



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS Y BIOLÓGICAS

CARRERA AGROPECUARIA

Proyecto de investigación previo
a la obtención del título de
Ingeniera Agropecuaria.

Título del Proyecto de Investigación:

“ANÁLISIS MOLECULAR DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA DE SUELOS DE
DOS FINCAS BAJO MANEJO AGROECOLÓGICO EN LA ISLA SANTA CRUZ,
GALÁPAGOS”

Autora:

Daniela Alexandra Martinez Vargas

Director de Proyecto de Investigación:

Ing. Agr. Camilo Alexander Mestanza Uquillas PhD.

Quevedo – Los Ríos – Ecuador

2022

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, **Daniela Alexandra Martínez Vargas**, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normatividad institucional vigente.



Daniela Alexandra Martínez Vargas

CI. 2000149589

AUTORA

CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El suscrito, **Ing. Camilo Alexander Mestanza Uquillas PhD**, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que la estudiante **Daniela Alexandra Martinez Vargas**, realizó el Proyecto de Investigación de grado “ANÁLISIS MOLECULAR DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA DE SUELOS DE DOS FINCAS BAJO MANEJO AGROECOLÓGICO EN LA ISLA SANTA CRUZ, GALÁPAGOS”, previo a la obtención del título de Ingeniera Agropecuaria, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Atentamente,



Ing. Camilo Alexander Mestanza Uquillas PhD
DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO

Ingeniero

Rommel Ramos Remache

COORDINADOR DE CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

De mi consideración:

Dado que el suscrito es conocedor que el proyecto de investigación titulado “ANÁLISIS MOLECULAR DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA DE SUELOS DE DOS FINCAS BAJO MANEJO AGROECOLÓGICO EN LA ISLA SANTA CRUZ, GALÁPAGOS” de autoría de la señorita **Daniela Alexandra Martínez Vargas**, estudiante de la carrera de INGENIERÍA AGROPECUARIA, del cual fui designado Profesor Tutor de Trabajo de investigación. Proyecto que ha sido analizado a través de la herramienta URKUND, no incluyendo las listas de fuentes de comparación entre las cuales se encuentran las páginas preliminares de carátula, declaración de autoría, certificación, agradecimientos, dedicatoria, índices, entre otras fuentes que no son utilizadas en el texto de la tesis.

Por lo expresado, **CERTIFICO** que el porcentaje validado por el URKUND es de 6% de similitud (Imagen 1), el mismo que es permitido por el mencionado Software, por lo cual solicito la continuación con los trámites pertinentes para solicitar fecha de sustentación del proyecto de investigación de la señorita **Daniela Alexandra Martínez Vargas**.

Imagen 1. Certificación del porcentaje de confiabilidad (94%) y similitud (6%) de URKUND.



The image shows a screenshot of the URKUND software interface. At the top, the URKUND logo is visible. Below it, a table-like structure displays the following information:

Documento	TESIS Daniela Martinez.docx (D149195264)
Presentado	2022-11-09 19:00 (-05:00)
Presentado por	Camilo (cmestanza@uteq.edu.ec)
Recibido	cmestanza.uteq@analysis.arkund.com
Mensaje	Tesis de Daniela Martinez Mostrar el mensaje completo

Below the table, a yellow highlighted box contains the text: "6% de estas 38 páginas, se componen de texto presente en 15 fuentes."


Ing. Camilo Mestanza Uquillas PhD.
DOCENTE TUTOR

UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

**“ANÁLISIS MOLECULAR DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA DE SUELOS
DE DOS FINCAS BAJO MANEJO AGROECOLÓGICO EN LA ISLA SANTA
CRUZ, GALÁPAGOS”**

Presentado a la Comisión Académica como requisito previo a la obtención del título de
Ingeniera Agropecuaria.

Aprobado por:



Biól. Ana Ruth Alvarez Sanchez, PhD.
PRESIDENTA DEL TRIBUNAL



Ing. Milena Acosta Farias, MSc.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Dr. Orly Cevallos Falquez
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por la vida, por ser fuente de fortaleza y sabiduría en momentos de debilidad. A mi familia, mis queridos padres Edison y Saara, mi más grande apoyo en cada objetivo propuesto; mis hermanos, Bryan y Cristhian, quienes son mi alegría en tiempos de adversidad. Ustedes son mi luz en los momentos de oscuridad.

A mi novio, Alex, por creer en mi incluso cuando yo he dejado de hacerlo; por siempre recordarme que soy capaz y no permitir que un obstáculo me detenga.

A mi mejor amiga, Linda, por extender su mano sincera en cada momento de dificultad.

A Gaby Gavilánez MSc, por su increíble paciencia y buena voluntad para enseñarme gran parte de lo que hoy se de laboratorio, excelente ser humano, profesional y gran amiga.

A la Dra. Diana Pazmiño por confiar en mí y darme la oportunidad de realizar este proyecto. Por compartir su conocimiento conmigo y ser parte fundamental de este.

Al Dr. Diego Ortiz por su apoyo desde el primer día en la ejecución de este proyecto, por sus consejos y recomendaciones que fueron de gran ayuda.

A la Ing. Karina Bautista MSc, propietaria de la finca Huerta Luna, por compartir su amplio conocimiento en agroecología para este proyecto.

A José Daniel Gonzáles MSc. por su gran apoyo en la realización de los análisis bioinformáticos, parte indispensable del presente trabajo.

Al Dr. Darío Ramírez por compartir sus scripts con nosotros, base del presente proyecto de investigación.

A Anita Carrión MSc., subdirectora del Galápagos Science Center y Cris Vintimilla MSc., coordinadora de laboratorios; por su confianza y apoyo desde el inicio de este proyecto de titulación.

A mis compañeros de Barcode, Wilson y Kerly, por su apoyo en el trabajo de laboratorio.

A mi tutor del proyecto de investigación, Dr. Camilo Mestanza, por su apoyo y confianza en cada momento.

A mi preciada alma mater, por darme la oportunidad de conseguir este logro, a quienes fueron mis docentes y autoridades que se mostraron prestos en todo este camino a contribuir con mi desarrollo académico. Gracias UTEQ.

A todo aquel que hizo posible de forma directa o indirecta el desarrollo de este trabajo, en especial a quienes me abrieron las puertas y compartieron sus conocimientos conmigo.

Y a ti que ahora estás en el cielo; mi fiel amigo, Max.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres, sin ellos su ejecución no hubiera sido posible. Estoy y estaré eternamente agradecida por su inconmensurable esfuerzo para hacer de mí el ser humano que soy ahora; por ser siempre los primeros en creer en mí y enseñarme a no rendirme nunca.

Y a todo aquel que dirija sus pasos a hacer de este mundo un lugar mejor...

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I. CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	3
1.1. Problema de investigación.....	4
1.1.1. <i>Planteamiento del problema</i>	4
1.1.2. <i>Diagnóstico</i>	6
1.1.3. <i>Pronóstico</i>	8
1.1.4. <i>Formulación del problema</i>	9
1.2. Objetivos.....	10
1.2.1. <i>Objetivo general</i>	10
1.2.2. <i>Objetivos específicos</i>	10
1.3. Justificación	10
CAPITULO II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN.....	12
2.1. Marco conceptual.....	13
2.1.1. <i>ADN</i>	13
2.1.2. <i>16S ARNr</i>	13
2.1.3. <i>Microbiota del suelo</i>	13
2.1.4. <i>Microorganismos</i>	14
2.1.5. <i>Microorganismos de montaña</i>	14
2.1.6. <i>Nanoporos</i>	14
2.1.7. <i>PCR</i>	14
2.1.8. <i>MinION</i>	15
2.1.9. <i>Secuenciación de ADN</i>	15
2.1.10. <i>Análisis de coordenadas principales (PCoA)</i>	15
2.1.11. <i>NCBI</i>	15
2.1.12. <i>Permacultura</i>	16
2.1.13. <i>Bosque comestible</i>	16
2.1.14. <i>Forestería análoga (FA)</i>	16
2.1.15. <i>Biol</i>	17
2.2. Marco referencial.....	17
2.2.1. <i>Islas Galápagos</i>	17
2.2.2. <i>Población de Galápagos y sostenibilidad agroalimentaria</i>	18
2.2.3. <i>Secuenciación del fragmento 16S y su uso como marcador molecular</i>	19
2.2.4. <i>La biodiversidad del suelo</i>	20

2.2.5.	<i>Biodiversidad microbiana y su efecto en la calidad del suelo</i>	20
2.2.6.	<i>Agricultura convencional</i>	21
2.2.7.	<i>Agricultura regenerativa</i>	21
2.2.8.	<i>Agricultura orgánica</i>	22
2.2.9.	<i>Agroecología</i>	22
2.2.10.	<i>Uso de microorganismos de montaña</i>	22
2.2.11.	<i>Índices de diversidad</i>	23
2.2.11.1.	<i>Diversidad Alfa (α)</i>	23
	<i>Riqueza específica (Richness)</i>	24
	<i>Chao 1</i>	24
	<i>Índice inverso de Simpson (InvSimpson)</i>	25
	<i>Índice de Shannon-Wiener</i>	25
	<i>Equitatividad o regularidad (evenness)</i>	25
2.2.11.2.	<i>Diversidad Beta (β)</i>	25
2.2.12.	<i>Abundancia relativa</i>	26
2.3.	<i>Investigaciones relacionadas con el tema de investigación</i>	26
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN		27
3.1.	<i>Localización</i>	28
3.2.	<i>Condiciones climáticas</i>	29
3.2.	<i>Tipo de investigación</i>	29
3.2.1.	<i>Línea de investigación</i>	29
3.2.2.	<i>Trabajo de campo</i>	29
3.2.3.	<i>Experimental</i>	30
3.3.	<i>Método de investigación</i>	31
3.3.1.	<i>Método comparativo</i>	31
3.3.2.	<i>Método analítico</i>	32
3.4.	<i>Fuentes de recopilación de información</i>	32
3.5.	<i>Diseño del experimento</i>	32
3.6.	<i>Instrumentos de investigación</i>	33
3.6.1.	<i>Variables por evaluar en la investigación</i>	33
3.7.	<i>Tratamiento de los datos</i>	34
3.8.	<i>Recursos humanos y materiales de la investigación</i>	34
3.8.1.	<i>Recursos humanos</i>	34
3.8.2.	<i>Recursos materiales</i>	34
	<i>Materiales de campo</i>	34

3.8.3. <i>Presupuesto</i>	35
3.9. Diagrama de flujo metodología	36
CAPÍTULO IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
4.1. Resultados y discusión.....	38
4.1.1. <i>Resultados de la secuenciación de las muestras de suelo</i>	38
4.1.2. <i>Abundancia relativa por tratamiento a nivel de Filo de bacteria y arquea</i>	38
4.1.3. <i>Abundancia relativa por tratamiento a nivel de Familia de bacteria y arquea</i>	44
4.1.4. <i>Diversidad</i>	47
4.1.4.1. Diversidad alfa (α).....	47
4.1.4.2. Diversidad beta (β)	54
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	56
5.1. Conclusiones	57
5.2. Recomendaciones	57
CAPÍTULO VI. LITERATURA CITADA	58
6.1. Bibliografía.....	59
CAPÍTULO VII. ANEXOS.....	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Condiciones meteorológicas Bellavista, isla Santa Cruz (Julio,2019) (58).</i>	29
Tabla 2. <i>Tratamientos empleados en el análisis de suelo.</i>	29
Tabla 3. <i>Vegetación presente en los sitios de colecta de muestras.</i>	30
Tabla 4. <i>Primers empleados para el secuenciamiento del fragmento 16S RNAr.</i>	31
Tabla 5. <i>Tiempo de manejo de las fincas al momento de toma de la muestra (Agosto 2021).</i>	31
Tabla 6. <i>Recursos materiales empleados.</i>	34
Tabla 7. <i>Recursos materiales de campo.</i>	35
Tabla 8. <i>Recursos materiales de laboratorio.</i>	35
Tabla 9. <i>α - diversidad por finca.</i>	48
Tabla 10. <i>α - diversidad por tratamiento.</i>	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Mapa de las islas Galápagos.</i>	18
Figura 2. <i>Área de estudio en las islas Galápagos: Isla Santa Cruz (colección de muestras de suelo en dos fincas agroecológicas: Huerta Luna en Bellavista y Lava Java en El Cascajo e Isla San Cristóbal (procesamiento en laboratorio).</i>	28
Figura 3. <i>Diagrama de flujo de la metodología de la investigación</i>	36
Figura 4. <i>Abundancia relativa por tratamiento agrupadas a nivel de Filo de bacteria y arquea con abundancia mayor a 0.05 en las fincas agroecológicas Huerta Luna y Lava Java en Galápagos, Ecuador.</i>	39
Figura 5. <i>Abundancia relativa por tratamiento agrupadas a nivel de familia de Bacteria y Arquea con abundancia mayor a 0.05 en las fincas agroecológicas Huerta Luna y Lava Java en Galápagos, Ecuador.</i>	44
Figura 6. <i>Diagrama de caja de los índices de diversidad alfa para: riqueza (Richness), Shannon y Uniformidad (Evenness) para los tres tratamientos estudiados en las fincas Huerta Luna y Lava Java en Galápagos, Ecuador.</i>	48
Figura 7. <i>Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) para muestras de microbioma de suelo de dos fincas agroecológicas en la isla Santa Cruz, Galápagos. Cada punto representa un muestra distinta, su color se basa en las dos fincas agroecológicas: Huerta Luna (rojo) y Lava Java (azul) y la distancia entre los puntos representa cuán diferentes en composición son las muestras entre sí. La correlación canónica de cada eje del PCoA está colocada en paréntesis e indica el porcentaje de variación explicado del conjunto de datos.</i>	54

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A. Pesticidas usados por hectárea de tierra (FAO, 2017)	68
Anexo B. LMR provincia de Los Ríos (Agrocalidad).....	68
Anexo C. Mapa digital de fertilidad química Ecuador.....	69
Anexo D. Protocolo empleado para la extracción de ADN de suelo.	70
Anexo D. Protocolo empleado para la extracción de ADN de suelo.	71
Anexo E. Índices de diversidad a nivel de finca.....	72
Anexo F. Índices de diversidad a nivel de tratamientos.	73
Anexo G. Preparación de librería para secuenciación, instalaciones de Galapagos Science Center - USFQ.....	74
Anexo H. Cargado de librería en el dispositivo de secuenciación MinIon.	74
Anexo I. Dispositivo de secuenciación MinIon.....	75

RESUMEN

Las islas Galápagos, representan un ejemplo de conservación de flora y fauna a nivel mundial, y proporcionan un gran soporte de evidencia para diversos estudios científicos. Sin embargo, del suelo y su biodiversidad se conoce muy poco. Considerando el rol que tienen los microorganismos en los sistemas agro-productivos, resulta indispensable caracterizarlo en las islas. En Santa Cruz, fincas agroecológicas han realizado tratamientos empíricos con microorganismos de montaña en sus cultivos, evidenciando mejoras en la producción. Esta investigación, pretende proporcionar una línea base de conocimiento sobre la diversidad microbiana de suelos de producción agrícola en Galapagos y evaluar la eficiencia del manejo orgánico realizado en dos fincas. Para este fin, se utilizaron nuevas tecnologías moleculares introducidas en las islas gracias al proyecto “Código Genético de Galápagos”. En ambas fincas se colectaron muestras de suelo de tres tratamientos donde se translocaron microorganismos para enriquecimiento de microbiota, donde T1: suelo fuente de microorganismos, T2: suelo de cultivo y T3: control. Se realizó la secuenciación del fragmento mitocondrial 16S, con el dispositivo de secuenciación portátil: MinION, y mediante herramientas bioinformáticas se realizaron análisis de abundancia relativa, composición de especies, y estimaciones de índices de diversidad alfa y beta de la microbiota bacteriana. Los filos de bacterias más abundantes fueron: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes*, en ambas fincas. Sin embargo, su composición varía entre muestras. La finca Huerta Luna mostró dentro de los índices de diversidad valores más altos y una mayor riqueza de especies. Esto posiblemente debido a su mayor tiempo bajo manejo orgánico. Este estudio provee conocimiento básico sobre la diversidad microbiana y sobre la efectividad de manejo orgánico en suelos de cultivo de las islas Galápagos, un paso clave hacia un modelo sustentable que garantice la seguridad alimentaria de la población y reducción de productos químicos en ecosistemas insulares frágiles.

Palabras clave: agricultura, agroecología, barcoding, diversidad, Galápagos, microorganismos, secuenciación, Shannon.

ABSTRACT

The Galapagos Islands represent a world-class example of flora and fauna conservation and provide a great deal of evidence for various scientific studies. However, very little is known about the soil and its biodiversity. Considering the role that microorganisms play in agro-productive systems, it is essential to characterize them on the islands. In Santa Cruz, agroecological farms have carried out empirical treatments with mountain microorganisms in their crops, showing improvements in production. This research aims to provide a baseline of knowledge on the microbial diversity of agricultural production soils in Galapagos and to evaluate the efficiency of organic management carried out on two farms. For this purpose, new molecular technologies introduced in the islands thanks to the "Galapagos Genetic Code" project were used. On both farms, soil samples were collected from three treatments where microorganisms were translocated for microbiota enrichment, where T1: soil source of microorganisms, T2: cultivation soil and T3: control. Sequencing of the mitochondrial 16S fragment was performed with the portable sequencing device: MinION, and using bioinformatics tools, analyses of relative abundance, species composition, and estimates of alpha and beta diversity indices of the bacterial microbiota were performed. The most abundant bacterial phyla were: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria* and *Bacteroidetes*, in both farms. However, their composition varied between samples. The Huerta Luna farm showed higher diversity index values and greater species richness. This is possibly due to its longer time under organic management. This study provides basic knowledge on microbial diversity and on the effectiveness of organic management in Galapagos farm soils, a key step towards a sustainable model that guarantees food security for the population and reduction of chemicals in fragile island ecosystems.

Key words: agriculture, agroecology, diversity, Galapagos, microorganisms, Shannon.

CÓDIGO DUBLIN

Título:	Análisis molecular de la diversidad microbiana de suelos de dos fincas bajo manejo agroecológico en la isla Santa Cruz, Galápagos				
Autor:	Martinez Vargas Daniela Alexandra				
Palabras clave:	Galápagos	microorganismos	diversidad	Agricultura	Shannon
Editorial:	Quevedo: UTEQ, 2022				
Resumen:	<p>Las islas Galápagos, representan un ejemplo de conservación de flora y fauna a nivel mundial, y proporcionan un gran soporte de evidencia para diversos estudios científicos. Sin embargo, del suelo y su biodiversidad se conoce muy poco. Considerando el rol que tienen los microorganismos en los sistemas agro-productivos, resulta indispensable caracterizarlo en las islas. En Santa Cruz, fincas agroecológicas han realizado tratamientos empíricos con microorganismos de montaña en sus cultivos, evidenciando mejoras en la producción. Esta investigación, pretende proporcionar una línea base de conocimiento sobre la diversidad microbiana de suelos de producción agrícola en Galapagos y evaluar la eficiencia del manejo orgánico realizado en dos fincas. Para este fin, se utilizaron nuevas tecnologías moleculares introducidas en las islas gracias al proyecto “Código Genético de Galápagos”. En ambas fincas se colectaron muestras de suelo de tres tratamientos donde se translocaron microorganismos para enriquecimiento de microbiota, donde T1: suelo fuente de microorganismos, T2: suelo de cultivo y T3: control. Se realizó la secuenciación del fragmento mitocondrial 16S, con el dispositivo de secuenciación portátil: MinION, y mediante herramientas bioinformáticas se realizaron análisis de abundancia relativa, composición de especies, y estimaciones de índices de diversidad alfa y beta de la microbiota bacteriana. Los filos de bacterias más abundantes fueron: <i>Proteobacteria</i>, <i>Firmicutes</i>, <i>Acidobacteria</i>, <i>Actinobacteria</i> y <i>Bacteroidetes</i>, en ambas fincas. Sin embargo, su composición varía entre muestras. La finca Huerta Luna mostró dentro de los índices de diversidad valores más altos y una mayor riqueza de especies. Esto posiblemente debido a su mayor tiempo bajo manejo orgánico. Este estudio provee conocimiento básico sobre la diversidad microbiana y sobre la efectividad de manejo orgánico en suelos de cultivo de las islas Galápagos, un paso clave hacia un modelo sustentable que garantice la seguridad alimentaria de la población y reducción de productos químicos en ecosistemas insulares frágiles.</p>				

Abstract	<p>The Galapagos Islands represent a world-class example of flora and fauna conservation and provide a great deal of evidence for various scientific studies. However, very little is known about the soil and its biodiversity. Considering the role that microorganisms play in agro-productive systems, it is essential to characterize them on the islands. In Santa Cruz, agroecological farms have carried out empirical treatments with mountain microorganisms in their crops, showing improvements in production. This research aims to provide a baseline of knowledge on the microbial diversity of agricultural production soils in Galapagos and to evaluate the efficiency of organic management carried out on two farms. For this purpose, new molecular technologies introduced in the islands thanks to the "Galapagos Genetic Code" project were used. On both farms, soil samples were collected from three treatments where microorganisms were translocated for microbiota enrichment, where T1: soil source of microorganisms, T2: cultivation soil and T3: control. Sequencing of the mitochondrial 16S fragment was performed with the portable sequencing device: MinION, and using bioinformatics tools, analyses of relative abundance, species composition, and estimates of alpha and beta diversity indices of the bacterial microbiota were performed. The most abundant bacterial phyla were: <i>Proteobacteria</i>, <i>Firmicutes</i>, <i>Acidobacteria</i>, <i>Actinobacteria</i> and <i>Bacteroidetes</i>, in both farms. However, their composition varied between samples. The Huerta Luna farm showed higher diversity index values and greater species richness. This is possibly due to its longer time under organic management. This study provides basic knowledge on microbial diversity and on the effectiveness of organic management in Galapagos farm soils, a key step towards a sustainable model that guarantees food security for the population and reduction of chemicals in fragile island ecosystems.</p>
Descripción	92 hojas
URL	

INTRODUCCIÓN

Galápagos es un archipiélago ubicado al este del Océano Pacífico y se encuentra constituido por siete islas mayores y numerosas islas menores e islotes. Cuenta con una superficie de 8,006 km² de los cuales un 90% está declarada como Parque Nacional, y políticamente pertenece al Ecuador de cuya costa dista unos 1,100 km aproximadamente. La flora y fauna de Galápagos son particularmente relevantes por su diversidad y alto grado de endemismo por lo cual han sido muy estudiadas, de tal manera que incluso el famoso científico inglés Charles Darwin realizó en las islas una expedición científica que inspiró su trabajo y el desarrollo de la teoría de la evolución (1). Sin embargo, esto no ha ocurrido con el suelo de las islas, de cuya diversidad y endemismo de microorganismos se conoce muy poco, especialmente en términos de ecosistemas subterráneos (2).

Según Pedraza et al. (2010) (3), la ineludible demanda de una producción sustentable de alimentos y biocombustibles y un ecosistema saludable para las generaciones futuras son cuestiones en la actualidad importantes para la población mundial. En este sentido, es de vital importancia la búsqueda de alternativas para que el desarrollo de la producción agrícola esté garantizado y en sintonía con una buena calidad ambiental (3). Esta necesidad es particularmente evidente en Galápagos debido al crecimiento poblacional no planificado y a su aislamiento geográfico (4) que supone la importación de productos alimentarios de primera necesidad desde el Ecuador continental y el uso de agroquímicos/técnicas convencionales en los cultivos producidos localmente. Estas actividades amenazan la sustentabilidad de la población y el ecosistema.

Una técnica de particular relevancia es el manejo agroecológico de microorganismos y su inoculación en el suelo de cultivos agrícolas. En la isla Santa Cruz, la Finca Huerta Luna lo ha realizado de manera empírica, evidenciando claras mejoras en la producción. Sin embargo, no se conoce cuáles son los microorganismos que intervienen en este manejo y si son los responsables de la mejora en producción. Partiendo del hecho de que los microorganismos son capaces de fijar nitrógeno atmosférico, de facilitar una mayor absorción de agua y nutrientes, e incluso están involucrados en la producción de hormonas reguladoras del crecimiento, como auxinas, citoquininas y giberelinas (5)

resulta necesario caracterizar, a diferentes niveles taxonómicos, cuáles organismos se encuentran involucrados en este sistema de manejo.

Mediante el estudio de la metagenómica y el uso de técnicas de secuenciación de “barcoding” (código de barras genético para identificación de especies), en los últimos años se ha logrado identificar la composición de comunidades microbianas gracias al uso de marcadores moleculares universales. De tal manera, en el presente estudio se hizo uso del gen 16S, un fragmento de ARNr que se encuentra presente en el genoma de todos los organismos vivos (6).

En el presente proyecto de investigación se realizó un análisis de la diversidad y composición microbiana del suelo de dos fincas agroecológicas en la isla Santa Cruz – Galápagos, Se realizaron comparaciones entre tres tratamientos: suelo de cultivo inoculado con microorganismos nativos (T2), los cuales provinieron de un suelo fuente (T1), y un suelo control (T3: no manejado).

Se hizo uso de nuevas tecnologías moleculares introducidas en las islas gracias al proyecto “Barcode Galápagos”, en este caso la secuenciación del gen 16S, con una tecnología de secuenciación portátil: MinION (Oxford Nanopore Technology). A un nivel más amplio, este estudio buscó; no solo conocer la diversidad microbiana del suelo de las fincas, sino también corroborar y comprender la eficiencia de las técnicas de manejo ya mencionadas, como una alternativa más amigable con el medio ambiente.

CAPÍTULO I.
CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de investigación.

1.1.1. Planteamiento del problema.

Desde tiempos inmemorables las islas Galápagos se han caracterizado por ser ejemplo de investigación y conservación de su flora y fauna a nivel mundial. Sin embargo, se le ha dado poca atención a la “diversidad oculta”, de la cual forma parte el microbioma de los diferentes ecosistemas. Entre estos, el suelo de uso agrícola es particularmente relevante puesto que de él hacemos uso directo para nuestra alimentación diaria. Para garantizar la continuidad de este invaluable recurso en el futuro, considerando el tiempo que le toma al suelo renovar sus propiedades, es necesaria la implementación de nuevas técnicas de manejo, como por ejemplo la sustitución parcial o total de agroquímicos por tratamientos con microorganismos para su enriquecimiento y regeneración.

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO), Ecuador es uno de los países con los índices más altos de uso de agroquímicos a nivel mundial, con 13.90 kg/Ha en el año 2017, compitiendo con China y otros por el primer lugar (ver Anexo A) (7). Para el mismo año, la institución estatal ecuatoriana Agrocalidad, implementó el Plan Nacional de Vigilancia y Control de Contaminantes en la Producción Primaria. Este plan controla y establece sanciones a los productos cuya cantidad de residuos de contaminantes sea superior a la permitida por normas internacionales de salud y comercio. Con esto, se busca precautelar la seguridad alimentaria en el territorio ecuatoriano y garantizar la calidad e inocuidad de la oferta exportable de nuestro país (8).

Entre octubre de 2013 y diciembre de 2016, Agrocalidad tomó muestras de residuos de agroquímicos de ciertos productos en Ecuador (Ver Anexo B). Por ejemplo, en cultivos de banano en la provincia de Los Ríos se obtuvo residuos de Oxamil (insecticida), en concentraciones de 54.25 - 219.25 ppb, cuando su límite permitido es de 10 ppb (9). Este estudio ejemplifica el uso desmedido de agroquímicos en Ecuador y la urgencia por el desarrollo de nuevas alternativas más sustentables con la salud humana y del medio ambiente.

El 26 de agosto de año en curso (2022) el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), hizo la entrega oficial del “Mapa Digital de Fertilidad Química de los Suelos del Ecuador continental” (ver Anexo C) en colaboración conjunta con Bioversity International, el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y la Fundación EcoCiencia, con el objetivo de codesarrollar un servicio que contribuyera a combatir la degradación de los suelos en el territorio nacional (10).

Este mapa reveló que el 50% de los suelos del Ecuador está en proceso de degradación. Situación que merece especial atención, pues no solo afecta la calidad del suelo en sí, sino también a la disminución de fuentes hídricas y en el aumento de la vulnerabilidad ante eventos climáticos en la agricultura. Combinados, estos factores ponen en riesgo la seguridad alimentaria. En palabras del Ministro de Agricultura y Ganadería, Bernardo Manzano Díaz: “Este mapa contribuirá al diagnóstico del estado de la degradación de los suelos del Ecuador, causada principalmente por la erosión, desertificación y contaminación” (10). Iniciativas como estas contribuyen al desarrollo de nuevas perspectivas para combatir esta problemática.

Como se puede evidenciar, en el Ecuador se han direccionado esfuerzos a la obtención de productos alimenticios más saludables y un mejor manejo del suelo. Sin embargo, esto no ha ocurrido en el territorio insular de las islas Galápagos, siendo este parte territorial de Ecuador, un ecosistema frágil y declarado Patrimonio Natural de la Humanidad por la UNESCO en 1979.

Es importante señalar que la información disponible y el sistema de manejo de suelos para Ecuador es aplicada indistintamente en Galápagos sin considerar sus particularidades ecológicas, sociales y de aislamiento. Por otro lado, Galápagos es además altamente dependiente de la importación de productos desde el Ecuador continental mediante vía aérea y marítima, lo cual supone otros serios problemas como una baja resiliencia de la población para responder ante futuras crisis que restringen la movilidad de personas y productos (ej. pandemia de COVID-19), y que deja una considerable huella de uso de carbono en general. De esta manera, promover la investigación básica sobre los sistemas biológicos del suelo y desarrollar planes de manejo de agricultura sustentable en las islas podría derivar en grandes beneficios al medio ambiente y a la seguridad alimentaria y salud de sus habitantes.

1.1.2. Diagnóstico.

Existe escasa investigación sobre microbiología del suelo en relación con su importancia agronómica en las islas. El Parque Nacional Galápagos mencionó en el año 2016 que, en el ámbito de las ciencias naturales ha predominado la investigación referente a la taxonomía, biogeografía, ecología evolutiva, y biología de la conservación con un claro sesgo hacia organismos superiores. Por otro lado, otras especies como los microorganismos han recibido escasa o nula atención (11). Cabe resaltar que esta no es una particularidad de Galápagos. A nivel mundial existe gran desconocimiento de la microbiología del suelo.

Un estudio realizado por Morugán et al., (12) señala la falta de estudios de investigación sobre metagenómica del suelo, usando secuenciación de nueva generación (NGS), y que comparen el efecto de diferentes prácticas de gestión sostenible en la producción agrícola. Los métodos metagenómicos tienen un gran potencial para explorar la abundancia y composición de grupos microbianos específicos (ej. Bacterias, hongos) mediante el uso de NGS y bioinformática (13).

Nuevas regulaciones, políticas y estrategias en todo el mundo defienden el uso de prácticas de gestión sostenible que mejoran la biodiversidad del suelo (14). Sin embargo, se necesita evidencia científica al seleccionar aquellas prácticas que son más propensas a fomentar aumentos en la biodiversidad del suelo y grupos microbianos beneficiosos. En este sentido, Morugán et al., (12) sugiere a la comunidad científica realizar experimentos que generen conocimiento sobre cómo las prácticas de manejo afectan la estructura de la comunidad microbiana del suelo y la biodiversidad en las tierras agrícolas, de manera que los tomadores de decisiones y los formuladores de políticas dispongan de datos sólidos (12).

Adicional a esto, es importante señalar que los suelos agrícolas son más susceptibles a la acumulación de metales pesados debido al uso indiscriminado de fertilizantes y otros agroquímicos (15). Según una expedición realizada entre el año 2016 y 2017 en Galápagos, en el suelo de las islas existen altas concentraciones de metales pesados como Cd, Zn y Cu, mismos que pueden estar influenciados por el uso de fertilizantes fosforados, especialmente en la isla Santa Cruz (16). Este estudio además reveló que los contenidos

totales de Cd, Co, Cr, Cu, Ni y Zn, están por encima del valor umbral de muchos de los suelos estudiados, lo cual indica posibles riesgos ecológicos o para la salud. Es importante considerar además que la fracción biodisponible de estos elementos es baja en el suelo, por lo cual se puede deducir que la presencia de estos metales no es producto de material parental del propio suelo sino de fuentes externas (16).

El uso indiscriminado de insumos agrícolas ha alterado de forma significativa los constituyentes orgánicos y los organismos del suelo, y con ello el equilibrio ecológico, modificando principalmente las actividades metabólicas de las diferentes poblaciones microbianas del agroecosistema. Con el fin de subsanar este problema resulta de gran interés restaurar la microbiota de los suelos mediante estrategias que permitan mejorar su calidad en relación con la productividad agrícola de manera no contaminante (17) (18).

Enfrentado esta problemática, en Galápagos existen fincas que han realizado prácticas de manejo orgánico del suelo durante un tiempo considerable, usando técnicas con microbiología nativa, y han obtenido mejoras notables en su producción agrícola. Es así que, con fines del presente proyecto de investigación se analizó la diversidad bacteriana del suelo de dos fincas agroecológicas en la isla Santa Cruz y se realizó una comparación entre suelo tratado y no tratado (con microorganismos nativos).

El procedimiento consiste en la transferencia de microorganismos de montaña a suelos de cultivo con la finalidad de reestablecer la microbiota del suelo. Este tratamiento o técnica es utilizada como imitadora de las funciones de un bosque, pero para sistemas de producción de alimento, logrando que estos sistemas de cultivo puedan, al igual que un bosque, mantener la integridad biológica y producción en la ausencia de agentes químicos.

Utilizar el manejo orgánico de estas fincas como un modelo a replicar sería un gran aporte al medio ambiente de Galápagos. Es por ello que, el presente proyecto de investigación ha direccionado sus esfuerzos a la exploración de la microbiología del suelo de fincas agroecológicas, mediante el análisis de los distintos grupos microbiológicos que se encuentran y sus potenciales interacciones, con la finalidad de establecer una línea base sobre los beneficios que conlleva el manejo orgánico en mismas.

A manera de antecedentes para el presente proyecto de investigación es necesario considerar el tipo de manejo que ha tenido cada finca a lo largo del tiempo, puesto que

esta ha servido como un indicador importante de comparación microbiológica. En este sentido, según información brindada por la propietaria una de las fincas de estudio “Huerta Luna” (Ing. Karina Bautista MSc.) y conocedora del manejo de la segunda finca “Lava Java”, se tiene que: finca *Huerta Luna* ha tenido un manejo agroecológico consciente desde su adquisición hace cinco años¹ y el manejo con microorganismos lleva el mismo tiempo, usando a su vez el suelo de bosque como un recurso ecológico² (fuente de microorganismos), con la menor intervención posible.

Cabe resaltar que, previo a este manejo, *Huerta Luna* (HL)³ se mantuvo históricamente como un bosque natural sin intervención humana. Esta finca maneja técnicas de permacultura, agricultura regenerativa, bosques comestibles, forestería análoga y otros, todo esto sin alterar el paisaje sino haciendo una intervención muy paralela al mismo proceso natural del bosque.

Por su parte, *Lava Java* (LJ) posee 12 años haciendo uso de un manejo y control de plagas orgánico, mediante el uso de biol y técnicas de compostaje propias. Considerando que desde el año 2020 apenas, LJ⁴ comenzó a aplicar los principios de agricultura regenerativa de manera más global e informada. Sin embargo, previo a estos 12 años la finca tuvo un manejo convencional.

1.1.3. Pronóstico.

Galápagos es un ecosistema frágil, por tanto, se debe trabajar en nuevas alternativas para protegerlo de uno de los tipos de contaminación más importantes: las malas prácticas agropecuarias. El uso desmedido de agroquímicos a largo plazo puede generar daños irreversibles a los ecosistemas. Por lo tanto, la restauración y enriquecimiento del suelo mediante el uso de microorganismos nativos es una opción prometedora para obtener un suelo de mejor calidad, protegiendo su poder natural regenerativo, mientras se garantiza una soberanía alimentaria en las islas y un entorno mejor conservado.

En las islas Galápagos, particularmente en la isla Santa Cruz existen fincas agroecológicas que han decidido tomar acción sobre esta problemática, haciendo conciencia de las implicaciones del uso de agroquímicos a corto y largo plazo. Una de ellas es la finca

¹ Los tiempos mencionados en relación con las fincas tienen como referencia/guía el año de toma de las muestras (2021).

² Dentro del manejo de Huerta Luna se han dejado zonas sin intervenir como bosques, con fines ecológicos.

³ Entiéndase a Huerta Luna como “HL”.

⁴ Lava Java

“Huerta Luna” que realiza tratamientos microbiológicos en el suelo cultivable con la finalidad de obtener alimentos más sanos y causar el menor impacto posible al medio ambiente. Esto ha servido como modelo para fincas como “Lava Java” que ha imitado este procedimiento, evidenciado claras mejoras en su producción al tener un suelo más diverso y equilibrado, con mayores posibilidades de combatir patógenos y con menos necesidades en general (ej., fertilizante externos), dado el rol de los microorganismos en el suelo.

Si bien estos esfuerzos empíricos han brindado información valiosa sobre esta alternativa frente al uso de agroquímicos, es necesario el desarrollo de información específica sobre los microorganismos que intervienen en estos tratamientos. Conocer qué microorganismos, o combinaciones de microorganismos, son responsables de las mejoras de producción permitirá una toma de decisiones más informada en futuros tratamientos.

Galápagos lucha día a día por la consecución de una soberanía alimentaria que poco a poco se va haciendo realidad. Este trabajo pretende brindar información científica que permita a las fincas agroecológicas entender la composición microbiológica de sus suelos, y, por lo tanto, tomar decisiones que ayuden a mejorar sus condiciones de producción a largo plazo. Es imperativo que Galápagos disminuya el uso de agroquímicos y la dependencia del Ecuador continental para el abastecimiento de productos. Este proceso debe tomarse con profunda seriedad, así como de manera responsable tanto para nuestra salud como para el medio ambiente.

1.1.4. Formulación del problema.

¿Es posible corroborar mediante la identificación de bacterias de suelo, usando técnicas moleculares, la eficacia de técnicas de manejo orgánico utilizadas en la mejora de la producción agroecológica en la isla Santa Cruz en Galápagos?

1.2. Objetivos.

1.2.1. Objetivo general.

Analizar la diversidad y composición microbiana del suelo en dos fincas agroecológicas de la isla Santa Cruz, Galápagos, mediante el uso de técnicas moleculares.

1.2.2. Objetivos específicos.

- Caracterizar mediante análisis moleculares la composición microbiana del suelo de las fincas agroecológicas.
- Corroborar si la técnica de transferencia de microorganismos es efectiva al comparar la diversidad y composición de microorganismos entre tres tratamientos dentro de cada finca.
- Proporcionar una línea base sobre el microbioma del suelo de sistemas agroecológicos para futuras investigaciones en la mejora de una agricultura más sostenible y responsable, mediante una revisión bibliográfica sobre la interacción de los microorganismos presentes en las muestras con las plantas.

1.3. Justificación.

Para lograr una óptima producción agrícola, es imprescindible considerar a la fertilidad del suelo como un factor clave, misma que no sólo depende de su composición química, sino también de la naturaleza cuantitativa y cualitativa de los microorganismos que habitan en él (3). Es por ello que se debe intentar suplir los requerimientos del suelo en la medida posible sin alterar su estado natural, es decir, otorgándole las cantidades justas según su necesidad. De esta manera se podría evitar alterar su composición microbiológica de manera drástica; considerando el hecho de que las poblaciones de microorganismos están inmersas de manera directa en la calidad del suelo y consecuentemente en el desarrollo de los cultivos.

La presente investigación tuvo como objetivo realizar un análisis de metabarcoding molecular del microbioma de suelo de fincas agroecológicas de la isla Santa Cruz – Galápagos. Santa Cruz es una isla de edad intermedia entre las tres principales pobladas (San Cristóbal, Santa Cruz e Isabela). Las muestras fueron colectadas de dos fincas agroecológicas con diferentes periodos libres de uso de agroquímicos, por lo cual se espera caracterizar el microbioma del suelo de ambas fincas y corroborar las causas de la eficiencia de tratamientos realizados en los cultivos con la inoculación de microorganismos nativos.

CAPITULO II.
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco conceptual.

A continuación, se describen conceptos clave para el desarrollo de esta investigación y que serán parte de las secciones siguientes de este proyecto de investigación.

2.1.1. ADN.

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es el código genético único que se encuentra en la mayoría de las células de los seres vivos. Es un polímero de nucleótidos, es decir, una larga estructura molecular compuesta por unidades llamadas nucleótidos (polinucleótido). Cada nucleótido está formado a su vez por una base nitrogenada, un azúcar (la desoxirribosa) y un grupo fosfato. Las bases nitrogenadas que pueden formar parte del ADN son cuatro: adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T). Los nucleótidos se unen entre sí formando cadenas largas que se diferencian unas de otras por las secuencias de sus bases (19).

2.1.2. 16S ARNr.

El fragmento 16S ARNr es un polirribonucleótido de aproximadamente 1,500 nucleótidos. Se pliega y adquiere una estructura secundaria que se caracteriza por tener segmentos de doble cadena que permiten la formación de asas y hélices. Esta molécula ha sido reconocida como un poderoso marcador universal en técnicas de barcoding genético debido a que se encuentra en todos los organismos conocidos. La secuenciación de este gen es una técnica ampliamente utilizada para la identificación de cepas bacterianas a nivel de género, y en ciertas ocasiones a nivel de especie (20).

2.1.3. Microbiota del suelo.

La microbiota o microbioma del suelo comprende organismos no visibles a simple vista, denominados microorganismos, tales como bacterias, hongos, protozoos y nemátodos. Estos microorganismos contribuyen en el funcionamiento de los ecosistemas, y de ellos depende la descomposición de la materia orgánica, el mantenimiento de la estructura del suelo, y la disponibilidad y reciclaje de agua y nutrientes (21).

2.1.4. Microorganismos.

Son organismos descomponedores de restos orgánicos que luego los transforman en compuestos inorgánicos, cerrando el ciclo de los elementos. Componen cerca del 85% de la fracción viva del suelo (22).

2.1.5. Microorganismos de montaña.

Los microorganismos de montaña hacen referencia a hongos, bacterias, micorrizas, levaduras y otros organismos benéficos que existen en el suelo de montañas y bosques, donde en los últimos tres años no se haya presentado intervención de productos químicos, de tal forma que estos se hayan desarrollado en un ambiente natural (23).

2.1.6. Nanoporos.

La secuenciación del ADN basada en nanoporos implica ensartar hebras de ADN monocatenario a través de poros muy diminutos en una membrana. Las bases de ADN se leen una a la vez a medida que pasan por el nanoporo. Las bases se identifican al medir las diferencias en el efecto que producen en los iones y la corriente eléctrica que fluye a través del poro. El objetivo de esta tecnología es optimizar el proceso de secuenciación (menor costo por muestra) (24). Sin embargo, una de las mayores ventajas del uso de secuenciación con nanoporos (y con el dispositivo MinION) es su tamaño y funcionamiento ya que son portátiles, y de esta manera los experimentos pueden realizarse en lugares remotos.

2.1.7. PCR.

PCR, por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), probablemente sea la tecnología más importante cuyo protocolo está dirigido al estudio del ADN. La función de la PCR es replicar millones de veces una secuencia específica de ADN blanco mediante una poderosa catálisis llevada a cabo por una enzima conocida como ADN polimerasa, de tal forma que cantidades pequeñas de ADN pueden ser sintetizadas y copiadas fielmente para analizarse con diferentes fines (25).

2.1.8. MinION.

MinION es un dispositivo portátil de secuenciación de ADN y ARN creado por la empresa británica *Oxford Nanopore Technologies*. Utiliza la tecnología de secuenciación mediante nanoporos, a través de la cual se analiza el ADN de forma directa al empujarlo a través de un poro suspendido en una membrana. Los nucleótidos que componen el ADN se diferencian debido a los cambios de corriente eléctrica que se producen durante su paso por la membrana, pues cada nucleótido tiene una carga eléctrica única. Además, dispone de su propio programa de análisis (26).

2.1.9. Secuenciación de ADN.

La secuenciación del ADN hace referencia a la determinación del orden de los cuatro componentes básicos químicos, llamados "bases" (adenina, citosina, timina y guanina), que forman la molécula de ADN. La secuencia específica de nucleótidos determina la función del fragmento de ADN, sea estructural (como el ARNr) o codificante como los genes que sintetizan proteínas (27).

2.1.10. Análisis de coordenadas principales (PCoA).

Análisis estadístico para estudiar la similitud o diferencia de un conjunto de datos, y crea variables sintéticas (componentes principales) para describir la variación de los datos a través de la reducción de su dimensionalidad (28). Por lo general, los primeros dos o tres ejes de variación en el ranking de componentes contienen la mayor variación y se utilizan para su visualización.

2.1.11. NCBI.

El Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) crea sistemas automatizados para almacenar y analizar conocimientos sobre biología molecular, bioquímica y genética. Un objetivo importante de NCBI es facilitar el uso libre de tales bases de datos y softwares por parte de la comunidad científica para la investigación en medicina y otras áreas. También promueve investigaciones sobre métodos avanzados de procesamiento de

información molecular basado en computadora (bioinformática) para analizar la estructura y función de moléculas biológicamente importantes (29).

2.1.12. Permacultura.

La permacultura es el diseño y mantenimiento consciente de ecosistemas agrícolas. Integra la tierra, los recursos, las personas y el medio ambiente a través de sinergias mutuamente beneficiosas, imitando los sistemas de circuito cerrado sin desperdicio que se observan en diversos sistemas naturales. La permacultura estudia y aplica soluciones holísticas aplicables en contextos rurales y urbanos a cualquier escala (30).

2.1.13. Bosque comestible.

Es un espacio destinado para la producción de alimentos imitando y modificando beneficiosamente el ecosistema de cada región, para la generación de alimentos. Basado en incorporar árboles frutales, maderables, arbustos, hierbas aromáticas, enredaderas, hortalizas, etc., y además sirve de refugio para la fauna y flora endémica de cada región, de las que el humano obtiene beneficios. Esto se logra mezclando especies para que crezcan en una sucesión de capas para crear un hábitat forestal (31).

2.1.14. Forestería análoga (FA).

Es un sistema que busca establecer ecosistemas con estructuras y funciones ecológicas similares a la vegetación original (i.e., sistema análogo). La FA es una forma compleja de agroforestería, donde el ecosistema es dominado por árboles, pero que, a su vez, ofrece especies con valor comercializable, que proveen sustento socioeconómico a las comunidades rurales. Además, los productos derivados de FA ofrecen un valor agregado a la hora de comercializarlos, pues se ha desarrollado un sistema de certificaciones denominado Productos de Jardines Forestales o FGP, por sus siglas en inglés (32).

2.1.15. Biol.

El Biol es un abono orgánico líquido que se origina a partir de la descomposición de materiales orgánicos en ausencia de oxígeno, como estiércoles de animales, plantas verdes, frutos, entre otros. Contiene nutrientes que son asimilados fácilmente, por las plantas haciéndolas más vigorosas y resistentes. La técnica empleada para obtener biol es a través de biodigestores (33).

2.2. Marco referencial.

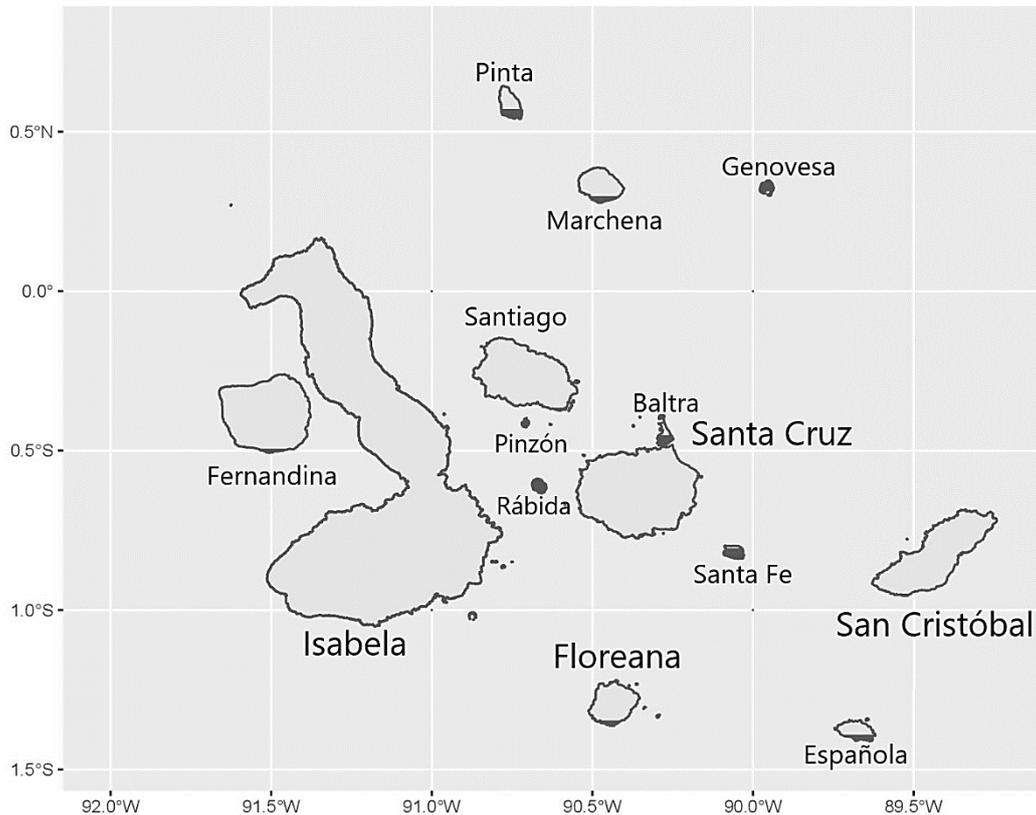
2.2.1. Islas Galápagos.

Las Islas Galápagos, con una superficie total de 799,540 ha, se encuentran ubicadas en el Pacífico Oriental, aproximadamente a 1,000 km al oeste de la costa ecuatoriana. Lo conforman, siete islas mayores: Isabela, Santa Cruz, Fernandina, Santiago, San Cristóbal, Floreana y Marchena; 14 islas menores: Española, Pinta, Baltra, Santa Fe, Pinzón, Genovesa, Rábida, Seymour Norte, Wolf, Tortuga, Bartolomé, Darwin, Daphne Mayor y Plaza Sur; 12 islas adicionales; 64 islotes y 136 rocas (Fig.1). Todo el archipiélago es de origen volcánico. Posee un rango altitudinal entre 0–1,707 msnm (siendo el punto más alto la cima del volcán Wolf en Isabela), y una precipitación en las zonas áridas de 0–300 mm/año y en la parte alta de 300–1,700 mm/año. De mayo a diciembre su temperatura oscila entre 19–26 °C; y de enero a mayo entre 31–33 °C (34).

Tiene una zona costera caracterizada por plantas y animales que dependen de la proximidad al mar; una zona árida y de transición caracterizada por largos períodos de sequía y carente de humedad; y una zona húmeda de tierras altas donde puede haber períodos de sequía (34). En las islas generalmente a mayor altura existe mayor humedad, y por ende, mayor retención de agua en el suelo. De esta manera, las tierras altas del archipiélago proveen condiciones favorables para el desarrollo de la agricultura y la ganadería en las islas pobladas.

Figura 1.

Mapa de las islas Galápagos.



Elaboración: José Daniel González MSc. y autora.

Software: RStudio v2022.017.1+554 - "Spotted Wakerobin"

2.2.2. Población de Galápagos y sostenibilidad agroalimentaria.

De la superficie terrestre de las islas, el 96,7% es zona protegida por el Parque Nacional Galápagos Nacional de Galápagos (PNG) y el 3,3% corresponde a áreas de asentamiento humano (urbano y rural), de las cuales 19,010 ha son tierras destinadas a actividades agrícolas identificadas como Unidades de Producción Agrícola (UPAs) (35). Según el Censo de Población y Vivienda de Galápagos (2015), la población de Galápagos es de 28,000 habitantes, entre residentes temporales y permanentes (36).

Según Pedraza et al. (2010), la ineludible demanda de una producción sustentable de alimentos y biocombustibles y un ecosistema saludable para las generaciones futuras son cuestiones en la actualidad importantes para la población mundial. En este sentido, es de vital importancia el empeño de la comunidad científica en la persecución constante de

alternativas posibles para que el crecimiento de la producción agrícola esté garantizado y en sintonía con una buena calidad ambiental (3). Esta necesidad es particularmente evidente en Galápagos debido al crecimiento poblacional no planificado y a su aislamiento (4), que supone la importación de productos alimentarios de primera necesidad desde el Ecuador continental y al uso de agroquímicos/técnicas convencionales en los cultivos producidos localmente. Estas actividades amenazan la sustentabilidad de la población y el ecosistema.

La baja productividad agropecuaria en las islas no ha permitido satisfacer la demanda alimentaria de la población; por tanto, las importaciones son la mayor fuente de alimentos del archipiélago. Aproximadamente el 75% del suministro de alimentos agrícolas fue transportado desde el continente en 2017, lo que puede aumentar al 95% en 2037 si no se producen cambios en las políticas alimentarias locales (37).

2.2.3. Secuenciación del fragmento 16S y su uso como marcador molecular.

El tamaño total del ADN bacteriano posee un rango que puede oscilar entre los 160,000 - 12 millones de pares de bases. El fragmento de ADN que codifica para la subunidad 16S ribosomal (16S ARNr), reúne ciertas particularidades que lo hacen muy interesante para el estudio de la taxonomía bacteriana: se trata de un gen común a todas las bacterias y arqueas, y al poseer una alta tasa de acumulación de mutaciones es ideal para estudiar patrones de deriva genética en la evolución de las especies. De esta manera, este fragmento permite la identificación de especies, y ha sido ampliamente utilizado en estudios de “barcoding” genético. Se compone de aproximadamente 1,500 pares de bases, que se clasifican en regiones conservadas y variables (6).

Para que una región de ADN sea considerada como un marcador molecular para estudios de barcoding (código de barra) y/o en cualquier estudio taxonómico o de evolución, debe cumplir con las siguientes características: contener una variabilidad y una divergencia genética significativa a nivel de especie; poseer sitios conservados adyacentes, que permitan el diseño de iniciadores universales, para su amplificación por PCR; y tener una longitud adecuada que permita la extracción y secuenciación de forma fácil, reproducible y precisa. Es así que, estas bases han permitido que las secuencias del 16S ARNr sean

utilizadas como una herramienta importante en la reconstrucción de relaciones filogenéticas (20).

Actualmente el 16S sigue siendo utilizado como un excelente marcador molecular y se han planteado nuevas estrategias de estudio, aprovechando las bondades de las nuevas técnicas genómicas. Debido a la rápida generación de información genómica y a la caracterización de las secuencias del 16S ARNr, en los últimos años se ha observado un cambio significativo en los métodos para la identificación de especies bacterianas y una aceleración en la asignación de especies (20).

2.2.4. La biodiversidad del suelo.

La biodiversidad del suelo refleja la variedad de organismos vivos presentes en él. Comprende innumerables organismos no visibles a simple vista: microorganismos (ej. Bacterias, hongos, protozoarios y nemátodos), la mesofauna (ej. ácaros, colémbolos) y la más reconocida macrofauna (ej. lombrices y termitas). Estos diversos organismos interactúan entre sí, con el sustrato del suelo y con las plantas del ecosistema, formando un complejo sistema de actividad biológica (38).

Los organismos del suelo aportan una serie de servicios fundamentales para la sostenibilidad de todos los ecosistemas. Estos servicios no sólo son decisivos para la función de los ecosistemas naturales, sino que constituyen un recurso fundamental para el manejo sostenible de los sistemas agrícolas. Estos organismos actúan como agentes primarios para la conducción del ciclo de los nutrientes, la regulación de la dinámica de la materia orgánica del suelo, el secuestro del carbono en el suelo y las emisiones de gases invernaderos, modificando la estructura física del suelo y el almacenamiento de agua, aumentando la cantidad y disponibilidad de nutrientes para la vegetación (38).

2.2.5. Biodiversidad microbiana y su efecto en la calidad del suelo.

En los sistemas agrícolas la biodiversidad del suelo desempeña servicios ecológicos, más allá de la producción de alimento, fibra, combustibles e ingresos monetarios. Entre los ejemplos se incluyen el ciclado de nutrientes, control del microclima local, regulación de procesos hidrológicos locales, regulación de la abundancia de organismos con impacto negativo, y detoxificación de productos químicos nocivos. Estos procesos de renovación y servicios de los ecosistemas son en gran parte microbiológicos, por lo tanto, su

persistencia depende del mantenimiento de la biodiversidad microbiana nativa o exógena del suelo (3).

Los microorganismos son capaces de fijar nitrógeno atmosférico, de proveer una mayor absorción de agua y nutrientes, e incluso están involucrados en la producción de hormonas reguladoras del crecimiento, como auxinas, citoquininas y giberelinas (5). Estas hormonas son parte fundamental del desarrollo vegetal ya que pueden llegar a modificar la morfología, superficie y actividad enzimática radical, así como también el crecimiento de la parte aérea. La producción de sustancias que inhiben el desarrollo de patógenos vegetales es otra función de los microorganismos, participando así de manera directa en el desarrollo óptimo de los cultivos agrícolas y su producción (39).

2.2.6. Agricultura convencional.

Se entiende por agricultura convencional al modelo productivo derivado de la implementación de los principios de la revolución verde (40). Este modelo se caracteriza por el predominio del monocultivo, el uso de variedades con alto potencial de rendimiento (generalmente híbridas o transgénicas), en lugar de conservar una alta variabilidad genética para adecuarse a la gran diversidad de ambientes ecológicos y socioculturales (41).

La agricultura convencional también involucra el uso de semillas que han sido alteradas genéticamente utilizando una variedad de métodos tradicionales de cultivo, excluyendo la biotecnología, y que no están certificadas como ecológicas. Algunos métodos de cultivo convencionales se han utilizado durante miles de años, a menudo para desarrollar plantas con un crecimiento más rápido, mayor rendimiento, resistencia a plagas y enfermedades, semillas más grandes o frutos más dulces (42).

2.2.7. Agricultura regenerativa.

La agricultura regenerativa es un sistema de principios y prácticas agrícolas que busca rehabilitar y mejorar todo el ecosistema de la granja otorgando una gran importancia a la salud del suelo, prestando atención también a la gestión del agua, el uso de fertilizantes y

más. Es un método de cultivo que mejora los recursos que utiliza, en lugar de destruirlos o agotarlos (43).

2.2.8. Agricultura orgánica.

La agricultura orgánica es un sistema de producción que trata de utilizar al máximo los recursos de la finca, dándole énfasis a la fertilidad del suelo y la actividad biológica, y paralelamente, a minimizar el uso de los recursos no renovables y no utilizar fertilizantes y plaguicidas sintéticos para proteger el medio ambiente y la salud humana. Así, la agricultura orgánica involucra mucho más que no usar agroquímicos (44).

2.2.9. Agroecología.

La agroecología es un enfoque holístico e integrado que aplica simultáneamente conceptos y principios ecológicos y sociales al diseño y la gestión de sistemas agrícolas y alimentarios sostenibles. Pretende optimizar las interacciones entre las plantas, los animales, los seres humanos y el medio ambiente, a la vez que aborda la necesidad de sistemas alimentarios socialmente equitativos en los que las personas puedan elegir lo que comen y cómo y dónde se produce (45).

La agroecología es a la vez una ciencia, un conjunto de prácticas y un movimiento social, y ha evolucionado como concepto en las últimas décadas para pasar de centrarse en los campos y las granjas, a abarcar la totalidad de los sistemas agrícolas y alimentarios. Ahora representa un campo transdisciplinar que incluye las dimensiones ecológica, sociocultural, tecnológica, económica y política de los sistemas alimentarios, desde la producción hasta el consumo (45).

2.2.10. Uso de microorganismos de montaña.

El uso de la tecnología de microorganismos para la agricultura fue desarrollado en los años 80's en Japón, por el Dr. Teruo Higa y a raíz de esto se han ido perfeccionando nuevas técnicas para reproducir los microorganismos que viven naturalmente en los bosques. Estos microorganismos son denominados usualmente "Microorganismos de Montaña" (MM). Gran parte de ellos cumplen roles benéficos en los procesos biológicos de los suelos y agroecosistemas y pueden ser encontrados en la capa superficial de todo suelo de un ecosistema natural donde no haya habido intervención del ser humano (46).

Para la activación de los microorganismos estos deben tener un mínimo de 30 días en la fase de reproducción anaeróbica, esto se puede realizar en barriles con la adición de diversos componentes a elección que contribuyan a su fermentación, como la melaza, por ejemplo. Los microorganismos de montaña activados (MMA) son una mezcla de bacterias, hongos, levaduras y otros microorganismos benéficos. Estos microorganismos pueden incorporarse en el suelo, en los abonos orgánicos y como una solución que contribuya al control plagas y enfermedades en los cultivos, incluso las levaduras que prevalecen luego de 14 días de activados los MM son las que se usan para la producción de abono orgánico fermentado (46).

2.2.11. Índices de diversidad.

En cada unidad geográfica, a diferentes escalas, se encuentra un número variable de comunidades de organismos. Por ello, para comprender los cambios de la biodiversidad con relación a la estructura del paisaje, la separación de los componentes alfa, beta y gamma (47) es de gran utilidad. Esta forma de analizar la biodiversidad resulta muy conveniente en el contexto actual ante la acelerada transformación de los ecosistemas naturales (48).

La *diversidad alfa* (α) es la riqueza de especies de una comunidad particular a la que consideramos homogénea (diversidad local), la *diversidad beta* (β) es el grado de cambio o reemplazo en la composición de especies entre diferentes comunidades en un paisaje o región, y la *diversidad gamma* (γ) es la riqueza de especies del conjunto de comunidades que integran un paisaje (diversidad regional), resultante tanto de las diversidades alfa como de las diversidades beta (47).

2.2.11.1. Diversidad Alfa (α).

La diversidad alfa está constituida por la diversidad intrínseca de una comunidad bajo condiciones similares en un paisaje. Existen tres medidas de diversidad alfa; riqueza, equitatividad y diversidad. La riqueza, se refiere al número de especies en un determinado sitio, independiente de las abundancias de cada una. La equitatividad se refiere a la variabilidad en las abundancias relativas de cada una de las especies de la comunidad. Es una medida que permite entender el reparto de recursos entre las

especies dentro de la comunidad, y por tanto cual es el aporte de cada una de las especies a la comunidad (49).

Por otro lado, los índices de heterogeneidad están basados en la relación entre equitatividad y riqueza. Los índices de Shannon-Weaver y de Simpson son los más comunes para medir diversidad alfa. La meta fundamental detrás del diseño de la mayoría de los índices de heterogeneidad es unificar dos elementos de la diversidad, la equitatividad, o sea la variabilidad en las abundancias relativas de las especies de la comunidad, y la riqueza, o sea el número total de especies que componen la comunidad (49).

La diversidad alfa alberga dos subgrupos: *Riqueza específica* y *Estructura* de la comunidad (48), de los cuales, para el presente estudio se hará uso de los siguientes; dentro los índices de *riqueza específica* se empleará la riqueza de especies, mientras que dentro del grupo *estructura*, un modelo no paramétrico a usar será Chao1 y dos índices de abundancia proporcional, uno de dominancia (InvSimpson) y un índice de equidad (Shannon).

Riqueza específica (Richness). El concepto más viejo y usado de la diversidad es el número de especies (riqueza). McIntosh (1967) sugiere el término alterativo de riqueza de especies que de una forma u otra relaciona al número de especies encontradas con la cantidad de individuos colectados o el área de la muestra (medida de esfuerzo de muestreo). En este caso las comparaciones se hacen tomando en cuenta un número de individuos o áreas uniformes (50).

Estructura>Modelos no paramétricos

Chao 1. Es un estimador del número de especies en una comunidad basado en el número de especies raras en la muestra (51) (52). S es el número de especies en una muestra, a es el número de especies que están representadas solamente por un único individuo en esa muestra (número de “singletons”) y b es el número de especies representadas por exactamente dos individuos en la muestra (51) (52).

Estructura>índices de abundancia proporcional>Índices de dominancia

Índice inverso de Simpson (InvSimpson). Valor menor posible es 1 (comunidad con solo 1 especie); a mayor diversidad mayor es el índice; el valor máximo es el número de especies de la comunidad (riqueza de especies) (53).

Estructura>índices de abundancia proporcional>Índices de equitatividad

Índice de Shannon-Wiener. Expresa la uniformidad de los valores de importancia a través de todas las especies de la muestra. Mide el grado promedio de incertidumbre en predecir a que especie pertenecerá un individuo escogido al azar de una colección (54). Asume que los individuos son seleccionados al azar y que todas las especies están representadas en la muestra.

Equitatividad o regularidad (evenness). Este concepto representa el grado de homogeneidad existente en las abundancias relativas de las especies. El término homogeneidad (evenness) se refiere a la absoluta igualdad de las abundancias relativas, mientras que "equitatividad" (equitability), se refiere al grado de homogeneidad relativa a un estándar específico (55).

2.2.11.2. Diversidad Beta (β).

La diversidad beta o diversidad entre hábitats es el grado de reemplazamiento de especies o cambio biótico a través de gradientes ambientales (47). A diferencia de las diversidades alfa y gamma que pueden ser medidas fácilmente en función del número de especies, la medición de la diversidad beta es de una dimensión diferente porque está basada en proporciones o diferencias (54).

Estas proporciones pueden evaluarse con base en índices o coeficientes de similitud, de disimilitud o de distancia entre las muestras a partir de datos cualitativos (presencia/ausencia de especies) o cuantitativos (abundancia proporcional de cada especie medida como número de individuos, biomasa, densidad, cobertura, etc.), o bien con índices de diversidad beta propiamente dichos (54).

2.2.12. Abundancia relativa.

Indica el porcentaje de participación que tiene cada una de las especies en una determinada área y se expresa como la relación porcentual entre el número de individuos de una especie determinada con el total de individuos en un área determinada (56). Además, el medir la abundancia relativa de cada especie permite identificar aquellas especies que por su escasa representatividad en la comunidad son más sensibles a las perturbaciones ambientales (54).

2.3. Investigaciones relacionadas con el tema de investigación.

Existe investigación en lo que respecta al estudio de microorganismos patógenos en la mora silvestre de Galápagos (*Rubus niveus*), lo cual es un gran avance para la erradicación de esta maleza que genera inconvenientes notorios en los cultivos agrícolas debido a facilidad de crecimiento en el medio isleño (57). Además, estudios sobre las propiedades físicoquímicas del suelo de las islas en relación con su edad y clima también se encuentran disponibles. Entre estos, existe un estudio que indica que en las islas de mayor edad existe una acumulación de Al y Fe (16). Este estudio también indicó que factores como la conductividad eléctrica, el Ph, retención de fosfatos tienden a disminuir en las islas más jóvenes (16). La presente investigación pretende sumarse a los estudios realizados en el suelo de las islas para tener así una base sólida de información y servir en la toma de decisiones en la agricultura a futuro. No obstante, este estudio provee evidencia molecular de la composición microbiana de suelos bajo manejo ecológico, un aporte nuevo a la problemática descrita en la sección 1.1. “Problema de investigación”.

CAPÍTULO III.
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización.

Los análisis moleculares se realizaron en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del Galapagos Science Center (Universidad San Francisco de Quito - University of North Carolina at Chapel Hill), en la Isla San Cristóbal, provincia de Galápagos. Las muestras de suelo analizadas en el presente estudio fueron colectadas en la Isla Santa Cruz, en dos fincas agroecológicas: 1) “Finca agroecológica Huerta Luna” (HL), ubicada en la parroquia Bellavista, cuya latitud es $00^{\circ}42.507'$, longitud $90^{\circ}19.398'$ y una altitud de 206 msnm; y 2) “Finca Lava Java”, ubicada en la Vía al Cascajo, km 4, latitud S $00^{\circ}42'00''$, longitud W $90^{\circ}18'55,7''$ y una altitud de 183 msnm. Ambas fincas se encuentran en la parte alta de la Isla Santa Cruz (Fig. 2).

Figura 2.

Área de estudio en las islas Galápagos: Isla Santa Cruz (colección de muestras de suelo en dos fincas agroecológicas: Huerta Luna en Bellavista y Lava Java en El Cascajo e Isla San Cristóbal (procesamiento en laboratorio).



Elaboración: José Daniel González MSc. y autora.

Software: RStudio v2022.017.1+554 - "Spotted Wakerobin"

3.2. Condiciones climáticas.

Tabla 1.

Condiciones meteorológicas Bellavista, isla Santa Cruz (Julio,2019) (58).

Parámetro	Promedio
Temperatura	19.3 °C
Humedad relativa	95 %
Precipitación	4.9 mm
Nubosidad	8 octa

3.2. Tipo de investigación.

3.2.1. Línea de investigación.

De acuerdo con la Secretaría de Investigación Ciencia y Tecnología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo el presente trabajo pertenece a la siguiente línea y Sublínea de investigación: Agricultura, Silvicultura y Producción animal. Desarrollo de conocimiento y tecnologías de agricultura alternativa aplicable a las condiciones del trópico húmedo y semihúmedo del Litoral Ecuatoriano.

3.2.2. Trabajo de campo.

Se colectó un total de 24 muestras de suelo: 12 pertenecen a la “Finca Lava Java” y 12 pertenecen a la “Finca agroecológica Huerta Luna”. En cada finca las muestras comprenden tres tratamientos con cuatro repeticiones cada uno (ver Tabla 2). Además, se realizó la georreferenciación de los sitios de toma de muestras mediante un GPS. La vegetación presente al momento de la colecta de muestras en cada tratamiento y finca se encuentra en la Tabla 3.

Tabla 2.

Tratamientos empleados en el análisis de suelo.

Tratamiento	Tipo de suelo
T1	Bosque mixto, parcialmente manejado (Fuente de microorganismos para suelos de cultivo)
T2	Suelo de cultivo (donde se inoculan los microorganismos)
T3	Suelo no manejado que será empleado como control

Tabla 3.

Vegetación presente en los sitios de colecta de muestras.

Tratamiento	Finca	Vegetación
T1	LJ	<i>Hibiscus</i> , <i>Scalesia pedunculata</i> , guaba, plátano verde, café
	HL	Aguacate, café, balsa, cedrela, puma rosa, sauco, guaba, helechos, musgo, maracuyá
T2	LJ	Café, <i>Scalesia pedunculata</i> , guayabillo, cedrela, cereza
	HL	Espinaca, caña de azúcar, ají, ajo, cebolla, arveja, keil dinosaurio, ruda, hiebraluisa, frejol negro, mostaza, matico, cúrcuma
T3	LJ	Café, cedrela, <i>Hibiscus</i>
	HL	Café, balsa, cedrela, laurel, maracuyá

3.2.3. Experimental.

Las muestras recolectadas (alrededor de 1 kg/muestra) fueron transportadas en refrigeración al laboratorio. De la muestra fresca se tomaron 15 ml en un tubo Falcon para su almacenaje a -20 °C y posterior uso en extracción de ADN. El resto de la muestra fue pesado, secado y almacenado. Se realizó una extracción de ADN con el kit DNeasy PowerSoil Pro-Kit de QIAGEN (ver anexo D) de las muestras para luego realizar una PCR del fragmento 16S RNAr (ver primer utilizados en Tabla 4) y finalmente hacer uso del dispositivo de secuenciación portátil MinION y el kit de secuenciación 16S barcoding (SQK-16S024) de Oxford Nanopore Technologies. Este dispositivo generó para este fragmento un aproximado de 200K– 4M de reads (secuencias generadas) por secuenciamiento.

El secuenciador MinION generó archivos FAST5⁵ y archivos FASTQ⁶. Adicionalmente, realiza un basecalling⁷ y demultiplexing⁸. Luego se visualizó la distribución de calidad y tamaño de las muestras con el fin de conocer el resultado de la secuenciación y comprobar

⁵ Datos crudos con información eléctrica, específicos de Oxford Nanopore Technologies.

⁶ Archivos de texto obtenidos a partir del basecalling de los FAST5 - Formato común en secuenciación de ADN

⁷ Asignación de la secuencia de nucleótidos

⁸ Separación de la librería por barcode

si el procedimiento fue exitoso. A partir de esto, se genera una tabla de resultados con el tamaño y calidad promedio a partir de los archivos FASTQ.

Se utilizó Python y R para hacer la limpieza de datos y un control de calidad de la librería (QC). Finalmente se utilizó el 16S workflow del EPI2ME (Oxford Nanopore Technologies) para la identificación de especies. Este software hace búsquedas de las reads en bases de datos mundiales, en este caso GenBank de NCBI. Los archivos que contenían la identificación de cada read fueron importados nuevamente en para los análisis subsiguientes de diversidad.

Tabla 4.

Primers empleados para el secueicamiento del fragmento 16S RNAr.

Primer	SEQ
16S F	5'-TTTCTGTTGGTGCTGATATTGCAGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
16S R	5'-ACTGCCTGTCGCTCTATCTTCCGGTTACCTTGTTACGACTT -3'

3.3. Método de investigación.

3.3.1. Método comparativo.

El método comparativo permitió evaluar las diferencias entre tratamientos para conocer finalmente la efectividad de las técnicas de manejo microbiológicas aplicados. Las comparaciones se realizarán en base a los siguientes criterios: tiempo de las fincas bajo manejo agroecológico y la diversidad existente entre tratamientos.

Tabla 5.

Tiempo de manejo de las fincas al momento de toma de la muestra (Agosto 2021).

Finca agroecológica	Tiempo de manejo orgánico (años)	Tiempo bajo tratamientos con microorganismos (años)
Huerta Luna	40	5
Lava Java	12	1

3.3.2. Método analítico.

Mediante la aplicación del método analítico se logró establecer las causas de la eficiencia de las técnicas de manejo aplicadas y la importancia de los microorganismos para los cultivos agrícolas.

3.4. Fuentes de recopilación de información.

La literatura consultada para el presente trabajo de investigación se basó en libros y artículos científicos.

3.5. Diseño del experimento.

En la presente investigación se realizó la caracterización de especies de microorganismos a partir de las secuencias generadas (reads) mediante un análisis de datos utilizando el software EPI2ME de Oxford Nanopore Technologies (basado en la base de datos de GenBank, NCBI⁹), obteniendo la clasificación taxonómica de cada read por muestra.

Se realizó además una comparación de la diversidad y composición de especies entre tratamientos para conocer el efecto de la inoculación de microorganismos desde los suelos fuente (T1) en los suelos de cultivo (T2). Adicionalmente, se realizó de un PCoA (Análisis de Coordenadas Principales) de la composición de la comunidad de microorganismos para conocer que tan distintas o similares son las comunidades entre tratamientos. El análisis PCoA es un método de análisis de reducción de dimensionalidad de datos no vinculante que se puede utilizar para estudiar la similitud o diferencia de la composición de muestras y observar las diferencias entre individuos o grupos (28).

Además de los resultados de la identificación de especies, el software empleado (EPI2ME) brinda información sobre la proporción de cada tipo de microorganismo por muestra o tratamiento lo cual resulta favorable como un indicador que contribuya a discutir que procesos están sucediendo en los suelos estudiados.

⁹ National Center for Biotechnology Information

Los análisis mencionados se realizaron para cada finca, para conocer, además, si el tiempo de manejo con esta técnica ha tenido un efecto importante. Considerando que la finca Lava Java tiene un año produciendo alimentos bajo el uso de tratamientos con microorganismos, mientras que Huerta Luna llevaba cinco años al momento de toma de la muestra.

3.6. Instrumentos de investigación.

La fase de laboratorio de la presente investigación se realizó en la isla San Cristóbal, Galápagos en las instalaciones del Galapagos Science Center, USFQ. Para lo cual se realizó una extracción de ADN de las muestras colectadas, PCR y secuenciación con los protocolos establecidos para el fragmento 16S y finalmente el análisis de los datos haciendo uso de plataformas bioinformáticas, incluida la propia del dispositivo de secuenciación (MinION).

Para la fase de campo, empezada en la isla Santa Cruz, se tomaron 4 muestras de suelo bulk por tratamiento y, tres tratamientos (total 12 muestras), en dos fincas agroecológicas diferentes. Las muestras fueron colectadas en agosto de año 2021 dentro del componente Microbiomas del proyecto “Barcode Galápagos”, del cual la autora de la presente investigación formó parte desde su inicio en Noviembre del 2020 hasta Abril del 2022.

El proyecto Barcode Galápagos tuvo como objetivo principal la caracterización de la diversidad genética de las islas, para este fin, durante aproximadamente un año se recolectaron muestras de suelo de diferentes islas con el fin de evaluar la diversidad de microbiomas de diferentes suelos y ecosistemas de las islas, muestras de agua marina y dulce para caracterización de eDNA, y de grupos taxonómicos específicos animales (ej. rayas, tiburones) y plantas (ej., mora y *Scalesia*).

3.6.1. Variables por evaluar en la investigación.

- * Diversidad de microorganismos presentes en cada tratamiento y finca
- * Variación de la composición de comunidades microbianas entre tratamiento y finca
- * Variación de diversidad microbiana entre fincas con base al tiempo de manejo agroecológico

3.7. Tratamiento de los datos.

- EPI2ME: plataforma de análisis basada en la nube que proporciona workflows analíticos en tiempo real
- RStudio v2022.017.1+554 - "Spotted Wakerobin"
- Principal Coordinate Analysis (PCoA), índices de diversidad: Ohchibi: Scripts R (Dr. Darío Ramírez)
- Excel

3.8. Recursos humanos y materiales de la investigación.

3.8.1. Recursos humanos.

Los integrantes del presente proyecto de investigación son:

- Tutor de la unidad de titulación: Dr. Camilo Mestanza Uquillas
- Tutores USFQ-GSC: Dra. Diana Pazmiño, MSc. Diego Ortiz, Ing. Agr. Karina Bautista MSc, José Daniel Gonzales BSc. (Hons)
- Dr. Darío Ramírez
- Autora del proyecto de investigación: Daniela Martinez Vargas

3.8.2. Recursos materiales.

Tabla 6.

Recursos materiales empleados.

Materiales de campo	Materiales de laboratorio
Guantes de jardinería	DNeasy PowerSoil Pro Kit -QUIAGEN
Alcohol al 70%	(Kit de extracción)
Pala de mano	MinION (secuenciador)
Papel	Flowcell
Fundas ziplock medianas	Kit de secuenciación - 16S Barcoding Kit
Cooler con hielo	(Nanopore protocol)
GPS	MM Taq polimerasa
	Pipetas, puntas
	Centrífuga
	Termociclador
	Cámara de electroforesis y visualización
	Cámara de bioseguridad

3.8.3. Presupuesto

Tabla 7.

Recursos materiales de campo.

Material o equipo	Valor (\$)
Guantes de jardinería	3.00
Alcohol al 70%	5.00
Pala de mano	5.00
Papel	0.50
Fundas ziplock medianas	10.00
Cooler con hielo	25.00
GPS	70.00

Nota: Los materiales y algunos equipos usados son propiedad del Proyecto “Barcode Galápagos” y otros del Galapagos Science Center-USQ, Laboratorio de Microbiología y biología molecular.

Tabla 8.

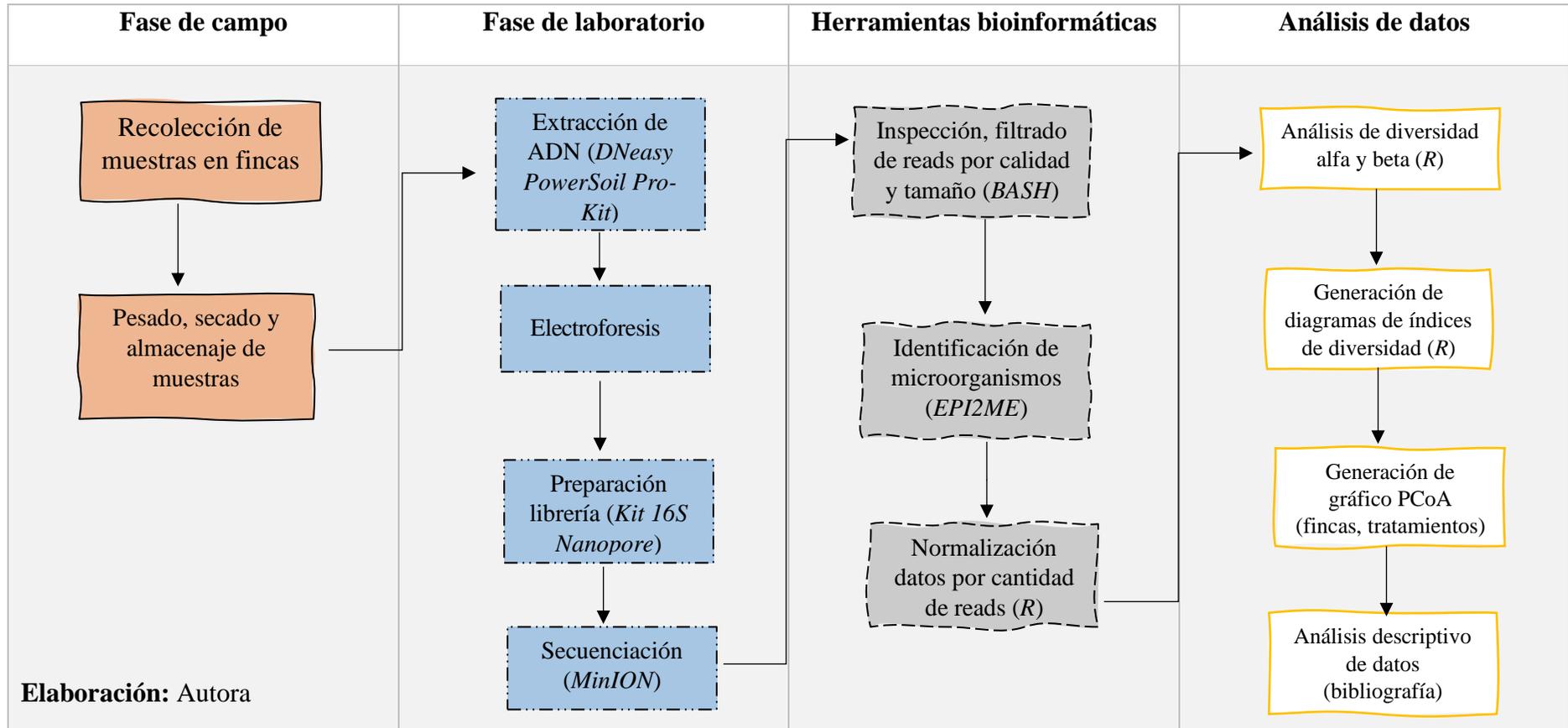
Recursos materiales de laboratorio.

Material o equipo	Valor (\$)
DNeasy PowerSoil Pro Kit	1,600.00
MinION (secuenciador)	5,000.00
Kit de secuenciación	8,000.00
Flowcell	700.00
Máster mix Taq polimerasa	600.00
Pipetas, puntas (0.5-10uL, 10-100uL, 100-1000uL)	200.00

3.9. Diagrama de flujo metodológica.

Figura 3.

Diagrama de flujo de la metodología de la investigación



CAPÍTULO IV.
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados y discusión.

4.1.1. Resultados de la secuenciación de las muestras de suelo.

La secuenciación de muestras de microbioma de suelos de las fincas agroecológicas, empleando el fragmento 16S, generó 5'254,032 secuencias (reads), con un promedio de 218,918 secuencias por muestra. Huerta Luna (HL) posee una suma total de 2'626,312 secuencias y un promedio de 218,859.33 por muestra. El T1 (bosque) de Huerta Luna obtuvo un total de 956,517 secuencias y un promedio de 239,129.25 por muestra; en T2 (cultivo) un total de 1'391,250 secuencias y un promedio de 347,812.5 por muestra y en T3(control) un total de 278,545 secuencias y un promedio de 69,636.25 por muestra.

Por su parte Lava Java obtuvo un total de 2'627.720 secuencias y un promedio de 218,976.67 por muestra. De estas, 466,699 secuencias pertenecieron a T1, con un promedio de 116,674.75 por muestra. T2 obtuvo 789,890 secuencias con un promedio de 197,472.5 secuencias por muestra. Finalmente, T3 obtuvo 1'371,131 secuencias y un promedio por muestra de 342,782.75.

4.1.2. Abundancia relativa por tratamiento a nivel de Filo de bacteria y arquea.

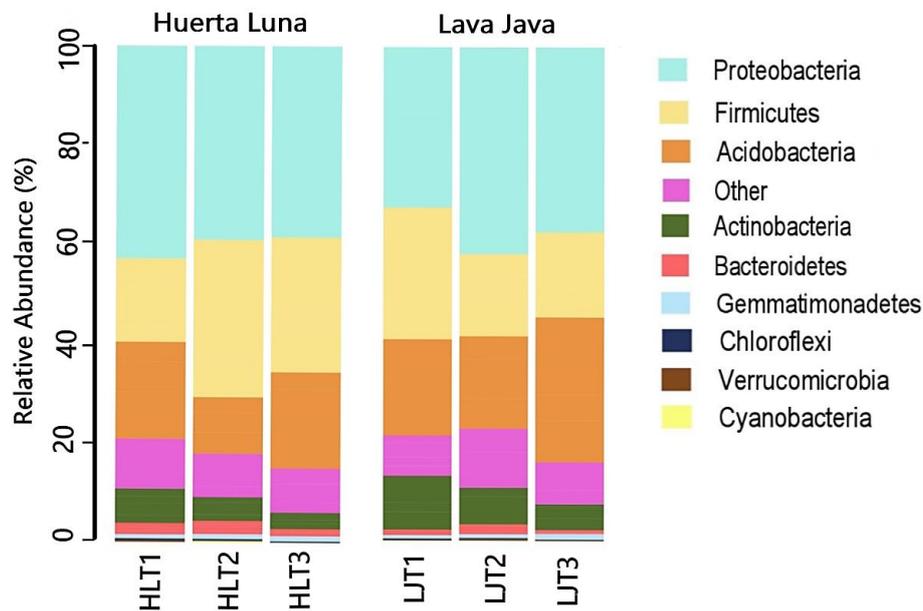
La abundancia relativa por tratamiento a nivel de filo de bacteria y arquea con abundancia mayor a 0.05 en las fincas agroecológicas Huerta Luna y Lava Java se muestra en la Figura 4. El gráfico de barras señala las composiciones microbianas de los 10 fillos principales encontrados entre tratamientos. El eje horizontal representa los distintos tratamientos; mientras que el eje vertical representa la abundancia relativa de los diferentes fillos. Diferentes colores representan diferentes fillos bacterianos.

El filo Proteobacteria (color celeste) es el más abundante en todas las muestras y tratamientos en ambas fincas. Esto es, corroborado a nivel mundial en estudios que reportan este filo como el más abundante, puesto que contiene alrededor del 30% del número total de especies bacterianas (59). Este filo bacteriano posee una enorme diversidad de características morfológicas y fisiológicas, comprendiendo la mayoría de las bacterias Gram negativas de uso agrícolas como *Bradyrhizobium*. Además de bacterias que participan en los ciclos del carbono, el azufre y el nitrógeno, el filo incluye también bacterias fototróficas (organismos que obtienen

energía de la luz) y no fototróficas, bacterias aeróbicas y anaeróbicas (59). En las dos fincas existe similitud en la abundancia relativa para este filo.

Figura 4.

Abundancia relativa por tratamiento agrupadas a nivel de Filo de bacteria y arquea con abundancia mayor a 0.05 en las fincas agroecológicas Huerta Luna y Lava Java en Galápagos, Ecuador.



A nivel regional, un estudio realizado en suelos asociados a la rizosfera de *Mortino* (*Vaccinium Floribundum* Kunth) en los páramos de Ganquis y Cubillín de la Provincia de Chimborazo – Ecuador (Arcos-Torres et al.), reveló mediante un análisis metagenómico de la población microbiana que el filo Proteobacteria fue el más abundante (53.3%), seguido de Bacteroidetes (26.67%); Actinobacteria (13.33%) y Firmicutes (6.67%) (Arcos-Torres et al.). Este estudio coincide con la presente investigación al señalar al filo proteobacteria como el más abundante ($\approx 40\%$). Otro filo que tuvo similitud entre ambos estudios fue Actinobacteria con un $\sim 7\%$ en esta investigación (60). La similitud entre estudios posiblemente se deba a que ambos fueron realizados en suelos poco intervenidos y de origen volcánico.

Por otro lado, hubo una notable diferencia entre el estudio de Arcos-Torres et al. (60) y el presente (Galápagos) en la abundancia de Firmicutes que fue mayor ($\approx 20\%$) y Bacteroidetes cuya abundancia fue baja ($\approx 2\%$) en ambas fincas. Estas diferencias pueden deberse a la diferencia de alturas, puesto que el presente estudio fue realizado en las Islas Galápagos (200 msnm), mientras que el estudio en comparación fue realizado en el páramo (3,857 msnm).

Las muestras colectadas para el presente estudio han sido tomadas de fincas agroecológicas, por tanto, la incidencia de reactivos sintéticos ha sido casi nula, considerando además que el tratamiento T1 (fuente de microorganismos) es un bosque mixto y poco intervenido, por lo cual alberga gran diversidad de flora nativa de las islas. Esto coincide con el páramo en estos términos puesto que, León-Yáñez (2011) (61), sugiere que son alrededor de 1,500 especies vegetales las cuales habitan en los páramos en Ecuador, lo que convierte, en relación con su tamaño, el país con la flora más diversa de la región andina para este ecosistema. En este sentido, el suelo de las fincas agroecológicas y el páramo coinciden en sus filos más abundantes (incluyendo el más abundante en ambos casos) probablemente debido a su alta diversidad vegetal.

Existe además un estudio desarrollado por investigadores del IVIC¹⁰, INABIO¹¹, Universidad Espíritu Santo, y Universidad de Chile, el cual determinó que la diversidad bacteriana en el suelo aumenta con la presencia de plantas invasoras, específicamente plantas herbáceas que generan sustancias alelopáticas en ecosistemas forestales de zonas templadas. Proporcionaron evidencia de que las plantas invasoras afectan la biota del suelo de manera diferente (62). En este sentido, cabe señalar que en las fincas agroecológicas ha prevalecido el comportamiento orgánico de la naturaleza y por tanto existe una gran diversidad de flora nativa en sus predios.

Una vez más en términos de diversidad microbiana, se comprueba que existe relación directamente proporcional en suelos que poseen más vegetación. Una posible explicación de esto es que al poseer cobertura vegetal la capa superficial del suelo es capaz de albergar mayor humedad, favoreciendo así la propagación de microorganismos, además, luego de cumplir su ciclo de vida, estas plantas se transforman en materia orgánica útil para los microorganismos.

Una alta diversidad de flora vascular puede mejorar la productividad primaria neta, lo que aumenta la entrada de carbono al suelo, debido al uso más eficiente de los nutrientes, y a la rotación más rápida de la biomasa vegetal que produce una mayor exudación radicular, que puede afectar positivamente a la comunidad microbiana (63) (64).

Zapata (65) en su estudio denominado “Caracterización del microbioma en el cultivo de banano (*Musa × paradisiaca* L.) bajo sistema de producción orgánico y convencional” reveló que, el tipo de manejo agrícola tiene un efecto significativo sobre la composición microbiana. Señaló

¹⁰ Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas

¹¹ Instituto Nacional de Biodiversidad

además que el filo Proteobacteria y Bacteroidetes están mayormente enriquecidos en el suelo y rizósfera orgánica, mientras que se detectó un aumento de miembros de los filos Acidobacteria y Actinobacteria en el manejo convencional (65).

Estos resultados coinciden en parte con lo esperado en base al estilo de vida de estos microorganismos, pues se considera que los filos Proteobacteria, Bacteroidetes y Actinobacteria son principalmente copiotróficos (66), es decir, crecen rápido en ambientes ricos en nutrientes como es el manejo orgánico. Mientras que, Acidobacteria es considerado principalmente oligotrófico, es decir que crecen lento en ambientes pobres en nutrientes (66), por lo que se espera que se encuentren enriquecidos en el manejo convencional (65).

En concordancia con el presente estudio, donde el filo Proteobacteria es el más abundante, Zapata (65) sugiere que el suelo de las fincas debe la presencia de este grupo de bacterias a su alto contenido de materia orgánica. Sin embargo, existe una leve diferencia entre la abundancia de este filo entre tratamientos dentro de cada finca. En Huerta Luna se evidencia mayor abundancia de Proteobacterias en el T1 (bosque mixto-fuente de microorganismos), mientras que, en contraste, en Lava Java el T1 es el que posee el nivel más bajo de este filo. Esto podría explicarse debido a la diferencia de tiempo que poseen las dos fincas con manejo agroecológico o a los diversos tipos de vegetación que estuvieron presentes en la toma de la muestra. El tratamiento T1 en Huerta Luna registró una vegetación más variada al momento de colectar las muestras en comparación con Lava Java (ver Tabla 3).

Aunque el tiempo de manejo y el tipo de vegetación presentes en cada finca parecen ser los factores más importantes que podrían explicar diferencias entre fincas, otro factor adicional es la altitud. Huerta Luna se encuentra ubicada en la parroquia Bellavista a una altitud de 206 msnm, mientras que Lava Java posee una altitud de 183 msnm. Los cambios en altitud generan una ordenación de las formaciones vegetales en pisos, ya que a mayor altitud aumentan las precipitaciones y desciende la temperatura lo cual también podría influir en los ecosistemas subterráneos.

Un estudio completo de la diversidad de Acidobacterias del suelo mediante pirosecuenciación, en el cual recolectaron un total de 87 suelos únicos que representan una amplia gama de características del suelo y del sitio en toda América del Norte y del Sur, cerca del pico de la temporada de crecimiento de las plantas evidenció que, en todos los suelos, las acidobacterias representaron el 30.9 % de todas las secuencias bacterianas clasificadas detectadas (67). Este

resultado coincide con la presente investigación, en la cual se ha obtenido alrededor del 20-30% de Acidobacteria, lo cual sugiere que el suelo de las fincas se encuentra dentro del rango “normal”.

Otro de los filos más abundantes dentro del presente estudio es Firmicutes ($\approx 20\%$). Las bacterias de este filo participan en el proceso de reducción de sulfatos en el suelo, siendo que pueden oxidar compuestos de carbono a través de esta vía, incluyendo la reducción de sulfato (SO_4^{2-}) a sulfuro (S^{2-}) a través de sulfito (SO_3^{2-}) en una reacción de disimilación¹² (68). Este proceso es particularmente importante en suelos agrícolas debido a que, según Narayan, et al. (69), el azufre es uno de los nutrientes esenciales que se requiere para el adecuado crecimiento y desarrollo de las plantas.

La mayor parte del azufre en el suelo está presente en la materia orgánica y, por lo tanto, no es accesible para las plantas si no se reduce a sulfato (SO_4^{2-}) ya que esta es la principal fuente de azufre para las plantas considerando además que este elemento generalmente está presente en cantidades mínimas en el suelo. Cabe señalar que es soluble en agua, por lo que se filtra fácilmente del suelo (69).

El proceso de absorción de azufre para las plantas ocurre directamente del suelo mediante el uso de transportadores de sulfato propios de las plantas. Sin embargo, las plantas también utilizan organismos asociado simbióticamente, como bacterias y hongos, para absorber azufre del suelo, especialmente en condiciones de agotamiento de azufre. La deficiencia de azufre conduce a un crecimiento atrofiado de las plantas y, en última instancia, a la pérdida de rendimiento (69).

Es necesario señalar esto debido a que, como es mencionado por Narayan, et al. (69) y la FAO (68), el proceso de absorción y síntesis del azufre del suelo para su aprovechamiento por las plantas es en gran medida producto del trabajo de microorganismos del suelo. Este es solo un ejemplo de lo que ocurre con distintos elementos que la planta necesita para su correcto desarrollo y crecimiento, de tal manera que, proteger la microbiota del suelo debido a sus funciones reguladoras y más, es un factor que no debe ser ignorado. Un correcto manejo del suelo es capaz de preservar estos organismos tan necesarios dentro del proceso alimentario humano.

¹² Conversión de sulfato en oxidación de sulfuro de un donante de electrones para la conservación de energía que posteriormente se utiliza para el crecimiento y el mantenimiento (94).

Un estudio denominado “Efecto de las diferentes prácticas de agricultura sobre las comunidades bacterianas en suelos del Valle del Yaqui” en el cual se investigó el efecto de tres diferentes prácticas agrícolas: sistemas de labranza, manejo de residuo y aplicación de fertilizante N (0 o 300 kg N/Ha) obtuvo que los taxones indicadores para los tratamientos de camas permanentes con labranza cero fueron principalmente miembros de Actinobacteria (*Actinomyces*, *Clavibacter*, *Mycobacterium*, *Sphaerisporangium*) (70). Otro estudio donde la abundancia relativa de Actinobacteria incrementó en los sistemas de labranza cero se ubica en un campo experimental del CIMMYT ubicado en el altiplano central de México (71).

Dentro del presente estudio, exceptuando el grupo de otros filos con abundancia < 0.05% (“other”), el filo Actinobacteria es el cuarto más abundante y su presencia dentro del grupo de muestras puede resultar como un indicador de buenas prácticas agrícolas, en este caso la mínima intervención mecánica en el suelo de las fincas. En estudios llevados a cabo en otros agroecosistemas se evidenció que la labranza es la práctica agrícola que más afecta la estructura de las comunidades bacterianas (72).

Los sistemas de cero labranza mantienen el suelo cubierto con residuos del cultivo, resultan en menos erosión que los sistemas de labranza convencional ya que el mantener una cobertura permanente del suelo sirve como una protección física contra los efectos del sol, la lluvia y el viento; maximiza la infiltración de agua mediante la formación de una barrera física y mejora la estructura física del suelo. Del mismo modo, mejoran la aireación del suelo, reducen las fluctuaciones de temperatura y humedad, incrementan el contenido de carbono en la superficie del suelo, reducen la compactación en la zona de las raíces y permite a los agricultores usar prácticas variadas de herbicidas y fertilizantes (73).

Según la Figura 4, el filo Cyanobacterias es el menor dentro del top 10 de los filos más abundantes, sin embargo, el que aparezca como filo principal entre todos los que se han obtenido del presente estudio (31 en total) es un excelente indicador de un suelo sano puesto que

Según un estudio de Chamizo et al. (2018) donde se inoculó dos especies de cyanobacterias: *Phormidium ambiguum* (no fija N) y *Scytonema javanicum* (fija N), en suelos de diferente textura (desde franco limoso hasta arenoso) y se exploró la evolución de las propiedades fisicoquímicas del suelo durante tres meses en condiciones de laboratorio se evidenció que *S. javanicum* promovió un mayor aumento en el contenido total de C orgánico y N total y que *P. ambiguum* fue más eficaz para aumentar el contenido total de exopolisacáridos (EPS) y la

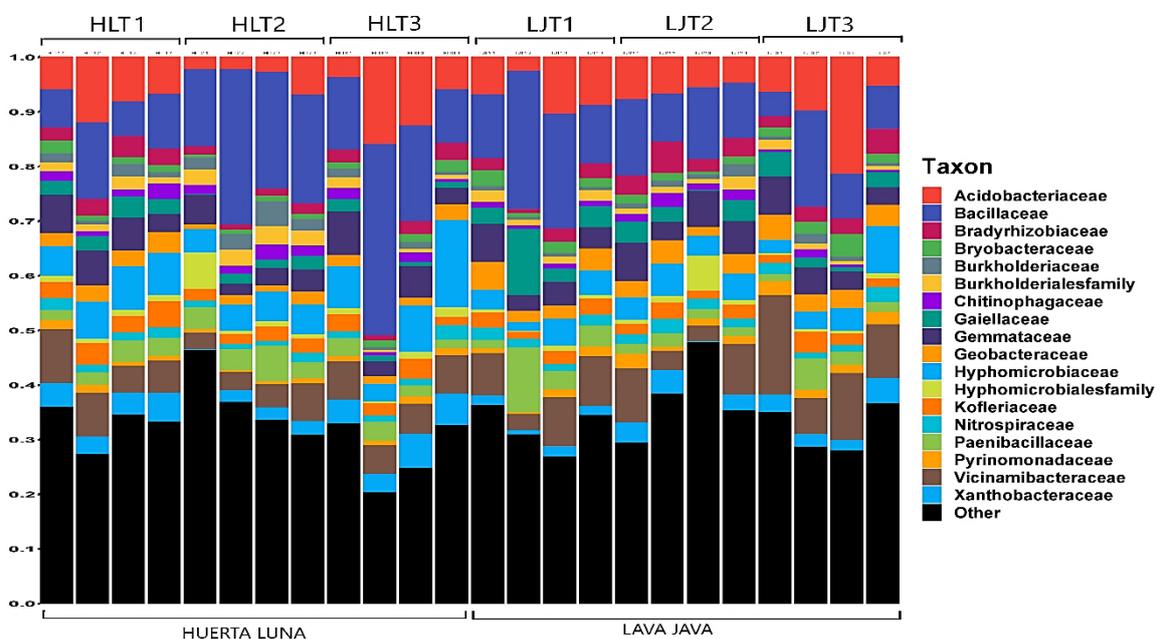
resistencia a la penetración del suelo. Se obtuvo además una mejora en la fertilidad del suelo en comparación con los suelos no inoculados en suelos arenosos y limosos, que originalmente tenían la fertilidad más baja. En general, la mejora en la fertilidad y estabilidad del suelo respalda la viabilidad del uso de cianobacterias para restaurar suelos áridos degradados (74). Este grupo de bacterias que se encuentran presentes en las fincas agroecológicas puede ser empleada para su inoculación en suelos poco fértiles como los empleados en el estudio de Chamizo et al. y futuros esfuerzos en las fincas agroecológicas de Galápagos podrían enfocarse en incrementar la proporción de este filo en sus suelos.

4.1.3. Abundancia relativa por tratamiento a nivel de Familia de bacteria y arquea.

La abundancia relativa por tratamiento agrupadas a nivel de familia de Bacteria y Arquea con abundancia mayor a 0.05 en las fincas agroecológicas Huerta Luna y Lava Java se muestra en la Figura 5. El gráfico de barras señala las composiciones microbianas de las 20 familias principales entre las 24 muestras de suelo. El eje horizontal representa las distintas muestras y respectivos tratamientos por finca; mientras que el eje vertical representa la abundancia relativa de los diferentes familias. Diferentes colores representan diferentes familias bacterianas.

Figura 5.

Abundancia relativa por tratamiento agrupadas a nivel de familia de Bacteria y Arquea con abundancia mayor a 0.05 en las fincas agroecológicas Huerta Luna y Lava Java en Galápagos, Ecuador.



En general, la familia más abundante en todas las muestras y tratamientos pertenece al filo Firmicutes; la familia *Bacillaceae* (azul marino). Los miembros de la familia *Bacillaceae* se encuentran entre las bacterias más fuertes de la Tierra, lo que se debe principalmente a su capacidad para formar endosporas resistentes. Bacterias de esta familia desempeñan funciones fundamentales en la ecología del suelo como el ciclo de la materia orgánica, en la salud de las plantas y la estimulación del crecimiento, por ejemplo, mediante la supresión de patógenos de las plantas y la solubilización de fosfato (75).

Debido a su capacidad para formar endosporas que brindan alta resistencia al calor, la radiación, los productos químicos y la sequía, estas bacterias pueden sobrevivir en condiciones adversas durante un período prolongado de tiempo (75). El género *Bacillus*, se encuentra dentro de esta familia y es actualmente el género más diverso dentro de *Bacillaceae*, con al menos 226 especies (76). Este género presenta una amplia diversidad metabólica involucrada en el control biológico de fitopatógenos, es así como, actualmente, diversas formulaciones comerciales cuentan como ingrediente activo cepas del género *Bacillus*, para su aplicación en campo, mitigando a fitopatógenos e indirectamente promoviendo el crecimiento vegetal con la mejora de la salud de la planta (77).

Bacilos como *B. subtilis*, *B. cereus*, y *B. mycooides* son conocidas por sus funciones como rizobacterias beneficiosas que promueven el crecimiento de las plantas (biofertilizantes) o protegen las plantas de los patógenos de las plantas (bioplaguicidas) (76). Gran parte de los integrantes del género *Bacillus* son saprófitos heterótrofos aerobios (78), son capaces de degradar una gama de sustancias carbonosas poliméricas. Por lo tanto, estos organismos pueden prosperar en microhábitats donde el carbono y el nitrógeno no están muy limitados. Se sabe que varios miembros del género *Bacillus* son habitantes típicos de los llamados puntos calientes de actividad microbiana en hábitats terrestres, por ejemplo, donde abunda la materia orgánica (79).

Es importante reconocer a importancia de esta familia de bacterias debido a sus grandes aportes dentro de la salud y mantenimiento del suelo, lo cual provee una posible explicación para la mejora observada en la producción de cultivos en ambas fincas agroecológicas estudiadas en Galápagos. La presencia de estos microorganismos (*Bacillaceae*) en el suelo de las fincas puede ser un indicador de la calidad del suelo que se encuentra en ellas. De manera particular, en el T3(control) de la finca Huerta Luna se evidencia en la réplica 2 una diferencia significativa de esta familia en comparación a las demás muestras, abarcando

aproximadamente un 40% del total de la muestra. Esto puede ser debido a que las muestras del tratamiento 3 fueron tomadas de una zona no manejada, lo cual parece reflejar condiciones naturales del suelo de la isla.

Existen informes donde se evidencia que varios endófitos, como *Bacillus* y *Paenibacillus* (también abundante dentro del presente estudio), inhiben los fitopatógenos del suelo de los cultivos de leguminosas mediante la producción de sideróforos, enzimas hidrolíticas, antibióticos y cianuro de hidrógeno (80). Esto puede sugerir que los tratamientos empleados en las fincas son capaces de mantener un suelo más equilibrado y con menos prevalencia de enfermedades en los cultivos. La familia *Paenibacillaceae*, muestra mayor abundancia en la muestra LJT1-2, perteneciente a Lava Java, lo cual puede ser explicado debido a que la muestra pertenece al T1, correspondiente a bosque mixto con poca intervención.

Otra familia particularmente abundante dentro de todas las muestras es *Acidobacteriaceae* (color rojo), una de las tres familias del filo Acidobacteria. Diversos estudios develan la capacidad de estas bacterias de degradar una amplia gama de compuestos de carbono simples, así como polisacáridos vegetales y microbianos, incluida la celulosa. Dos géneros de esta familia son anaerobios facultativos; el resto son quimioheterótrofos¹³ aerobios (81). Existen además estudios donde se observaron diferencias en el crecimiento y la diversidad de varios taxones de *Acidobacteriaceae* cuando se añadió carbono fácilmente oxidable o polímeros vegetales como sustratos en los enriquecimientos de suelos agrícolas (82). Otro estudio evidenció que el total de Acidobacterias disminuyó significativamente en los suelos de cultivo enmendados con fertilizantes inorgánicos (83). Los miembros de la subdivisión 1 también fueron significativamente menos abundantes en los suelos de tundra ácida enmendados con nitrógeno inorgánico (84).

La información anterior es de particular importancia dado en enfoque ecológico de la presente investigación, donde dos fincas agroecológicas fueron empleadas como modelo de sustentabilidad. El tiempo de las fincas con manejo orgánico ha contribuido a que bacterias benéficas, como son las de esta familia *Acidobacteriaceae* se encuentren en altas proporciones dentro del sistema productivo a través de los tratamientos.

Generalmente, las Acidobacterias se asocian con ambientes ácidos, no obstante, dentro del presente estudio se ha encontrado en buena proporción, la primera familia dentro de

¹³ Organismos que utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía.

sd6 *Acidobacteria*, las *Vicinamibacteraceae* (85). Los miembros de esta familia son aeróbicos, neutrofílicos, psicotolerantes a los quimioheterótrofos mesófilos (85). Según diversos análisis del cultivo de comunidades microbianas en todo el mundo, las acidobacterias sd6 prevalecen en suelos con pH neutro (86) (67).

Según Jones, et al., el pH del suelo regula fuertemente la abundancia de *Acidobacteria* (en relación con todas las bacterias) en comunidades individuales (67). Además, un estudio encontró que la disponibilidad de carbono orgánico era el mejor predictor de la abundancia de *Acidobacteria* en los suelos (66). Esto concuerda con el análisis físico - químico de suelo realizado en Huerta Luna, el cual reporta un pH neutro con un valor correspondiente a 6.9 y un nivel de materia orgánica muy bueno (4.73%). Estos valores han aumentado progresivamente con el paso de los años para HL y es posible que, en la actualidad con las mejoras implementadas por la finca, se encuentren en mejores condiciones aún (Bautista K., com. pers.).

Es importante señalar, además, que para la abundancia relativa por familia, el grupo de otras ("other") se ha presentado como el más abundante, en algunos casos abarcando más el 50% del total de la muestra (ver Figura 5). Esto supone una gran diversidad de otras familias, pero con abundancias muy bajas.

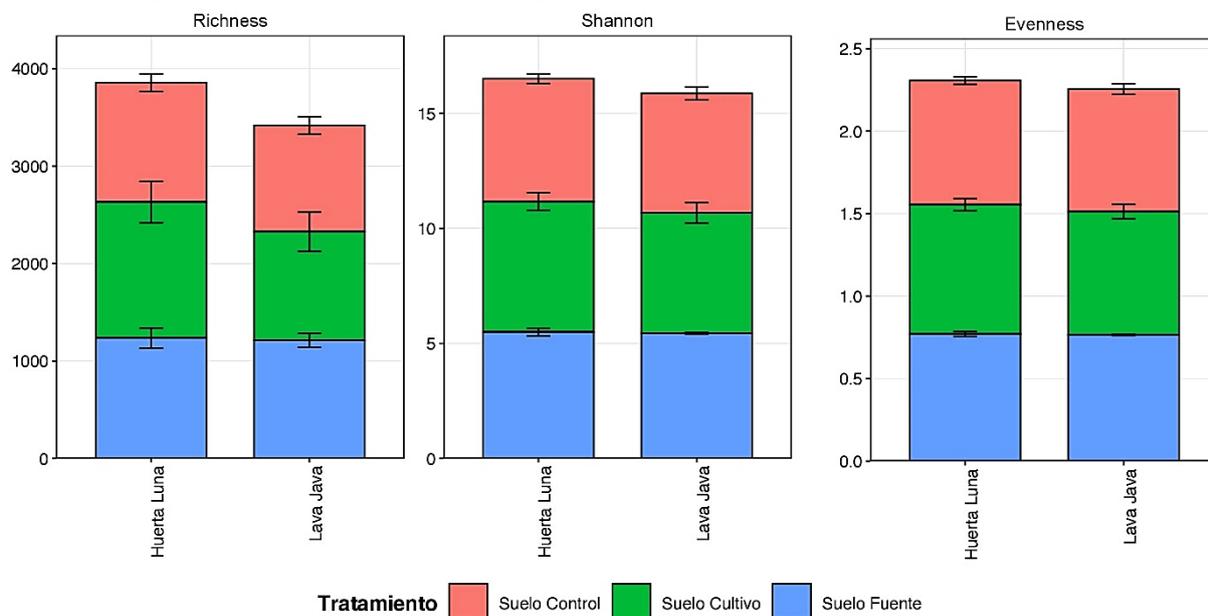
4.1.4. Diversidad.

4.1.4.1. Diversidad alfa (α).

La riqueza y los índices de Shannon, Chao1, InvSimpson y de uniformidad fueron estudiados en dos diferentes niveles: a nivel de fincas y a nivel de tratamientos. La figura 6 muestra la estimación de la riqueza, y los índice de Shannon y uniformidad de especies a nivel de fincas por el método de diagrama de caja. Las líneas horizontales divisorias de la caja indican la media de cada tratamiento, su margen inferior y superior representan los cuartiles 25% y 75% respectivamente y los bigotes determinan el límite para la detección de valores atípicos.

Figura 6.

Diagrama de caja de los índices de diversidad alfa para: riqueza (Richness), Shannon y Uniformidad (Evenness) para los tres tratamientos estudiados en las fincas Huerta Luna y Lava Java en Galápagos, Ecuador.



Según los índices de diversidad presentados a nivel de finca, no se observa diferencia significativa entre fincas cuanto a los índices de uniformidad y Shannon, lo cual sugiere una abundancia relativa muy similar con respecto a la proporción de especies de microorganismos por tratamiento y finca. Sin embargo, el índice de riqueza (Richness) muestra un mayor número de especies para Huerta Luna, como también se puede corroborar en la Tabla 9. Esta diferencia probablemente sea ocasionada por la historia de manejo en cada finca previo a incorporar un modelo de manejo orgánico. Lava Java mantuvo un manejo convencional por un tiempo considerable, a diferencia de Huerta Luna que en ha sido una finca agroecológica y con la mínima intervención en toda su extensión durante un tiempo significativo (i.e., 40 años). Pese a esto, la diferencia no es grande puesto que un año previo a la colecta de muestras para el presente estudio, LJ comenzó a aplicar un manejo mucho más consiente en su suelo.

Tabla 9.

α - diversidad por finca.

FINCA	Richness	Chao1	Shannon	invSimpson	Evenness
Huerta Luna	1,285.42	1,687.39	5.10	59.62	0.77
Lava Java	1,139.17	1,733.08	4.07	58.51	0.75

Se reportan diferencias numéricas entre fincas, Huerta Luna muestra los valores más altos en todos los índices de diversidad (Tabla 9). Sin embargo, adicional al tiempo de manejo orgánico, existen otras diferencias entre fincas como la localización y altitud. Huerta Luna, ubicada en la Parroquia Bellavista, se encuentra a una mayor altitud que Lava Java. Según Gentry (1988), entre los factores que determinan la riqueza de especies se encuentra la ubicación geográfica, variaciones de temperatura, precipitación, disponibilidad de luz, tipo de suelo, las cuales son muy variables de un lugar a otro (87).

Según Espinoza (49), el índice de Shannon (H) normalmente toma valores entre 1 y 4.5. Valores encima de 3 son típicamente interpretados como “diversos” (49), como es el caso de la presente investigación al tratarse de suelos con manejo orgánico. La Tabla 9 indica que la diversidad de especies para la finca Huerta Luna muestra valores de 5.10 (H), mientras que para Lava Java fue 4.07 07 (para índice de Shannon), y valores de uniformidad de 0.77 y 0.75 respectivamente.

Otros estudios muestran mayores índices de diversidad en suelos sujetos a manejo orgánico comparados con manejo convencional. En un estudio realizado por la Universidad Autónoma Metropolitana (México) se tomaron muestras de suelo bajo dos prácticas agrícolas diferentes: un *sistema convencional* (labranza normal, remoción de residuos de cultivos, aplicación de fertilizantes inorgánicos y aplicación de herbicidas y monocultivo de maíz) y el suelo de un *sistema de milpa orgánica* (labranza cero, retención del 100% de los residuos de los cultivos, aplicación de fertilizantes orgánicos, manejo de malezas y rotación de maíz, calabaza y frejol), durante tres años (88).

En este estudio se obtuvo para el estimador de riqueza Chao1 en el sistema convencional un valor de 2,308 mientras que en milpa orgánica 2,660. Un índice de Shannon de 8,993 en manejo convencional y en milpa orgánica 9,432 (88). El aumento de la materia orgánica del suelo debido a la adición de fertilizantes orgánicos, la retención de los residuos de los cultivos y el laboreo mínimo incrementó la actividad microbiana del suelo, como lo demuestra su estudio, siendo el sistema de milpa orgánica el que obtuvo una mayor diversidad microbiana, corroborando así la eficiencia del uso de un manejo orgánico en el suelo en comparación al convencional.

En el presente estudio se han obtenido una media de valores de 5.10 y 4.07 para el índice de Shannon en la finca HL y LJ respectivamente, mientras que para Chao1 se obtuvo 1,687.39

y 1,733.08. Sin embargo, en la Tabla 10, donde se muestran los valores obtenidos por tratamiento, se observan valores, en Chao1 de 2,209.76 para el T1 en LJ y un índice de Shannon de 5.67 para el tratamiento 2 de HL. Revelando así diferencias entre los tratamientos puesto que de manera individual algunos tratamientos influyen más sobre la media que otros.

En este sentido, si bien es cierto que en el presente estudio se han obtenido valores de diversidad más bajos en comparación al estudio por Moreno- Espíndola, et al (2018) (88), es importante considerar la diferencia de factores ambientales y geográficos. El presente estudio fue realizado en un suelo volcánico, donde a partir de los 120 msnm hasta los 450 msnm (dentro de la zona agrícola), se encuentran suelos con espesores de hasta 1 m, con una textura arcillosa y en algunos casos franco limosa a arenosa fina (89). Sin embargo, las fincas agroecológicas han logrado con sus técnicas de manejo aprovechar y mejorar este suelo de la mejor manera, lo cual es evidenciado en la presencia de grupos de bacterias de importancia en suelos saludables.

A nivel de diversidad por tratamiento, la Figura 7 muestra la estimación de la riqueza de especies, el índice de Shannon y Chao1 por el método de diagrama de caja. La línea horizontal divisoria de la caja indica la media, su margen inferior y superior representan los cuartiles 25% y 75% respectivamente y los bigotes determinan el límite para la detección de valores atípicos. Los valores atípicos están representados por un punto.

Un estudio realizado por Balón y Vera en las islas, denominado “Análisis de fertilidad de los suelos agrícolas de las Islas Galápagos - Santa Cruz, San Cristóbal, Isabela y Floreana”, reveló que el uso agrícola intensivo ha reducido fuertemente la biomasa microbiana del suelo de las islas. Según los autores, esto fue relevado por la disminución del carbono orgánico disuelto en suelos agrícolas por los efectos tóxicos de los agroquímicos. Adicionalmente, encontraron que en las cuatro islas habitadas de Galápagos el uso de agroquímicos (herbicidas, fungicidas e insecticidas), representa una práctica agrícola extendida y de uso frecuente (90).

Considerando los resultados presentados en este estudio, los antecedentes de la fertilidad del suelo en Galápagos (90) y el estudio realizado por Moreno- Espíndola, et al., (88), es posible sugerir que las malas prácticas agrícolas en los suelos de las islas en general podrían derivar en una diversidad de microorganismos mucho más baja que la de las fincas agroecológicas, ocasionando así una menor productividad agrícola y un mayor impacto ambiental. Sin

embargo, un estudio como el presente, en suelos bajo manejo convencional puede ser un gran aporte para la comparación de las técnicas de manejo agrícolas y futuras tomas de decisiones.

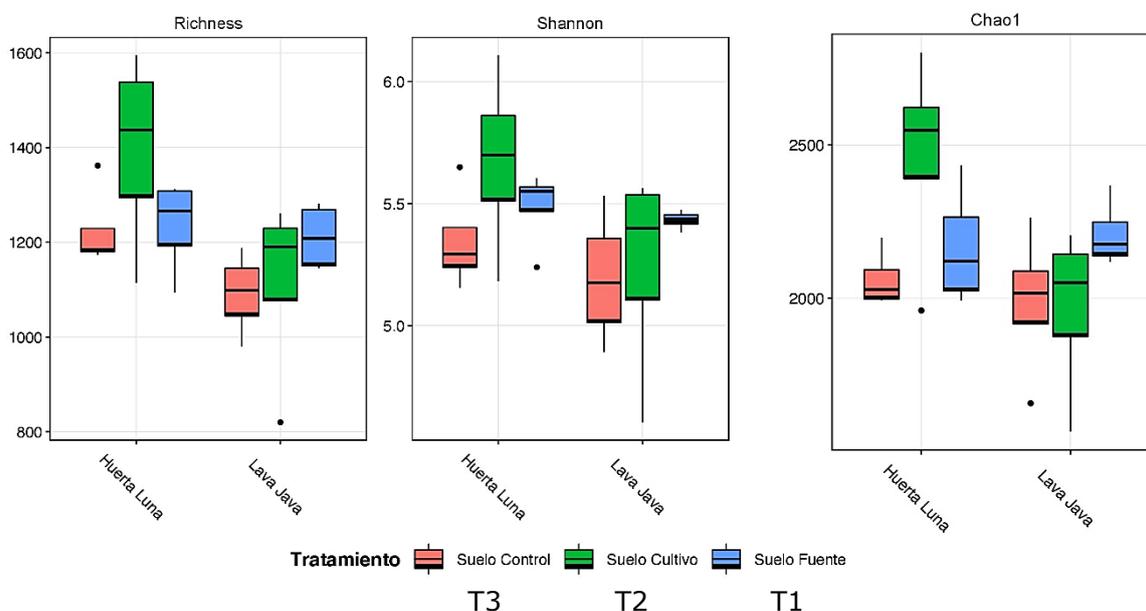
Según el libro técnico “Productividad y sostenibilidad de los sistemas de producción agropecuaria de las islas Galápagos-Ecuador” (INIAP, 2019). A nivel de Galápagos los organismos e instituciones de investigación alrededor del tema de suelos y agua, no han generado ningún tipo de investigaciones que demuestren con bases técnicas y científicas la cuantificación de las pérdidas de suelo (91).

Por tanto, se debería impulsar investigaciones que se encaminen a mantener y mejorar la capacidad productiva de los suelos para la producción de los cultivos predominantes en cada isla como el presente estudio; reducir la degradación, mediante la implementación de prácticas mecánicas y agronómicas de conservación de suelos; evaluar la pérdida de suelo bajo diferentes sistemas de manejo; evaluar el manejo de nutrientes por sitio específico, bajo sistemas de labranza mínima, reducida o cero; y estimar los pools y flujos de carbono en los suelos, que permitan mantener la humedad del suelo, y establecer su importancia en la cantidad total de carbono en el suelo (91). Por ser las zonas de las islas de alto valor social y ecológico, se recomienda actividades de conservación, control de especies invasoras, monitoreo ecológico, monitoreo y reintroducción de especies nativas y endémicas propias de cada isla, y creación de zonas ecológicas (91).

Los distintos tratamientos están representados por los colores rojo, verde y azul, estos representan los tratamientos T3, T2 y T1 respectivamente (ver Tabla 2). Para lo cual, como consta además en la Tabla 10, se evidencia que para la finca Huerta Luna, los índices de Riqueza, Shannon, Chao1 y uniformidad (evenness) del T2 (suelo de cultivo) son los más altos en comparación a los demás tratamientos, mientras que InvSimpson fue mayor en el T1 que es el suelo fuente. Obtener los valores más altos en el suelo de cultivo de HL, probablemente no fue lo esperado. Sin embargo, es algo favorable para las plantas allí establecidas puesto que se ven beneficiadas de un suelo altamente diverso y con menos posibilidades de afecciones por patógenos en general, por lo ya mencionado en el análisis de abundancia relativa y las familias encontradas en este estudio. Esto posiblemente haya sido ocasionado por las distintas labores culturales y manejo empleado en el suelo de cultivo especialmente a fines de tener una mayor producción de manera orgánica.

Figura 7.

Diagrama de caja de los índices de diversidad alfa de Riqueza, Shannon y Chao 1 para las muestras de suelo agrupadas por tratamiento en dos fincas agroecológicas en Galápagos, Ecuador.



Se observan además valores atípicos en todos los índices. En el índice riqueza, T3 de HL, se observa un valor atípico casi al mismo nivel del T2 que es el más alto, este valor corresponde a la réplica 1, tiene un valor de riqueza de 1,362. Esto puede sugerir que dependiendo del sitio de muestreo y la vegetación presente a la toma de la muestra, la microbiología puede variar, inclusive a escalas muy refinadas.

Tabla 10.

TRATAMIENTO/FINCA	Richness	Chao1	Shannon	invSimpson	Evenness
HLT1	1,234.50	1,619.37	5.49	72.79	0.77
HLT2	1,395.75	1,830.00	5.67	45.45	0.79
HLT3	1,226	1,611.74	4.15	60.65	0.75
LJT1	1,210.75	2,209.76	4.21	61.60	0.77
LJT2	1,115.50	1,967.40	4.06	62.55	0.75
LJT3	1,091.25	1,022.07	3.95	51.38	0.74

α - diversidad por tratamiento.

Nota: Los valores más altos por finca están marcados en color verde.

Por su parte, Lava Java, contrario a Huerta Luna, muestra sus valores más altos de diversidad en el T1 (suelo fuente), a excepción de InvSimpson que lo tiene en el T2 (cultivo). Esto puede

explicarse debido a que, en los últimos años, pese a que LJ ha mantenido un manejo orgánico, este no ha sido tan eficiente en comparación a HL. Como se ha mencionado, un año antes de la toma de muestras, LJ comenzó su proceso por una agricultura orgánica más consistentemente. Por esto, el tratamiento T1, perteneciente al suelo fuente de microorganismos y muy poco intervenido ha resultado en valores mayores. Pese a esto, los valores entre tratamientos no se encuentran tan distantes entre sí.

Torres, et al. (92) en el año 2021 realizó una evaluación del uso de microorganismos de montaña activados en el cultivo de rosas en México empleando variables como longitud del tallo, diámetro del tallo, número de hojas, tamaño de la flor y vida de anaquel. En este estudio se obtuvo diferencias estadísticas significativas a mayores concentraciones de aplicación. Se propone el uso de MM (microorganismos de montaña) como una alternativa para reducir la aplicación de fertilizantes sintéticos, disminuyendo así los costos de producción, la protección de los recursos naturales y la salud de los agricultores locales.

Otro estudio realizado con microorganismos de montaña, por Umaña, et al. (93), señala el efecto de los MM sobre sistemas edáficos productivos, demostrando ser altamente beneficiosos. Además de mostrar respuestas positivas de las plantas ante una dinámica más acelerada de microorganismos beneficiosos. Sus resultados presentaron cambios fenotípicos significativamente notables que muestran el potencial de la biofertilización en la consecución de una producción de alimentos más sanos y con huellas de carbono menores.

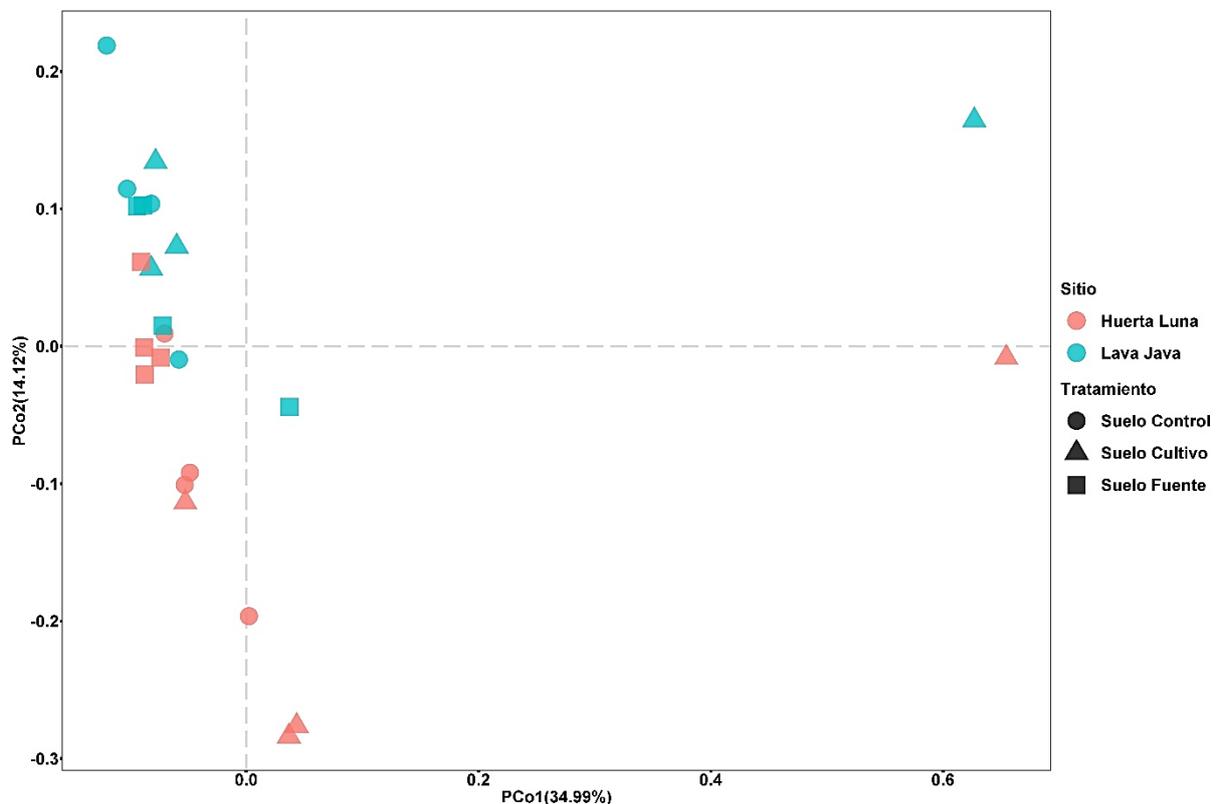
Los estudios mencionados en concordancia con el presente corroboran la eficiencia del uso de microorganismos de montaña en los sistemas agrícolas. Si bien es cierto que en los tratamientos se han observado variación de valores de diversidad de bacterias y arqueas, se aprecia que los suelos de cultivos expresan los valores más altos de diversidad en HL. En LJ por el contrario, los valores de diversidad no son los más altos en los suelos de cultivo pero tampoco distan mayormente de los tratamientos con los valores más altos. En general, en ambas fincas se aprecia un suelo diverso y equilibrado, que contienen grupos taxonómicos asociados a efectos positivos para la producción.

4.1.4.2. Diversidad beta (β).

Correlación diversidad – finca. El Gráfico de coordenadas principales empleando la distancia de Bray-Curtis de la composición de especies muestra las relaciones que existen entre muestras, tratamientos y fincas, donde suelo fuente de microorganismos corresponde a T1 (■), suelo de cultivo a T2 (▲) y el control al T3 (●).

Figura 6.

Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) para muestras de microbioma de suelo de dos fincas agroecológicas en la isla Santa Cruz, Galápagos. Cada punto representa un muestra distinta, su color se basa en las dos fincas agroecológicas: Huerta Luna (rojo) y Lava Java (azul) y la distancia entre los puntos representa cuán diferentes en composición son las muestras entre sí. La correlación canónica de cada eje del PCoA está colocada en paréntesis e indica el porcentaje de variación explicado del conjunto de datos.



Cada punto representa un muestra distinta, su color se basa en las dos fincas agroecológicas: Huerta Luna (rojo) y Lava Java (azul) y la distancia entre los puntos representa cuán diferentes en composición son las muestras entre sí. La correlación canónica de cada eje del PCoA está

colocada en paréntesis e indica la fuerza de la asociación entre los datos multivariados y la hipótesis de diferencias entre tratamientos por finca.

Como primera observación a resaltar dentro del presente análisis se puede mencionar que la mayor diferenciación entre muestras (eje PCoA1) separa dos muestras pertenecientes al T1 (una de cada finca) a la derecha del gráfico versus un grupo de muestras de ambas fincas a la izquierda (Fig. 6). El segundo eje de variación (PCoA2) muestra una separación de las muestras de cada finca. Es decir que, aunque existen diferencias entre tratamientos en algunos casos, las muestras de todos los tratamientos tienen similitud dentro de cada finca. Esta clara diferenciación se da principalmente debido a que, aunque las dos fincas se encuentran en la misma isla, HL se encuentra ubicada en una zona más alta que LJ, este es un factor importante para la composición de las comunidades microbianas. No obstante, hay varias muestras que se agrupan entre fincas entre los suelos fuente de HL con muestras de suelos control de LJ.

Es importante señalar además que, aunque Huerta Luna lleve cinco años empleando los tratamientos microbiológicos, según su propietaria, esta finca posee alrededor de 40 años sin intervención. Sin embargo, pese a que Lava Java posee 12 años bajo manejo agroecológico y un año con tratamientos microbiológicos consistentes, anterior a ello hubo intervención de insumos químicos. Esto puede ser una posible explicación al nivel de dispersión de las muestras ya que, como se puede evidenciar en la Figura 6, las muestras de HL se encuentran más dispersas que las de LJ. Esto sugiere que, aunque HL posee mayor variación de comunidades en sus diferentes suelos. Otro aspecto importante por considerar es que la finca LJ posee un sistema agroforestal enfocado en el cultivo de café, sin embargo, su composición y abundancia microbiológica es bastante similar entre tratamientos.

En HL, las muestras pertenecientes a suelo de cultivo se muestran significativamente separadas entre ellas, lo cual se podría atribuir a la diversidad de cultivos que posee, que modifican la microbiología del lugar donde se encuentran. Particularmente, las dos muestras de suelo cultivo al extremo derecho del gráfico, probablemente son muy diferentes a las demás. Estas muestras son las que menor número de reads tuvieron en la secuenciación, posiblemente esto haya interferido en las especies recuperadas de estas muestras en comparación a las demás muestras.

CAPÍTULO V.
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones.

- Se ha logrado identificar mediante análisis molecular de la diversidad microbiana del suelo que las especies más abundantes en las fincas agroecológicas son el filo *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, entre otros.
- Mediante los índices de diversidad se corrobora que la técnica de transferencia de microorganismos de montaña en suelo de cultivo ha resultado efectiva dado que, entre tratamientos, la diversidad microbiana se muestra similar, e incluso en una de las fincas mayor en el suelo de cultivo.
- La finca Huerta Luna muestra mayor diversidad microbiana en comparación a Lava Java, por tanto, al llevar más tiempo de manejo orgánico muestra una clara mejora en la microbiota del suelo.

5.2. Recomendaciones.

- Se recomienda realizar un estudio en el cual las muestras sean seleccionadas de fincas con manejo convencional para en contraste con la presente investigación poder hacer una comparación.
- Realizar más estudios sobre la diversidad microbiana incluyendo otros grupos taxonómicos además de bacterias, puesto que microorganismos como hongos, protozoarios y nemátodos son importantes en la producción agrícola también.
- Se recomienda a los sistemas agrícolas de Galápagos incluir prácticas de manejo agronómico de las fincas agroecológicas, considerando los beneficios no solo ecológicos que conlleva sino también una posible mejora en la producción y la obtención de alimentos inocuos.

CAPÍTULO VI.
LITERATURA CITADA

6.1. Bibliografía.

1. Darwin C. On the origin of species by means of natural selection, or preservation of favoured races in the struggle for life New York: D APPLETON AND COMPANY; 1859.
2. Quintanilla V. Fitogeografía de las Islas Galápagos. Observaciones preliminares en la Isla de San Cristóbal. Revista Geográfica. 1983 Diciembre;(98): p. 58 -71.
3. Pedraza R, Teixeira K, Scavino A, Salamone G, Baca B, Azcón R, et al. Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Revisión. Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 2010; 11(2): p. 155-164.
4. Lozano G. Galápagos: población sigue creciendo y científicos temen impacto en la biodiversidad. [Online].; 2018 [cited 2022 Febrero. Available from: <https://es.mongabay.com/2018/09/galapagos-ecuador-crecimiento-poblacional/>.
5. García I, Hynes R, Nelson LM. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. Canadian Journal of Microbiology. 2001 Mayo; 47.
6. Robles V. En busca del gen 16S, la huella genética bacteriana. [Online].; 2015 [cited 2022 Enero. Available from: <https://www.elprobiotico.com/gen-huella-genetica-bacteriana/>.
7. FAO. Agri-environmental indicator on the Use of pesticides per area of cropland (which is the sum of arable land and land under permanent crops) at national level for the period 1990 to 2016. Agriculture Organization of the United Nations. ; 2020.
8. Agrocalidad. AGROCALIDAD CONTROLA EL USO ADECUADO DE INSUMOS AGRÍCOLAS. [Online].; 2019. Available from: <https://www.agrocalidad.gob.ec/agrocalidad-controla-el-uso-adeecuado-de-insumos-agricolas/>.
9. Agrocalidad. MAPA DE LMR. [Online].; 2016. Available from: https://www.agrocalidad.gob.ec/?page_id=41484#info.
10. EcoCiencia. Restaurar suelos del Ecuador continental, una meta más factible con nuevo Mapa Digital de Fertilidad Química. [Online].; 2022 [cited 2022. Available from: <https://ecociencia.org/restaurar-suelos-del-ecuador-continental-una-meta-mas-factible-con-nuevo-mapa-digital-de-fertilidad-quimica/>.
11. Parque Nacional Galápagos (PNG). Ciencia para Galápagos. [Online].; 2016 [cited 2022 Febrero. Available from: http://www.carlospi.com/galapagospark/ciencia_investigacion_prioridades.html.

12. Morugán-Coronado A, Pérez-Rodríguez P, Insolia E, Soto-Gómez D, Fernández-Calviño D, Zornoza R. The impact of crop diversification, tillage and fertilization type on soil total microbial, fungal and bacterial abundance: A worldwide meta-analysis of agricultural sites. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 2022 Mayo; 329.
13. Sangwan N, Xia F, Gilbert J. Recovering complete and draft population genomes from metagenome datasets. *Microbiome* volume. 2016 Marzo 08; 4.
14. European Commission. Biodiversity strategy for 2030. [Online].; 2020 [cited 2022 Septiembre]. Available from: https://environment.ec.europa.eu/strategy/biodiversity-strategy-2030_en.
15. Alloway B. Sources of heavy metals and metalloids in soils. In *Environmental Pollution*.; 2012. p. 11-50.
16. Dinter TC, Puschenreiter M, Zehetner F. Heavy metal contents, mobility and origin in agricultural topsoils of the Galápagos Islands. *Chemosphere*. 2021 Febrero; 02.
17. Molina M, Mahecha L, Medina M. Importancia del manejo de hongos micorrizógenos en el establecimiento de árboles en sistemas silvopastoriles. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 2005 Junio; 18(2).
18. Tapia DL. Biodiversidad microbiana y almacenamiento de Carbono en suelos con distinto uso en la provincia del Carchi (República de Ecuador). [Online].; 2020 [cited 2022].
19. SEQC. Secuenciación del ADN. [Online].; 2020 [cited 2022 Enero]. Available from: <https://labtestsonline.es/articulos/secuenciacion-del-adn>.
20. Valenzuela-González F, Casillas-Hernández R, Villalpando E, Vargas-Albores F. The 16S rRNA gene in the study of marine microbial communities. *SCielo*. 2015 Diciembre.
21. Vilatuña F. Determinación de la microbiota del suelo en dependencia de la altitud y especies vegetales cultivadas. [Online].; 2019 [cited 2022 Enero]. Available from: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/20393/3/T-UCE-0004-CAG-200.pdf>.
22. UNC. ECOLOGIA MICROBIANA. [Online].; 2014 [cited 2022]. Available from: <http://agro.unc.edu.ar/~microbiologia/wp-content/uploads/2014/04/unidad-4-ecologia.pdf>.
23. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA). Proyecto para el Apoyo a Pequeños Agricultores en la Zona Oriental (PROPA-Oriente). [Online]. Available from: https://www.jica.go.jp/project/elsalvador/0603028/pdf/production/vegetable_04.pdf.
24. NIH (National Human Genome Research Institute). ¿Hay tecnologías de secuenciación más nuevas en desarrollo? [Online].; 2019. Available from: <https://www.genome.gov/es/about-genomics/fact-sheets/Secuenciacion-del-ADN>.

25. Tamay L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*. 2013 Agosto; 2(2): p. 70-78.
26. Genotipia. MinION: un secuenciador de bolsillo. [Online].; 2014. Available from: https://genotipia.com/genetica_medica_news/minion-secuenciador-de-bolsillo/.
27. National Human Genome Research Institute (NIH). Secuenciación del ADN. [Online].; 2019 [cited 2022 Enero. Available from: <https://www.genome.gov/es/about-genomics/fact-sheets/Secuenciacion-del-ADN>.
28. CD Genomics. Principal Co-ordinates Analysis. [Online]. Available from: <https://bioinfo.cd-genomics.com/principal-co-ordinates-analysis.html>.
29. NCBI National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Our Mission. [Online]. [cited 2022. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/home/about/mission/>.
30. Permaculture Research Institute. What is Permaculture ? [Online]. [cited 2022. Available from: <https://www.permaculturenews.org/what-is-permaculture/>.
31. Gobierno de México. BOSQUES COMESTIBLES. [Online].; 2020. Available from: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/583343/PRESENTACION_EVA_SEPTIEMBRE_2020_2.0_.pdf.
32. IAFN-RIFA. Forestería Análoga: Una guía práctica. [Online]. [cited 2022. Available from: <http://www.analogforestry.org/wpsite/wp-content/uploads/2015/03/Gu%C3%ADa-Pr%C3%A1ctica-de-Forester%C3%ADa-An%C3%A1loga.pdf>.
33. INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN AGRARIA - INIA. - Producción y uso del biol. [Online].; 2008 [cited 2022. Available from: http://repositorio.inia.gob.pe/bitstream/20.500.12955/115/1/Uso_Biol_Lima_2008.pdf.
34. Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica. PARQUE NACIONAL GALÁPAGOS. [Online]. [cited 2022 Julio. Available from: <https://www.ambiente.gob.ec/parque-nacional-galapagos/>.
35. Consejo de Gobierno del Régimen Especial de Galápagos (CGREG). Puerto Baquerizo Moreno, Galápagos-Ecuador. [Online].; 2014 [cited 2022 Julio.
36. INEC. Censo de Población y Vivienda de Galápagos. [Online].; 2015. Available from: <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/galapagos-tiene-25-244-habitantes-segun-censo-2015>.
37. Sampedro C, Pizzitutti F, Quiroga D, Mena C, Walsh S. Food Supply System Dynamics in the Galapagos Islands: Agriculture, Livestock and Imports. *Renewable Agriculture and Food Systems*. [Online].; 2020 [cited 2022.

38. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). Portal de Suelos de la FAO. [Online].; 2021 [cited 2022. Available from: <https://www.fao.org/soils-portal/soil-biodiversity/es/>.
39. Kloepper J. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological agents New York,USA; 1993.
40. daSilva E, Vasques-Vieira E, Nogueira-Tashima L, deOliveira-Guilherme D. A sustainability rereading of agrarian production on systems. INTERAÇÕES. 2017; 18(4): p. 43-54.
41. Javier SS, Marasas ME. Breve historia de la agroecología en la Argentina: orígenes, evolución y perspectivas futuras. Agroecología. 2015; 10(2): p. 93-102.
42. USDA- Unites States Department of Agriculture. USDA Coexistence Fact Sheets Conventional Farming. [Online].; 2015 [cited 2022. Available from: <https://www.usda.gov/sites/default/files/documents/coexistence-conventional-farming-factsheet.pdf>.
43. Rodale institute. Regenerative Organic Agriculture and Climate Change. [Online].; 2014 [cited 2022. Available from: <https://rodaleinstitute.org/wp-content/uploads/rodale-white-paper.pdf>.
44. FAO. ¿Qué es la agricultura orgánica? [Online]. [cited 2022. Available from: <https://www.fao.org/3/ad818s/ad818s03.htm>.
45. FAO. ¿Qué es la agroecología? [Online]. [cited 2022. Available from: <https://www.fao.org/agroecology/overview/es/>.
46. Rodríguez-Calampa N, Tafur-Torres Z. Producción de Microorganismos de Montaña para el Desarrollo de una Agricultura Orgánica. [Online]. [cited 2022 Febrero. Available from: https://estaticos.qdq.com/swdata/files/950/950904418/CIn_3256.pdf.
47. Whittaker RH. Evolution and Measurement of Species Diversity. Taxon. Mayo 1972; 21(2/3): p. 213-251.
48. Moreno CE. Métodos para medir la biodiversidad M&T–Manuales y Tesis SEA Zaragoza; 2001.
49. Espinosa CI. Medidas de Alpha Diversidad. [Online].; 2019 [cited 2022. Available from: <https://ciespinosa.github.io/AlphaDiversidad/>.
50. McIntosh RP. An Index of Diversity and the Relation of Certain Concepts to Diversity. Ecology. 1967 Mayo; 48(3): p. 392-404 (13 pages).
51. Chao A. Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. Scandinavian Journal of Statistics. 1984; 11(4): p. 265-270 (6 pages).
52. Chao A, Lee SM. Estimating the Number of Classes Via Sample Coverage. Journal of the American Statistical Association. 1992 Marzo; 87(417): p. 210-217.

53. UNAM - (Universidad Nacional Autónoma de México). ESTRUCTURA DE COMUNIDADES. [Online]. [cited 2022. Available from: http://www.sisal.unam.mx/labeco/LAB_ECOLOGIA/Ecologia_Acuatica_files/Estructura%20de%20comunidades.pdf.
54. Magurran AE. Ecological Diversity and Its Measurement New Jersey; 1988.
55. Lloyd M, Ghelardi R. A Table for Calculating the “Equitability” Component of Species Diversity. *Journal of Animal Ecology*. 1964; 33.
56. Matteucci S, Colma A. Metodología para el estudio de la vegetación Chesneau EV, editor.: The General Secretariat of the Organization of American States; 1982.
57. Barriga N, Decker T, León-Reyes A, Dong V, Worley C, León-Reyes C, et al. Caracterización molecular y funcional de patógenos endémicos que afectan a la mora invasora (*Rubus niveus*) de la isla San Cristóbal del archipiélago de Galápagos. [Online].; 2019.
58. Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI). Charles Darwin Foundation. [Online]. Available from: <https://www.darwinfoundation.org/es/datazone/clima/bellavista>.
59. Orgiazzi A, Bardgett RD, Barrios E, Behan-Pelletier V, Briones MJJ, Chotte JL, et al. Global Soil Biodiversity Atlas European Commission; 2016.
60. Arcos-Torres JF, Quishpe-Quishpi NS, Erazo-Sandoval FE. Caracterización de Suelos Asociados a la Rizosfera de Mortiño (*Vaccinium Floribundum* Kunth) en los Páramos de Ganquis y Cubillín de la Provincia de Chimborazo. *Dominio de las Ciencias*. 2022 Enero-Marzo; 8(1): p. 482-502.
61. León-Yáñez S. La flora de los páramos ecuatorianos. In Vásconez PM, editor. Páramo.: Editorial Universitaria Abya-Yala; 2011. p. 25.
62. Torres N, Herrera I, Bustamante L, Ramiro F. Meta-analysis of the impact of plant invasions on soil microbial communities. *BMC Ecol Evol*. 2021; 21(172).
63. Zak J, Willig M, Moorhead D, Wildman H. Functional diversity of microbial communities: A quantitative approach. *Soil Biology and Biochemistry*. 1994 Septiembre; 26(9): p. 1101-1108.
64. Bartelt-Rysera J, Joshi J, Schmid B, Brandl H, Balsler T. Soil feedbacks of plant diversity on soil microbial communities and subsequent plant growth. *Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematics*. 2005 Marzo; 7: p. 27-49.
65. Ramón CGZ. Caracterización del microbioma en el cultivo de banano (*Musa ×paradisiaca* L.) bajo sistema de producción orgánico y convencional. [Online].; 2021 [cited 2022. Available from: <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/10630/1/138377.pdf>.

66. Fierrer N, Bradford M, Jackson R. TOWARD AN ECOLOGICAL CLASSIFICATION OF SOIL BACTERIA. *Ecology*. 2007; 88(6): p. 1354–1364.
67. Jones R, Robeson M, Lauber C, Hamady M, Knight R, Fierer N. A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. *ISME*. 2009 Enero; 3.
68. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Global Soil Biodiversity Initiative (GSBI), Secretariat of the Convention on Biological Diversity (CBD) & European Commission (EC). State of knowledge of soil biodiversity - Status, challenges and potentialities Roma; 2020.
69. Narayan O, Kumar P, Yadav B, Dua M, Johri A. Sulfur nutrition and its role in plant growth and development. 2022.
70. Jiménez G. “Efecto de las diferentes prácticas de agricultura sobre las comunidades bacterianas en suelos del Valle del Yaqui. [Online].; 2016. Available from: <https://repositorio.cinvestav.mx/bitstream/handle/cinvestav/1375/SSIT0013961.pdf?sequence=1>.
71. Navarro-Noya Y, Gómez-Acata S, Montoya-Ciriaco N, Rojas-Valdez A, Suárez-Arriaga M, Valenzuela-Encinas C, et al. Relative impacts of tillage, residue management and crop rotation on soil bacterial communities in a semi-arid agroecosystem. *Soil Biol Biochem*. 2013; 65.
72. Kiharaa J, Martius C, Bationo A, Thuita M, Lesueur D, Herrmann L, et al. Soil aggregation and total diversity of bacteria and fungi in various tillage systems of sub-humid and semi-arid Kenya. *Applied Soil Ecology*. 2012.; 58(1).
73. Romero-Perezgrovas R, Verhulst N, Rosa DDL, Hernandez V, Maertens M, Deckers J, et al. Long-term consequences of tillage, residue management, and crop rotation on selected soil micro-flora groups in the subtropical highlands. *Pedosphere*. 2014 Agosto; 24(4): p. 476-486.
74. Chamizo S, Mugnai G, Rossi F, Certini G, Filipis Rd. Cyanobacteria Inoculation Improves Soil Stability and Fertility on Different Textured Soils: Gaining Insights for Applicability in Soil Restoration. *Front. Environ. Sci.*. 2018 Junio 11.
75. Mandic-Mulec I, Stefanic P, Elsas JDv. Ecology of Bacillaceae. *Microbiol Spectr*. 2015 April; 3(2).
76. Choudhary D, Johri B. Interactions of *Bacillus* spp. and plants – With special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research*. 2009 Septiembre 29; 164(4): p. 493-513.
77. Villarreal-Delgado M, Villa-Rodríguez E, Cira-Chávez L, Estrada-Alvarado M, Parra-Cota F, Santos-Villalobos Sdl. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus impresiones en la bioseguridad agrícola. *Revista mexicana de fitopatología*. 2018 enero-abril; 36(1).

78. Waksman SA. Principles of Soil Microbiology Baltimore: THE WILLIAMS & WILKINS COMPANY; 1927.
79. Mandic-Mulec I, Stefanic P, Elsas JDv. Ecology of Bacillaceae. Microbiology Spectrum. 2015 Marzo 20.
80. Senthilkumar M, Swarnalakshmi K, Govindasamy V, Lee YK, Annapurna K. Biocontrol Potential of Soybean Bacterial Endophytes Against Charcoal Rot Fungus, *Rhizoctonia bataticola*. Current Microbiology volume 58. 2009 Diciembre; 58: p. 288–293.
81. Campbell BJ. The Family Acidobacteriaceae Department of Biological Sciences, Clemson University, Clemson, SC, USA; 2014.
82. Eihorst S, Kuske C, Schmidt TM. Influence of plant polymers on the distribution and cultivation of bacteria in the phylum acidobacteria. Appl Environ Microbiol. 2011 Enero; 77(2): p. 586–596.
83. Jangid K, Williams MA, Franzluebbers AJ, Sanderlin JS, Reeves JH, Jenkins MB, et al. Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems. Soil Biology & Biochemistry. 2008; 1(11).
84. Campbell B, Polson S, Hanson T, Mack M, Schuur E. The effect of nutrient deposition on bacterial communities in Arctic tundra soil. Environ Microbiol. 2010 Marzo; 12: p. 1842-1854.
85. Huber K, Overmann J. Vicinamibacteraceae fam. nov., the first described family within the subdivision 6 Acidobacteria. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2018 July 01; 68(7).
86. Barns S, Takala S, Kuske C. Wide Distribution and Diversity of Members of the Bacterial Kingdom Acidobacterium in the Environment. ASM Journals. Abril 1999; 65(4).
87. Gentry AH. Changes in Plant Community Diversity and Floristic Composition on Environmental and Geographical Gradients. Annals of the Missouri Botanical Garden. 1998; 75(1): p. 1-34.
88. Moreno-Espíndola IP, Ferrara-Guerrero MJ, Luna-Guido ML, Ramírez-Villanueva DA, León-Lorenzana ASD, Gómez-Acata S, et al. The Bacterial Community Structure and Microbial Activity in a Traditional Organic Milpa Farming System Under Different Soil Moisture Conditions. Frontiers in Microbiology. 2018; 9.
89. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP). Proyecto: "Almacenamiento de agua para uso agropecuario a través de micro-reservorios en la provincia de Galápagos". Santa Cruz – Puerto Ayora. ; 2014.
90. Balón-Rodríguez K, Vera-Balladares E. ANÁLISIS DE FERTILIDAD DE LOS SUELOS AGRÍCOLAS DE LAS ISLAS GALÁPAGOS - SANTA CRUZ, SAN CRISTÓBAL, ISABELA Y FLOREANA. [Online].; 2018 [cited 2022. Available from:

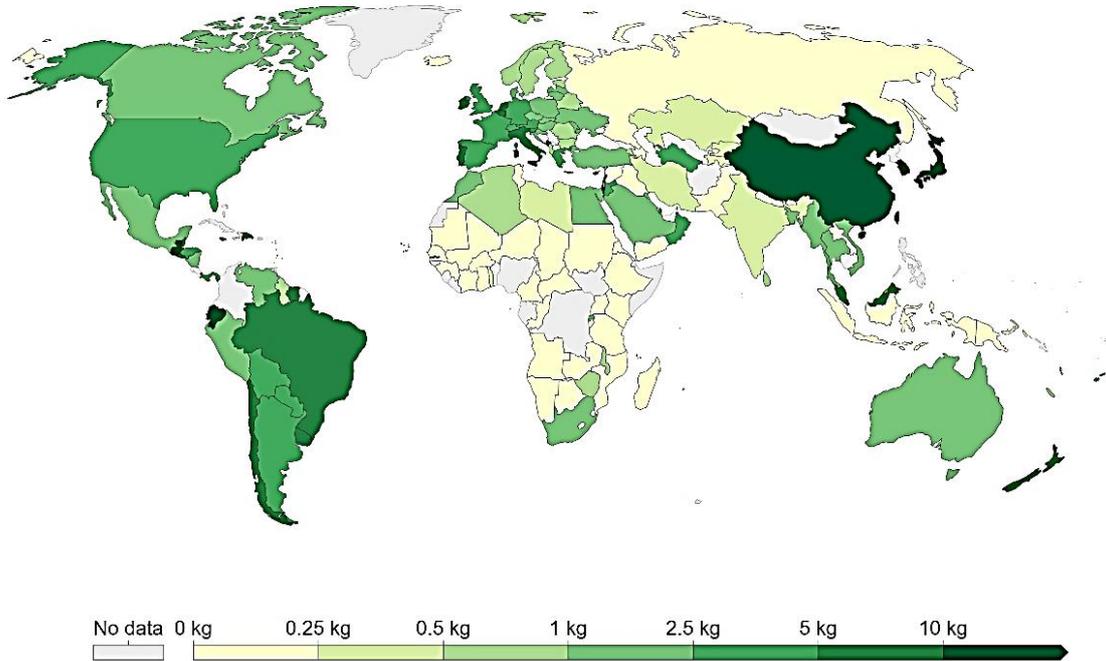
<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/15100/1/T-UCE-0017-CB-008-2018.pdf>.

91. Barrera V, Valverde M, Escudero L, Allauca J. Productividad y sostenibilidad de los sistemas de producción agropecuaria de las islas Galápagos-Ecuador: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP); 2019.
92. Torres-Pérez J, Aguilar-Jiménez C, Vázquez-Solís H, Solís-López M, Gómez-Padilla E, Aguilar-Jiménez J. Evaluación del uso de microorganismos de montaña activados en el cultivo de rosas, Zinacantán, Chiapas, México. SIEMBRA. 2022 Enero.
93. Umaña S, Rodríguez K, Rojas C. ¿Funcionan realmente los microorganismos de montaña (MM) como estrategia de biofertilización? Un enfoque de ingeniería de biosistemas. Revista de Ciencias Ambientales (Trop J Environ Sci). 2017; 51(2): p. 133-144.
94. Bijmans MFM. Environmental Biotechnology and Safety. 2nd ed.: Comprehensive Biotechnology; 2011.
95. VIAJANDOX. Islas Galápagos. [Online]. Available from: <https://ec.viajandox.com/galapagos-R9>.
96. Furian PH. Islas Galápagos, Ecuador, mapa político gris, capital Puerto Baquerizo Moreno. [Online].; 2021 [cited 2022 Julio. Available from: <https://www.alamy.es/islas-galapagos-ecuador-mapa-politico-gris-capital-puerto-baquerizo-moreno-archipiélago-de-islas-volcanicas-a-ambos-lados-del-ecuador-en-el-pacifico-image446370318.html>.

CAPÍTULO VII.
ANEXOS

Pesticide use per hectare of cropland, 2017

Average pesticide application per unit of cropland, measured in kilograms per hectare.



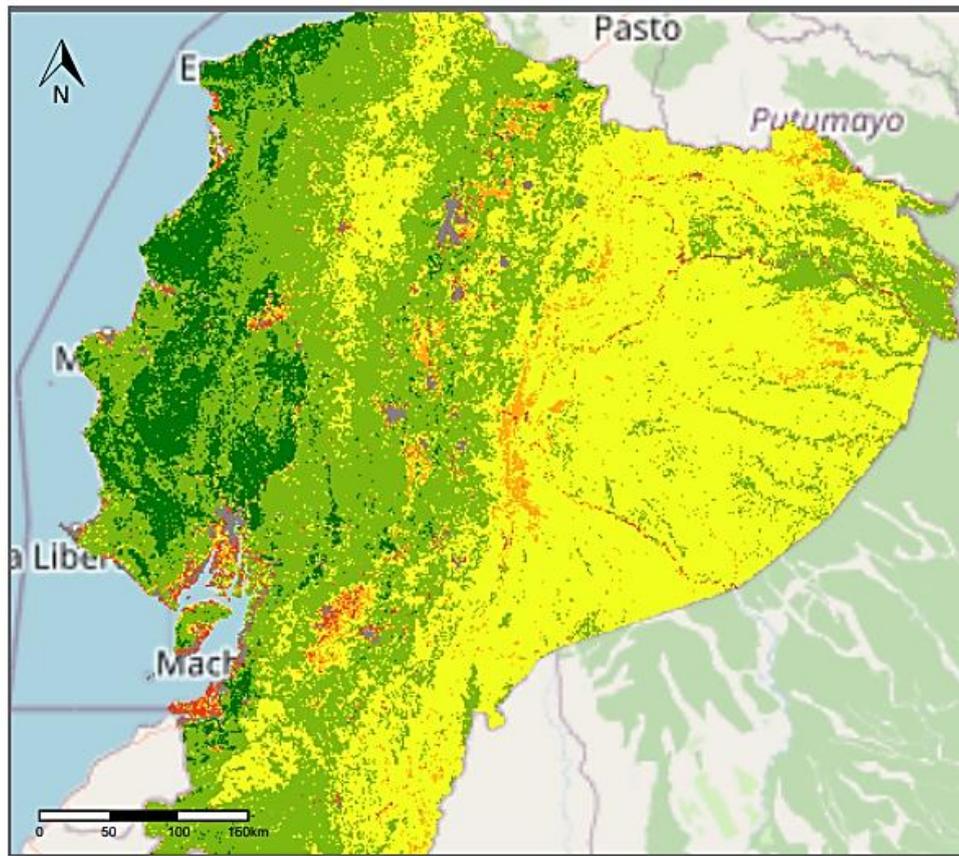
Source: UN Food and Agricultural Organization (FAO)

OurWorldInData.org/pesticides/ • CC BY

Anexo A. Pesticidas usados por hectárea de tierra (FAO, 2017)

LOS RIOS				
MUESTRA	RESIDUOS DETECTADOS	LMR DETECTADO (ppb)	LMR PERMITIDO (ppb)	TIPO DE PLAGUICIDA
Cacao	Malatión	25,75 – 47,5	20	Insecticida
	Oxamil	74,25	50	Insecticida
Arroz	Methiocarb	124,5	100	Insecticida
Banano	Oxamil	54,25 – 219,25	10	Insecticida

Anexo B. LMR provincia de Los Ríos (Agrocalidad)



Anexo C. Mapa digital de fertilidad química Ecuador.

Se consideran ocho propiedades químicas del suelo para determinar el nivel de fertilidad: materia orgánica, potencial hidrógeno, fósforo, potasio, saturación de bases, suma de bases, conductividad eléctrica y capacidad de intercambio catiónico

Escala: 1:4000000 Copyright 2022 SIPA-MAG

[\(http://geoportal.agricultura.gob.ec/\)](http://geoportal.agricultura.gob.ec/)

DNeasy[®] PowerSoil[®] Pro Kit

Solution CD2 should be stored at 2–8°C upon arrival. All other reagents and kit components should be stored at room temperature (15–25°C).

Further information

- DNeasy[®] PowerSoil[®] Pro Kit Handbook: www.qiagen.com/HB-2495
- Safety Data Sheets: www.qiagen.com/safety
- Technical assistance: support.qiagen.com

Notes before starting

- Ensure that the PowerBead Pro Tubes rotate freely in the centrifuge without rubbing.
 - If Solution CD3 has precipitated, heat at 60°C until precipitate dissolves.
 - Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).
1. Spin the PowerBead Pro Tube briefly to ensure that the beads have settled at the bottom. Add up to 250 mg of soil and 800 µl of Solution CD1. Vortex briefly to mix.
 2. Secure the PowerBead Pro Tube horizontally on a Vortex Adapter for 1.5–2 ml tubes (cat. no. 13000-V1-24). Vortex at maximum speed for 10 min.
Note: If using the Vortex Adapter for more than 12 preps simultaneously, increase the vortexing time by 5–10 min.
Note: For more information about other bead beating methods, see the “Protocol: Detailed” section of DNeasy[®] PowerSoil[®] Pro Kit Handbook.
 3. Centrifuge the PowerBead Pro Tube at 15,000 x g for 1 min. **6000 RPM**
 4. Transfer the supernatant to a clean 2 ml Microcentrifuge Tube (provided).
Note: Expect 500–600 µl. The supernatant may still contain some soil particles.
 5. Add 200 µl of Solution CD2 and vortex for 5 s.
 6. Centrifuge at 15,000 x g for 1 min at room temperature. Avoiding the pellet, transfer up to 700 µl of supernatant to a clean 2 ml Microcentrifuge Tube (provided).
Note: Expect 500–600 µl.
 7. Add 600 µl of Solution CD3 and vortex for 5 s.



— Sample to Insight —

Anexo D. Protocolo empleado para la extracción de ADN de suelo.

-
8. Load 650 μ l of the lysate onto an MB Spin Column and centrifuge at 15,000 x g for 1 min.
 9. Discard the flow-through and repeat step 8 to ensure that all of the lysate has passed through the MB Spin Column.
 10. Carefully place the MB Spin Column into a clean 2 ml Collection Tube (provided). Avoid splashing any flow-through onto the MB Spin Column.
 11. Add 500 μ l of Solution EA to the MB Spin Column. Centrifuge at 15,000 x g for 1 min.
 12. Discard the flow-through and place the MB Spin Column back into the same 2 ml Collection Tube.
 13. Add 500 μ l of ~~Solution C5~~ ^{PCR water} to the MB Spin Column. Centrifuge at 15,000 x g for 1 min.
 14. Discard the flow-through and place the MB Spin Column into a new 2 ml Collection Tube (provided).
 15. Centrifuge at up to 16,000 x g for 2 min. Carefully place the MB Spin Column into a new 1.5 ml Elution Tube (provided).
 16. Add ~~50-100~~ ³⁵ μ l of Solution C6 to the center of the white filter membrane. → precalentado a 55°C
 17. Centrifuge at 15,000 x g for 1 min. Discard the MB Spin Column. The DNA is now ready for downstream applications.

Note: We recommend storing the DNA frozen (-30 to -15°C or -90 to -65°C) as Solution C6 does not contain EDTA. To concentrate DNA, please refer to the Troubleshooting Guide.



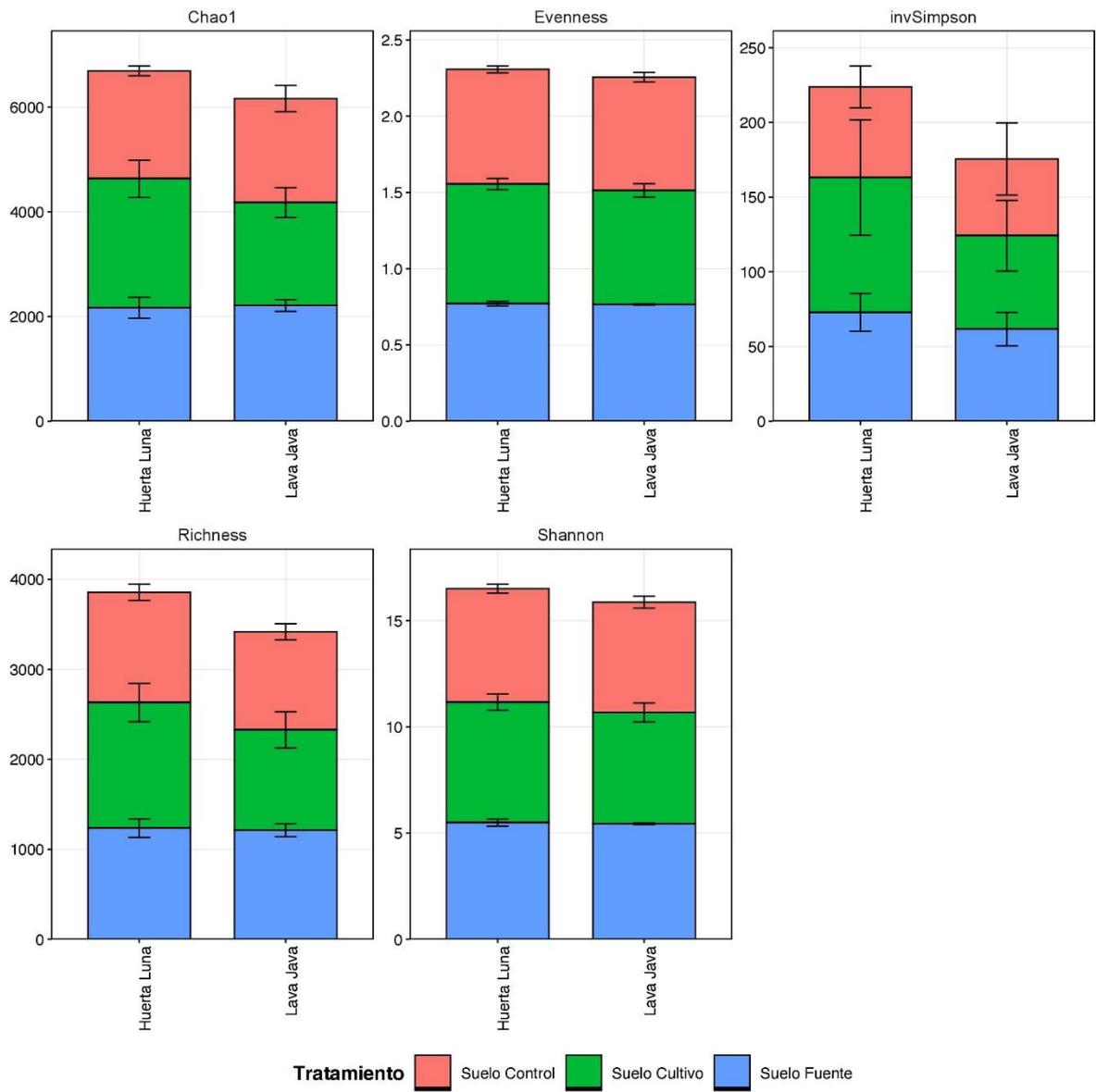
Scan QR code for handbook.

For up-to-date licensing information and product specific disclaimers, see the respective QIAGEN kit handbook or user manual.

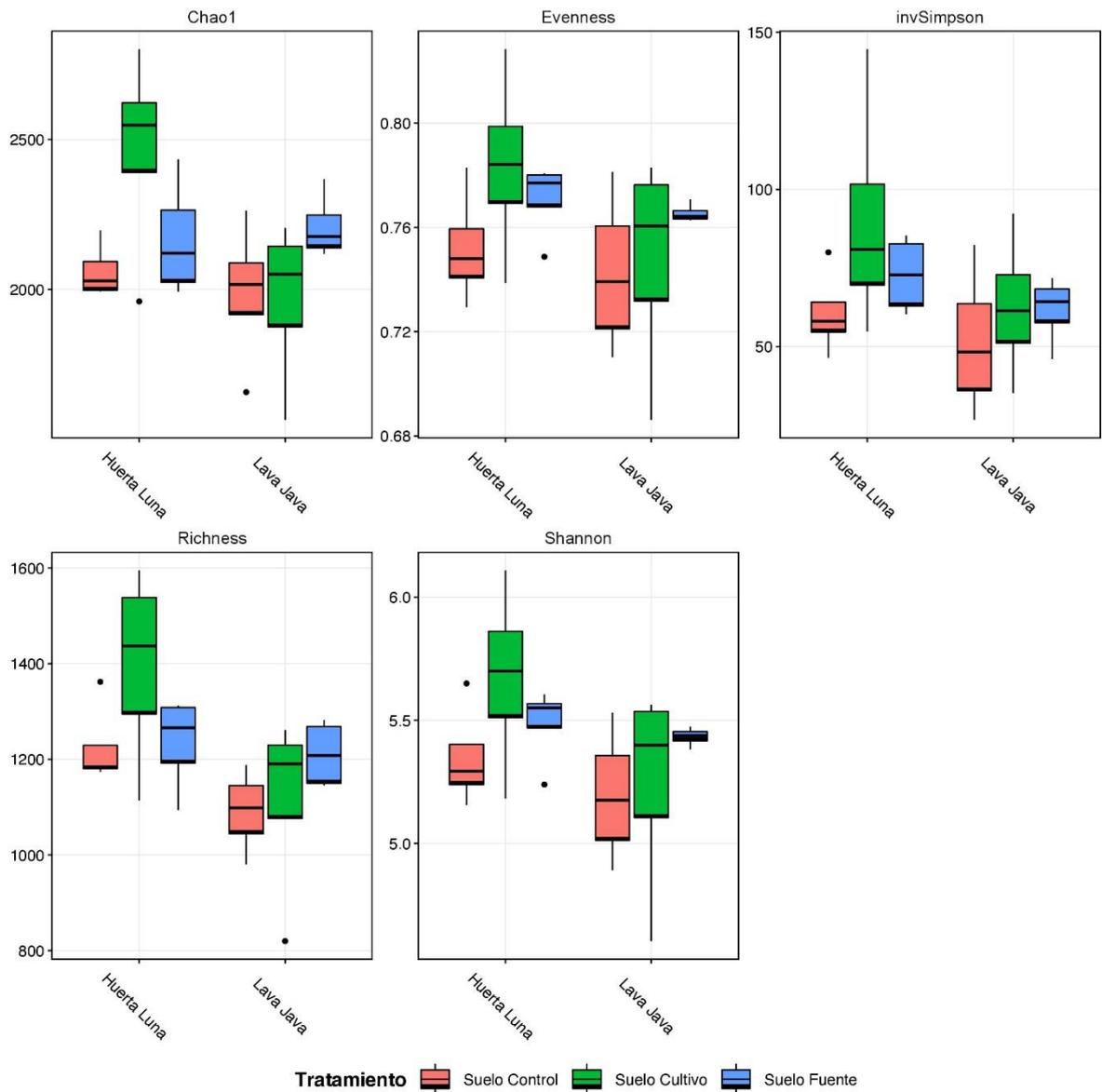
Trademarks: QIAGEN®, Sample to Insight®, DNeasy®, PowerSoil® (QIAGEN Group). 1117569 05/2019 HB-2494003 © 2019 QIAGEN, all rights reserved.

Ordering www.qiagen.com/contact | Technical Support support.qiagen.com | Website www.qiagen.com

Anexo D. Protocolo empleado para la extracción de ADN de suelo.



Anexo E. Índices de diversidad a nivel de finca.



Anexo F. Índices de diversidad a nivel de tratamientos.



Anexo G. Preparación de librería para secuenciación, instalaciones de Galapagos Science Center - USFQ



Anexo H. Cargado de librería en el dispositivo de secuenciación MinIon.



Anexo I. Dispositivo de secuenciación MinIon.