal del enriquecimiento mediante inspección microscópica.

Karimi, Tahmourespour, & Hoodaji (2022) purificaron las cepas con el método de estriado y lo repitieron varias veces hasta obtener un solo cultivo.

3.1.1.5. IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS

Identificar nuevos candidatos a cianobacterias es crucial, pues es necesario conocer y establecer sus funciones en la biocorteza. Entre las funciones más destacadas de las cepas podemos mencionar que algunas muestran una gran capacidad para mejorar la estabilidad estructural del suelo, mientras otras muestran propiedades biofertilizantes prevalentes. Durante las investigaciones enfocadas a erosión en campo, es ideal identificar los aislamientos con una notable capacidad para estabilizar la superficie del microcosmos y para mejorar las condiciones

fisicoquímicas del sustrato. De esta manera se pueden diseñar tratamientos eficaces en el laboratorio. En la Tabla 7 se muestran cianobacterias más comunes de la corteza del suelo y sus características morfológicas.

Tabla 7. Descripción morfológica de las cinco cianobacterias más comunes de las comunidades biológicas de la corteza del suelo

Especie	Descripción morfológica
<i>Microcoleus vaginatus</i>	Filamentos móviles, no restringidos en las paredes transversales. Células estrechas al final (4,0-6,0 μm de ancho) y más cortas que anchas (2-5 μm de largo). Las células finales pueden ser redondeadas, cónicas o tener calyptra
<i>Microcoleus steenstrupii</i>	Filamentos móviles, restringidos en las paredes transversales, de ancho 4.0-5.5 μm . El tamaño de las células varía de 3.5-9 μm de largo. Las células terminales pueden ser alargadas o redondeadas, sin calyptra.
<i>Nostoc</i> spp.	Tricomas cilíndricos con constricciones notables en las paredes transversales, de ancho 2-8 μm . Las células son cilíndricas, esféricas u ovoides. Los heterocitos están dispersos individualmente. A menudo se observa un gel que mantiene los tricomas juntos, formando un talo masivo de forma variada.
<i>Tolypothrix</i> spp.	Los tricomas son uniseriados con heterocitos basales y extremos apicales libres, enfundados, con ramas falsas. Las células tienen una longitud ligeramente variable en comparación con su anchura (de 9-14 μm a 5-14 μm).
<i>Scytonema</i> spp.	Los tricomas son uniseriados, enfundados, restringidos en las paredes transversales, con ramas falsas de tamaño 2-20 μm . Las células pueden tener una longitud variable en comparación con su anchura. Los heterocitos son

	intercalados, solitarios, y tienen forma cilíndrica o de barril.
--	--

Fuente: Tomado de (Cano-Díaz, Mateo, Muñoz-Martín, & Maestre, 2018)

Giraldo-Silva, Nelson, Barger, & Garcia-Pichel (2019) realizaron una asignación taxonómica preliminar sobre la base de la morfología. Asignaron a cada aislamiento compatible un código de identificación de la cepa y permitieron que crecieran por completo para luego transferirlos a un nuevo medio y proceder a examinar la consistencia y la ausencia de contaminantes morfológicamente visibles.

Para obtener la identificación taxonómica, extrajeron el DNA de los aislamientos utilizando el kit de aislamiento de ADN Soil, de acuerdo con las instrucciones del fabricante y utilizaron el protocolo de PCR proporcionado en el mismo. Secuenciaron los productos de PCR mediante secuenciación de Sanger. Las secuencias directas e inversas se alinearon en la versión 8.0 de Geneious, y las secuencias las consensaron contra GenBank usando BLASTN (base de datos para consulta de nucleótidos).

Karimi, Tahmourespour, & Hoodaji (2022) identificaron la cianobacteria predominante en el suelo según sus características morfológicas y moleculares examinando con un microscopio óptico y comparando con una clave válida. Puntuaron las características de los filamentos individuales, incluidos los tamaños de las células, los filamentos y los tricomas, la presencia o ausencia de recubierta y la disposición de las células y los filamentos. Utilizaron el análisis del gen 16S rDNA para la identificación molecular de la cepa aislada. Primero extrajeron el ADN y realizaron la amplificación del gen 16S rDNA utilizando un par de cebadores universales. Posterior a la PCR enviaron el producto para su secuenciación y verificaron la secuencia resultante inicialmente con el software Chromas Pro para luego confirmarla con la herramienta BLAST del sitio NCBI. Finalmente, la enviaron a GenBank.

Roncero-Ramos et al. (2019) identificaron morfológicamente las cepas para características específicas, incluida la aparición de células especializadas, recubiertas, características de tricomas o morfología de células y colonias, utilizando un fotomicroscopio. Posteriormente, extrajeron el ADN genómico total de cultivos

aislados con un kit de aislamiento de ADN con un protocolo involucró un proceso de tres pasos que consistió en congelar alícuotas de 0,3 µL de suspensiones de cianobacterias de cada cultivo en nitrógeno líquido, descomponerlas con un taladro adaptado y fundirlas en un baño de agua a 60°C. Amplificaron el gen 16S rRNA por PCR utilizando cebadores para producir amplicones que adicionalmente corrieron en un gel de agarosa (1%) y visualizaron con la tinción de ADN fluorescente para evaluar si el tamaño del producto amplificado era correcto. Purificaron los productos de PCR utilizando un kit y depositaron las secuencias de nucleótidos en la base de datos GenBank.

3.1.1.6. SELECCIÓN DE CEPAS

Para poder seleccionar los nuevos candidatos es necesario tomar en cuenta las propiedades de cada cepa, pues como se mencionó anteriormente, algunas cepas muestran una gran capacidad para mejorar la estabilidad estructural del suelo, mientras otras muestran propiedades biofertilizantes prevalentes; dado que la mayoría de las cepas exhiben una u otra propiedad, rara vez ambas, se recomienda seleccionar aquellos aislamientos con una notable capacidad para estabilizar la superficie del microcosmos y mejorar las condiciones fisicoquímicas del sustrato.

De acuerdo con la literatura revisada, parece que los géneros no heterocistos como *Microcoleus* o *Leptolyngbya* y, en general, las cepas pertenecientes al orden *Oscillatoriales*, tienen una elevada capacidad para estabilizar sustratos arenosos en condiciones de estrés abiótico. La cepa *Microcoleus vaginatus* es la más empleada para estudios destinados a la estabilización de suelos de tierras secas y el control de la erosión. Por otro lado, especies heterocíticas como *Nostoc* spp., *Tolypothrix* spp., *Anabaena* spp. o *Calothrix* spp. representan una mejor opción en la mejora de la fertilidad del suelo, por lo que son ampliamente utilizadas en contextos agrícolas. De igual manera, las cepas heterocísticas han demostrado ser efectivas para mejorar las características de los suelos con un contenido sustancial de limo y/o arcilla. *Nostoc commune* mostró una excelente capacidad en la colonización de sustratos bastante ricos en limo (28–58%) y arcilla (alrededor de 10–26%). *Nostoc* spp. tuvo éxito en su inoculación con el propósito de mejorar la estructura de los suelos

arcillosos en experimentos de laboratorio controlados y en suelos tropicales ricos en limo (45%).

A pesar de no ser un estabilizador de arena tan eficaz como *M. vaginatus* y *Phormidium tenue*, el género *Nostoc* es un elemento importante en las biocortezas por su capacidad de acumular agua, pues retiene más de 200 veces su peso seco en agua en las biocortezas. Al mismo tiempo, *Nostoc* contribuye al aumento de la disponibilidad de nitrógeno, beneficiando de esta manera a las especies microbianas que cohabitan en la biocorteza. De manera similar, en las biocortezas, *Scytonema javanicum* favorece la productividad del suelo y la acumulación de nitrógeno.

Si se busca lograr tanto la estabilización como la biofertilización del suelo se recomienda combinar los diferentes rasgos de diferentes cepas, por lo que se puede incluir más de una especie en el inoculante final. De esta manera, es posible combinar aquellas cepas con una capacidad predominante de agregación de sedimentos con aquellas cepas capaces de favorecer la biofertilización. Por ejemplo, el inoculante de dos cepas *M. vaginatus* / *S. javanicum* (en una proporción de 10:1) ha sido probado con éxito en ensayos de inoculación a gran escala en la reparación de dunas de arena y suelos con desertificación.

Para la selección, Giraldo-Silva, Nelson, Barger, & Garcia-Pichel (2019) hicieron un pedigrí de nuestros cultivos para seleccionar el aislado más representativo de las poblaciones de campo de las cianobacterias más abundantes en el sitio de origen. Utilizaron un enfoque de ubicación filogenética como herramienta para la selección para *M. vaginatus* en el sitio de suelo arenoso del desierto frío. Se llevaron a cabo los mismos procedimientos para seleccionar un aislado de cada uno de los principales grupos de cianobacterias (*Microcoleus* spp. y Nostocales) para el resto de localidades y tipo de suelo.

3.1.2. PRODUCCIÓN DE BIOMASA, INOCULANTE Y DISPERSIÓN

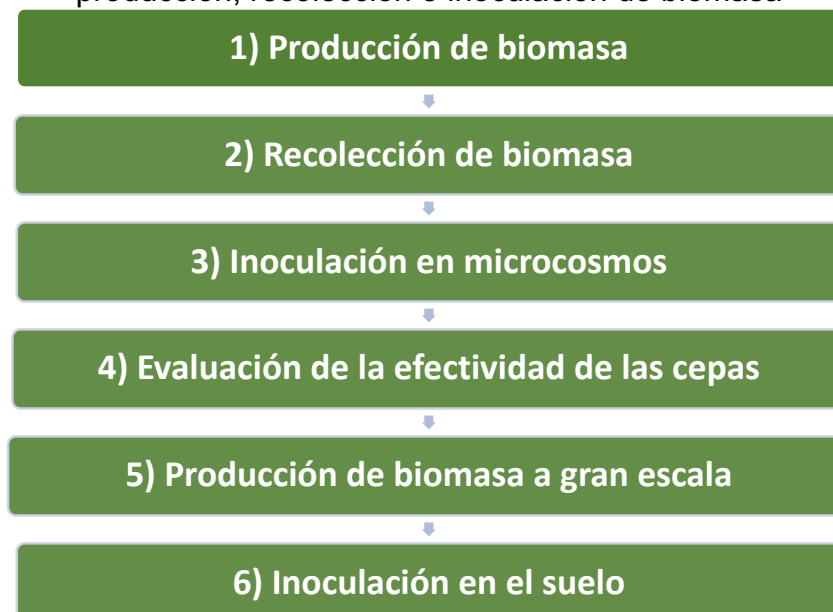
La producción de la biomasa necesaria para obtener el inóculo se lleva a cabo mediante técnicas de cultivo a escala en medio líquido o en fotobiorreactores de columna de burbujas. En los estudios de inoculación, es necesario establecer condiciones de cultivo para producir la biomasa. Entre estas condiciones se puede

mentar la temperatura, que por lo general oscila entre 25 y 30°C, o la iluminación oscila en valores entre 50 y 180 μmol (fotones) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

La selección de parámetros óptimos de cultivo; como lo son el contenido de sal, iluminación, temperatura, agitación, disponibilidad de nutrientes, nitrato y fosfato, etc. dependerán de los procesos fisiológicos y metabólicos de las cianobacterias. Dado que durante el desarrollo de las cianobacterias se deben equilibrar las demandas de generación de energía, asimilación de carbono y síntesis de biomasa; para asignar las condiciones ideales de cultivo se deben tomar en cuenta factores que promuevan el crecimiento óptimo, induzcan la diversidad de metabolitos secundarios (por ejemplo, EPS), y sean adecuados para el desarrollo de una variedad de cepas diferentes. El hecho de no hacer una buena selección, además de afectar la tasa de crecimiento y contribuir con la escasez de nutrientes, también puede afectar el proceso de síntesis de EPS y las características de los polímeros secretados. Está demostrado que la escasez de nutrientes es la responsable de una síntesis de EPS con una composición más simple, dominada por glucosa y galactosa.

El Procedimiento metodológico y analítico para producir, recolectar y dispersar biomasa de cianobacterias se muestra en la Figura 8.

Figura 8. Esquematización de los pasos básicos del flujo de trabajo para la producción, recolección e inoculación de biomasa



Fuente: Elaboración propia

3.1.2.1. PRODUCCIÓN DE BIOMASA

Por lo general se obtiene por cultivo en medio líquido, aumentando los volúmenes de manera escalonada de 50 a 250 mL en matraces Erlenmeyer o en fotobiorreactores de columna de burbujeo. Es necesario definir una combinación óptima de parámetros de cultivo para cada especie, pues de esta manera se podrá explotar todo el potencial del futuro inoculante.

Giraldo-Silva, Nelson, Barger, & Garcia-Pichel (2019) desarrollaron enfoques favorables para la producción de suficiente biomasa. Todos los aislamientos pertenecientes a *Nostoc* spp., *Tolypothrix* spp. y *Scytonema* spp. (cianobacterias fijadoras de N₂, no móviles) fueron desarrollados en cultivos líquidos estándar, en lotes de hasta 15 L. Todos los aislamientos mostraron un crecimiento sólido en cultivos líquidos colocados en cámaras de incubación estándar. Las cepas que se probaron en un invernadero también mostraron un alto crecimiento. Para las cepas de *Nostoc* spp., el tiempo de duplicación (que se obtuvo calculando curvas de crecimiento basadas en producción de clorofila a) osciló entre 6 y 11 días, para *Tolypothrix* spp. de 8 a 15 días, y para *Scytonema* spp. de 8 a 18 días. El rendimiento final de estos cultivos a gran escala estuvo en el rango de 0,8 a 1,2 mg clorofila a por litro, de modo que principalmente 1 L de inóculo a gran escala sería suficiente para inocular 5 a 50 m² de suelo al 5 % de la biomasa típica encontrada en las biocortezas de origen.

Por otro lado, los aislamientos de *Microcoleus* spp. que fueron sometidos a un aumento de escala basado en cultivo líquido, mostraron rendimientos bajos o ningún crecimiento, incluso cuando usaron variaciones en las condiciones de incubación; como la exposición a la luz, temperatura, concentración de nutrientes, velocidad de agitación o adición de perlas de vidrio. Durante el experimento observaron que los *Microcoleus* spp. aislados tendían a agruparse rápidamente en una masa irregular que dejaba de crecer. En la mayoría de los casos, las masas permanecieron viables durante meses, pero sin mostrar un mayor crecimiento. Las cepas de *Microcoleus* spp. mostraron rendimientos bajos de 0,20 a 0,64 mg de clorofila a por cada placa

de Petri. Con este rendimiento, una sola placa puede servir para inocular entre 0,2 y 3,3 m² de suelo (dependiendo de la cepa) a concentraciones de 5% de la biomasa típica encontrada en las biocortezas de origen.

Peng & Bruns (2019) transfirieron los cultivos de caja Petri a medio líquido contenido en matraces Erlenmeyer (1/5 del volumen del matraz) a 22-23°C bajo iluminación fluorescente continua ("luz natural") con una intensidad promedio de 4 μmol de fotones m⁻² s⁻¹ con agitación rotatoria media de 90 rpm.

Roncero-Ramos et al. (2019) utilizaron doce reactores de columna de burbujeo con base hemisférica y un volumen total de 0,3 L (3 cm × 45 cm). Colocaron cada reactor en una cámara de temperatura controlada a 25°C. Adicionalmente, instalaron ocho tubos fluorescentes de 28 W de manera horizontal para proporcionar un ciclo de luz diurna solar de 12:12 h con una irradiancia máxima de 1600 μmol fotones m⁻² s⁻¹. Para simular el ciclo solar, encendieron un par de tubos fluorescentes cada 1,5 h para aumentar la irradiación, comenzando con 290 μmol de fotones m⁻² s⁻¹, seguido de 800 y 1400 μmol de fotones m⁻² s⁻¹, hasta llegar al máximo que duró 3 h, y luego fueron decreciendo siguiendo el mismo patrón.

3.1.2.2. RECOLECCIÓN DE BIOMASA

El cálculo de la curva de crecimiento de las cepas de cianobacterias se puede calcular con diversas técnicas. Para la cuantificación de clorofila a se puede medir el incremento de peso seco del cultivo en una escala de tiempo, medir la densidad óptica espectrofotométricamente en intervalos de tiempo específicos, o cuantificar con ayuda de fluorimetría de modulación de amplitud de pulso. La concentración de exopolisacáridos (EPS) en el cultivo líquido se puede evaluar realizando el ensayo de fenol-ácido sulfúrico (prueba de Dubois) a alícuotas conocidas del sobrenadante del cultivo en el que se liberan los EPS después de la centrifugación.

Para extraer EPS, Karimi, Tahmourespour, & Hoodaji (2022) se separó la biomasa de cianobacterias después de 15 días de ensayo mediante papel Whatman No. 1. Centrifugaron el caldo restante (6400 g, 40 min, a 4°C), añadieron dos volúmenes de acetona al sobrenadante y lo almacenaron (0°C, 48 h). Realizaron una segunda centrifugación para proceder a liofilizar y almacenar el sedimento resultante para su

posterior análisis. Usaron glucosa como estándar de referencia para medir la cantidad de EPS. Mezclaron la muestra de EPS liofilizado (2 mg) con agua destilada (1 ml), 50 μ L de fenol al 80 % (80 g de fenol por 20 ml de agua) y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado (98 % de pureza) en un tubo de ensayo de vidrio sellado con ácido y lo calentaron durante 100 min a 100°C y luego lo enfriaron a 20°C. Por último, leyeron la intensidad de absorción con un espectrofotómetro a 490 nm.

Para detectar la materia orgánica del EPS producido, utilizaron la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Molieron una cantidad de 1 a 2 mg de EPS liofilizado con 100 mg de KBr y la prensaron a 7500 kg durante 30 s para obtener un gránulo transparente. Para el registro de los espectros de absorción infrarroja utilizaron un espectrofotómetro FTIR con una resolución espectral y una precisión de longitud de onda de cm^{-1} y 0,01, respectivamente, y como referencia utilizaron una pastilla de KBr.

Roncero-Ramos et al. (2019) determinaron el EPS en el cultivo líquido centrifugando la muestra del cultivo para obtener la fracción del EPS (5000 $\times$ g, 20 min, 20 °C) y filtraron el sobrenadante con filtros de 0,45 μ m para eliminar las células de cianobacterias. Realizaron la determinación de todas las extracciones por el método del fenol-ácido sulfúrico (Dubois), midiendo la absorbancia (488 nm) con un espectrofotómetro.

Giraldo-Silva, Nelson, Barger, & Garcia-Pichel (2019) obtuvieron los extractos de clorofila a después de moler cada muestra en acetona al 90% con mortero y mano durante 3 minutos. Transfirieron la molienda obtenida a un tubo Falcon donde le ajustaron el volumen a 10 mL con acetona al 90%, para después realizar una extracción durante 24 horas a 4°C. °C. Por último, registraron los espectros de absorbancia del extracto en un espectrofotómetro. Todas las determinaciones las realizaron al menos por triplicado.

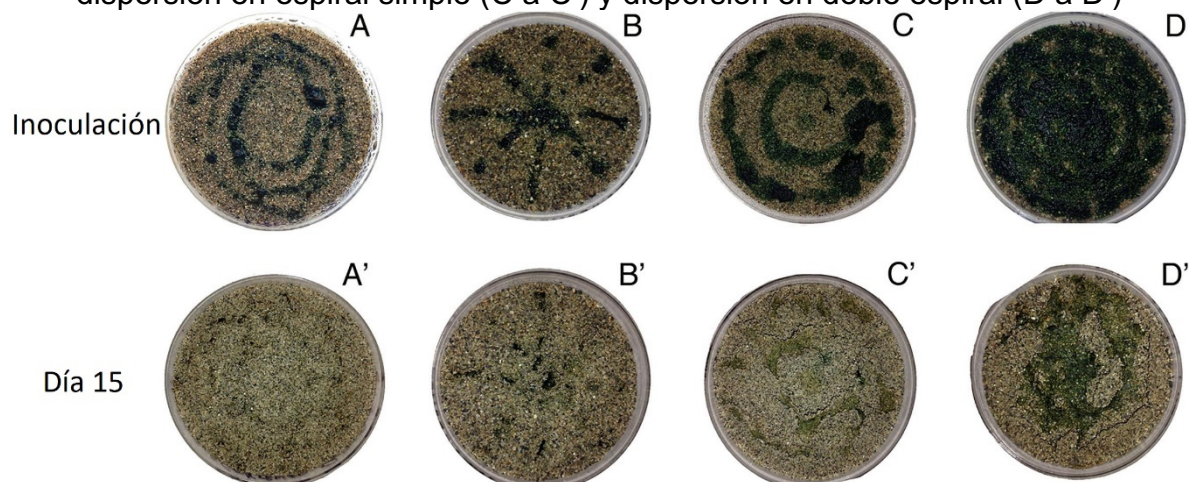
Chamizo, Mugnai, Rossi, Certini, & De Philippis (2018) cuantificaron el contenido de clorofila de la siguiente manera: Pesaron 1 g de suelo en un vial con tapa roscada con 5 ml de etanol para luego agitarlo en un vórtex y calentarlo a 80°C durante 5 min. Posteriormente, enfriaron las muestras a 4°C durante 24 h y luego las

centrifugaron; finalmente analizaron el sobrenadante con ayuda de un espectrofotómetro.

3.1.2.3. INOCULACIÓN EN MICROCOSMOS

El paso final del proceso es la dispersión del inoculante. Se ha demostrado que es necesaria una distribución uniforme sobre la superficie del microcosmos para apoyar el desarrollo de biocortezas estables. La forma de distribución es importante, pues afecta los patrones de colonización, así como la consistencia y estabilidad de la biocorteza inducida en los microcosmos. (Rossi, Mugnai, & De Philippis, 2022), demostraron que la aplicación del inóculo mediante un método de dispersión en doble espiral (Figura 9, DD'), es decir, una primera línea espiral seguida de una segunda espiral en los huecos dejados en la superficie del microcosmos, conduce a la formación de biocortezas consistentes.

Figura 9. Distintos patrones de dispersión de la biomasa de cianobacterias en suspensión líquida y sus respectivos desarrollos de biocorteza desde la inoculación hasta el día 15 de incubación. Dispersión aleatoria (A a A'), dispersión radial (B a B'), dispersión en espiral simple (C a C') y dispersión en doble espiral (D a D')



Fuente: Tomado de (Rossi, Mugnai, & De Philippis, 2022)

Para inocular, Karimi, Tahmourespour, & Hoodaji (2022) volvieron a muestrear el suelo del área estudiada y lo transfirieron a charolas (53 × 33 × 100 cm). Centrifugaron el caldo de cultivo (4000 g, 30 min) y utilizaron agua destilada para la suspensión de la biomasa, también determinaron su peso seco para posteriormente rociar la cianobacteria a 1,6 g –2 g de peso seco sobre la superficie del suelo. El

riego lo realizaron a razón de 4 mm/día con aspersión de agua y usaron un tratamiento no inoculado como control. Después de 15 días, se formaron costras biológicas. Por último, recolectaron las biocortezas del suelo a profundidades de 0–1 y 1–5 cm a intervalos de 15, 30, 60 y 90 días después de la inoculación con una espátula y las enviaron al laboratorio. Adicionalmente secaron y molieron las biocortezas, y les midieron algunas características químicas y biológicas.

Para el experimento de inoculación, Chamizo, Mugnai, Rossi, Certini, & De Philippis (2018) separaron la biomasa del medio de cultivo por centrifugación a 4000 rpm durante 30 min y luego la fragmentaron en un tubo de plástico estéril utilizando una espátula esterilizada. Finalmente, suspendieron la biomasa en agua destilada y determinaron su peso seco. Posteriormente inocularon una concentración de 5 g (peso seco) m^{-2} en cajas de Petri que contenían los diferentes tipos de suelo (en adelante, microcosmos). Los microcosmos tenían unas dimensiones de 12 mm de altura $\times$ 54 mm de diámetro y los llenaron con 30 g de suelo esterilizado. En estos microcosmos inocularon ~ 30 mg de biomasa. Además, prepararon microcosmos más grandes (16 mm de altura $\times$ 88 mm de diámetro) con 80 g de cada tipo de suelo e inocularon con la misma concentración de cianobacterias. Dispersaron la biomasa utilizando una pipeta estéril de 10 mL y aplicando la biomasa de la forma más homogénea posible sobre la superficie, siguiendo una distribución en espiral.

Por último, incubaron los microcosmos en una cámara de crecimiento de plexiglás a temperatura controlada (30°C), intensidad de luz ($45 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y humedad relativa (0 %) durante 90 días. Para el riego, dos veces por semana, aplicaron 2 mm (5 mL en los microcosmos pequeños y 13 mL en los microcosmos más grandes) de agua destilada sobre los microcosmos utilizando un rociador.

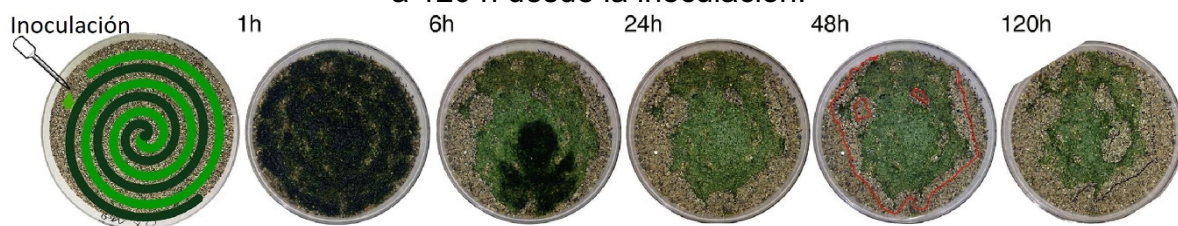
Peng & Bruns (2019) controlaron el crecimiento de las cianobacterias en el suelo utilizando microcosmos de suelo artificial preparados en placas de Petri estándar (diámetro = 8,5 cm) que contenían 45 cm^3 (alrededor de 69 g) de suelo y 12 mL de líquido MBG₁₁. Para inocular el suelo, distribuyeron uniformemente 3 mL de biomasa de cianobacterias fresca condensada (1–2 mg de biomasa seca mL^{-1}) pipeteando sobre la superficie del suelo. Envolvieron los bordes de las placas de Petri con Parafilm e incubaron los microcosmos del suelo en las mismas condiciones descritas

anteriormente hasta 80 días. Por último, seleccionaron al azar microcosmos por triplicado para la recolección del suelo superficial (3 mm superiores).

3.1.2.4. EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE LA BIOCORTEZA

La formación de biocorteza por inoculación de cianobacterias, tanto en microcosmos como en los campos es un proceso relativamente rápido, con tiempos registrados de 15 días en experimentos de microcosmos y entre 7 y 20 días en campo. La formación de biocorteza se revela por la coloración verdosa en la superficie del suelo, la posible presencia de terrones verdes como se muestra en la Figura 10. Se recomienda realizar pruebas previas en microcosmos antes de proceder a la producción de biomasa a gran escala.

Figura 10. Imágenes del desarrollo de una biocorteza monitoreada a intervalos de 1 a 120 h desde la inoculación.



Fuente: Tomado de: (Mugnai et al., 2018)

3.1.2.5. PRODUCCIÓN DE BIOMASA A GRAN ESCALA

Para producir la biomasa a gran escala y realizar las inoculaciones en suelo es necesario seleccionar técnicas de cultivo adecuables y viables económicamente hablando. También se deben tomar en cuenta los factores más críticos que definen los rendimientos óptimos de la biomasa; entre ellos podemos mencionar un diseño adecuado del reactor, el control de la intensidad de la luz, la temperatura y el continuo mantenimiento del medio de cultivo.

Uno de los métodos más factibles para obtener cantidades elevadas de biomasa es el uso de estanques abiertos, esto debido a sus numerosas ventajas que ofrece, como sus estructuras simples, sus procesos operativos amigables, bajos costos y el aprovechamiento de la luz solar, entre otros.

Malam Issa et al., 2007) Llevaron a cabo la producción masiva de biomasa de cepas de cianobacterias mediante una técnica de cultivo discontinuo en laboratorio, que después escalaron al aire libre. Comenzaron por cultivar pequeñas muestras de las cepas seleccionadas en matraces pequeños conteniendo medio líquido BG₁₁ a 27°C bajo condiciones de luz y oscuridad, agitación y burbujeo. Posteriormente transfirieron los cultivos a recipientes cada vez más grandes (matraces cónicos de 50, 100, 250, 1000 y 2000 mL, botellas de vidrio de 25 L y finalmente 200 L en estanques al aire libre, donde aprovecharon la luz solar y mantuvieron constantes las condiciones de agitación y burbujeo.

Por su parte, Lan, Wu, Zhang, & Hu (2015) después de obtener una biomasa de cianobacterias adecuada en el laboratorio, inocularon los cultivos en doce biorreactores cilíndricos verticales abiertos con capacidad de 18 L, con medio BG₁₁ y aireación. Mantuvieron los biorreactores abiertos, con la finalidad de añadirles una cierta cantidad de agua diariamente y de esta manera compensar la evaporación. Los biorreactores se mantuvieron en todo momento bajo luz natural.

3.1.2.6. INOCULACIÓN EN SUELO

Actualmente existen dos tipos de aplicaciones para la inoculación de suelos a gran escala. Estas estrategias consisten en la dispersión de cultivos vía terrestre y un enfoque basado en aeronaves.

Colica et al. (2014) utilizaron una estrategia de dispersión terrestre con ayuda un camión cisterna todoterreno con el objetivo de inocular grandes áreas desérticas. El camión cisterna contaba con un rociador asistido por aire para esparcir el cultivo directamente en el suelo de derecha a izquierda durante su recorrido. Para adaptarse al rociador mecanizado, concentraron la biomasa de las cianobacterias por centrifugación y filtración y la resuspendieron hasta una concentración óptima, agregando agua del grifo al tanque del camión. Posterior a la inoculación, regaron las áreas inoculadas intermitentemente durante 15 a 18 días. con 20 mm de agua subterránea por día con ayuda de instalaciones automáticas de riego por aspersión, hasta que se hizo visible el crecimiento inicial de cortezas de cianobacterias.

James & Prithiviraj (2012) estudiaron el uso de un sistema de inoculación basado en aeronaves. Este sistema brinda una distribución más homogénea de los cultivos cianobacterianos la superficie; además, contrario a los sistemas de dispersión terrestres, esta técnica favorece la preservación de la flora existente y asegura la cobertura de grandes áreas, incluso en terrenos carente de caminos o de difícil acceso para vehículos. Este sistema además trae consigo una gran viabilidad económica y ecológica, pues se pueden sembrar hasta 200 ha (20 kg de dispersante por hectárea) por vuelo de un avión agrícola.

4. BENEFICIOS REPORTADOS

El uso de biocortezas en la restauración de suelos afectados por erosión trae consigo resultados muy positivos con respecto a mejoras en la textura, fertilidad y calidad del suelo, entre la bibliografía analizada podemos citar los siguientes resultados:

Karimi, Tahmourespour, & Hoodaji (2022) demostraron que la formación de una biocorteza por inoculación de *M. vaginatus* aumentó significativamente el contenido de clorofila, carbono orgánico, exopolisacáridos, nitrógenos y también cationes divalentes como Ca y Mg y promovió las actividades de invertasa y deshidrogenasa del suelo superficial después de 90 días. Dichos cambios en las propiedades químicas y biológicas del suelo tuvieron un impacto positivo en el ciclo de nutrientes; favorecieron la formación de agregados, la mejora de la estructura, la fertilidad y la estabilidad del suelo. Estos hallazgos sugieren que la inoculación de cianobacterias productoras de exopolisacáridos es un método biogeotecnológico sostenible para el restablecimiento y mejora de las propiedades del suelo en tierras con deficiencias nutricionales provocadas por la erosión debido al papel clave de las cianobacterias.

Muñoz-Rojas et al. (2018) reportaron efectos positivos y a corto plazo de las cianobacterias inoculadas durante su investigación. 90 días después de la inoculación de cianobacterias, el 30–40 % de la superficie de los suelos tratados estaba cubierta por biocorteza de cianobacterias y el contenido de clorofila aumentó junto con el contenido de C del suelo. Además, las tasas de mineralización del C del suelo fueron generalmente más bajas en los suelos inoculados, lo que

sugiere una estabilización del C acumulado en el suelo, y por lo tanto, destaca el potencial de las cianobacterias para aumentar la funciones del suelo al promover el secuestro de C.

Chamizo, Mugnai, Rossi, Certini, & De Philippis (2018) demostraron que la inoculación en el suelo con cianobacterias condujo a una rápida formación de biocorteza y mejoró la estabilidad del suelo y/o las propiedades de fertilidad en diferentes suelos. Los efectos positivos se vieron reflejados principalmente en la textura del suelo gracias al desarrollo de una biocorteza estable y resistente de cianobacterias. De igual manera documentaron aumentos de la biomasa fotosintética, el contenido de nitrógeno y la resistencia del suelo; además, de un aumento en las propiedades de fertilidad y calidad del suelo.

Roncero-Ramos et al. (2019) demostraron que la inoculación en el suelo con la cianobacteria *Nostoc commune* promovió la formación de una biocorteza artificial de cianobacterias en suelos estériles, sin vida y muy degradados. El experimento mostró éxito formando una gran cobertura de la biocorteza, la cual tuvo efecto sobre varias propiedades del suelo directamente relacionadas con la hidrología, la estabilidad y la fertilidad. Por otro lado, los cambios en la frecuencia de riego aplicada no mostraron un efecto significativo sobre las variables medidas, por lo que se demostró que la cianobacteria *Nostoc commune* puede colonizar aún bajo condiciones de estrés hídrico utilizadas.

Asghari, Zeinalzadeh, Kheirfam, & Azar (2022) concluyeron que las cianobacterias mejoraron el potencial de los suelos, aumentando la cantidad y la duración de la retención de agua de diferentes maneras, gracias a la secreción de EPS. A su vez favorecieron el aumento de nutrientes del suelo como carbono y nitrógeno, mejorando su absorción.

CONCLUSIONES

En la actualidad nos enfrentamos a un aumento alarmante de pérdida de suelos por erosión, por lo que se requiere con urgencia llevar a cabo técnicas que mitiguen estos procesos de degradación. El uso de biocortezas de cianobacterias es una tecnología relativamente nueva y poco estudiada, por lo que representa una alternativa bastante factible para la restauración de suelos con altos niveles de erosión. A través de esta revisión se desarrolló un protocolo general de trabajo en el que se destacaron los principales pasos a seguir para la inoculación de las cianobacterias y el desarrollo de biocortezas. Se evaluaron también las ventajas que trajo consigo el establecimiento de las biocortezas en aquellos suelos donde fueron inoculadas y se compararon las características de los suelos estudiados en las diversas investigaciones con los suelos de los olivares en pendiente con el objetivo de identificar las similitudes entre ambos. Una vez que se establecieron las similitudes y basándose en los resultados de la bibliografía revisada se formularon los beneficios que podría traer consigo el uso de las biocortezas en suelos de olivares en pendiente. Los resultados resumidos en esta revisión muestran que es posible llevar a cabo investigaciones experimentales futuras para mejorar las condiciones de los suelos agrícolas de los olivares en pendiente y aplicarlas para reducir los efectos de la erosión.

BIBLIOGRAFÍA

- Adessi, A., De Philippis, R., & Rossi, F. (2021). Drought-tolerant cyanobacteria and mosses as biotechnological tools to attain land degradation neutrality. *Web Ecol.*, 65–78.
- Albiñana, L. I. (2018). *Guía completa del cultivo del olivo*. Estados Unidos de América: Parkstone International.
- Anderson, J., Lévesque, N., Caron, F., Beckett, P., & Spiers, G. A. (2022). A review on the use of lichens as a biomonitoring tool for environmental radioactivity. *Journal of Environmental Radioactivity*, 243-265.
- Antoninka, A., Bowker, M. A., Reed, S. C., & Doherty, K. (2016). Production of greenhouse-grown biocrust mosses and associated cyanobacteria to rehabilitate dryland soil function. . *Restoration Ecology*, 324-335.
- Asghari, S., Zeinalzadeh, K., Kheirfam, H., & Azar, B. H. (2022). The impact of cyanobacteria inoculation on soil hydraulic properties at the lab-scale experiment. *Agricultural Water Management*, 128-139.
- Barranco, D., Fernández, R., & Rallo, L. (2017). *El cultivo del olivo*. España: Ediciones Mundi-Prensa.
- Barranco, D., Navero, D. B., & Romero, L. R. (2008). *El cultivo del olivo*. España: Mundi-Prensa.
- Belnap, J., Weber, B., & Büdel, B. (2016). Biological soil crusts as an organizing principle in drylands. *Springer International Publishing*, 3-13.
- Bowker, M. A., Antoninka, A. J., & Chuckran, P. F. (2020). Improving field success of biocrust rehabilitation materials: hardening the organisms or softening the environment? *Restoration Ecology*, 177-186.
- Cano-Díaz, C., Mateo, P., Muñoz-Martín, M. Á., & Maestre, F. T. (2018). Diversity of biocrust-forming cyanobacteria in a semiarid gypsiferous site from Central Spain. *Journal of arid environments.*, 83-89.

- Chamizo, S., Mugnai, G., Rossi, F., Certini, G., & De Philippis, R. (2018). Cyanobacteria inoculation improves soil stability and fertility on different textured soils: gaining insights for applicability in soil restoration. . *Frontiers in Environmental Science*, 49-71.
- Colica, G., Li, H., Rossi, F., Li, D., Liu, Y., & De Philippis, R. (2014). Microbial secreted exopolysaccharides affect the hydrological behavior of induced biological soil crusts in desert sandy soils. . *Soil Biology and Biochemistry*, 62-70.
- Díaz, C. (2011). Alternativas para el control de la erosión mediante el uso de coberturas convencionales, no convencionales y revegetalización. *Ingeniería e Investigación*.
- Durán, V., Rodríguez, C., Cuadros, S., & Francia, J. (2014). Impacto de la erosión y escorrentía en laderas de. *Ecosistemas, Revista científica de ecología y medio ambiente*, 66-72.
- Giraldo-Silva, A., Nelson, C., Barger, N. N., & Garcia-Pichel, F. (2019). Nursing biocrusts: isolation, cultivation, and fitness test of indigenous cyanobacteria. *Restoration Ecology*, 793-803.
- Guerra, C., Rosa, I., Valentini, E., Wolf, F., Filipponi, F., Karger, D., . . . Eisenhauer, N. (2020). Global vulnerability of soil ecosystems to erosion. *Landscape Ecology*, 823–842.
- James, T., & Prithiviraj, B. (2012). Seeding of large areas with biological soil crust starter culture formulations: using an aircraft disbursable granulate to increase stability, fertility and CO2 sequestration on a landscape scale. *IEEE green technologies conference*, 1-3.
- Jiménez-González, M., Machado de Lima, N., Chilton, A., Almendros, G., & Muñoz-Rojas, M. (2022). Biocrust cyanobacteria inoculants biomineralize gypsum and preserve indigenous bacterial communities in dryland topsoil. *Geoderma*, 16-61.

- Karimi, A., Tahmourespour, A., & Hoodaji, M. (2022). The formation of biocrust and improvement of soil properties by the exopolysaccharide-producing cyanobacterium: a biogeotechnological study. . *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-11.
- Lan, S., Wu, L., Zhang, D., & Hu, C. (2015). Effects of light and temperature on open cultivation of desert cyanobacterium *Microcoleus vaginatus*. . *Bioresource Technology*, 144-150.
- Malam Issa, O., Défarge, C., Le Bissonnais, Y., Marin, B., Duval, O., Bruand, A., & Annerman, M. (2007). Effects of the inoculation of cyanobacteria on the microstructure and the structural stability of a tropical soil. *Plant and soil*, 209-219.
- Mugnai, G., Rossi, F., Felde, V., Colesie, C., Büdel, B., Peth, S., & De Philippis, R. (2018). The potential of the cyanobacterium *Leptolyngbya ohadii* as inoculum for stabilizing bare sandy substrates. *Soil biology and Biochemistry*, 318-328.
- Muñoz-Rojas, M., Román, J. R., Roncero-Ramos, B., Erickson, T. E., Merritt, D. J., Aguila-Carricondo, P., & Cantón, Y. (2018). Cyanobacteria inoculation enhances carbon sequestration in soil substrates used in dryland restoration. . *Science of the Total Environment*, 1149-1154.
- Panagos, P., Borrelli, P., Poesen, J., Cristiano, B., Lugato, E., Meusburger, K., . . . Alewell, C. (2015). The new assessment of soil loss by water erosion in Europe. *Environmental Science & Policy*, 438–447.
- Parra, M. A., Escobar, R. F., Navarro, C., & Arquero, O. (2002). *Los suelos y la fertilización del olivar cultivado en zonas calcáreas*. . España: Junta de Andalucía y Mundi-Prensa.
- Peng, X., & Bruns, M. A. (2019). Development of a nitrogen-fixing cyanobacterial consortium for surface stabilization of agricultural soils. *Journal of Applied Phycology*, 1047-1056.

- Raggio, J., Green, A., Pintado, A., Sancho, L., & Büdel, B. (2021). Functional performance of biocrusts across Europe and its implications for drylands. *Journal of Arid Environments*, 104-116.
- Ramos, M., Feito, F., & Gil, A. (2008). Consecuencias de la erosión en el olivar de pendiente. *I Congreso de cultura del olivo* (págs. 611-621). España: Diputación Provincial de Jaén, Instituto de Estudios Giennenses.
- Rodrigo-Comino, J., Taguas, E., Seeger, M. K., & Ries, J. B. (2019). Evaluation of surface runoff processes in gullies originated in conventional olive groves. A section to consider in territorial planning. *Revista de geografía norte grande*, 229-248.
- Roncero-Ramos, B., Muñoz-Martín, M. Á., Chamizo, S., Fernández-Valbuena, L., Mendoza, D., Perona, E., & Mateo, P. (2019). Polyphasic evaluation of key cyanobacteria in biocrusts from the most arid region in Europe. *PeerJ*, 169-184.
- Roncero-Ramos, B., Román, J. R., Rodríguez-Caballero, E., Chamizo, S., Águila-Carricondo, P., Mateo, P., & Cantón, Y. (2019). Assessing the influence of soil abiotic and biotic factors on Nostoc commune inoculation success. *Plant and Soil*, 57-70.
- Rosentreter, R. (2020). Biocrust lichen and moss species most suitable for restoration projects. *Restoration ecology*, 67-74.
- Rossi, F., Mugnai, G., & De Philippis, R. (2022). Cyanobacterial biocrust induction: a comprehensive review on a soil rehabilitation-effective biotechnology. *Geoderma*, 64-87.
- Sepehr, A., Hassanzadeh, M., & Rodriguez-Caballero, E. (2019). The protective role of cyanobacteria on soil stability in two Aridisols in northeastern Iran. *Geoderma Regional*, 352-365.
- Sierra, M., González, J., Pozo, C., Vela, M., Peinado, F., Martínez, F., . . . Fernández, E. (2018). Transferencia de un método para el control de la erosión del suelo en el olivar . En M. Sierra, J. González, C. Pozo, M. Vela, F. Peinado, F.

- Martínez, . . . E. Fernández, *Europa invierte en zonas rurales* (págs. 1-46). España: Universidad de Granada.
- Tsavkelova, E., Lobakova, E., Kolomeitseva, G., Cherdyntseva, T., & Netrusov, A. (2003). Associative Cyanobacteria Isolated from the Roots of Epiphytic Orchids. *Microbiology*, 92-97.
- Valdez, J., Badii, M., Guillen, A., & Acuña, M. (2015). Causes and Socio-Economic and Environmental Impacts of Erosion. *International Journal of Good Conscience*, 76-87.
- Vargas, R. (2009). *Guía para la descripción de suelos*. Italia: FAO.
- Weber, B., Belnap, J., Büdel, B., Antoninka, A., Barger, N., Chaudhary, V., . . . Rodriguez-Caballero, E. (2022). What is a biocrust? A refined, contemporary definition for a broadening research community. *Biological reviews*, 1768-1785.