



**EDUCACIÓN**  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Tlajomulco



TESIS

**Efecto de consorcios microbianos nativos en la tolerancia de la alfalfa (*Medicago sativa*) a suelos salino – sódicos en condiciones controladas**

QUE PRESENTA:

**I.Q. MARÍA CONCEPCIÓN RODRÍGUEZ LEMUS**

DIRECTOR DE TESIS:

**DR. JUAN FLORENCIO GÓMEZ LEYVA**

REVISORES DE TESIS:

**DRA. IRMA GUADALUPE LÓPEZ MURAIRA**

**DRA. PAOLA ANDREA PALMEROS SUÁREZ**

---

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS EN AGROBIOTECNOLOGÍA**

---

TLAJOMULCO DE ZÚÑIGA, JALISCO. DICIEMBRE, 2019.



"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

DIRECCIÓN  
SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, **27 Noviembre/2019**

No. DE OFICIO: DEPI/215/2019

Asunto: Autorización de impresión de tesis.

**ING. MARÍA CONCEPCIÓN RODRÍGUEZ LEMUS  
CANDIDATA AL GRADO DE MAestrÍA  
PRESENTE**

Por este conducto, tengo el agrado de comunicarle que el Comité Tutorial asignado a su trabajo de tesis titulado **Efecto de consorcios microbianos nativos en la tolerancia de la alfalfa (*Medicago sativa*) a suelos salino-sódicos en condiciones controladas**, ha informado a esta División de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPI), que están de acuerdo con el trabajo presentado. Por lo anterior, se le autoriza a que proceda con la impresión definitiva de su trabajo de tesis.

Esperando que el logro del mismo sea acorde con sus aspiraciones profesionales, reciba un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**

Excelencia en Educación Tecnológica®  
Educando para la Sociedad Actual y los Retos del Futuro

**DR. MIGUEL ÁNGEL SEGURA CASTRUITA  
JEFE DE LA DEPI**



S.E.P  
TECNM  
14DIT0003B  
IT TLAJOMULCO  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS  
DE POSGRADO  
E INVESTIGACIÓN

C.c.p.- L.I. Andrea Torres Rico.-Jefa del Dpto. de Servicios Escolares.  
C.C.P.- Expediente  
C.c.p.- Archivo.  
MASC/mjvs.



**Efecto de consorcios microbianos nativos en la tolerancia de la alfalfa (*Medicago sativa*) a suelos salino – sódicos en condiciones controladas**

María Concepción Rodríguez Lemus

Tlajomulco de Zúñiga, Jal. Diciembre 2019

## DEDICATORIAS

Con alegría, amor y esperanza dedico este proyecto a cada uno de mis seres queridos, quienes han sido los pilares y mi fortaleza para seguir adelante en todo momento.

A mis padres:

Quienes me dieron la libertad y confianza para elegir y tomar mis propias decisiones, y han estado ahí cuando los he necesitado.

A mi hija:

Eres mi motivación más grande que me alienta a seguir adelante y no déjame vencer. Eres mi orgullo y mi fuerza para conquistar cada día.

A mi esposo:

A quien he elegido para que me acompañe por esta gran fiesta de la vida, disfrutando y aprendiendo de cada momento que hemos vivido; que con tu apoyo constante y amor me has dado la fuerza y el valor que he necesitado para lograr este anhelado objetivo.

Gracias Erik, por amarme y acompañarme...

Gracias Dios:

Por darme la fortaleza que he necesitado en mi vida.

## AGRADECIMIENTO

Al Dr. Juan Florencio Gómez Leyva, por ser el guía, mi maestro y apoyo en el desarrollo de mi proyecto.

A mis amigos del laboratorio Rigo, Mireya, David, Ery quienes me enseñaron mucho en el laboratorio y compartí hermosos momentos y sueños.

A mis amigos de grupo Rigo, Juan, Getse y Claudia, con los que aprendí a ver la vida desde otra perspectiva.

Al Ing. Martín Ojeda, quien me acompaño y ayudo todas las veces que fui al predio a tomar muestras.

Al Tecnológico Nacional de México (TecNM) y a la Dirección de Superación Académica. Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

## INDICE GENERAL

<b>ÍNDICE DE CUADROS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>IX</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XII</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN. ....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. SUELOS EN MÉXICO. ....</b>	<b>3</b>
2.1.1. Degradación de Suelos en México. ....	5
2.1.2. Tipo de Degradación de Suelos en México. ....	6
2.1.3. Superficie Afectada por proceso de degradación en México. ....	9
2.1.4. Superficie afectada por proceso de degradación en Jalisco. ....	11
2.1.5. Tipos de suelos en el municipio de Zacoalco de Torres. ....	13
2.1.6. Extensión de suelo salino en el municipio de Zacoalco de Torres. ....	13
<b>2.2. SALINIZACIÓN DE LOS SUELOS .....</b>	<b>14</b>
2.2.1. Suelo salino. ....	16
2.2.2. Suelo sódico. ....	17
2.2.3. Suelo salino-sódico .....	18
2.2.4. Naturaleza de las sales solubles del suelo .....	18
2.2.5. Solubilidad de cationes y aniones .....	19
2.2.6. Dinámica de las sales en el suelo .....	20
2.2.7. Efecto de las sales del suelo en las plantas.....	21
2.2.8. Mecanismos de tolerancia de las plantas al estrés salino .....	22
<b>2.3. BACTERIAS DEL SUELO .....</b>	<b>26</b>
2.3.1. Distribución y abundancia bacteriana.....	27
2.3.2. Influencias ambientales y población bacteriana.....	28
2.3.3. Ambientes salinos y bacterias halófilas. ....	29
2.3.4. Asociación bacteria y planta .....	32
<b>2.4. BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL (BPCV) .....</b>	<b>34</b>
2.4.1. Mecanismos de acción de las BPCV .....	35
2.4.1.1. Mecanismos directos .....	36
2.4.1.2. Mecanismos indirectos. ....	40
2.4.2. Aplicación de las BPCV.....	42
2.4.2.1. Aplicación de las BPCV en México.....	45
2.4.2.2. Aplicación de las BPCV en alfalfa.....	46
<b>2.5. ALFALFA (<i>Medicago sativa</i>).....</b>	<b>47</b>
2.5.1. Origen y clasificación taxonómica.....	48
2.5.2. Descripción botánica y fenológica .....	48
2.5.3. Fenología.....	50
2.5.4. Importancia nutrimental y económica.....	51
2.5.5. Producción. ....	52
2.5.6. Características agronómicas del cultivo de alfalfa .....	53
2.5.7. Tipo de vegetación reportada para el municipio de Zacoalco de Torres.....	54
Vegetación .....	54
Vegetación halófila.....	54

2.5.8. Bosque espinoso .....	55
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>56</b>
<b>4. HIPÓTESIS .....</b>	<b>56</b>
<b>5. OBJETIVOS .....</b>	<b>57</b>
5.1. OBJETIVO GENERAL .....	57
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	57
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>58</b>
6.1. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO. ....	59
6.1.1. Ubicación geográfica.....	59
6.1.2. Clima .....	59
6.2. MUESTREO Y CARACTERIZACIÓN DEL SUELO.....	59
6.2.1. Toma de muestras. ....	59
6.2.2. Análisis físicos y químicos del suelo.....	61
6.2.3. Preparación de la muestra del suelo.....	62
6.2.4. Determinación de pH.....	62
6.3. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS. ....	63
6.3.1. Aislamiento y caracterización morfológica de microorganismos del suelo. ....	63
6.3.2. Aislamiento de microorganismos de raíz. ....	63
6.3.3. Extracción de ADN bacteriano .....	64
6.3.4. Amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA.....	64
6.3.5. Clasificación de los aislados en la tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl.....	65
6.3.6. Caracterización bioquímica de las cepas. ....	66
6.3.7. Actividad antagonica contra Fusarium oxysporum.....	66
6.3.8. Producción de ácido indolacético (AIA). ....	66
6.3.9. Prueba de efectividad biológica en alfalfa in vitro.....	67
6.3.10. Cuantificación de amoníaco. ....	67
6.3.11. Selección de cepas promisorias. ....	68
6.3.12. Pruebas realizadas en cultivo de alfalfa, albahaca y tomate en invernadero con suelo salino - sódico. 68	
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>70</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>93</b>
<b>9. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>93</b>
<b>10. ANEXOS 1.....</b>	<b>94</b>
10.1. Anexo medios de cultivo.....	94
<b>11. ANEXOS 2.....</b>	<b>97</b>
11.1. Obtención de la secuencia en formato FASTA .....	98
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>99</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.- Superficie afectada por los procesos de degradación y sus tipos específicos en el estado de Jalisco. ....	12
Cuadro 2.- Grupos de suelos en Zacoalco de Torres.....	13
Cuadro 3.- Clasificación de los suelos afectados por sales (USDA, 1954). ....	16
Cuadro 4.- Solubilidad de sales en agua a 20oC, gramos/litro. ....	20
Cuadro 5.- Concentración de sal en el agua del suelo (extracto de saturación).....	30
Cuadro 6.- Clasificación de los halófilos en función de la salinidad. ....	31
Cuadro 7.- Microorganismos halófilos. ....	32
Cuadro 8.- Clasificación taxonómica de la alfalfa (Medicago sativa). ....	48
Cuadro 9.- Composición nutrimental de la alfalfa (100 g deshidratada). ....	52
Cuadro 10.- Clasificación del suelo en cuanto a su valor de pH.....	62
Cuadro 11.- Diseño experimental para cultivos de alfalfa, tomate y albahaca. ....	69
Cuadro 12.- Fertilidad, salinidad y clasificación del suelo (muestras M1, M2 y M3).....	71
Cuadro 13.- Secuenciación del gen 16S rRNA para la identificación genética de cepas aisladas de suelo salino – sódico del predio El Llano, en el municipio de Zacoalco de Torres, Jalisco. ....	73
Cuadro 14.- Características morfológicas de bacterias aisladas de suelo salino.....	75
Cuadro 15.- Características morfológicas de bacterias aisladas de nódulos de raíz de alfalfa. ....	75
Cuadro 16.- Grado de crecimiento de las bacterias incubadas con las concentraciones de 0.85 M, 1.7 M y 2.56 M de NaCl a las 24, 48 y 72 horas. ....	78
Cuadro 17.- Análisis cualitativo de actividad enzimática extracelular en bacterias aisladas de suelo salino. ....	82
Cuadro 18.- Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del patógeno.....	82
Cuadro 19.- Promedio de producción de AIA µg mL.....	84
Cuadro 20.- Crecimiento vegetal de alfalfa inoculada con bacterias aisladas de nódulos de raíz de alfalfa.....	86
Cuadro 21.- Promedio de concentración de amoníaco mg/mL.....	87

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Superficie relativa de los principales grupos de suelos en México. ....	3
Figura 2.- Principales grupos de suelos en México. ....	4
Figura 3.- Principales causas de degradación del suelo en México. ....	9
Figura 4.- Superficie afectada por procesos de degradación del suelo en México. ....	9
Figura 5.- a) Superficie afectada por erosión hídrica en sus tipos específicos b) Superficie afectada según nivel de afectación. ....	10
Figura 6.- a) Superficie afectada por erosión eólica en sus tipos específicos b) Superficie afectada según nivel de afectación. ....	10
Figura 7.- a) Superficie afectada por degradación química en sus tipos específicos b) Superficie afectada según nivel de afectación. ....	11
Figura 8.- a) Superficie afectada por degradación física en sus tipos específicos b) Superficie afectada según nivel de afectación. ....	11
Figura 9.- Clasificación de la salinidad del suelo y la sodicidad en relación con la conductividad eléctrica, RAS, PSI y pH. ....	17
Figura 10.- Mecanismo de resistencia a la sal en diferentes plantas (Garg y Gupta, 2011). ....	24
Figura 11.- Partes de la Raíz. ....	33
Figura 12.- Diagrama de los mecanismos de acción de la BPCV (Goswami, Thakker, y Dhanhukia, 2016). ....	35
Figura 13.- Interacción de exudados de raíces de plantas, patógenos, BPCV y otros microbios beneficiosos en la rizósfera, según lo descrito por (Dutta y Podile, 2010). ....	41
Figura 14.- Las BPCV en la fertilidad de los suelos y la salud de la planta (Prasad et al; 2015). ....	43
Figura 15.- Fases fenológicas de la alfalfa. ....	50
Figura 16.- Calidad del forraje. ....	52
Figura 17.- Diagrama general de trabajo. ....	58
Figura 18.- Toma de muestras (M1, M2, M3 y M4) en el predio El Llano, en el municipio de Zacoalco de Torres. ....	60
Figura 19.- Toma de muestra para el aislamiento de microorganismos de nódulos de raíz de alfalfa (M5). ....	61
Figura 20.- Reamplificación del gen 16S del rRNA de cepas aisladas del suelo salino. ....	72
Figura 21.- Porcentaje de morfología de microorganismos aislados de suelo salino mediante tinción de Gram. ....	76
Figura 22.- Ejemplo de morfología macroscópica y microscópica (tinción de Gram) de bacterias aisladas de suelo salino y raíz. EZ20 y EZ24 son <i>Bacillus subtilis</i> Gram (+), EZ39 Cocos Gram (-) (No secuenciada) bacterias que crecieron en medio LB. EZR4 es <i>Sinorhizobi</i> . ....	76
Figura 23.- Aislados que crecieron en concentraciones de 0.85, 1.7 y 2.56 M de NaCl. Porcentaje de aislados que crecieron de manera óptima 100, 75 y 10% respectivamente. ....	77
Figura 24.- Ejemplo de aislados que crecieron A. 5% 24 horas, B. 10% 48 horas y C. 15% (p/v) de NaCl a 72 horas posteriores a la siembra. ....	77
Figura 25.- Actividad enzimática extracelular. ....	79
Figura 26.- Actividad enzimática extracelular de cepas aisladas de suelo salino. A) Amilasa en agar almidón, B) Proteasa en agar caseína, C) Celulasa en agar carboximetilcelulosa, D) Lipasa en agar Tween 80, E) Fosfatasa en agar Pikovskaya y F) Quitinasa en agar. ....	80

Figura 27.- Evaluación de la actividad antagonica. A: Control, B y C cepas con el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>F. oxysporum</i> .....	83
Figura 28.- Curva de calibración de ácido indolacético (AIA).....	84
Figura 29.- A) Semillas de alfalfa inoculadas con bacterias aisladas de nódulos de raíz de alfalfa, 12 días posteriores a la inoculación con la rizobio <i>Sinorhizobium meliloti</i> , B) control. ....	85
Figura 30.- Curva de calibración del reactivo de Neesler.....	87
Figura 31.- En las graficas se muestran los promedios de altura de las plantas, longitud de raíz y número de hojas. ....	88
Figura 32.- La imagen muestran los tratamientos del cultivo de la albahaca y se observa el color amarillo y verde oscuro en las hojas. ....	89
Figura 33.- En las graficas se muestran los promedios de altura de las plantas, longitud de raíz, número de hojas compuestas, hojas secundarias y primarias.....	90
Figura 34.- La figura muestran los tratamientos del cultivo de la tomate y observa el color verde oscuro y morado en las hojas. La letra A corresponde a la planta control. ....	90
Figura 35.- En las graficas se muestran los promedios de germinación, altura de la planta y longitud de raíz de la alfalfa.....	91
<i>Figura 36.-</i> La imagen muestran los promedios de germinación, altura de la planta y longitud de raíz.....	91
Figura 37.- La imagen muestran la raíz de los cultivos a los dos meses del tratamiento.....	92
Figura 38.- Ejemplo de cromatograma obtenido de la secuenciación.....	97
<i>Figura 39.-</i> Ejemplo de resultado mostrando la alta homología de la secuencia obtenida 99% con la reportada.....	98

## RESUMEN

El agotamiento de los suelos cultivables es un problema cada vez más común en los países y una de las causas por la que los suelos dejan de ser cultivados es por las altas concentraciones de sales. La aplicación de microorganismos que prosperan en condiciones de alta concentración de sal y estrés osmótico con capacidad para fijar nitrógeno y producir de enzimas representan un potencial como biofertilizantes para aumentar el crecimiento de los cultivos y el rendimiento en suelos salinos. En este estudio se aislaron 48 bacterias de suelos salino – sódico provenientes del predio El Llano en el municipio de Zacoalco de Torres, en el estado de Jalisco, México. Para evaluar el efecto de un consorcio microbiano en la tolerancia a la salinidad en el cultivo de alfalfa (*Medicago sativa*). Estos aislamientos bacterianos se caracterizaron morfológicamente obteniendo que el 73% fueron bacilos Gram (+), el 23% bacilos Gram (-) y el 4% cocos Gram (-), en cuanto a su capacidad de crecer en concentraciones de 0.85, 1.7 y 2.56 M de NaCl, la formación de halos de hidrólisis, potencial antagónico contra *Fusarium oxysporum*, cuantificación por espectrofotómetro de amoníaco y producción de ácido indol acético (AIA). En base a los resultados, se seleccionaron 39 cepas aisladas de suelo salino - sódico y cinco cepas aisladas de nódulos de raíz potenciales para condiciones salinas y se identificaron mediante análisis de secuenciación del gen 16S rRNA. Se determinó la homología de las bacterias en base a la base de datos del NCBI. Se identificaron seis géneros distintos los cuales fueron *Bacillus sp.*, *Brevibacterium sp.*, *Sinorhizobium sp.*, *Ensifer adhaerens sp.*, *Azospirillum lipoferum sp.* y *Agrobacterium sp.* se obtuvo que los aislados bacterianos de suelo salino – sódico fueron el 100% halófilos moderados y el 10% se clasificó como halotolerantes.

## ABSTRACT

Depletion of arable soils is an increasingly common problem in countries and one of the reasons why soils cease to be cultivated is due to high salt concentrations. The application of microorganisms that thrive in conditions of high salt concentration and osmotic stress with the ability to fix nitrogen and produce enzymes represent a potential as biofertilizers to increase crop growth and yield in saline soils. In this study 48 bacteria were isolated from saline - sodium soils from the El Llano farm in the municipality of Zacoalco de Torres, in the state of Jalisco, Mexico. To evaluate the effect of a microbial consortium on salinity tolerance in alfalfa cultivation (*Medicago sativa*). These bacterial isolates were characterized morphologically obtaining that 73% were Gram (+) bacilli, 23% Gram (-) bacilli and 4% Gram (-) cocci, in terms of their ability to grow in concentrations of 0.85, 1.7 and 2.56 M NaCl, the formation of hydrolysis halos, antagonistic potential against *Fusarium oxysporum*, quantification by ammonia spectrophotometer and indole acetic acid (AIA) production. Based on the results, 39 isolated strains of saline-sodium soil and five isolated strains of potential root nodules for saline conditions were selected and identified by sequencing analysis of the 16S rRNA gene. The homology of the bacteria was determined based on the NCBI database. Six different genera were identified which were *Bacillus* sp., *Brevibacterium* sp., *Sinorhizobium* sp., *Ensifer adhaerens* sp., *Azospirillum lipoferum* sp. and *Agrobacterium* sp. it was obtained that the bacterial isolates of saline - sodium soil were 100% moderate halophiles and 10% were classified as halotolerant.

## 1. INTRODUCCIÓN.

El suelo es la capa de material fértil que cubre la superficie de la tierra en la que se desarrolla la vida y donde se llevan a cabo las actividades del hombre para producir la mayor parte de los productos alimenticios y materias primas de uso vital para la humanidad, se estima que el 95% de los alimentos son producidos directa o indirectamente en el suelo (FAO, 2015). Un suelo sano es un suelo vivo que proporciona los nutrientes esenciales, agua, oxígeno y el sostén para las plantas y la degradación del suelo constituye el más importante proceso de desertificación. El incremento de la población a nivel mundial y la demanda por los recursos naturales para satisfacer las necesidades primarias y secundarias de la población, han ocasionado que cerca de la mitad de los suelos del país presenten problemas de degradación (SEMARNAT, 2014). La degradación significa reducción o pérdida de la capacidad de la tierra para producir lo que de ella se espera (López Bermúdez, 1994). En México una de las causas principales de degradación del suelo es la salinización que afecta el 3.1% de la superficie en el estado de Jalisco, se estima que 28.51 miles de hectáreas están afectadas por sales (SEMARNAT, 2014). La salinidad causa trastornos nutricionales en las plantas que conducen a deficiencias de varios nutrientes y aumentan drásticamente los niveles de  $\text{Na}^+$  (Zahedi, et al., 2012). Los efectos de la salinidad en las plantas incluyen estrés osmótico, interrupción del transporte de iones a través de membrana, toxicidad directa de altas concentraciones citoplasmáticas de sodio y cloruro en los procesos celulares y estrés oxidativo inducido (Volkov y Beilby, 2017). La planta está expuesta a una amplia gama de tensiones ambientales como alta temperatura, frío, sequía, salinidad, alcalinidad UV e infección por patógenos. El estrés abiótico es la causa principal de la pérdida de cultivos en todo el mundo en más del 30% (Ahmad y Prasad, 2011). Para la recuperación de los suelos afectados por sales existen diversos métodos que van desde los físicos, eléctricos, hidrotécnicos, químicos y biológicos; aunque aplicados a grandes extensiones resultan muy costosos. Recientemente se está optando por la utilización de BPCV que dan soporte de resistencia a las plantas expuestas a estrés abiótico. Algunas bacterias endofíticas ejercen varios efectos beneficiosos sobre las plantas hospedadoras, como la estimulación del crecimiento de las plantas mediante la producción de hormonas vegetales, la fijación de nitrógeno y la inducción de resistencia a los patógenos de las plantas, mayor absorción de nutrientes, mayor tolerancia a la sequía (May, Khai, Ayme, & Yu, 2016). Las BPCV provocan resistencia sistémica inducida (RSI es la capacidad defensiva desarrollada por la planta cuando es estimulada por diversos agentes, incluidas las rizobacterias) en las plantas al aumentar la fuerza física y mecánica de la pared celular junto con el cambio de las reacciones fisiológicas y bioquímicas de la planta hospedera. Dando como resultado la síntesis de químicos de defensa tales como quitinasa, peroxidasa y proteínas relacionadas con la patogénesis (Silva, et al., 2004). La alfalfa es considerada moderadamente sensible al  $\text{NaCl}$ , intermedia en la tolerancia a la sal entre los forrajes (Maas, 1987), y muy tolerante en las legumbres (Munns, 2008). La alfalfa bajo estrés salino acumula en sus brotes menores concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , mientras que las raíces acumulan concentraciones más altas de  $\text{Na}^+$ , un crecimiento superior está asociado con la exclusión de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  de las hojas de

alfalfa (Kapulnik, Teuber, & Phillips, 1989). Una alternativa es la aplicación de microorganismos benéficos que den capacidad de tolerancia a la sal y el uso de cultivos forrajeros, ambos representan una alternativa económica y sustentable, que además puede ser aprovechados como cultivos de amplia cobertura para la disminución de la erosión del suelo. En la recuperación de suelos salinos se ha estudiado la posibilidad de implementar cultivos forrajeros poco exigentes que se adapten a las condiciones del suelo aplicando de BPCV.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA.

### 2.1. SUELOS EN MÉXICO.

El suelo, es la capa externa de la corteza terrestre constituido por material fragmentado no consolidado, formado por la interacción continua y simultánea de la materia a partir de la cual se origina. Es la capa de material fértil que cubre la superficie de la tierra en donde las plantas obtienen sostén, nutrientes y agua requerimientos para su desarrollo, por lo que es de gran importancia conocer las características morfológicas, físicas y químicas de este elemento sobre todo para la producción agrícola, pecuaria o para la recuperación de suelos contaminados.

En México existe una gran diversidad de suelos debido a la geología del territorio y su interacción con factores como la topografía que es originada por la actividad volcánica, las diferentes altitudes y la presencia de cuatro tipos de climas reconocidos por la clasificación de Köppler (García, 1988) y la cubierta vegetal, entre otros. De acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2007), en el país se tienen 26 de los 32 grupos de suelo reconocidos por el Sistema Internacional Base Referencial Mundial del Recurso Suelo (IUSS, 2007). Dominan los Leptosoles (28.3% del territorio), Regosoles (13.7%), Phaeozems (11.7%), Calcisoles (10.4%), Luvisoles (9%) y Vertisoles (8.6%) que, en conjunto, ocupan 81.7% de la superficie nacional, en el 18.3% restante está el Cambisol (4.2%), Arenosol (1.8%), Solonchak (1.8%), Kastañozem (1.8%), Gleysol(1.5%), Fluvisol (1.3%), Chernozem (1.3%), Andosol (1.3%) y otros como Umbrisol, Durisol, Acrisol, Planosol, Solonetz, Gypsisol, Nitisol, Alisol, Lixisol, Histosol, Ferralsol y Pintosol con un 3.3% (Fig.1).

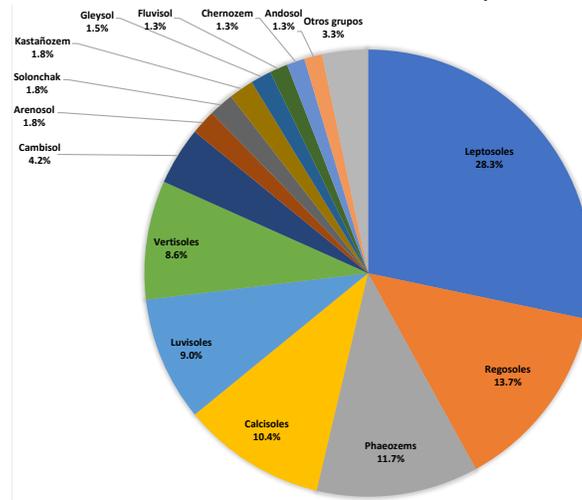


Figura 1.- Superficie relativa de los principales grupos de suelos en México.

Los suelos someros y poco desarrollados como son: Leptosoles, Regosoles y Calcisoles ocupan el 52.4% siendo los de más amplia distribución en el territorio nacional, estas características dificultan su aprovechamiento en las actividades agrícolas lo que aumenta la susceptibilidad a la erosión hídrica y eólica. Los suelos con mayor fertilidad y más explotados son: Phaeozems, Luvisoles y Vertisoles ocupan el 29.3% de la superficie del país (Figura 2).

Los otros 20 grupos<sup>1</sup> de suelos aproximadamente el 18.3%, se distribuyen en un gran número de relieves, microclimas y tipos de vegetación.

Los suelos de México están siendo cada vez más explotados aumentando primeramente los suelos con buena estructura y alto contenido de nutrientes y materia orgánica (Phaeozems, Luvisoles y Vertisoles) abarcando hasta los suelos que se consideran poco aptos para la agricultura como son los Leptosoles, Regosoles y Calcisoles lo anterior debido a la necesidad de satisfacer la demanda alimentaria, aplicando las nuevas agrobiotecnologías en estos suelos poco desarrollados para la agricultura.

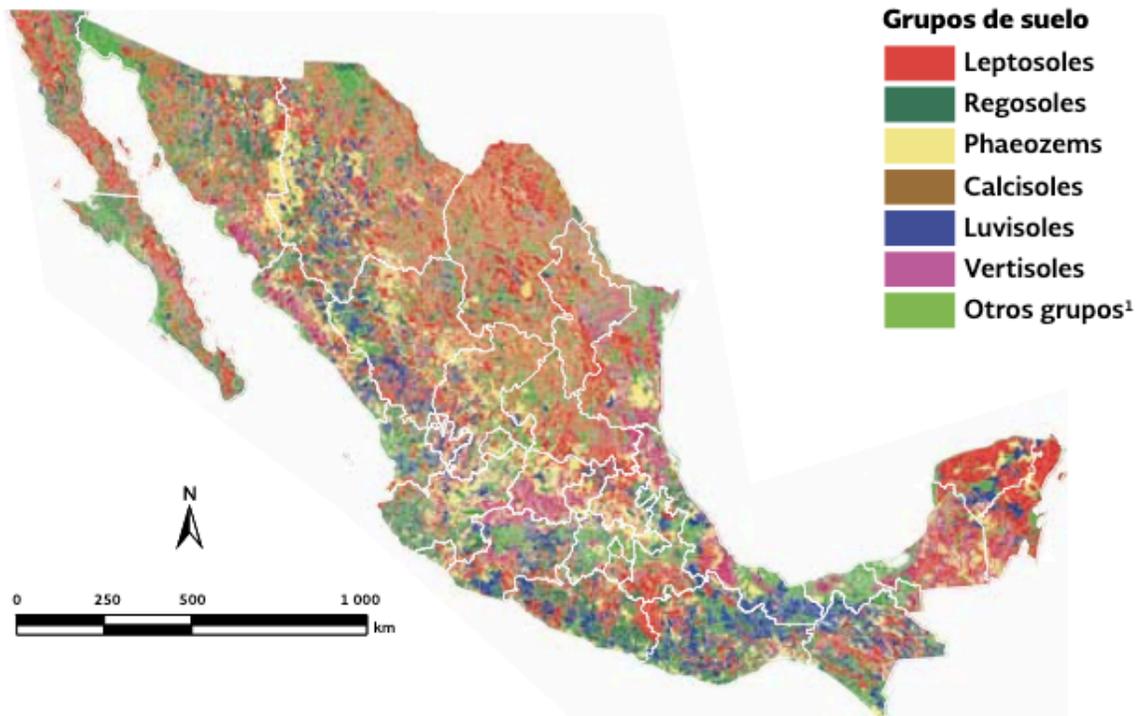


Figura 2.- Principales grupos de suelos en México.

La gran diversidad edáfica representada en 26 grupos de suelos y reconocidos por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO) y el Centro Internacional de Referencia e Información sobre Suelos (ISRIC), seis ocupan el 81.7% del territorio nacional, siendo los de mayor importancia para la agricultura y la ganadería.

<sup>1</sup> Otros grupos: Cambisol, Arenosol, Solonchak, Kastañozem, Gleysol, Fluvisol, Chernozem, Andosol, Umbrisol, Durisol, Acrisol, Planosol, Solonetz, Gypsisol, Nitisol, Alisol, Lixisol, Histosol, Ferralsol y Pintosol.

### 2.1.1. Degradación de Suelos en México.

En México, la degradación del suelo, el cambio climático, la diversidad biológica y el abastecimiento de agua potable forman parte de un problema de orden nacional ya que está estrechamente relacionado con las dificultades sociales y económicas, de seguridad alimenticia, migraciones y la estabilidad política. Por lo que se tiene dentro de las prioridades preservar el medio ambiente.

El 1 de junio de 1995, mediante decreto que se promulga en el Diario Oficial de la Federación, México ratifica la adhesión a la Convención de las Naciones Unidas de Lucha contra la Desertificación en los países afectados por la sequía grave o desertificación. Para efectos de la convención y para el país, desde este decreto de promulgación y hasta principios de 1999, se entendió que la desertificación es la degradación de suelos de zonas áridas, semiáridas y subhúmedas secas, resultante de factores diversos, tales como las variaciones climáticas y actividades humanas. Esta definición incluye tres elementos distintos y con requerimientos diferentes como son las sequías recurrentes (en periodos cortos), fluctuaciones climáticas a largo plazo y degradación de suelos por actividades humanas. Un aspecto de mayor importancia en esta definición es el concepto degradación de la tierra, que es sumamente diferente, conceptualmente, a degradación del suelo ya que en la primera no sólo se contempla la degradación del suelo sino de cualquier otro de los elementos biológicos y físicos del terreno, como son la cubierta vegetal, la biota animal, los recursos hídricos, etcétera.

El suelo proporciona bienes y servicios ambientales con los que se benefician las poblaciones de los ecosistemas como son:

**Servicio de Soporte.** Provee una gran variedad de microambientes para las bacterias, protozoarios, artrópodos y nemátodos involucrados en el reciclaje de la materia orgánica y en la continuidad de los principales ciclos biogeoquímicos.

**Servicio de Regulación.** El suelo tiene la capacidad de filtrar, desactivar o retener compuestos potencialmente tóxicos que pudieran llegar a las aguas subterráneas o afectar las redes tróficas de los ecosistemas terrestres y acuáticos, además la actividad microbiana y las interacciones químicas entre las partículas de arcilla y materia orgánica pueden ayudar a degradar o desactivar estos compuestos, interviene también en la regulación climática por medio de su papel en el ciclo hidrológico y por su capacidad de absorber y posteriormente emitir calor.

**Servicio de Provisión.** Se obtiene del suelo de manera indirecta al proveer biomasa vegetal (alimento) para el consumo humano y animal o para la producción de combustibles y textiles. El suelo hospeda organismos que son fuente de genes utilizados en el desarrollo biotecnológico (como control de patógenos o promover el crecimiento vegetal).

**Servicios Culturales.** Proporcionando áreas verdes que son utilizadas para esparcimiento, actividades recreativas y/o deportivas o de descanso. Los primeros tres son los que dan sustento a la humanidad.

El suelo contiene mucho más carbono que el que se encuentra en la vegetación y cerca de dos veces más que el que se encuentra en la atmósfera (FAO, 2004). Esta captura reduce su liberación a la atmósfera como CO<sub>2</sub>, uno de los principales gases de efecto invernadero. Es muy importante conocer los beneficios que nos proporcionan los suelos así como los niveles y magnitudes de la degradación para buscar las estrategias que nos permitan recuperar y mantener los suelos sanos y fértiles.

De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2019), la degradación del suelo se define como un cambio en la salud del suelo resultando en una disminución de la capacidad del ecosistema para producir bienes o prestar servicios para sus beneficiarios. Los suelos degradados contienen un estado de salud que no pueden proporcionar los bienes y servicios normales del suelo en cuestión en su ecosistema. La degradación es el resultado de la interacción de factores ambientales, como el tipo de suelo, la topografía y el clima, y de factores humanos, como la deforestación, el sobrepastoreo y el uso de los recursos naturales (SEMARNAT, 2014).

En México, se han realizado diversos estudios por parte de instituciones del gobierno federal y educativas, para determinar los procesos y niveles de degradación del suelo, sin embargo debido a la diversidad de aproximaciones, metodologías y definiciones resulta difícil llegar a un resultado equiparable en el que coincidan las cifras, por lo anterior en la redacción de este punto se utilizaron los datos del informe Evaluación de la degradación del suelo causada por el hombre en la República Mexicana, publicado por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) y el Colegio de Posgraduados (CP) en 2003. En el 2002, el 44.9% del territorio nacional presenta degradación en sus cuatro procesos (es decir, degradación química y física y erosión hídrica y eólica), teniendo para cada tipo un nivel que va de ligera, moderada, fuerte y extrema, así como las causas que la originaron.

Una de las causas principales de degradación del suelo es debido a las actividades humanas, en la búsqueda por satisfacer las necesidades materiales transformando los recursos naturales y alterando el medio ambiente. Esta visión del ser humano ha ocasionado que cerca de la mitad de los suelos del país presenten actualmente problemas de degradación en algún grado.

### 2.1.2. Tipo de Degradación de Suelos en México.

El proceso más importante de degradación del suelo en México es el químico. Los efectos más catastróficos se presentan por la disminución de la fertilidad y la reducción del contenido de materia orgánica, dando como resultado zonas improductivas para cualquier actividad económica. De la misma manera, la erosión también afecta las capas superficiales de las tierras, donde si bien es posible seguir desarrollando actividades agropecuarias y forestales, se presenta una baja considerable en la producción y en estas áreas donde es posible revertir el fenómeno mediante un uso sustentable del recurso. Otro tipo de degradación de gran importancia es la erosión hídrica, es un tipo de degradación que afecta

principalmente a las zonas de bosques de coníferas y encinos. Tanto en la erosión hídrica como en la eólica, el tipo dominante fue la pérdida de suelo superficial, caracterizada por la remoción uniforme del material superficial por las escorrentías o el viento, mientras que en el caso de la física fue la compactación.

Se ha identificado que la mayor degradación de los suelos del país se debe a la deforestación asociada a cambios de uso del suelo hacia actividades agropecuarias. El deterioro de los suelos relacionado con tales actividades se debe a prácticas de producción inadecuada tales como la aplicación excesiva de riego, la quema de residuos de cosecha, el exceso de labranza y la falta de prácticas de conservación de suelo y agua. A continuación, se describen los procesos de degradación y sus tipos específicos.

**Erosión Hídrica:** Se define como la remoción laminar o en masa de los materiales del suelo debido a la acción del agua de lluvia, la cual puede deformar el terreno y originar canalillos y cárcavas, este proceso se subdivide en tres tipos:

Deformación de terreno: La compleja topografía del territorio nacional es un factor que, combinado con el manejo inadecuado de las tierras forestales, agrícolas y ganaderas, puede favorecer las escorrentías que erosionan las capas superficiales del suelo.

Efectos fuera de sitio: Las deformaciones del terreno permiten el escurrimiento de una gran cantidad de agua y el arrastre de sedimentos que pueden llegar a presas, ríos o lagunas, entre otros cuerpos de agua, contribuyendo a su contaminación, azolvamiento e incluso a que lleguen a desbordarse e inunden zonas aledañas.

Pérdida de suelo superficial: Cuando el suelo es arrastrado por el agua debido a que no hay suficiente protección por parte de la vegetación se remueven los nutrientes y la materia orgánica, reduce la profundidad de enraizamiento de las plantas disminuyendo la tasa de infiltración y retención de agua.

**Erosión Eólica:** Afecta principalmente a las regiones áridas, semiáridas y subhúmedas secas del país, aunque no es exclusiva de ellas. Las causas también se atribuyen a una insuficiente protección del suelo por la cubierta vegetal, a la destrucción de la estructura del suelo y a niveles bajos de humedad. Los tipos específicos de erosión eólica son los mismos que los de la erosión hídrica. También en este caso predominó la pérdida de suelo superficial.

En estos suelos es común la formación de dunas, lo que dificulta el establecimiento y el desarrollo de la vegetación.

**Degradación Química:** Este proceso conduce a la disminución o eliminación de la productividad biológica del suelo y está fuertemente asociada con la presencia de actividades agrícolas. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2019), determina tres aspectos fundamentales de la degradación química del suelo: agotamiento de nutrientes del suelo, la salinización y la contaminación. Los tipos de degradación son:

Disminución de la fertilidad: Se entiende como el decremento neto de nutrimentos y materia orgánica disponibles en el suelo, es debido a un balance negativo entre las entradas de nutrimentos y materia orgánica (vía la fertilización, conservación de los residuos de las cosechas y los depósitos de sedimentos fértiles) y las salidas (representadas por los

productos de las cosechas, las quemas o la lixiviación), todo ello con importantes repercusiones en la productividad del suelo.

Polución: Se debe a la concentración y efecto biológico adverso de algunas sustancias que pueden provenir de tiraderos a cielo abierto, derrames, residuos industriales, deposición de compuestos acidificantes y/o metales pesados.

Salinización/alcalinización: Están representadas por un incremento en el contenido de sales en el suelo superficial que provoca, entre otras cosas, la disminución del rendimiento de los cultivos. Sus posibles causas incluyen la intromisión de aguas marinas y el uso de sistemas de riego que utilizan agua con una alta concentración de sodio, lo que puede ocasionar la formación de una capa de salitre en la superficie de los suelos que tienen drenaje deficiente, alta evaporación, o se encuentran bajo riego excesivo.

Este tipo de suelo se presenta principalmente en las regiones áridas, en las cuencas cerradas y en las zonas costeras que tienen suelos naturalmente salinos.

Eutrofización: Es el exceso de nutrimentos en el suelo que perjudica el desarrollo de la vegetación y puede deberse a la aplicación excesiva de fertilizantes químicos.

**Degradación Física:** Se refiere a un cambio en la estructura del suelo cuya manifestación más conspicua es la pérdida o disminución de su capacidad para absorber y almacenar agua. Se puede presentar en cinco tipos:

Compactación: Se refiere a la destrucción de la estructura del suelo, es decir al arreglo de las partículas de arena, limo y arcilla para formar conglomerados o agregados de suelo, manteniendo a las partículas unidas por raíces o productos de la actividad microbiana. La compactación frecuentemente se asocia al pisoteo del ganado o al paso habitual de maquinaria pesada.

Encostramiento: En este subproceso los poros se rellenan con material fino, lo que impide la infiltración del agua de lluvia, con el consecuente incremento del volumen de las escorrentías superficiales y la erosión hídrica. Por lo general, este tipo de degradación es mayor en zonas con escasa cobertura vegetal y bajo contenido de materia orgánica, lo que incrementa el daño mecánico de las gotas de lluvia.

Anegamiento: Se debe a la presencia de una lámina superficial de agua sobre el suelo, frecuentemente asociada a la construcción de represas para riego.

Disminución de la disponibilidad de agua: Esta se origina por la extracción excesiva del agua con fines agrícolas o de suministro a la población, o por la disminución de la cobertura vegetal y de la materia orgánica del suelo.

Pérdida de la función productiva: Esto es cuando los suelos son usados en actividades no biológicas (por ejemplo: construcción de infraestructura, minería o canteras) pierden su función productiva.

Las causas de la degradación de los suelos en el país involucran actividades de diversa índole: 35% de la superficie nacional degradada se asocia a las actividades agrícolas y pecuarias (17.5% cada una de ellas) y 7.4% a la pérdida de la cubierta vegetal. El resto se divide entre urbanización, sobreexplotación de la vegetación y actividades industriales.

La degradación del suelo es lo resulta de la interacción de factores ambientales y humanos entre los que se encuentran el tipo de suelo, la topografía, el clima, la deforestación, el

sobrepastoreo, la densidad poblacional, la manera en la que se usan los recursos naturales y el tipo y estado de la cobertura vegetal.

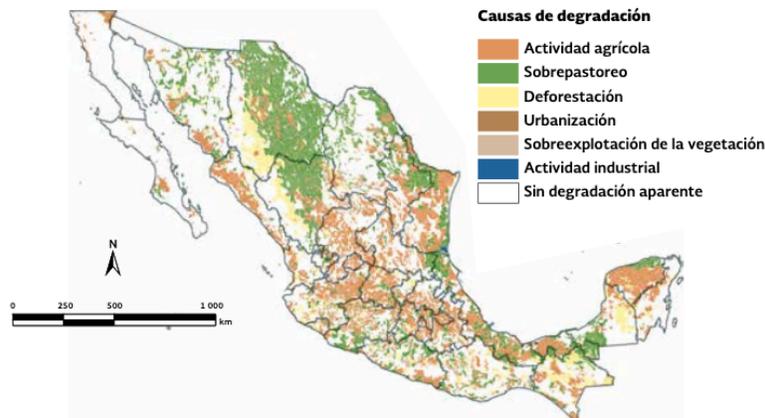


Figura 3.- Principales causas de degradación del suelo en México.

### 2.1.3. Superficie Afectada por proceso de degradación en México.

Cuando se refiere a degradación del suelo se hace referencia a los procesos inducidos por las actividades humanas o de la naturaleza que provocan la disminución de su productividad biológica o de su biodiversidad, afectando su capacidad para sostener la vida.

Respecto a la superficie afectada por los diferentes procesos, la degradación química ocupa el primer lugar con 34.04 millones de hectáreas (17.8%), seguida por la erosión hídrica con 22.73 millones de hectáreas (11.9%), eólica con 18.12 millones de hectáreas (9.5%) y la degradación física con 10.84 millones de hectáreas (5.7%). Los suelos sin degradación aparente cuentan con una superficie de 105.2 millones de hectáreas (55.1%)<sup>2</sup>.

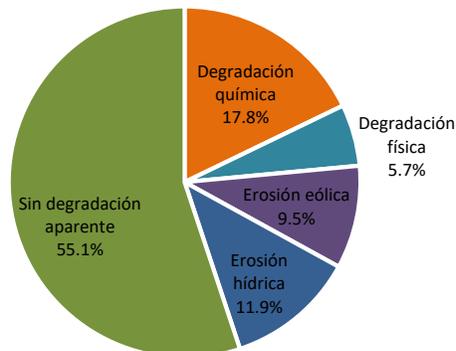


Figura 4.- Superficie afectada por procesos de degradación del suelo en México.

Considerando las subdivisiones de los cuatro grandes procesos, en la erosión hídrica como en la eólica, el tipo específico de degradación fue la pérdida de suelo superficial, siendo el

<sup>2</sup> Se considera la superficie nacional de 1 909 818.5 km<sup>2</sup>. No incluye cuerpos de agua, asentamientos humanos, zonas urbanas, regiones desprovistas de vegetación y superficie insular.

mas dominante. En el caso de la hídrica, represento el 88% de la superficie nacional afectada, y en la eólica fue del 95.5%. En el proceso de degradación química predominó la disminución de la fertilidad del suelo con un 92.7% y en la física la compactación en un 68.2% de la superficie nacional degradada.

Si se analiza desde el punto de vista del nivel de afectación en que se encuentra el suelo, considerando la reducción de la productividad biológica tenemos: que el nivel ligero se refiere a los terrenos aptos para sistemas forestales, pecuarios y agrícolas locales, que presentan alguna reducción apenas perceptible en su productividad; en el nivel moderado se consideran los terrenos aptos para sistemas forestales, pecuarios y agrícolas locales que presentan una marcada reducción en su productividad; para el nivel fuerte los terrenos en la categoría de predio o de granja, tienen una degradación tan severa, que se pueden considerar con productividad irrecuperable a menos que se realicen grandes trabajos de ingeniería para su restauración; en el nivel de extremo, su productividad es irrecuperable y su restauración materialmente imposible.

En la Evaluación de la degradación del suelo causada por el hombre en la República Mexicana (SEMARNAT, 2014), se determinaron los porcentajes que representa cada nivel de degradación del suelo. Para los niveles ligero y moderado en conjunto constituyen el 42.8% (81.78 millones de hectáreas) del país, mientras que el 2.1% (3.97 millones de hectáreas) restante esta representado por los niveles fuerte y extremo.

A continuación, se representa con gráficas los porcentajes de degradación del suelo según el tipo específico y los niveles de afectación.

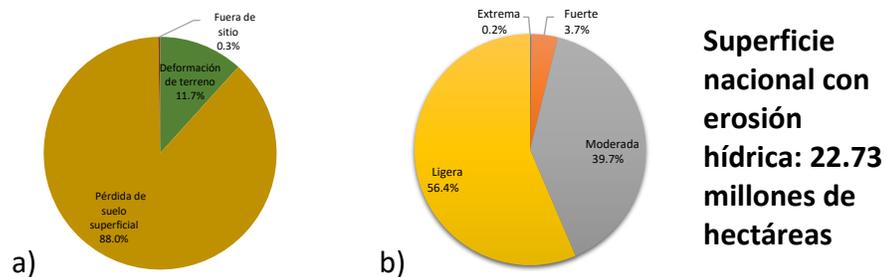


Figura 5.- a) Superficie afectada por erosión hídrica en sus tipos específicos b) Superficie afectada según nivel de afectación.

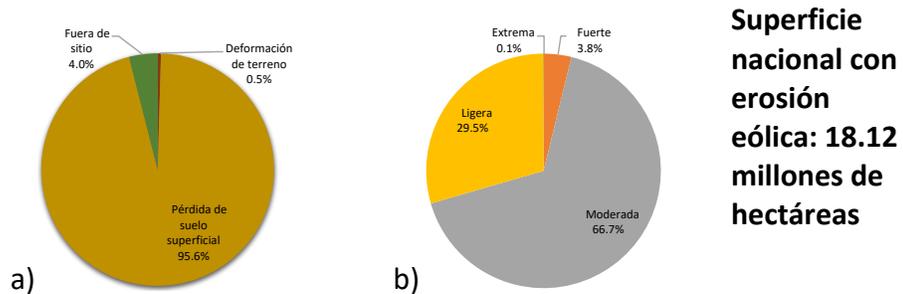


Figura 6.- a) Superficie afectada por erosión eólica en sus tipos específicos b) Superficie afectada según nivel de afectación.

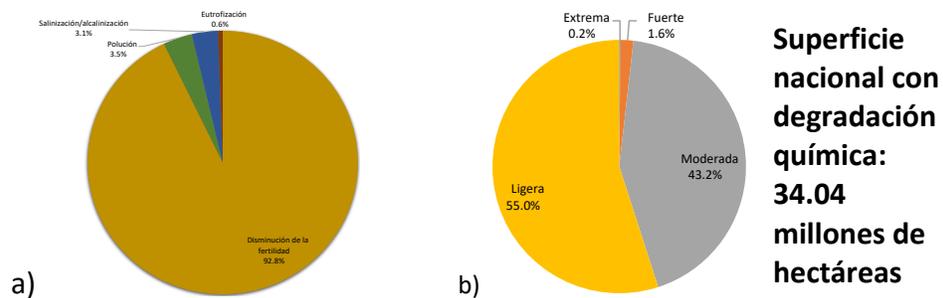


Figura 7.- a) Superficie afectada por degradación química en sus tipos específicos b) Superficie afectada según nivel de afectación.

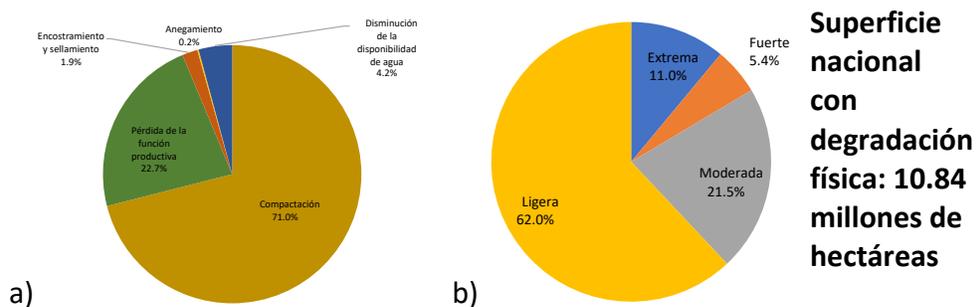


Figura 8.- a) Superficie afectada por degradación física en sus tipos específicos b) Superficie afectada según nivel de afectación.

#### 2.1.4. Superficie afectada por proceso de degradación en Jalisco.

El estado de Jalisco no se queda fuera de los procesos de degradación del suelo, al ser una de las entidades federativas con mayor crecimiento poblacional y demanda de recursos naturales y alimento que satisfagan las necesidades de supervivencia del hombre, las formas y mecanismos de apropiación de los recursos con frecuencia están ligados a la economía social y política, manifestándose en el cambio de la cobertura vegetal y uso de suelo, lo que conlleva al deterioro del medio ambiente debido a la ampliación de la actividad agrícola, ganadera, industrial, a la deforestación y el crecimiento urbano, poniendo en peligro la productividad de los ecosistemas de miles de especies de plantas y animales.

El estado de Jalisco<sup>3</sup> se localiza en la porción media occidental del país y representan el 4.01% de la superficie del territorio nacional, sus municipios son reconocidos por su amplia riqueza natural y biodiversidad de flora y fauna, esto a la vez lo hace un territorio muy vulnerable a la sobreexplotación, contaminación, agotamiento y degradación de los ecosistemas, especialmente los forestales que en muchos casos se debe a las malas practicas agrícolas que dan lugar a la degradación química, que se manifiesta con la acidificación del suelo por el uso de fertilizantes químicos nitrogenados que provocan la pérdida de la capacidad de producción de biomasa, y la salinidad que se da por la

<sup>3</sup> Extensión del territorio del estado de Jalisco 80,137 km<sup>2</sup>.

acumulación de sales ya sea por un mal manejo del agua de regadío o porque contiene gran cantidad de ésta.

La Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT, 2014), reporta en sus estudios realizados la magnitud de la superficie<sup>4</sup> afectada por los procesos de degradación y sus tipos específicos en el estado de Jalisco.

Cuadro 1.- Superficie afectada por los procesos de degradación y sus tipos específicos en el estado de Jalisco.

Procesos	Tipos específicos	Superficie		Totales por proceso	
		Miles de ha	Porcentaje	Miles de ha	Porcentaje
Erosión Hídrica	Deformación del terreno	182.73	2.4	1912.51	25.3
	Pérdida de suelo superficial	1 723.26	22.8		
	Fuera de sitio	6.52	0.1		
Erosión Eólica	Deformación del terreno	0.0	0	204.56	2.7
	Pérdida de suelo superficial	204.56	2.7		
	Fuera de sitio	0.0	0		
Degradación Química	Disminución de la fertilidad	1 528.85	20.2	1656.64	21.9
	Polución	99.29	1.3		
	Salinización - Alcalinización	28.51	0.4		
	Eutrofización	0.0	0		
Degradación Física	Encostramiento y sellamiento	12.99	0.2	302.32	4.1
	Pérdida de la función productiva	170.51	2.3		
	Anegamiento	5.50	0.1		
	Disminución de la disponibilidad de agua	0.0	0		
	Compactación	113.31	1.5		
<b>Superficie estatal afectada</b>		<b>4 076.03</b>	<b>54</b>		

Los suelos que predominan en el estado son háplicos, cambisol eútrico, litosol, vertisol pélico, luvisol vértico, xerosol lúvico, planosol eútrico, xerosol háplico y el feozem háplico y lúvico (INAFED, 2005). Los principales usos que se tienen son: agricultura 26.6%, pastizal 9.3%, bosque 31.1%, matorral 9.0%, selva 24.5% y otros usos 22.2%. El estado cuenta con 19 Área Naturales Protegidas (ANP), que representan el 10% de su territorio. Las causas de la deforestación obedecen al cambio de uso de suelo, incendios forestales, tala ilegal, permisos especiales para infraestructura y minería, ganadería extensiva realizada de manera directa en la vegetación natural y en menor medida los desastres naturales.

Una cuarta parte del territorio de Jalisco es suelo agrícola. Es decir cerca de dos millones de hectáreas, de las cuales 2 mil han dejado de ser productivas debido a procesos de degradación del suelo, entre los cuales sobresale la degradación química (acidificación, salinización), degradación física (compactación) y la erosión hídrica y eólica (pérdida de material orgánico), afirma profesor investigador del Instituto de Medio Ambiente y

<sup>4</sup> Superficie en miles de hectáreas y porcentajes.

Comunidades Humanas, del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuaria, el académico también manifiesta que la degradación del suelo puede revertirse, porque ya hay tecnologías de conservación y restauración del suelo (Curiel Ballesteros, 2013).

#### 2.1.5. Tipos de suelos en el municipio de Zacoalco de Torres.

De acuerdo con el Diagnóstico del Municipio de Zacoalco de Torres<sup>5</sup> (IIEG , 2018), su subsuelo esta conformado en su mayoría por roca aluvial 44.3%, seguida de basalto 37.9%, brecha volcánica 11.9%, arenisca 3.9%, extrusiva ácida 1.5% y otros 0.6% son el deposito de materiales sueltos, provenientes de rocas preexistentes, que han sido transportados por corrientes superficiales de agua. El suelo predominante es phaeozems (44.1%), presenta acumulación pronunciada de materia orgánica en el suelo mineral superficial, superficie oscura, sin carbonatos secundarios (a menos que estén muy profundos), alta saturación de bases. Es el cuarto tipo de suelo más abundante en el país con de profundidad variable. Cuando son profundos se utilizan para la agricultura de riego o temporal. Los grupos de suelos que podemos encontrar en el municipio se muestran en el siguiente cuadro (IIEG , 2018).

Cuadro 2.-Grupos de suelos en Zacoalco de Torres.

Suelos	Porcentaje (%)
Phaeozems	44.1
Vertisols	33.7
Solonchaks	20.9
Fluvisols	0.3
Otros	0.7

El uso de suelo predominante en el municipio es la agricultura 39.3%, selva 36.0%, bosque 4.6%, asentamiento humano 2.6%, pastizal 0.8%, otro tipo de vegetación 1.1%; el 15.7% restante del suelo esta cubierto por cuerpos de agua. En el ordenamiento ecológico territorial, 56.18% de su territorio está bajo políticas ambientales de conservación.

#### 2.1.6. Extensión de suelo salino en el municipio de Zacoalco de Torres.

De acuerdo con la Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, (SEMARNAT, 2007), en el país se tiene 139 256.8 hectáreas de suelo ensalitrado y el estado de Jalisco cuenta con una superficie de 911.2 ha de suelo con esta condición. El 20.9% de la superficie del municipio de Zacoalco de Torres, que equivale a 80.674 km<sup>2</sup> de su territorio presenta el tipo de suelo denominado solonchaks, que se caracteriza por la alta concentración de sales solubles, la extensión total de estos suelos en el mundo se estima en unos 260 millones de ha (FAO, 2015).

<sup>5</sup> Superficie municipal de Zacoalco de Torres 386 km<sup>2</sup>.

Los Solonchaks son suelos que tienen alta concentración de sales solubles en algún momento del año y presentan una Conductividad Eléctrica (CE) superior a 4 mmhos/cm, están ampliamente confinados a regiones climáticas áridas y semiáridas y regiones costeras en todos los climas. Principalmente en áreas donde el agua freática ascendente alcanza la parte superior del suelo o donde se presenta algo de agua superficial, con vegetación de pastos y/o hierbas halófilas, y en zonas con mal manejo del riego. Los nombres comunes internacionales son suelos salinos y suelos afectados por sales. La presencia de las sales afecta la asimilación de nutrientes por las plantas y la actividad microbiana del suelo. La salinidad tiende a afectar otros tipos de suelo, pero en menor medida y pueden llevar al reconocimiento de fases salinas (FAO, 2018).

De acuerdo con los Grupos de Suelos de Referencia (GSR) de la Base de Referencia Mundial (WRB), se tiene en la tercera posición a los suelos con enraizamiento limitado (FAO, 2015):

Cryosols: Afectados por permafrost<sup>6</sup>

Leptosols: Delgados o con muchos fragmentos gruesos

Solonetz: Alto contenido de Na intercambiable

Vertisols: Condiciones alternas de sequía-humedad, arcilla de expansión-retracción.

Solonchaks: Alta concentración de sales solubles.

Dos de los tipos de suelos que conforman la superficie del municipio de Zacoalco de Torres pertenecen al grupo anterior, es decir que aproximadamente el 54.6% de su superficie son suelos con enraizamiento limitado.

## **2.2. SALINIZACIÓN DE LOS SUELOS.**

La salinización es la acumulación de sales solubles en el suelo y/o agua, esto tiene su origen de manera antropogénica, es decir cuando se asocia a sistemas de riego que van aportando sales al suelo ya sea en menor o mayor cantidad dependiendo de la calidad del agua, y la otra forma es la natural cuando se trata de suelos bajos con planicies que periódicamente son inundados con lluvias de temporal y que al evaporarse se van acumulando las sales; o cuando el nivel de las aguas subterráneas es poco profundo y el agua que asciende por capilaridad contiene sales disueltas. La sal dominante en estos suelos por lo general es cloruro de sodio (NaCl), por lo que también se le llama suelo salino-sódico. Al converger estos dos elementos en el suelo se incrementa la presión osmótica del agua del suelo, impidiendo el aprovechamiento de los nutrientes por las raíces y ocasionando un desbalance nutricional en las plantas. La calidad del agua y del suelo para la agricultura

---

<sup>6</sup> Permafrost: capa de suelo o roca, a alguna profundidad debajo de la superficie, en la cual la temperatura ha estado continuamente por debajo de 0 °C por lo menos algunos años. Existe donde el calentamiento de verano no alcanza a llegar a la base del terreno congelado. Base referencial mundial del recurso suelo 2014.

influyen directamente en el rendimiento de los cultivos. La salinización altera las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo y por lo tanto su fertilidad.

A continuación, se enlistan algunos procesos que favorecen la salinización del suelo de forma natural o primaria y antropogénica o secundaria:

Material geológico original es rico en sales.

Zonas áridas o semi-áridas (secanos). La mayor parte de la lluvia se evapora dejando una alta concentración de sales en el suelo.

Lluvias escasas. Las bajas precipitaciones no aseguran el lavado de las sales que se acumulan en el suelo como resultado del riego. No hay aportes de agua a los acuíferos. Se usa agua de menor calidad.

Alta evaporación. En regiones con una tasa alta de evaporación las sales se concentran en la capa superior del suelo.

Nivel freático superficial. Las sales que contiene el agua subterránea llegan por capilaridad a la superficie en donde se evaporan por el viento y el sol dejando una concentración de sales en el suelo.

Alta capilaridad del suelo. Relacionado con los dos puntos anteriores.

Tipo de suelo. Suelos arcillosos tienden a salinizarse con más facilidad.

Depresiones del terreno. Las sales superficiales son arrastradas por el agua a las partes bajas del terreno.

Drenaje insuficiente: Suelos poco permeables con dificultad para el lavado de las sales o drenajes inadecuados.

Calidad del agua de riego y su manejo. La baja calidad del agua de riego es en ocasiones el aporte principal del cloruro, boro y sodio. La implementación de riego adecuado puede reducir la toxicidad de estos elementos.

Bombeo exagerado, sobre todo de pozos cercanos al mar.

El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, 1954), define a los suelos salinos y sódico como aquellos que presentan concentraciones excesivas de sales solubles, sodio intercambiable o ambos, y que afectan o alteran la productividad. Los clasifica en cuatro clases: normal, salino, sódico y salino - sódico, esta clasificación toma criterios evaluativos como Conductividad Eléctrica (CE) de  $4 \text{ dS m}^{-1}$  o  $\text{mmhos/cm}$  a  $25^\circ\text{C}$  para la salinidad y el 15% para el Porcentaje de Sodio Intercambiable (PSI). Este criterio es para suelos halomórficos es decir con exceso de sales, de zonas áridas, usualmente destinados a riego, y no siempre se aplica correctamente a los suelos halomórficos de zonas húmedas y subhúmedas. Para estos suelos se toma en consideración los niveles excesivos de sodio intercambiable es decir PSI y el valor Relación Adsorción Sodio (RAS).

Cuadro 3.- Clasificación de los suelos afectados por sales (USDA, 1954).

Suelo	pH	CE (dS/m <sup>-1</sup> )	PSI (%)
Normal	6 a 7	< 2	< 15
Salino	< 8.2	> 4	< 15
Sódico	> 8.2	< 4	> 15
Salino-Sódico	> 8.2	> 4	> 15

### 2.2.1. Suelo salino.

De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, un suelo salino es el que contiene suficientes sales solubles como para reducir el crecimiento de las plantas, con conductividad eléctrica (CE) en la pasta de saturación igual o mayor a 4 dS m<sup>-1</sup> o mmhos/cm.

También se considera suelo salino (o suelos halomórficos) cuando las concentraciones de sales solubles, es decir aquellos compuestos químicos inorgánicos más solubles que el yeso<sup>7</sup> (CaSO<sub>4</sub>), que en su mayoría se componen por cationes como calcio (Ca<sup>2+</sup>), magnesio (Mg<sup>2+</sup>), sodio (Na<sup>+</sup>), potasio (K<sup>+</sup>), amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) y aniones como cloruros (Cl<sup>-</sup>), sulfatos (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), carbonatos (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>), bicarbonatos (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), y otros elementos como Boro y Selenio; alcanzan niveles muy altos en la zona radicular de la planta impidiendo el crecimiento y desarrollo de estas. Estos suelos son característicos de zonas de climas áridos y semiáridos, secos en su mayoría del tiempo, donde las bajas precipitaciones no permiten la lixiviación de las sales de manera natural hacia estratos más profundos y son insuficientes para compensar las pérdidas de agua por la evapotranspiración, en algunas regiones estos suelos permanecen inundados en el temporal de lluvias y posteriormente se evaporan, condición que favorece la acumulación de sales. Los suelos salinos también pueden desarrollarse en regiones donde el nivel freático es muy cercano a la superficie.

Un suelo salino se distingue de los sódicos o sódicos-salinos porque contienen altas concentraciones de sales solubles, buena estructura y permeabilidad, relación de adsorción de sodio (RAS) baja, la conductividad eléctrica de los extractos de saturación de estos suelos es superior a 4 mmhos/cm, pero el porcentaje de sodio intercambiable es inferior a 15%. La lectura del pH es menor a 8.5. El cloruro y el sulfato son los principales aniones solubles presentes en estos suelos, el contenido de bicarbonato es relativamente bajo y no hay carbonato. Los contenidos de sodio soluble superan en algo a los de calcio más magnesio, pero la relación de adsorción de sodio es bajas. El yeso y los carbonatos alcalinotérreos son componentes comunes de los suelos salinos. Como muestran los valores de la conductividad eléctrica de los extractos de saturación, los niveles de salinidad son lo suficientemente altos como para afectar negativamente el crecimiento de la mayoría de las plantas. La recuperación de los suelos solo requerirá lixiviación, siempre que el drenaje sea adecuado (USDA, 1954).

<sup>7</sup> Solubilidad del yeso es de 0.241 gramos en 100 mililitros de agua a 0°C.

Las plantas que crecen en dicho suelo pueden aparecer atrofiadas y tener hojas engrosadas y un color verde oscuro. Se pueden producir reducciones sustanciales en el crecimiento de la planta sin cambios apreciables en la apariencia (Strawn, et al., 2015).

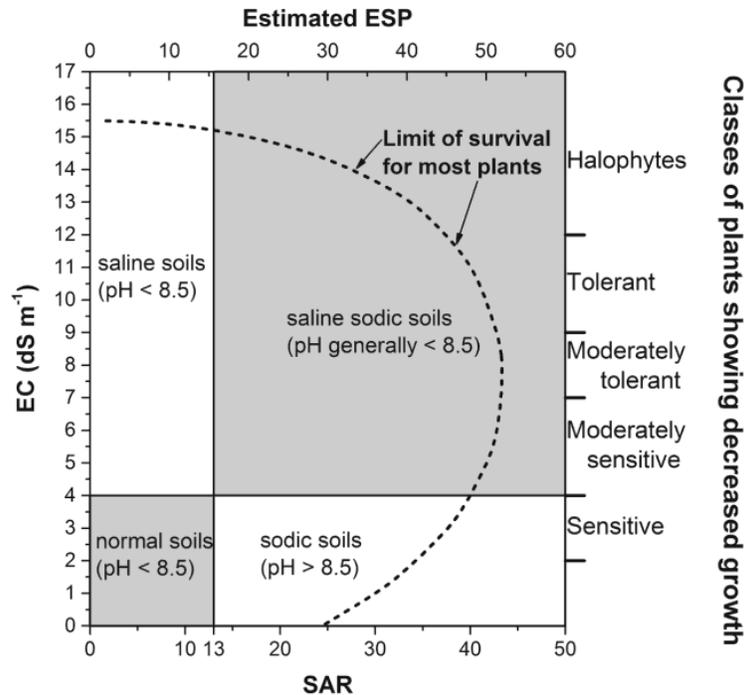


Figura 9.- Clasificación de la salinidad del suelo y la sodicidad en relación con la conductividad eléctrica, RAS, PSI y pH.

La curva muestra el límite de supervivencia de la mayoría de las plantas. También se muestra el rango de CE para plantas. La relación adsorción de sodio (RAS) y el porcentaje de sodio intercambiable (PSI) se deriva de una relación empírica (Strawn, 2015).

### 2.2.2. Suelo sódico.

Suelo en el cual el porcentaje de sodio intercambiable (PSI) es de 15 o más, o el que contiene el sodio suficiente como para afectar adversamente las propiedades físicas y la permeabilidad del suelo (SEMARNAT, 2002).

Son suelos de las regiones semiáridas, semihúmedas y húmedas en los cuales predomina el ión  $\text{Na}^+$  en el complejo de cambio. El sodio se presenta en mayor cantidad que la suma de  $\text{Ca} + \text{Mg}$ . Esta condición indica un pH alto, un deterioro en su estructura física que provoca dispersión química de arcilla transportándola hacia las capas más bajas del suelo, lo que ocasiona la compactación y disminución de su porosidad que impide el libre flujo de agua, gases y el desarrollo de las raíces, causando un desbalance nutricional en el suelo que afecta a las plantas. Los cationes dominantes presentes de mayor a menor abundancia son  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  y los aniones en el mismo orden son  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  y  $\text{Cl}^-$ .

La conductividad eléctrica (CE) es menor de 4 mmhos/cm a 25°C, el PS es mayor de 15, la RAS es mayor a 13 y el pH se encuentra entre 8.5 - 10. Se le conoce también como “salitre negro” ó “solonetz”(USDA, 1954). Las sales provocan que la materia orgánica se disperse y disuelta se deposita sobre la superficie del suelo adquiriendo ese color oscuro distintivo.

### 2.2.3. Suelo salino-sódico.

Los suelos que contienen suficiente sodio intercambiable para interferir con el crecimiento de la mayoría de los cultivos y que contiene cantidades apreciables de sales solubles. El porcentaje de sodio intercambiable (PSI) es mayor de 15%, la conductividad del extracto de saturación mayor de 4 dS m<sup>-1</sup> o mmhos/cm (NOM-021-RECNAT-2000).

Debido a que las sales solubles previenen la hidrólisis, el pH de los suelos salinos-sódicos es típicamente menor de 8.5, sí el contenido de sales es elevado el pH raramente es superior. La composición de las sales solubles generalmente es similar a la de los suelos salinos. Solo las plantas más sensibles a la sal se verán afectadas por el nivel de salinidad, el porcentaje de sodio intercambiable es demasiado alto para permitir el crecimiento de la mayoría de los cultivos (USDA, 1954). La relación de adsorción de sodio (RAS) es alta.

El peligro principal ocurre cuando estos suelos se lixivian para eliminar sales. La lixiviación elimina las sales más rápido de lo que elimina el Na<sup>+</sup> intercambiable, lo que provoca la conversión a suelos sódicos. Esto puede reducir severamente la permeabilidad del suelo o la conductividad hidráulica y afectar las relaciones planta-agua y la capacidad de lixiviación para el control de la salinidad (Strawn, et al., 2015).

### 2.2.4. Naturaleza de las sales solubles del suelo.

Las sales pueden encontrarse en el suelo precipitadas bajo las formas de cristales, disueltas en la solución o retenidas y adsorbidas en el complejo de cambio<sup>8</sup>. El contenido de sales en cualquiera de estas tres situaciones está cambiando continuamente debido a variaciones en la capacidad de humedad edáfica y al aporte que se pueda estar presentando en cada condición. En el período seco la cristalización aumenta, por lo tanto la solución se concentra y aumentan las sales en la matriz del suelo; y en el período húmedo, el comportamiento es inverso (Narvaez M, 2014).

Las sales más abundantes están formadas por los siguientes cationes: Calcio (Ca<sup>2+</sup>), magnesio (Mg<sup>2+</sup>), sodio (Na<sup>+</sup>), potasio (K<sup>+</sup>) y aniones como cloruros (Cl<sup>-</sup>), sulfatos (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), carbonatos (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>), bicarbonatos (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

---

<sup>8</sup> Complejo de cambio, es el conjunto de partículas con capacidad para adsorber los iones de las soluciones del suelo.

De acuerdo con (Ibañez N, 2004), las sales más frecuentemente encontradas en los suelos son:

Cloruros: NaCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, KCl,

Sulfatos: MgSO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Nitratos: NaNO<sub>3</sub>, KNO<sub>3</sub>

Carbonatos: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

Bicarbonatos: NaHCO<sub>3</sub>

Las sales proceden fundamentalmente de la meteorización de las rocas ígneas y se acumulan en rocas sedimentarias, suelo y agua; algunos otros iones constituyentes como el cloro y el azufre proceden de las emanaciones volcánicas. La liberación de estos iones componentes de las rocas y minerales, su movilidad y su facilidad para acumularse en las depresiones fisiográficas, dando suelos salinos, es inversamente proporcional al coeficiente de energía de estos iones.

Los nitratos, cloruros, sulfatos y carbonatos de iones alcalinos y alcalinotérreos, son las sales que con mayor facilidad han de formarse como consecuencia de la meteorización de la corteza terrestre.

Los cloruros junto con los sulfatos son las principales sales formadas en este proceso. El calcio, el magnesio y el sodio son los cationes que mayoritariamente se unen a los cloruros y a los sulfatos para formar las sales, con menor frecuencia se encuentra el potasio y los bicarbonatos, carbonatos y nitratos.

#### 2.2.5. Solubilidad de cationes y aniones.

La solubilidad de las sales determina su movilidad y precipitación, así como su concentración. Los análisis de suelos salinos y alcalinos para cationes y aniones solubles generalmente se realizan para determinar la composición de las sales presentes. Las determinaciones de cationes solubles se utilizan para mantener las relaciones entre el total de cationes y otras propiedades de las soluciones salinas, como la conductividad eléctrica y la presión osmótica. Las concentraciones relativas de los diversos cationes en los extractos de agua del suelo también proporcionan información sobre la composición de los cationes intercambiables en el suelo.

El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, 1954), determinó que los cationes y aniones solubles comúnmente determinados en suelos salinos y alcalinos son calcio, magnesio, sodio, potasio, carbonato, bicarbonato, sulfato y cloruro. Ocasionalmente se determinan nitrato y silicato soluble. Al hacer análisis completos, una terminación de nitrato se indica si la suma de cationes expresados en una base equivalente excede significativamente la de los aniones comúnmente determinados. Cantidades apreciables de silicato soluble ocurren solo en suelos alcalinos que tienen altos valores de pH. En los

análisis realizados por los métodos habituales, cualquier silicato soluble presente se determina como carbonato.

Los valores obtenidos de las determinaciones de los contenidos de cationes y aniones solubles de los suelos salinos y alcalinos están marcadamente influenciados por el contenido de humedad al que se realiza la extracción. Las cantidades totales disueltas de algunos iones aumentan con el aumento del contenido de humedad, mientras que simultáneamente los de otros pueden disminuir; Los valores casi invariablemente obtenidos para el contenido total de sal aumentan con el aumento del contenido de humedad en la extracción.

Cuadro 4.- Solubilidad de sales en agua a 20oC, gramos/litro.

Sal	Solubilidad	Sal	Solubilidad
CaCO <sub>3</sub>	0.01	Ca (HCO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	262
MgCO <sub>3</sub>	0.1	NaCl	360
CaSO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	2.4	MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	710
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	71	NaNO <sub>3</sub>	921
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	195	MgCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O	1,670
MgSO <sub>4</sub>	262	CaCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O	2,790

Los cloruros y nitratos son los más solubles, después los bicarbonatos junto a los sulfatos, siendo en general los menos solubles los carbonatos. Por tanto, serán estos últimos los primeros en precipitar, seguidos del sulfato cálcico y no serán considerados dentro del concepto de sales solubles, concepto que se refiere a sales muy solubles, concretamente empiezan a partir del carbonato sódico.

#### 2.2.6. Dinámica de las sales en el suelo.

La dinámica de las sales solubles en el tiempo y el espacio es relativamente rápida; la carga negativa de los coloides del suelo retiene a los cationes en delgada película de agua y sus solutos (sustancias disueltas) adherida a la superficie de las partículas. Esto disminuye la pérdida de Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>, K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> por lixiviación, manteniéndolos disponibles para la absorción vegetal. Los cationes alcalinos y alcalinotérreos, debido a su tamaño y carga, tienen poca oportunidad de precipitar. Estos son considerados como los macronutrientes esenciales de las plantas. Debido a las condiciones del suelo, estos cationes pueden ser fácilmente intercambiables por otros iones. Esta condición de cationes intercambiables permite su manipulación para y por la fertilización de los suelos, así como para la remediación de los problemas agrícolas, especialmente la salinización (Bohn, et al., 2001).

Existen tres categorías de cationes en el suelo. Algunos iones tienden a reprecipitar como minerales formadores de suelo (fase sólida); otros tienden a permanecer en la solución, estando en constante asociación con las superficies de fase sólida (iones intercambiables);

otros son competidores de carga superficial y son lixiviados fácilmente (iones solubles) (Bohn, et al., 2001).

La distribución de los cationes intercambiables principales en los suelos agrícolas productivos tiene la siguiente secuencia:  $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{K}^+ = \text{NH}_4^+ = \text{Na}^+$ . La composición de cationes intercambiables en suelos diferentes tiende a ser mucho más uniforme que la composición del material parental de los cuales se derivan dichos cationes (Bohn, et al., 2001).

#### 2.2.7. Efecto de las sales del suelo en las plantas.

La temperatura relativa, la humedad y la contaminación del aire afecta significativamente la respuesta de la planta a la salinidad. La mayoría de los cultivos toleran más estrés de salinidad si el clima es frío y húmedo que si hace calor y seco. Los efectos combinados de la salinidad y condiciones de alta demanda de evaporación, ya sea causada por alta temperatura, baja humedad, viento o sequía, son más estresantes que la salinidad sola. Porque el clima tiene un efecto marcado en la respuesta de la planta a la salinidad (Garg y Gupta, 2011).

Los efectos de la salinidad en las plantas incluyen estrés osmótico, interrupción del transporte de iones a través de membrana, toxicidad directa de altas concentraciones citoplasmáticas de sodio y cloruro en los procesos celulares y estrés oxidativo inducido (Volkov y Beilby, 2017).

De acuerdo con (Strawn, 2015), el principal efecto de las sales solubles en las plantas es osmótico. Las plantas deben gastar grandes cantidades de energía para absorber el agua de la solución del suelo, energía que de otro modo se usaría para el crecimiento de las plantas y el rendimiento de los cultivos. Las raíces de las plantas son membranas semipermeables que permiten el paso del agua, pero restringen la mayor parte de la sal. Por lo tanto, el agua es osmóticamente más difícil de extraer de soluciones cada vez más salinas. Las plantas que crecen en medios salinos pueden aumentar sus concentraciones osmóticas internas al producir ácidos orgánicos o al absorber sales. Este proceso se llama ajuste osmótico. El efecto de la salinidad en la planta parece ser principalmente el desvío de energía de los procesos de crecimiento para mantener el diferencial osmótico entre el interior de la planta y la solución del suelo. Uno de los primeros procesos de los que se desvía esta energía es el alargamiento celular. Las células del tejido de la hoja continúan dividiéndose, pero no se alargan. La aparición de más células por unidad de área foliar explica el color típicamente verde oscuro de las plantas estresadas osmóticamente.

El crecimiento relativo de las plantas en presencia de salinidad se ha denominado tolerancia a la sal. Lo anteriormente descrito se resume separando las plantas en varios grupos tolerantes a la sal; en términos de crecimiento relativo de la planta en varios niveles de salinidad (CE) del extracto de saturación del suelo y en la tolerancia a la sal (CE) de la planta en el que se observa una disminución del rendimiento. Los valores de tolerancia a la sal se

proporcionan en términos de porcentaje de disminución del rendimiento por unidad de aumento de la salinidad.

Algunas plantas son particularmente sensibles a la salinidad durante las etapas de germinación o plántulas. Además de los efectos osmóticos generales, muchas plantas son sensibles a iones específicos en aguas de riego o soluciones de suelo (Strawn, 2015). La toxicidad del boro es probablemente la más común. Por ejemplo, la remolacha azucarera, la alfalfa y la lechuga toleran niveles relativamente altos de boro ( $2-4 \text{ mg L}^{-1}$  B en agua de riego). En contraste, la naranja, el aguacate, muchas frutas de hueso y muchas nueces son intolerantes a las concentraciones de boro que exceden los  $0.3 \text{ mg L}^{-1}$  en el agua de riego. El boro es generalmente más difícil de controlar que la salinidad porque se filtra más lentamente que las sales solubles.

Para plantas que son extremadamente sensibles al sodio, tan solo el 5% de sodio intercambiable puede conducir a acumulaciones tóxicas de sodio en los tejidos de las hojas de frutas caducifolios, cítricos, nueces, frijoles y aguacates. Sin embargo, la sensibilidad directa al sodio intercambiable o soluble es difícil de diferenciar de los efectos perjudiciales del sodio en las propiedades del suelo (es decir, permeabilidad y potencial osmótico).

La toxicidad del cloruro parece ser similar a la toxicidad del sodio. Las acumulaciones excesivas en los tejidos cerca de las puntas de las plantas, el final de la corriente de transpiración de la planta, conducen a necrosis, muerte de las puntas y márgenes de las hojas, y eventual muerte de la planta. Algunas plantas pueden filtrar iones como el cloruro a través de las membranas de la raíz. Además, los portainjertos diferentes pueden poseer diferentes capacidades para excluir el sodio o el cloruro de las partes aéreas.

Un tercer mecanismo para el daño de la sal a las plantas son los desequilibrios nutricionales. Un ejemplo son las toxicidades de bicarbonato reportadas para algunos ambientes salinos. La toxicidad resulta principalmente de la disponibilidad reducida de  $\text{Fe}^{3+}$  al alto pH común en suelos con alto contenido de bicarbonato, en lugar de los iones de bicarbonato en sí mismos. Las necesidades nutricionales de las plantas también pueden variar con los tipos de sales presentes. Por ejemplo, los niveles altos de  $\text{Na}^+$  pueden conducir a deficiencias de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . Los altos niveles de pH de los suelos sódicos pueden acentuar las deficiencias de muchos de los microelementos y conducirlos a altas concentraciones de aluminio soluble.

#### 2.2.8. Mecanismos de tolerancia de las plantas al estrés salino.

La mayoría de las plantas de importancia agrícola son sensibles a la salinidad, y su producción se ve significativamente reducida cuando se cultivan en suelos salinos. Como se menciona anteriormente, la presencia de sal disminuye la absorción de agua y nutrientes presentes en el suelo y en grandes cantidades pueden ser tóxicos para una variedad de procesos metabólicos. Las plantas expuestas a la sal en el ambiente de la raíz tienden a ajustar sus concentraciones osmóticas internas para mantener un gradiente constante del

potencial hídrico desde la rizósfera hasta las raíces y los brotes de las plantas (Garg y Gupta, 2011).

El transporte de iones es el punto de partida crucial que determina la tolerancia a la salinidad en las plantas: esto incluye el transporte de cationes y aniones a través de las membranas plasmáticas de las células de la raíz, el transporte a través de las membranas vacuolares, el transporte de iones de larga distancia a través de xilema y floema y la excreción de sal y acumulación por las células especializadas (Volkov y Beilby, 2017).

El transporte a través de membranas está mediado principalmente por los canales iónicos y los transportadores, que aseguran el paso selectivo de iones específicos. En la planta modelo sensible a la sal, *Arabidopsis thaliana*, se predice que más de mil genes codifican proteínas de membrana: más de cien de estos determinan los canales y transportadores catiónicos. La diversidad molecular y estructural de estos canales iónicos y transportadores es sorprendente. Difieren en el número de dominios transmembrana de proteínas, en los filtros de selectividad para permitir el paso de iones específicos, en las estructuras moleculares para la activación (apertura y cierre) por el cambio de la diferencia de potencial (Volkov y Beilby, 2017).

La resistencia a la sal incluye mecanismos de evitación y tolerancia. La evitación de sal puede operar a través de (a) exclusión pasiva de iones debido a la impermeabilidad de la membrana, (b) extrusión activa de iones por bombas específicas o (c) dilución por crecimiento rápido asociado con un aumento en el contenido de agua. Una consecuencia inevitable del crecimiento en un suelo / solución salina que contiene altas concentraciones de sal es el desarrollo de estrés osmótico, seguido de una pérdida de turgencia (Garg y Gupta, 2011).

La tolerancia al estrés osmótico puede operar a través de la tolerancia a la deshidratación, que permite que las células sobrevivan sin crecer cuando disminuye la turgencia, o evitando la deshidratación a través de la osmoregulación, que incluye un aumento de la concentración de solutos en la célula y, en consecuencia, la rehidratación. Los solutos pueden ser sustancias orgánicas o iones de sal que pueden ser secuestrados en la vacuola y equilibrados osmóticamente por solutos orgánicos en el citoplasma. Lo primero ocurre cuando se impide que los iones de sal entren a las células. De acuerdo con (Garg y Gupta, 2011), los mecanismo de resistencia y tolerancia que pueden ser operativos en diferentes plantas se muestran esquemáticamente en la figura 10.

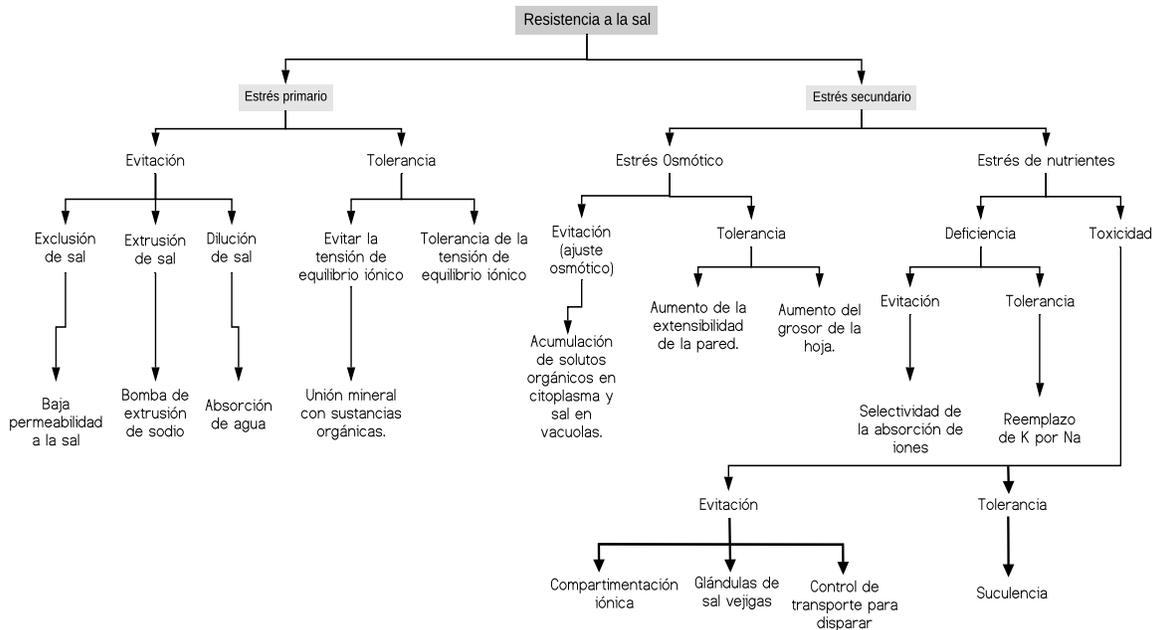


Figura 10.- Mecanismo de resistencia a la sal en diferentes plantas (Garg y Gupta, 2011).

La mayoría de los estudios sobre los mecanismos de tolerancia a la sal en las plantas superiores se han centrado en el ajuste osmótico y la compartimentación iónica en toda la planta (raíces / brotes) o en el nivel celular (citoplasma / vacuola). De estudios más recientes, ha derivado una hipótesis coherente y ampliamente aceptada con respecto a las características principales de la tolerancia a nivel celular. Se han avanzado tres proposiciones interrelacionadas (Garg y Gupta, 2011):

En condiciones salinas, las grandes cantidades de sales (principalmente, pero no exclusivamente, cloruro de sodio) que se absorben en las hojas y contribuyen masivamente al ajuste osmótico se acumulan principalmente en la vacuola cuando las concentraciones de tejido exceden aproximadamente 200 mM.

La concentración de iones inorgánicos en el citoplasma se mantiene en el rango de 100 a 200 mM y el citoplasma muestra una fuerte selectividad por potasio sobre sodio, magnesio sobre calcio y fosfato sobre cloruro o nitrato.

En condiciones hiperosmóticas (presión osmótica celular superior a -0.9 MPa), el mantenimiento del equilibrio osmótico a través del tonoplasto requiere la acumulación en el citoplasma de solutos orgánicos no tóxicos, que generalmente se denominan solutos compatibles. La naturaleza química de estos solutos compatibles varía de un grupo taxonómico de otro, pero la mayoría son derivados de polioles o dipolos de nitrógeno.

La planta puede utilizar uno o varios de los métodos siguientes para evitar el estrés salino interno:

1-Exclusión de sales: Por disminución de la permeabilidad selectiva de la membrana a los iones sodio y cloruro. La permeabilidad diferencial de la célula vegetal depende de un balance (normalmente alrededor de 10:1) entre cationes monovalentes ( $K^+$ ,  $Na^+$ ) y divalentes (principalmente  $Ca^{2+}$ ). El ión  $Ca^{2+}$ , por tanto, puede actuar como un agente

protector de la membrana, garantizando su impermeabilidad a elevadas concentraciones exteriores de NaCl (50 mM o más). Bajo estas condiciones habría una adsorción preferencial de ión  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la membrana modificando sus propiedades y disminuyendo la permeabilidad para los cationes monovalentes y otros iones. De esta forma, al menos teóricamente podría mantener el balance iónico normal en presencia de concentraciones moderadamente altas de electrolitos, siempre que en el medio radical exista suficiente  $\text{Ca}^{2+}$ .

2-Expulsión activa de sales: Existen dos sistemas diferentes de ATPasas activadas por  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en las células de plantas haloresistentes. Uno de óptima actividad a elevadas concentraciones de  $\text{K}^+$  y que se localiza en el plasmalema celular y otro localizado en el tonoplasto y que requiere altas concentraciones de  $\text{Na}^+$ . De este modo existiría un sistema de transporte que tomaría  $\text{Na}^+$  del citoplasma expulsándolo al medio circundante e intercambiándolo por  $\text{K}^+$ , y otro que también tomaría  $\text{Na}^+$  del citoplasma y lo vertería a la vacuola. Por lo tanto, está bien documentado que las bombas de expulsión de iones, reconocibles bioquímicamente como ATPasas de membrana, desempeñan un papel muy importante para mantener las funciones celulares en las plantas haloresistentes, contribuyendo a que la concentración de  $\text{Na}^+$  libre en el citoplasma sea lo más baja posible. Relacionadas con la expulsión de iones se encuentran las glándulas salinas excretoras de sal, las cuales pueden estar constituidas por una o varias células rodeadas de cutícula, pero siempre con una gran cantidad destinada a recoger y dar salida a la secreción salina.

3-Dilución de sales: Dado que lo esencial del efecto de las sales no es su cantidad absoluta, sino su concentración una absorción de agua en cantidad suficiente puede prevenir un incremento peligroso en el líquido tisular. Así, en numerosas halófitas cuando la concentración de solutos alcanza un determinado valor, la célula (especialmente las del parénquima) se alargan permitiendo un mayor contenido de agua que previene la concentración excesiva del jugo celular y conduce a la succulencia de la hoja. Una respuesta característica a la salinidad consiste en la reducción de la transpiración por incremento tanto de las resistencias del mesófilo como estomática a la pérdida de vapor de agua, lo que limita la absorción pasiva de iones por las raíces. Esto se encuentra bien relacionado con el aumento de la síntesis de ácido abscísico en plantas sometidas a estrés salino.

Mecanismos de tolerancia al daño producido por el estrés salino:

1-La planta puede amortiguar el cambio en el balance iónico, excretando la sal absorbida en la vacuola, evitando así el daño directo e indirecto.

2-La planta puede tolerar el cambio en el balance iónico.

Las elevadas concentraciones de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  pueden inducir deficiencias en otros elementos esenciales. Las plantas de tolerancia natural a la sal, los halófitos, que sobreviven a altas concentraciones de sal, proporcionan una fuente única de rasgos para la tolerancia y de genes para proteínas de membrana involucradas en el transporte de iones y sus reguladores: los genes que funcionan bajo salinidad podrían transferirse a cultivos agrícolas importantes para aumentar su tolerancia (Volkov y Beilby, 2017).

Todos estos son mecanismos que evitan la deficiencia nutritiva, pero también los hay de tolerancia como es la capacidad de sustitución de unos iones por otros en procesos no demasiado específicos. Así sucede con el  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , por ejemplo en la activación de ciertas enzimas, como la malato deshidrogenasa. Sin embargo el  $\text{Na}^+$  no parece ser capaz de sustituir el papel del  $\text{K}^+$  en la síntesis de clorofila o proteína ( aunque todavía quedan muchas incógnitas acerca de los factores que condicionan la especificidad de un determinado ion). En el caso del sodio, las plantas tolerantes a la salinidad lo aculan y depositan a lo largo de su eje de crecimiento, en mayor cantidad en las partes más jóvenes de las hojas, donde es encapsulado dentro de la vacuola central de las células. Existen células especializadas en las superficies de las hojas y los tallos que se desarrollan durante el crecimiento, permaneciendo reprimidas en ausencia de sal, pero su crecimiento se ve estimulado en presencia de sales.

### **2.3. BACTERIAS DEL SUELO.**

Las bacterias del suelo pueden clasificarse en dos grandes grupos:

Especies nativas o autóctonas: están presentes en el suelo y su número se mantiene aproximadamente constante, están adaptadas a las condiciones del suelo ya sea participando en las actividades bioquímicas del ecosistema o permaneciendo largos periodos sin tener actividad metabólica.

Especies alóctonas o invasoras: a diferencia de las anteriores, no participan activamente en las funciones bioquímicas de la comunidad y crecen por periodos cortos. Llegan al suelo con las precipitaciones, en tejidos enfermos, aguas negras, entre otras (Alexander, 1980).

De acuerdo con su morfología podemos caracterizar a las poblaciones bacterianas en bacilos (forma de bastón), cocos (forma esférica) y los espirilos. Los bacilos Gram positivo son los más abundantes por su capacidad de formar endósporas (célula inactiva y altamente resistente que preserva el material genético) que les permitan sobrevivir cuando se agota el alimento en tiempos de estrés extremo (incluye temperatura alta, alta irradiación UV, desecación, daño químico y la estructura enzimática).

El Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA, 2019), dividen a las bacterias en cuatro grupos funcionales:

Descomponedores: La mayoría de las bacterias pertenecen a este grupo, consumen compuestos de carbono simples, como exudados de raíz y los residuos frescos de las plantas. Mediante este proceso, los desechos de las bacterias se convierten en materia orgánica y en formas útiles para el resto de los organismos en la red alimentaria del suelo; proporcionando minerales que necesita la planta. Estas bacterias pueden descomponer pesticidas y contaminantes en el suelo. Los descomponedores son especialmente importantes para inmovilizar o retener nutrientes en sus células, evitando así su pérdida, como el nitrógeno, de la zona de enraizamiento.

Bacterias mutualistas: Estas forman asociaciones con las plantas. Las más conocidas son las bacterias fijadoras de nitrógeno.

Bacterias patógenas: Los patógenos bacterianos incluyen especies de *Xymomonas* y *Erwinia*, y especies de *Agrobacterium* que causan la formación de agallas en las plantas.

Bacterias litotróficos o quimioautótrofos: Estas obtiene su energía de compuestos de nitrógeno, azufre, hierro o hidrógeno en lugar de compuestos de carbono. Algunas de estas especies son importantes para el ciclo del nitrógeno y la degradación de los contaminantes.

Desde el punto de vista agronómico, las bacterias se agrupan de acuerdo con la función que desempeñan (Benintende y Sanchez, 2019):

Bacterias amonificadoras: descomponen las sustancias orgánicas nitrogenadas y las transforman en amonio o en sales amoniacales.

Bacterias nitrificadoras: oxidan el amoníaco hasta nitrato.

Bacterias fijadoras de nitrógeno: toman el N atmosférico ( $N_2$ ) y lo transforman en compuestos aprovechables por los vegetales.

Bacterias celulolíticas: degradan la celulosa. Es el grupo más numeroso por ser este compuesto el más abundante en los residuos vegetales.

Bacterias pectinolíticas: degradan la pectina y sus derivados. El género más abundante es *Arthrobacter*.

### 2.3.1. Distribución y abundancia bacteriana.

Una cucharadita de suelo productivo generalmente contiene entre 100 millones y mil millones de bacterias (USDA, 2019). La abundancia en el suelo se puede medir por medio de un conteo en placa que varía entre  $10^8$  a  $10^{10}$  bacterias/g de suelo. Aunque son numerosas, debido a su tamaño, sólo representan menos de la mitad de la biomasa microbiana total (Benintende y Sanchez, 2019).

Un solo gramo de suelo contiene millones de individuos y varias miles de especies de bacterias. Un típico suelo sano puede contener varias especies de animales vertebrados, varias especies de lombrices, 20-30 especies de ácaros, 50 -100 especies de insectos, decenas de especies de nemátodos, centenas de especies de hongos, y quizás miles de especies de bacteria y actinomicetos (FAO, 2019).

En suelos aireados predominan bacterias y hongos, en cambio en los medios anaerobios las bacterias son responsables de la mayoría de procesos bioquímicos. Las poblaciones bacterianas sobresalen por su crecimiento rápido y por su capacidad de descomponer una variedad de sustratos naturales. El tipo de suelo y las prácticas agrícolas determina la cantidad y tipo de bacterias (Alexander, 1980).

La mayoría de los microorganismos son mesófilos con una temperatura óptima cercana a  $25^\circ$  y  $30^\circ$  C y una capacidad de crecimiento entre  $15^\circ$  y  $45^\circ$ C. Los mesófilos constituyen la mayor parte de las bacterias en el suelo (Barbosa Amaya, 2011).

Los microorganismos con sus innumerables reacciones metabólicas permiten incorporar los materiales del suelo en el mundo viviente, están en la base de la productividad y fertilidad del suelo. Desde el punto de vista agronómico se puede utilizar a estos microorganismos para mejorar la salud y la productividad de las cosechas. Estos microorganismos se encuentran en mayor abundancia en el volumen de suelo que rodea a las raíces de las plantas, en una región de entre 1-2 mm de suelo a partir de la superficie de la raíz, extendiendo su efecto hasta 4 mm en lo que conoce como rizósfera, es decir la parte del suelo en donde el sistema radical induce la proliferación microbiana al liberar secreciones, grasa y exudados radiculares, que contienen según la especie vegetal y estado fenológico entre el 10 y el 50% de la energía fijada por fotosíntesis. Es bastante común que la población bacteriana en la rizósfera sea 100–1,000 veces mayor que en el resto del suelo. El 15% de la superficie de la raíz está cubierta por poblaciones microbianas que pertenecen a varias especies bacterianas (Govindasamy, et al., 2011). Las raíces representan de 5 a 6 ton por hectárea en un terreno cultivado. Estos exudados ricos en compuestos carbonatados sirven de alimento a los microbios de la rizósfera que, a cambio, proporcionan minerales que necesita la planta.

### 2.3.2. Influencias ambientales y población bacteriana.

Las variables del medio ambiente que afectan la densidad y composición de la población de bacterias del suelo son: temperatura, humedad, aireación, materia orgánica, pH y suministro de nutrientes inorgánicos (Alexander, 1980). Otras variables que también pueden influir son: el tipo de cultivo, la estación del año y profundidad del suelo.

**Humedad:** controla la actividad microbiana ya que el principal componente del protoplasma es el agua, si existe exceso de agua limita el intercambio gaseoso disminuyendo el suministro de oxígeno y creando un ambiente anaerobio que repercute en la disminución de la población de bacterias aerobias. La mayor densidad de población bacteriana se encuentra por lo regular en regiones con humedad del 50 al 75% de la capacidad de retención del suelo.

**Temperatura:** Cada microorganismo tiene una temperatura de crecimiento óptima y un intervalo fuera del cual el crecimiento se detiene. Esto nos permite delimitar tres grupos microbianos:

Los microorganismos mesófilos (con temperaturas óptimas entre los 25° y 30°C y na capacidad de crecimiento entre 15 y 45°C).

Los psicrófilos (estas especies se desarrollan mejor a temperaturas inferiores a los 20°C, estas bacterias no son comunes en los suelos).

Los termófilos (bacterias crecen fácilmente a temperaturas comprendidas entre 45° y 60°C, algunas son incapaces de crecer a menos de 40°C).

La temperatura determina la velocidad de los procesos bioquímicos, un incremento de ésta aumenta la velocidad de reacción hasta el punto la transformación.

**Materia orgánica:** Varias especies de bacterias prosperan en diferentes fuentes de alimentos y en diferentes microambientes. En general, las bacterias son más competitivas cuando hay sustratos lábiles (fáciles de metabolizar). Esto incluye residuos frescos de

plantas jóvenes y los compuestos que se encuentran cerca de las raíces vivas. Las bacterias se concentran especialmente en la rizósfera, la región estrecha al lado y en la raíz. Existe evidencia de que las plantas producen ciertos tipos de exudados de raíz para estimular el crecimiento de bacterias protectoras (Ingham, 2019).

pH: Para la mayoría de las bacterias el pH óptimo está cercano a la neutralidad, las variaciones extremas pueden inhibir su crecimiento. En pH bajos las comunidades son menores, en caso contrario las bacterias se ven favorecidas en pH más alcalinos.

Suministro de nutrientes inorgánicos: Muchos suelos son deficientes en nutrientes lo que se traduce en plantas con contenidos bajos en elementos esenciales para la salud humana. Para contrarrestar esta deficiencia se aplican fertilizantes inorgánicos, estas sustancias tienen doble función ya que abastecen a las plantas como a los microorganismos.

Las prácticas de cultivo ejercen también numerosos efectos biológicos que varían en profundidad del suelo y el tipo de residuo de cultivo que se incorpora al suelo; en ocasiones se puede ver reflejado en la mejora de la estructura y porosidad del suelo, favoreciendo el movimiento del aire y exponiendo nutrientes orgánicos a la acción bacteriana.

Las bacterias alteran el ambiente del suelo en la medida en que el ambiente del suelo favorecerá ciertas comunidades de plantas sobre otras. Antes de que las plantas puedan establecerse en sedimentos frescos, la comunidad bacteriana debe establecerse primero, comenzando con las bacterias fotosintéticas. Estas fijan el nitrógeno y el carbono atmosféricos, producen materia orgánica e inmovilizan suficiente nitrógeno y otros nutrientes para iniciar los procesos de ciclo del nitrógeno en el suelo joven. Entonces, las especies de plantas sucesionales tempranas pueden crecer. A medida que se establece la comunidad de plantas, diferentes tipos de materia orgánica ingresan al suelo y cambian el tipo de alimento disponible para las bacterias. A su vez, la comunidad bacteriana alterada cambia la estructura del suelo y el ambiente para las plantas. Algunos investigadores piensan que es posible controlar las especies de plantas en un lugar mediante el manejo de la comunidad de bacterias del suelo (Ingham, 2019).

### 2.3.3. Ambientes salinos y bacterias halófilas.

La concentración de sal en el agua extraída de un suelo saturado (llamado extracto de saturación) define la salinidad de este suelo (ver cuadro 5). Si esta agua contiene menos de 3 gramos de sal por litro, se dice que el suelo no es salino. Si la concentración de sal del extracto de saturación contiene más de 12 g/l, se dice que el suelo es altamente salino (FAO, 2019).

Cuadro 5.- Concentración de sal en el agua del suelo (extracto de saturación).

g/l	Milimhos/cm	Salinidad
0 – 3	0 – 4.5	No salino
3 – 6	4.5 – 9	Ligeramente salino
6 – 12	9 - 18	Solución salina
Más de 12	Más de 18	Altamente salino

La mayoría de los cultivos no crecen en suelos salinos, ya que la sal causa estrés iónico y osmótico, interviniendo en los procesos bioquímicos, fisiológicos y moleculares de las plantas. Además, algunas sales son tóxicas para las plantas cuando están presentes en alta concentración.

Los cultivos altamente tolerantes pueden soportar una concentración de sal del extracto de saturación de hasta 10 g/l. Los cultivos moderadamente tolerantes pueden soportar concentraciones de sal de hasta 5 g/l. El límite del grupo sensible es de aproximadamente 2.5 g/l (FAO, 2019).

Los ambientes salinos tienen una flora bacteriana natural, que desempeña un papel importante en estos ecosistemas. Generalmente contienen una salinidad equivalente a 4 - 30% de NaCl, estos pueden ser acuáticos (marismas) o terrestres (suelos salinos). Los ambientes salinos albergan grupos bacterianos taxonómicamente diversos, que poseen características fisiológicas y estructurales modificadas que les permiten sobrevivir en condiciones salinas. La mayoría de estas bacterias halófilas pueden osmoregularse sintetizando osmolitos orgánicos compatibles específicos, como glutamina, prolina y glicina betaína. Algunas de estas bacterias pueden acumular solutos inorgánicos como Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Mg<sup>2+</sup> (Zahran, 1997).

La morfología de la bacteria generalmente se modifica, al mantener el equilibrio osmótico de la concentración de sales intracelular similar a la del exterior; la célula generalmente se alarga, se hinchan y muestran contracción, además de los cambios en la célula y el volumen citoplasmático. La composición química de las membranas también puede modificarse ocasionalmente, y el patrón de síntesis de proteínas, lípidos, ácidos grasos y polisacáridos puede cambiar con un aumento moderado de la salinidad. Sin embargo, se desconoce si existen modificaciones estructurales fundamentales en las células de las bacterias halófilas, estos cambios sustanciales en las propiedades celulares de estas bacterias solo se producen a concentraciones superiores a 2 M de NaCl (Zahran, 1997).

Las bacterias halófilas se han definido como quimioheterótrofos, microorganismos que se han adaptado a la disponibilidad de nutrientes que se encuentran en el medio. Se han registrado casos de bacterias halófilas que han fijado el CO<sub>2</sub> en un principio de fotosíntesis. Estas bacterias se consideran elementos esenciales en el ambiente salino debido a su actividad, como la degradación de los restos vegetales, la fijación de nitrógeno y la producción de metabolitos activos que son cedidos para otros microorganismos o para las plantas mismas.

Los halófilos, organismos amantes de la sal que florecen en ambientes salinos en concentraciones de sal de 50 g/l (equivalente a 0.85 M NaCl) o superior, y toleran 100 g/l

de sal (equivalente a 1.7 M NaCl) al menos (Aharon, 2008). Se clasifican en función de la cantidad de sal que requieren para su desarrollo y crecimiento: como débiles, moderados, extremos y halotolerantes, según sus requerimientos de cloruro de sodio. Mientras que la mayoría de los organismos marinos son halófilos leves, los halófilos moderados y extremos son generalmente microbios más especializados que habitan en ambientes hipersalinos que se encuentran en todo el mundo en lugares áridos, costeros y de aguas profundas, minas de sal subterráneas y salinas artificiales.

Cuadro 6.- Clasificación de los halófilos en función de la salinidad.

Halófilos	Concentración de NaCl
Halófilos extremos	Arriba de 20%
Halófilos moderados	Arriba de 10 - 20%
Halófilos débiles	0.5 – 10%
Halotolerantes	Toleran la salinidad

Tomado de: (Ramirez, et al., 2006)

Adaptaciones de las bacterias halófilas ocurren en la membrana citoplasmática ya que constituye una barrera que separa el citoplasma del medio externo en el que pueden producirse cambios en la concentración de sales, por lo que jugar un papel importante en la respuesta de la célula a dichos cambios. Se ha demostrado que la adaptación de la composición lipídica de las membranas celulares frente a una nueva situación de estrés osmótico incluye modificaciones en el tipo de fosfolípidos existentes en las membranas, y en el tipo de ácidos grasos que forman parte de los lípidos (Ramirez, et al., 2006).

Los mecanismos de estos microorganismos para adaptarse (haloadaptación) al estrés osmótico se basa en la acumulación masiva de compuestos en el citoplasma para compensar la presión osmótica del medio externo. Estos compuestos pueden ser iónico o no iónicos, según el tipo de microorganismo (Ramirez, et al., 2006). Los mecanismos de acumulación son:

*Salt-in* es típico en bacterias halófilas moderadas anaerobias estrictas, estas acumulan en el citoplasma iones inorgánicos, principalmente K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>. El aumento de KCl en el citoplasma conlleva a una adaptación a las altas concentraciones salina de todas las proteínas y otros compuestos celulares como los ribosomas.

*Salt out* es el que utilizan las bacterias halófilas como no halófilas. Las halófilas moderadas (arqueas metanógenas) acumulan en su citoplasma compuestos orgánicos de bajo peso molecular que mantiene el equilibrio osmótico sin interferir con el metabolismo celular, por lo que se denominan solutos compatibles. Este sistema permite la adaptación a las fluctuaciones en la presión osmótica del medio. Los solutos compatibles pueden acumularse tras su transporte al interior celular desde el medio exterior, o mediante síntesis. Los principales solutos compatibles son: aminoácidos, azúcares, glicina betaína, ectoína e hidroxiectoína.

Cuadro 7.- Microorganismos halófilos.

Dominio	Género	Referencia	Dominio	Género	Referencia
Arquea	<i>Halobacterium sp</i>	Oren, 1999	Bacteria	<i>Halobacteroides sp.</i>	Rainey et al., 1995
	<i>Methanohalobium sp</i>	Zhilina y Zavarin, 1987		<i>Haloanaerobacter sp.</i>	Rainey et al., 1995
	<i>Methanohalophilus sp</i>	Paterek y Smith, 1988		<i>Salibacillus sp.</i>	Mota et al., 1997
Bacteria	<i>Acetohalobium sp</i>	Zhilina y Zavarin, 1990		<i>Halobacillus sp.</i>	Mota et al., 1997
	<i>Halorhodospira sp.</i>	Imhoff y Süling, 1996		<i>Marinococcus sp.</i>	Mota et al., 1997
	<i>Actinopolyspora sp.</i>	Skerman et al., 1980		<i>Salinococcus sp.</i>	Mota et al., 1997
	<i>Salinibacter sp.</i>	Antón et al., 2002		<i>Tetragenococcus sp.</i>	Mota et al., 1997
	<i>Halanaerobium sp.</i>	Rainey et al., 1995		<i>Halomonas sp.</i>	Vreeland et al., 1980
	<i>Halocella sp.</i>	Rainey et al., 1995		<i>Chromohalobacter sp.</i>	Ventosa et al., 1989
	<i>Halothermothrix sp.</i>	Rainey et al., 1995		<i>Salipiger sp.</i>	Martínez-Cánovas et al., 2004
	<i>Palleronia sp.</i>	Martínez-Checa et al., 2005			

Tomado de: (Castillo, et al., 2011).

#### 2.3.4. Asociación bacteria y planta.

Las plantas participan constantemente en interacciones con un amplio número de bacterias, cuando existe una asociación benéfica para ambas partes se conoce como mutualismo en el que dos seres vivos de diversas especies viven juntos habitualmente con beneficios recíprocos para el hospedero (planta) y simbionte (bacteria). La mayoría de estas asociaciones se dan a nivel de la rizósfera (región del suelo inmediata a la raíz) en donde la actividad microbiana es intensa, de acuerdo con la definición hecha por Hittner (1904), es el volumen del suelo que rodea a la raíz de las plantas con la mayor población bacteriana que está influenciada por los exudados de las raíces. La rizósfera a su vez se divide en tres partes: rizoplano (microorganismos pegados a la superficie de la raíz), endorizósfera (microorganismos dentro de la raíz) y ectorizósfera (microorganismos que actúan de manera circundante a la raíz). Dicha asociación se inicia como respuesta al llamado efecto rizosférico, el cual sucede a través de un intercambio de señales que se disparan a partir de la interacción microbio-planta, con resultados claramente benéficos para los dos.

Estos microorganismos bajo ciertas condiciones se pueden establecer y desarrollar en tres regiones de la planta: la rizósfera, el rizoplano y la filosfera. En la rizósfera y en el rizoplano es donde se localiza la mayor cantidad de microorganismos debido a que las raíces excretan cantidades considerables de azúcares, aminoácidos, hormonas, ácidos orgánicos, glúcidos, mucigel y vitaminas. La filosfera es la superficie de la hoja de la planta. Los microorganismos que colonizan esa región suelen ser muy abundante entre los que se encuentran hongos y bacterias. Las bacterias que colonizan la rizósfera (rizobacterias), la filosfera (epífitas) y el interior de los tejidos vegetales (endófitos).

Algunas bacterias endofíticas ejercen varios efectos beneficiosos sobre las plantas hospedadoras, como la estimulación del crecimiento de las plantas mediante la producción de hormonas vegetales, la fijación de nitrógeno y la inducción de resistencia a los patógenos

de las plantas, mayor absorción de nutrientes, mayor tolerancia a la sequía (May, Khai, Ayme, & Yu, 2016). Cerca del 40% del carbono fijado en la fotosíntesis, en la parte aérea de las plantas puede ser excretado a la rizósfera, lo cual beneficia a la mayoría de las bacterias que la habitan al nutrirse de los exudados de las raíces.

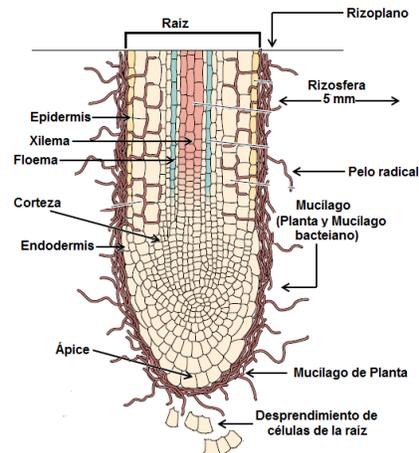


Figura 11.- Partes de la Raíz.

Estos microorganismos que establecen asociaciones con las plantas ya sean patógenos o simbióticos se catalogan como:

**Saprófitos:** Son los que se alimentan de materia inorgánica y materia orgánica en descomposición. Estos microorganismos desempeñan un papel muy importante en los ciclos biogeoquímicos de los elementos y el catabolismo de la materia orgánica al transformar las moléculas biológicas complejas en moléculas sencillas.

**Simbiótica o benéficos:** Son los que favorecen el desarrollo de la planta con la que interactúan a cambio de alimento, viéndose reflejado en el crecimiento, productividad y sanidad de la planta. Se pueden encontrar como biofertilizantes, fitoestimulantes, biocontroladores y rizoremediadores.

**Patógenos o parásita:** Estos microorganismos provocan enfermedades en la planta, ocasionan cambios en su estructura o fisiología que se refleja en las hojas, tallos y raíces. Al conjunto de acontecimientos mediante los cuales se origina y desarrolla una enfermedad se le conoce como patogénesis.

Los microorganismos de la rizósfera que establecen relaciones de simbiosis con las plantas intervienen en el ciclo de algunos elementos minerales como el P, N, C, Fe, etcétera favoreciendo la nutrición de las plantas y obteniendo de ellas exudados de las raíces en forma de ácidos orgánicos, mucílagos, aminoácidos o azúcares. Los microorganismos que establecen esta simbiosis se pueden agrupar como: bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), hongos formadores de micorrizas arbusculares y bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico.

## 2.4. BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL (BPCV)

Los microorganismos del suelo son parte primordial en los ecosistemas forestales, muchos de los cuales tienen el potencial de influir significativamente en el crecimiento de las plantas al establecer una relación de simbiosis. Estas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) o comúnmente conocidas como PGPR (por sus siglas en inglés, que significan *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* este tipo de bacteria fue definido por (Kloepper & Schroth, 1978)). Las BPCV ayudan a mejorar el crecimiento y la nutrición de las plantas, el patrón de crecimiento de las raíces y las respuestas a los factores de estrés externos, incluida la producción de sustancias químicas que promueven el crecimiento (Kloepper, Zablowicz, Tipping, & Lifshitz, 1991). En general, alrededor del 2-5% de las bacterias de la rizósfera son BPCV (Antoun y Prevost, 2006). Las BPCV son las herramientas potenciales para una agricultura sostenible y una tendencia para el futuro. Uno de los mecanismos por los cuales las bacterias se adsorben en las partículas del suelo es mediante intercambio iónico.

Las plantas participan constantemente en interacciones con un amplio grupo de BPCV, que colonizan la rizósfera y proporcionan múltiples beneficios en la agricultura al mejorar la productividad de los cultivos, el contenido de nutrientes y suprimir el crecimiento de patógenos. El desarrollo de interacciones beneficiosas entre plantas y microbios basadas en datos genómicos, transcriptómicos, proteómicos y metabólicos tanto de BPCV como del huésped conducirá a inoculantes microbianos optimizados para mejorar el rendimiento del cultivo y el contenido de nutrientes. Las BPCV son promovidas como una tecnología verde que reducirá el uso de fertilizantes químicos mejorando así la salud del suelo.

Ciertas cepas de bacteria del suelo *Pseudomonas fluorescens* tienen actividad antifúngica que inhibe algunos patógenos de las plantas. *P. Fluorescens* y otras especies de *Pseudomonas* y *Xanthomonas* pueden aumentar el crecimiento de las plantas de varias maneras. Pueden producir un compuesto que inhibe el crecimiento de patógenos o reduce la invasión de la planta por un patógeno. También pueden producir compuestos (factores de crecimiento) que aumentan directamente el crecimiento de las plantas (Kennedy, 2019). Estas bacterias que mejoran el crecimiento de las plantas se producen naturalmente en los suelos, pero no siempre en cantidades lo suficientemente altas como para tener un efecto importante; se dice que un suelo es naturalmente fértil cuando los organismos del suelo están liberando nutrientes inorgánicos de las reservas orgánicas a una velocidad suficiente para sostener el rápido crecimiento de las plantas (Goswami, et al., 2016). Actualmente los agricultores realizan inoculación de semillas con bacterias antifúngicas, como *P. Fluorescens*, para garantizar que las bacterias reduzcan los patógenos alrededor de la semilla y la raíz del cultivo (Kennedy, 2019).

Algunas de las especies de BPCV más estudiadas incluyen las bacterias asociativas a los géneros *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Arthobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Frankia*, *Serratia*, *Thiobacillus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* por sus efectos beneficiosos sobre el crecimiento y salud de las plantas (Kloepper, Rodríguez-Kabana, McInroy, & Young, 1992), (Glick, 1995), (Vassey, 2003). La bacteria rizosférica *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium trifolii* y *Agrobacterium rhizogenes* estimularon el crecimiento de las plantas en suelos cultivables. Las bacterias

promotoras del crecimiento produjeron las enzimas fitohormonas, auxina, celulasa, pectinasa entre otros, para mejorar el crecimiento y la salud de la planta.

#### 2.4.1. Mecanismos de acción de las BPCV.

En base a la interacción con la planta huésped los mecanismos por los que BPCV favorecen el crecimiento y desarrollo de las planta se han agrupado en directos e indirectos, pudiendo darse la combinación de dos o mas mecanismos de acción. La diferencia principal es que los mecanismos indirectos, como regla general, son los que ocurren fuera de la planta, mientras que los directos ocurren dentro de ella y afectan directamente a su metabolismo a través de la modificación de la expresión de genes (Birch y Kamoun, 2000).

Los primeros pueden involucrar aquellos que afectan el equilibrio de los reguladores del crecimiento de las plantas, ya sea porque los microorganismos mismos liberan reguladores del crecimiento que están integrados en la planta o porque los microorganismos actúan como aceptadores de hormonas liberadas por las plantas, y aquellos que inducen el metabolismo de la planta que conduce a una mejora en su capacidad de adaptación (Glick, 2014).

El mecanismo indirecto requiere la participación de procesos metabólicos defensivos de las plantas, que responden a la señal enviada por las bacterias que influyen en la planta. Se incluyen dos mecanismos importante en este grupo: inducción de resistencia sistémica a patógenos de plantas (estrés biótico) y protección contra condiciones ambientales no saludables (estrés abiótico) (Aeron, et al., 2011).



Figura 12.- Diagrama de los mecanismos de acción de la BPCV (Goswami, Thakker, y Dhanhukia, 2016).

#### 2.4.1.1. Mecanismos directos.

Son los procesos que facilitan el acceso de nutrientes poco disponible y modulan los niveles de hormonas que intervienen en el crecimiento.

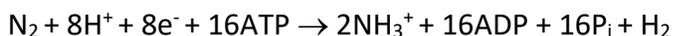
##### **Fijación biológica de nitrógeno (FBN).**

Las cepas bacterianas que poseen el rasgo de fijación de nitrógeno se clasifican en dos categorías. La primera categoría incluye bacterias simbióticas asociadas a raíces de leguminosas que poseen la especificidad e infectan las raíces para producir nódulos.

Entre las bacterias procariontas rizosféricas simbióticas que fijan N, en asociación con las leguminosas, se encuentra el grupo rhizobia, por ejemplo *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Allorhizobium*, y las cepas *Frankia*, pertenecientes al género *Streptomicetaceas*, bacterias esporuladoras filamentosas asociadas con plantas actinorrizas, especialmente géneros *Alnus* y *Casuarina* (Noumavo, et al., 2016). La simbiosis entre las bacterias del género *Rhizobium* y las leguminosas ha sido considerada la forma más eficiente de fijar el N atmosférico, haciéndolo disponible para las plantas. Sin embargo, estudios recientes sobre la FBN por bacterias asociativas, de vida libre o asimbióticas, proceso descubierto en 1901 por Martinus Willem Beijerinck, ha cobrado mayor atención por parte de los investigadores, con el propósito de encontrar alternativas a la creciente demanda de fertilizantes sintéticos (Pazos, et al., 2000).

El segundo grupo de bacterias son los llamados fijadores de nitrógeno de vida libre que no poseen especificidad para la planta (Oberson, et al, 2013).

La FBN está limitada a procariontas que poseen a diferencia de la planta un complejo enzimático de nitrogenasa, el cual consta de dos proteínas dinitrogenasa (componente I) y dinitrogenasa reductasa (Componente II): ambas contienen Fe en su estructura, además la dinitrogenasa contiene Mo (Acuña, et al., 2010) que cataliza la reducción del N atmosférico en amoníaco (Venieraki, y otros, 2011) proceso que se explica, en términos generales, por medio de la figura 13 donde se describe la activación microbiológica del N<sub>2</sub> atmosférico genera amoníaco, el cual ioniza al catión amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), vía hidrólisis de ATP y la transferencia de poder reductor acoplado a una cadena de transporte electrónico. Las bacterias que fijan el N atmosférico en amonio biológicamente utilizable, se denominan diazotróficas. Entre los organismos diazótrofes se encuentra un amplio rango de Arqueas y bacterias que colonizan a diversas especies vegetales, en una amplia variedad de ecosistemas (Venieraki, et al., 2011)



##### **Figura 13.- Reducción del N atmosférico en amoníaco**

Algunos ejemplos de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre incluyen *Azospirillum sp.*, *Azotobacter sp.*, *Burkholderia sp.*, *Herbaspirillum sp.*, *Bacillus sp.* y *Paenibacillus sp.* (Goswami, et al., 2015). Estas bacterias de vida libre no penetran en los tejidos de la planta,

se establece una relación muy estrecha donde estas bacterias viven lo suficientemente cerca de la raíz como para que el nitrógeno atmosférico fijado por las bacterias no se use para su propio beneficio, sino que se toma arriba por la planta permitiendo una mejor disponibilidad de absorción de nitrógeno. Esta relación se describe como una simbiosis no específica. La cantidad de nitrógeno fijado oscila entre 20 y 30 kg por hectárea por año (Stacey, et al., 1992). Las especies pertenecientes a *Azotobacter* y *Azospirillum* son las más utilizadas en las pruebas agrícolas. Varias cepas de este género han ganado importancia ya que junto con la fijación de nitrógeno también mejoran el crecimiento de las plantas al producir fitohormonas, incluido el ácido indol-3-acético, el ácido giberélico y las citoquininas. La aplicación de los inoculantes *Azotobacter chroococcum* y *Azospirillum brasilense* en la agricultura, especialmente en los cereales, ha resultado en incrementos notables en los rendimientos de los cultivos (Oberson, et al., 2013).

### **Solubilización de fosfato.**

El fósforo (P) es el segundo nutriente mineral limitante para las plantas. El suelo posee abundantes reservas de fósforo total, pero solo una pequeña cantidad está disponible para la absorción de las plantas ya que la mayoría del P se encuentra en formas insolubles. Las plantas solo pueden absorber el ion monobásico ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) y ion dibásico ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ), que son las dos formas solubles de P (Jha, et al., 2012). Las bacterias BPCV son capaces de solubilizar el fosfato poniéndolo a disposición de la planta y dándole ventaja frente a todas las plantas que carecen de microbiota capaz de solubilizar este elemento.

Los microorganismos convierten el fósforo orgánico en forma inorgánica, ayudando en última instancia a la disponibilidad de fosfato para las plantas. Estas bacterias solubilizadoras de fosfato utilizan diferentes mecanismos para solubilizar las formas insolubles del fosfato. El mecanismo principal de la solubilización de fosfato se basa en la secreción de ácido orgánico por parte de los microbios debido al metabolismo del azúcar. Los organismos que residen en la rizósfera utilizan azúcares de exudados de raíz de las plantas lo metabolizan y liberan ácidos orgánicos como el ácido butírico, oxálico, succínico, málico, glucónico, acético, cítrico, láctico, entre otros, que actúan como buenos quelantes de los cationes de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$  principalmente, aunque también hierro (Fe) aluminio (Al) y magnesio (Mg)) que acompañan a la liberación de fosfatos a partir de compuestos fosfáticos insolubles (Goswami, et al., 2014). Estos ácidos liberados por los microorganismos actúan como buenos quelantes de los cationes divalentes de  $\text{Ca}^{2+}$  que acompañan la liberación de fosfatos de los compuestos fosfáticos insolubles. Muchos de los microbios solubilizadores de fosfato reducen el pH del medio mediante la secreción de ácidos orgánicos como los ácidos acético, láctico, málico, succínico, tartárico, glucónico, 2-cetoglucónico, oxálico y cítrico (Rodríguez y Fraga, 1999).

Otro método de obtención de fosfatos especialmente en suelos que tienen déficits de éste, es mediante unas enzimas producidas por determinados tipos de bacterias, conocidas como fosfatasas. Estas enzimas son capaces de solubilizar mediante hidrólisis el fósforo orgánico procedente de materia orgánica. De todas las fosfatasas cabe destacar las fitasas, capaces

de hidrolizar el hexafosfato de inositol o fitato, que constituye alrededor de un 80% del total de formas en que podemos encontrar el fósforo orgánico (Alexander M. , 1977).

Entre las comunidades bacterianas del suelo, las cepas ectorrizosféricas (que residen en las raíces y en el suelo rizosférico) de *Pseudomonas* y *Bacilli*, y la rizobia endosimbiótica (que reside dentro de las raíces formando nódulos) se han descrito como solubilizadores de fosfato efectivos (Goswami, et al., 2014). *Bacillus megaterium*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. subtilis*, *P. polymyxa*, *B. sircalmous* y *Pseudomonas striata* podrían denominarse las cepas más importantes (Govindasamy, et al., 2011). Se informa que *Pseudomonas fluorescens*, *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas cepacia* y *Burkholderia cepacia* son productores eficientes de ácido glucónico, que es el agente eficiente más frecuente en la solubilización de fosfato mineral (Rodríguez y Fraga, 1999).

### **Producción de fitohormonas.**

Se trata de hormonas que regulan parámetros de crecimiento, división celular y extensión de la raíz. Las clases de fitohormonas más conocidas incluyen auxinas, giberelinas, citoquininas, etileno y ácido abscísico y microorganismos del suelo, particularmente la bacteria rizósfera, poseen el potencial para producir estas hormonas (Arshad & Frankenberger, 1998). La planta responde a cualquier fitohormona en la rizósfera que se complemente externamente o que haya sido producida por la flora microbiana que reside en la rizósfera. Estas fitohormonas pueden mediar procesos que incluyen el crecimiento, división y extensión de células vegetales en raíces simbióticas y no simbióticas (Glick, 2014).

**Auxinas**, controlan varias etapas del crecimiento y desarrollo de las plantas, como el alargamiento celular, la división celular, la diferenciación de tejidos y ayudan al dominio apical. La biosíntesis microbiana y el mecanismo fundamental de acción de las auxinas en la planta han sido objeto de una intensa investigación. El ácido indol-3-acético (AIA), es una fitohormona importante producida por varias cepas de BPCV y es bien sabido que el tratamiento de las rizobacterias productoras de AIA aumenta el crecimiento de las plantas (Amara, et al., 2015).

La planta bajo el tratamiento de AIA tiene raíces altamente desarrolladas, lo que a su vez le permite absorber mejor los nutrientes ayudando al crecimiento general de la planta. Las auxinas también están implicadas en la regulación de la dormancia y la germinación de ñas semillas. Alrededor del 80% de la flora bacteriana en la rizósfera produce AIA (Salisbury, 1994).

**Giberelinas (Gas)**, son un gran grupo de fitohormonas que constituyen hasta 136 moléculas de diferente estructura. Influyen en muchos procesos de desarrollo en plantas superiores, incluida la germinación de semillas, el alargamiento del tallo, la floración y la producción de la fruta (Hedden y Phillips, 2000). Se han identificado 4 GA (GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> y GA<sub>20</sub>) de 7 especies bacterianas (MacMillan, 2001).

Estas hormonas son transportadas desde las raíces a las partes aéreas de la planta, donde los efectos que ejercen son notables y más aún cuando las bacterias también producen

auxinas que estimulan el sistema radicular mejorando el suministro de nutrientes para facilitar el crecimiento en la parte aérea

La producción de giberelinas por las BPCV es rara, solo dos cepas documentadas son capaces de producir giberelinas son *Bacillus pumilus* y *Bacillus licheniformis* (Gutierrez, et al., 2001).

**Citoquininas**, representan otra clase de fitohormonas producidas por microorganismos, cuando se aplican a las plantas, ayudan a aumentar el rendimiento y el crecimiento de las plantas. Similar al AIA, las respuestas de las plantas a las aplicaciones exógenas de citoquinina dan como resultado mejoras en la división celular, el desarrollo radicular, en la formación del vello radicular, inhibición del alargamiento de la raíz, inicio del brote u otras respuestas fisiológicas (Jha y Saraf, 2015). Las citoquininas son derivados de las purinas que promueven y mantienen la división celular de las plantas y están involucradas en varios procesos de diferenciación incluyendo la formación de los brotes o el crecimiento primario de la raíz. Las plantas usan continuamente citoquininas para mantener los grupos de células madre totipotentes en sus lóbulos y meristemas de raíz.

Las citoquininas son aminopurinas sustituidas con N6 que cuando se aplican a las plantas influyen en sus procesos fisiológicos y de desarrollo. Los principales microorganismos que se han estudiado que producen estas aminopurina, son de géneros como *Pseudomonas*, *Azospirillum* y *Bacillus*, que fueron aislados de una amplia gama de especies de plantas como cebada, canola, frijol y arabidopsis (Ortíz-Castro, et al., 2008). Aunque recientemente también se ha comprobado que géneros como *Proteus*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas* tienen también la habilidad de producir citoquinas (Maheshwari, et al., 2015).

**Etileno (ET)**, es una hormona vegetal difusible que tiene un rol preponderante como mediador y coordinador de las señales internas y externas que modulan la dinámica del crecimiento y los programas de desarrollo en las plantas (Santner *et al.*, 2009). El etileno está involucrado en diversos procesos en el desarrollo de las plantas, como germinación de las semillas, desarrollo de pelos radiculares, nodulación, maduración de los frutos, abscisión y senescencia (Vandenbussche y Van Der Straeten, 2012). También es un importante mediador en la respuesta a distintos tipos de estrés tanto bióticos (por ejemplo ataque por patógenos) como abióticos (como daño, hipoxia, frío, sequía, salinidad) (Tao, et al., 2015). A nivel génico, en respuesta a los estímulos citados, el ET induce la transcripción de un gran número de genes (Tao, et al., 2015). En las plantas superiores el ET es sintetizado a partir de metionina vía los intermediarios S-adenosil-L-metionina (SAM), y ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). Las enzimas involucradas secuencialmente en el proceso son SAM sintetasa, ACC sintasa (ACS) y ACC oxidasa. Los efectos fisiológicos que destacan son maduración más rápida de los frutos, epinastia y senescencia floral, lo que se conoce como la triple respuesta del etileno.

#### 2.4.1.2. Mecanismos indirectos.

**Producción de sideróforos,** El hierro es un nutriente esencial para las plantas. Actúa como cofactor en una serie de enzimas esenciales para procesos fisiológicos importantes como la respiración, la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno, por lo que su deficiencia se exhibe en modificaciones metabólicas severas. El hierro es bastante abundante en los suelos, pero con frecuencia no está disponible para las plantas o los microorganismos del suelo. Su especie química predominante es el ion  $\text{Fe}^{+3}$ , es la forma que reacciona para formar óxidos e hidróxidos insolubles e inaccesibles para plantas y microorganismos. Las plantas han desarrollado dos estrategias para la absorción eficiente de hierro.

El primero consiste en liberar compuestos orgánicos capaces de quelar el hierro, haciéndolo soluble donde se difunde hacia la planta, se reduce y se absorbe por medio de un sistema enzimático presente en la membrana celular de la planta. La segunda estrategia consiste en absorber el complejo formado por el compuesto orgánico y  $\text{Fe}^{+3}$ , donde el hierro se reduce dentro de la planta y se absorbe fácilmente. Algunas bacterias de la rizósfera son capaces de liberar moléculas quelantes de hierro a la rizósfera y, por lo tanto, sirven para atraer el hierro hacia la rizósfera, donde puede ser absorbido por la planta (Payne, 1994).

Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular sintetizados por determinados tipos de bacterias, principalmente de género *Pseudomonas* (*P. fluorescens* y *P. aeruginosa*), que contienen grupos capaces de unir el hierro de manera reversible (Haas y Défago, 2005). Los grupos funcionales más frecuentes son hidroxamatos y catecoles.

La bacteria rizosférica libera estos compuestos para aumentar su potencial competitivo, ya que estas sustancias tienen actividad antibiótica, la producción de sideróforos mejoran la salud de las plantas en varios niveles: mejoran la nutrición del hierro, inhiben el crecimiento de otros microorganismos con la liberación de su molécula antibiótica y dificultan el crecimiento de patógenos al limitar el hierro disponible para el patógeno, generalmente hongos, constituye un mecanismo de defensa frente al estrés biótico (Shen, et al., 2013).

**Síntesis de enzimas para el control de patógenos por BPCV,** Uno de los principales mecanismos utilizados por los agentes de biocontrol para controlar los patógenos del suelo implica la producción de enzimas que degradan la pared celular (Kobayashi, et al., 2002). Las enzimas que degradan la pared celular, como la  $\beta$ -1,3-glucanasa, la quitinasa, la celulasa, lipasa y la proteasa secretadas por las cepas de biocontrol de BPCV, ejercen un efecto inhibitorio directo sobre el crecimiento hifal de los patógenos fúngicos al degradar su pared celular. La quitinasa degrada la quitina, un polímero lineal insoluble de  $\beta$ -1, 4-N-acetilglucosaamina, que es el componente principal de la pared celular fúngica. La  $\beta$ -1,3-glucanasa sintetizada por cepas de *Paenibacillus* y *Streptomyces spp.* puede degradar fácilmente las paredes celulares fúngicas de *F. oxysporum* patógena (Compant, et al., 2005). Los posibles agentes de biocontrol con actividades quitinolíticas incluyen *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. subtilis* y *B. thuringiensis* (Sadfi, et al., 2001). Entre las bacterias Gram negativas, se ha encontrado que *Serratia marcescens*, *Enterobacter agglomerans*, *Pseudomonas aeruginosa* y *P. fluorescens* poseen actividades quitinolíticas (Neiendam-Nielsen y Sørensen, 1999).

**Producción de antibióticos por BPCV,** Se propone la utilización de bacterias antagónicas en los cultivos agrícolas como una alternativa para bajar el consumo de pesticidas químicos.

Las BPCV pertenecientes a especies de *Bacillus* y *Pseudomonas* juegan un papel activo en la supresión de microorganismos patógenos. Las bacterias antagónicas imponen la supresión de los patógenos de las plantas mediante la secreción de metabolitos extracelulares que son inhibidores incluso a baja concentración.

Las bacterias que pertenecen al género *Bacillus* producen una amplia variedad de antibióticos antibacterianos y antifúngicos. Los antibióticos también son producidos por cepas de *Pseudomonas* (*Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas aeruginosa*). Las BPCV altera los exudados de la raíz, ya sea directa o indirectamente a través de otros microbios beneficiosos como los hongos micorrícicos arbusculares (AM), lo que facilita la colonización de la raíz. Las toxinas producidas por las raíces y los patógenos que habitan el suelo también pueden ser degradadas por BPCV (Dutta y Podile, 2010).

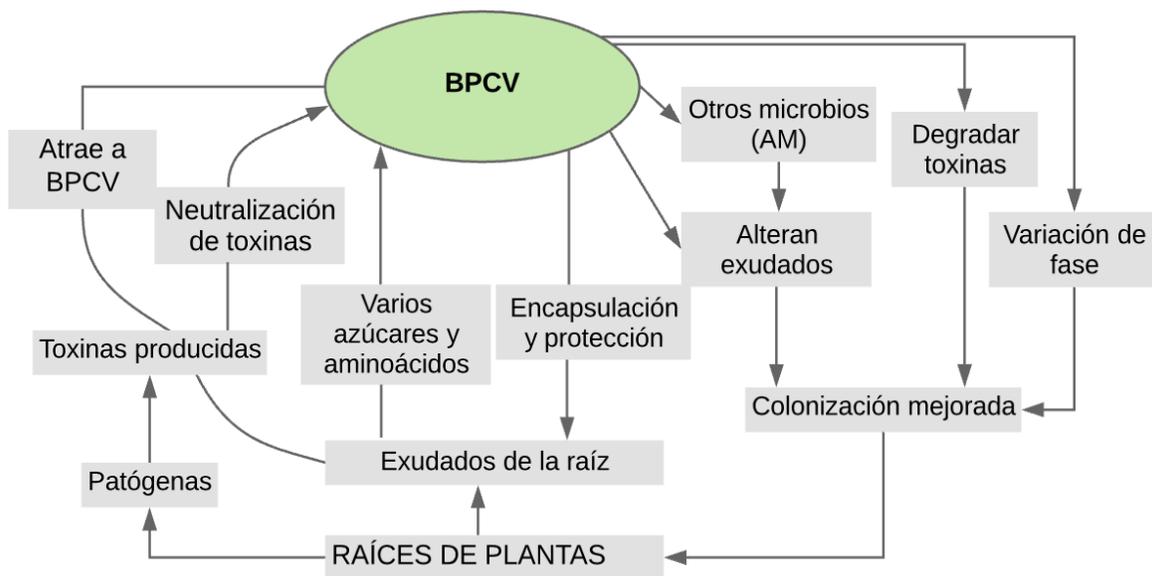


Figura 13.- Interacción de exudados de raíces de plantas, patógenos, BPCV y otros microbios beneficiosos en la rizósfera, según lo descrito por (Dutta y Podile, 2010).

**Resistencia sistemática inducida,** Las BPCV proporciona una estrategia alternativa para proteger a la planta de enfermedades a través de la resistencia sistemática inducida (RSI). Se denominan RSI al proceso en el que el tratamiento de la planta con BPCV provoca la defensa del hospedero, como lo indica la reducción en la gravedad o la incidencia de la enfermedad causada por patógenos que están separados espacialmente del agente inductor. En su mayoría, el carácter no específico de la resistencia inducida constituye un aumento en el nivel de resistencia basal a varios patógenos simultáneamente, lo cual es beneficioso en condiciones naturales donde múltiples patógenos permanecen presentes (van Loon, et al., 1998).

Las BPCV, como las cepas de *Pseudomonas*, inducen resistencia sistémica en clavel, rábano y *Arabidopsis*, donde la "cadena lateral antigénica O" de los lipopolisacáridos de la membrana externa bacteriana actúa como un determinante inductor, mientras que los sideróforos de pseudobactina producidos por cepas *Pseudomonas* inducen resistencia sistémica en tabaco y *Arabidopsis*. Otro tipo de sideróforo, la pseudomanina producida por

cepas de *Pseudomonas* induce la producción de ácido salicílico en el rábano, lo que finalmente mejora la defensa de la planta (Van Loon y Bakker, 2006). Por lo tanto, la inducción de rizobacterias en las raíces de las plantas produce una señal, que se extiende sistémicamente dentro de la planta y aumenta la capacidad defensiva de los tejidos distantes de la infección posterior a los patógenos (Thakker, et al, 2012).

**BPCV modulan los marcadores de estrés de la planta bajo estrés abiótico**, La planta está expuestas a una amplia gama de tensiones ambientales como alta temperatura, frío, sequía, salinidad, alcalinidad UV e infección por patógenos. El estrés abiótico es la causa principal de la pérdida de cultivos en todo el mundo en más del 30%. Entre estos la salinidad se considera uno de los principales estreses abióticos que limita el rendimiento del cultivo debido a la reducción de la fotosíntesis, la respiración y la síntesis de proteínas (Ahmad & Prasad, 2011). La salinidad causa trastornos nutricionales en las plantas que conducen a deficiencias de varios nutrientes y aumentan drásticamente los niveles de Na<sup>+</sup> (Zahedi, et al, 2012).

Según investigadores creen que la aplicación de BPCV en plantas afectadas por la salinidad modula los niveles de POX<sup>9</sup>, SOD, CAT, APX, GR, etc. Por ejemplo, (ChunJuan, et al., 2012) reportaron que la aplicación de una cepa de BPCV *B. cereus* AR156 en tomate (*Lycopersicon esculentum*) bajo tal estrés abiótico mostró una mayor actividad de SOD, POX y CAT en la planta, lo que probablemente indica una mayor activación de defensa cuando se trata con BPCV. Las BPCV provocan resistencia sistémica inducida (RSI, es la capacidad defensiva desarrollada por la planta cuando es estimulada por diversos agentes, incluidas las rizobacterias) en las plantas al aumentar la fuerza física y mecánica de la pared celular junto con el cambio de las reacciones fisiológicas y bioquímicas de la planta hospedera. Esto da como resultado la síntesis de químicos de defensa tales como quitinasa, peroxidasa y proteínas relacionadas con la patogénesis (Silva, et al., 2004).

#### 2.4.2. Aplicación de las BPCV.

La aplicación a gran escala de estos microorganismos como biofertilizantes, fitoestimulantes, biocontroladores y rizoremediadores en cualquier sistema de producción agrícola traería grandes beneficios, además se consideran más baratos que los de origen inorgánico, tienen efectos positivos en las plantas (similares a los de un fertilizante químico) y no ejercen un impacto ecológico perjudicial en el ambiente ni en la salud humana. Aplicar esta innovación tecnológica que nos ofrece la conservación del ambiente, incrementar la productividad de los cultivos, bajar los costos de producción, contribuir a una agricultura sustentable y respetar el medio ambiente.

**Aplicación de BPCV como biofertilizadores y biocontroladores**, la capacidad de los sideróforos y antibióticos bacterianos para suprimir a los fitopatógenos es de gran importancia para la agricultura. Ambos mecanismos tienen funciones esenciales en el

---

<sup>9</sup> POX (Peroxidasas), SOD (Superóxido dismutasa), CAT (Catalasa), APX (Ascorbato peroxidasa), GR (Glutación reductasa)

antagonismo microbiano, pero también conducen a producir resistencia inducida, lo que se conoce como RSI. La inducción de la resistencia sistémica y las rizobacterias antagonicas pueden ser útiles en la formulación de nuevos inoculantes, ofreciendo una alternativa atractiva de control biológico respetuoso con el medio ambiente de las enfermedades de las plantas y mejorando los sistemas de cultivo en los que se pueden aplicar de manera más rentable. Algunas cepas de *Pseudomonas* y *Trichoderma* son conocidos por producir antibióticos antifúngicos, inducir la resistencia sistémica en la planta huésped o interferir específicamente con factores de patogenicidad fúngica (Haas y Défago, 2005).

La capacidad promotora del crecimiento de bacterias del género *Pseudomonas* resulta del efecto sinérgico de más de un modo de acción. En cuanto a los beneficios secundarios de *Trichoderma spp.* sobre el crecimiento de las plantas, se han revelado dos mecanismos principales de acción: 1) Aumento de la nutrición de las plantas mediante la solubilización y/o captación mejorada de macro y micronutrientes del suelo, 2) Aumento de los factores de crecimiento de las plantas. Estos mecanismos son responsables del llamado "efecto biofertilizante" de *Trichoderma*. La *Pseudomonas* por lo general emplean una serie de mecanismos como la producción de antibióticos, quitinasa, sideróforos, amoníaco, pigmentos fluorescentes y antifúngicos volátiles para antagonizar los patógenos (Pal *et al*; 2001). Varias cepas bacterianas de BPCV están comercialmente disponibles en forma de productos formulados que se usan como biofertilizantes y agentes de control biológico.

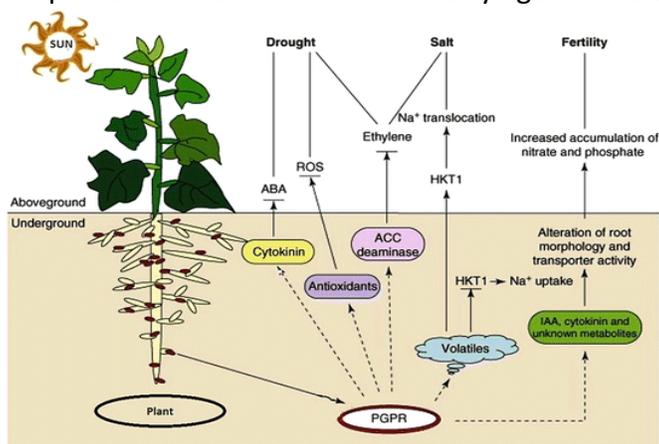


Figura 14.- Las BPCV en la fertilidad de los suelos y la salud de la planta (Prasad *et al*; 2015).

El término biofertilizante es ampliamente utilizado y hace referencia al "inoculante biológico". Por lo general, se refiere a formulaciones de microorganismos vivos o latentes (bacterias u hongos, solos o combinados) y que son agregados a los cultivos agrícolas para estimular su crecimiento y productividad y que pueden ser un sustituto parcial o completo para la fertilización química (Aguado-Santacruz, 2012). También son conocidos como bioinoculantes, inoculantes microbianos o inoculantes del suelo, son productos agrobiotecnológicos que contienen microorganismos.

**Rizoremediación:** Las plantas están expuestas a una amplia gama de agentes que provocan estrés ambiental como la alta temperatura, el frío, la sequía, la salinidad, la alcalinidad, la radiación UV, los compuestos tóxicos y las infecciones por patógenos.

La rizoremediación es el proceso que implica la eliminación de agentes contaminantes de sitios contaminados por interacción mutua de raíces de plantas y poblaciones microbianas adecuadas que ocurren en la rizósfera, y es considerada como el proceso de biorremediación más evolucionado. Las rizobacterias pueden ayudar directamente a la rizoremediación mediante la producción de AIA, fijación biológica del nitrógeno, solubilización de P y secreción de sideróforos (Bashan *et al*; 2014). Existen BPCV que pueden degradar e incluso mineralizar los contaminantes. Estas bacterias se utilizan por lo general en asociación con plantas que pueden tolerar y acumular altas concentraciones de metales, para obtener su principal fuente de nutrientes, los exudados de la raíz. De este modo, la bacteria contribuye con la degradación o solubilización del contaminante sino también ayuda a que la planta tenga un mejor crecimiento y sea capaz de desarrollar una mayor biomasa, para así acumular mayores cantidades del contaminante. Entre las bacterias rizoremediadoras que se han estudiado se encuentran *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Burkholderia* y *Rhizobium* (Sarabia-Ochoa, et al., 2010).

**Fitoestimuladores:** Producen sustancias que estimulan el crecimiento de las plantas en ausencia de patógenos. El uso de bacterias del género *Azospirillum* que producen auxinas, principalmente ácido indolacético, que incrementa el tamaño de la raíz. Igual existen bacterias del género *Bacillus* que promueven el crecimiento de las plantas a través de la liberación de compuestos volátiles (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

**Fitorremediación:** Es un proceso de biodegradación *in situ* que utiliza plantas verdes y los microorganismos asociados con ellas para extraer, secuestrar o desintoxicar contaminantes del suelo. Las plantas tienen la capacidad de absorber, acumular, degradar o eliminar metales, pesticidas, disolventes, petróleo crudo y muchos contaminantes industriales. La fitorremediación es una tecnología limpia, rentable y respetuosa con el medio ambiente, especialmente para el tratamiento de áreas grandes y difusas que están contaminadas. Hay muchos ejemplos exitosos en los que se ha empleado la fitorremediación y donde se ha documentado que funcionan bien para remediar ambientes industriales contaminados. La fitorremediación puede clasificarse de acuerdo al método y/o naturaleza del contaminante, con lo que puede utilizar una de varias técnicas (Glick, et al., 2004) como son:

**Fitoextracción:** También conocida como fitoacumulación, elimina metales tomando ventaja de la capacidad de algunas plantas para absorber y acumular o translocar metales o metaloides, concentrándolos dentro de la biomasa. El propósito de este tipo de remediación es reducir la concentración de metales en suelos contaminados para que puedan ser utilizados de manera rentable para la agricultura, horticultura, pastoreo, etc.

**Fitoestimulación:** Las raíces de las plantas promueven el desarrollo de microorganismos de rizósfera que son capaces de degradar el contaminante, los microbios utilizan exudados de raíces de plantas como fuente de carbono.

**Fitovolatilización/Rizovolatilización:** emplea las capacidades metabólicas de las plantas y los microorganismos rizosféricos asociados para transformar los contaminantes en compuestos volátiles que se liberan en la atmósfera. Algunos iones (elementos de los

subgrupos II, V y VI de la tabla periódica como mercurio, selenio y arsénico) son absorbidos por las raíces, se convierten en formas menos tóxicas y volátiles, y luego se liberan mediante evapotranspiración a través de las hojas.

Fitodegradación: los contaminantes orgánicos son degradados o mineralizados por enzimas específicas.

Rizofiltración: utilizar las plantas terrestres para absorber, concentrar, y/o precipitar contaminantes en el sistema acuoso. La rizofiltración también se utiliza para tratar la escorrentía industrial y agrícola.

#### 2.4.2.1. Aplicación de las BPCV en México.

La agricultura es uno de los sectores de mayor crecimiento en México, sin embargo en los sistemas de producción, en su mayoría se siguen aplicando grandes cantidades de productos químicos. Estas prácticas con fertilizantes nitrogenados puede provocar impactos negativos en los agroecosistemas, como lixiviación de nitratos, contaminación de recursos hídricos y emisiones gases impactando en el ambiente (Zahid, et al., 2015). La aplicación de las BPCV son una opción sustentable para el campo Mexicano ya que favorece la disponibilidad de los elementos nutritivos, el desarrollo y crecimiento de las plantas, aumentado la salud del suelo y los rendimientos.

Las BPCV más estudiadas y utilizadas en las tierras agrícolas se encuentran principalmente *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Azospirillum*, siendo éste último uno de los primeros microorganismos utilizados como biofertilizantes en México. Se ha reportado que la inoculación de *Rhizobium nepotum* y *Serratia plymuthica* en chile poblano (*Capsicum annuum* L.) obtuvieron un incremento de más del 19% en promedio en altura, área foliar y biomasa seca total (Gonzalez Mancilla, y otros, 2016). Se evaluó la aplicación de BPCV en sorgo (*Sorghum spp.*) en el estado de Tamaulipas, logrando incrementar del 10 al 27% la productividad en plantas inoculadas con *Azospirillum* respecto a las plantas control (García-Olivares, et al., 2006). Se ha utilizado *Azospirillum spp.* en conjunto con bacterias solubilizadoras de fosfatos, como *Paenibacillus spp.*, en programas de reforestación de cactáceas en suelo erosionado (Bashan, et al., 2009).

Un estudio realizado en la Comarca Lagunera en Torreón Coahuila, México, en donde se utilizaron BPCV como *Bacillus spp.*, *Aeromonas spp* y *P. Lini* para inocular tomate cv. Afrodita (*Solanum lycopersicum* L.), se observó que al aplicar BPCV se incrementó en un 34.82% con respecto al rendimiento promedio obtenido por los productores mexicanos. El incremento en el rendimiento de los cultivos por la aplicación de BPCV puede ser debido a la producción de metabolitos secundarios, tales como fitohormonas (auxinas, citoquininas y giberelinas), riboflavina y vitaminas (tiamina, niacina y ácido pantoténico) (Espinoza Palomeque, et al., 2017).

Se han realizado otras investigaciones con bacterias del género *Bacillus*, en chile y calabacita, se ha encontrado que, además de incrementar el crecimiento y productividad,

su uso proporciona protección contra enfermedades fúngicas y virales (Maldonado-Cruz, et al., 2008).

Los casos citados anteriormente solo son algunos ejemplos de la aplicación de BPCV en la agricultura en México, existen otros casos en donde se han utilizado estos microorganismos con fines de reforestación y remediación de suelos contaminados.

#### 2.4.2.2. Aplicación de las BPCV en alfalfa.

Se evaluó el efecto promotor del crecimiento de bacterias con actividad ACC desaminasa en las plantas de alfalfa bajo déficit hídrico. Las semillas fueron inoculadas con cepas de *Bacillus sp.* y *Pseudomonas sp.* con actividad ACC desaminasa. Se evaluó el número de nódulos, conductancia estomática, área específica de hojas y fluorescencia de la clorofila. La nodulación fue mejorada en un 20% en condiciones de sequía. La conductancia estomática fue mayor ( $P < 0.05$ ) con 142 mmol m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> con co-inoculadores de *Bacillus sp.* El área foliar fue mayor en un 20% en los tratamientos con BPCV. La inoculación con BPCV con actividad ACC desaminasa mejora características fisiológicas y agronómicas claves en la tolerancia al déficit hídrico en el cultivo de alfalfa (Cedeño Garcia, 2018).

*Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani* se encuentran entre los patógenos de raíces transmitidos por el suelo más importantes que afectan la producción de alfalfa (*Medicago sativa* L.) y papa (*Solanum tuberosum* L.) (El-Meleigi, et al., 2017). Se evaluaron cinco cepas de *Bacillus spp.*, Aisladas del suelo para controlar *R. Solani* y *F. Solani* en experimentos en invernadero, observándose eficacia de las cinco Rhizobacterias (BPCV), (*Bacillus amyloliquefaciens* sub sp. *Plantarum*, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus amyloliquefaciens* sub sp. *Plantarum*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*). Se analizaron *R. solani* y *F. solani* en alfalfa. Las semillas de alfalfa, a cultivar California-1 se trataron con polvo BPCV y se sembraron en suelo infectado artificialmente con *R. solanior* y *F. solania* en condiciones de invernadero. Los tratamientos de semillas con polvos de BPCV indujeron cambios significativos en el porcentaje de germinación de semillas y/o peso fresco y seco de la planta. *R. solani* fue más virulento con la alfalfa que *F. solani*. Los pesos frescos y los pesos secos de las plántulas de alfalfa aumentaron hasta un 21% en respuesta a los tratamientos de semillas con *Paenibacillus polymyxa* o *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* en comparación con las semillas tratadas con el fungicida Rizolex o sin tratar (El-Meleigi, et al., 2017).

Hay poca información sobre bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (BPCV) que viven en nódulos para ayudar en la tolerancia al estrés abiótico como la salinidad y la sequía. En otro estudio realizado para aislar bacterias rizobianas y no rizobianas tolerantes a la sequía y la salinidad de los nódulos de raíz esterilizados de la superficie de la alfalfa, cultivados en suelos salinos, y evaluar los efectos de los aislamientos efectivos en el crecimiento de las plantas bajo estrés salino. Con base en la tolerancia a la sequía y la salinidad de los aislamientos bacterianos y con múltiples rasgos de BPCV, se seleccionaron dos aislamientos endofíticos no rizobiales y un aislante endofítico rizobial, los aislados no

rizobiales y los aislados rizobiales estaban estrechamente relacionados con *Klebsiella sp.*, *Kosakonia cowanii* y *Sinorhizobium meliloti*, respectivamente. Ninguna de las dos cepas no rizobianas pudo formar nódulos en las raíces de alfalfa en condiciones de invernadero e *in vitro*. Coinoculación de la planta de alfalfa con *Klebsiella sp.*, *K. cowanii* y la cepa rizobial *S. meliloti* tuvieron un efecto positivo en los índices de crecimiento de las plantas bajo estrés de salinidad. Además, la inoculación única de cepas no rizobianas sin cepa rizobial dio como resultado un aumento en los índices de crecimiento de alfalfa en comparación con las plantas no inoculadas y las inoculadas con *S. meliloti* solo bajo estrés de salinidad, lo que indica que las cepas no rizobiales del nódulo tienen potencial de BPCV y pueden ser una forma prometedora para mejorar la efectividad de los biofertilizantes de *Rhizobium* en suelos afectados por sal (Fatemeh Noori, et al., 2018).

## **2.5. ALFALFA (*Medicago sativa*).**

La alfalfa (*Medicago sativa* L.) es una planta herbácea perteneciente a la familia de las fabáceas o leguminosa, sus hojas y tallos son aprovechados con fines forrajeros por su alto valor nutricional (proteína 22% y 70% de digestibilidad), rendimiento anual de hasta 30 ton de materia seca por hectarea, su excelente calidad de forraje, y su gran adaptabilidad a diversas condiciones edafoclimáticas (suelo, clima y manejo agronómico). También por su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico a través de la simbiosis con *Shinorhizobium meliloti* lo que la convierte en un importante componente de la sustentabilidad de los ecosistemas, ya que evita la erosión y la degradación de las praderas al mejorar la cobertura vegetal y participa en la recuperación de suelos pobres en nitrógeno o calcáreos (Vance, 2008).

La alfalfa es la fabácea más cultivada y utilizada en la alimentación animal a nivel mundial, llegando incluso a recomendarse como suplemento dietético para combatir la desnutrición y trastornos digestivos en humanos (Gawel, et al., 2017). Es muy apreciable por los bovinos que la consumen fresca, henificada o ensilada y de gran importancia para la alimentación de ganado lechero en México (Rojas-García, et al., 2017).

En otro estudio realizado se examinó a través de una serie de experimentos en macetas el potencial de *Medicago sativa* para resistir la toxicidad de hidrocarburos mientras degrada los hidrocarburos de combustible diesel a través de las acciones de las BPCV. El crecimiento de *Medicago sativa* bajo diferentes concentraciones de combustible diesel fue monitoreado durante un período de 60 días. La tasa de crecimiento relativa (BPCV) y la biomasa total se calcularon para comprender la capacidad de la planta para resistir la fitotoxicidad. Para comprender mejor el efecto del combustible diesel en la colonización microbiana y el crecimiento de las plantas, se usó microscopía electrónica de barrido (SEM) para examinar el desarrollo de nódulos.

Los resultados demostraron que el combustible diesel inicialmente desaceleró el crecimiento de *Medicago sativa*. Sin embargo, el desarrollo de la nodulación y su colonización por rizobacterias mejoró significativamente el crecimiento de la planta, con

tasas de crecimiento relativas en suelos contaminados que exceden el control en los primeros 30 días con 5 g/Kg y 50 días para concentraciones de combustible diesel de 10 g/Kg. Además, el combustible diesel en ambas concentraciones mejoró significativamente la densidad microbiana de la rizósfera (como lo revelan las micrografías SEM) y la producción total de biomasa. Estos estudios indican el potencial de esta planta en conjunto con las BPCV para procesos de fitorremediación (Michael O., et al., 2019).

### 2.5.1. Origen y clasificación taxonómica.

La alfalfa (*Medicago sativa*) es una especie forrajera que se introdujo a México por los españoles durante el período de la conquista. El centro primario del género se localiza en la zona montañosa del Cáucaso, el noroeste de Irán y el noreste de Turquía. El género *Medicago* es muy extenso y comprende más de 60 especies diferentes, dos tercios de las cuales son anuales y un tercio de plantas perennes (Quiros y Bauchan, 1988).

*Medicago sativa*, es una especie de planta perenne, herbácea, vivaz y de porte erecto, perteneciente a la familia de las fabáceas o leguminosas y al género *Medicago*. Actualmente, ésta leguminosa se siembra desde el norte hasta el sureste de México. La producción de forraje de alfalfa es la base para la industria lechera en el norte de México.

Cuadro 8.- Clasificación taxonómica de la alfalfa (*Medicago sativa*).

Reino	Vegetal
División	Magnoliophita
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Fabales
Familia	Leguminosae
Subfamilia	Papilionoideae
Tribu	Trifolieae
Género	<i>Medicago</i>
Especie	<i>sativa</i>

Tomado de: (Flores-Delgado, 2015).

### 2.5.2. Descripción botánica y fenológica.

Es una planta perennifolia, sobre todo erectas a suberectas que alcanzan un tamaño de 30-100 cm de altura, pubescentes a subglabras. Los foliolos en color verde brillante de 5-20 mm de largo, 3-10 mm de ancho, obovadas a sublineal, dentados en el ápice, adpreso pubescentes; entera o dentada en la base. Inflorescencia en racimo pedunculado, el pedúnculo mucho más largo que el pecíolo. Corola de 6-12 mm de largo, violeta pálido lavanda. Los frutos, es una legumbre indehisciente sin espinas que contienen entre 2 y 6 semillas amarillentas, arriñonadas y de 1.5 a 2.5 mm de longitud.

Presenta un sistema radical robusto y profundo, y su principal función es la absorción de agua. La raíz puede alcanzar los 2 a 5 metros de longitud, en tan solo 2 a 4 años de vida, siempre que no existan impedimentos en el perfil del suelo. Dicho sistema radical puede clasificarse en cuatro tipos generales: raíz pivotante o típica, ramificada, rizomatosa y rastrera. Debido al importante sistema radicular que posee, le permite extraer el agua de capas profundas, lo que le confiere tolerancia a las épocas de sequía (Basigalup y Rossanigo, 2007).

El tallo primario es cuadrado en su sección transversal y presenta estomas y pelos. Posee además del crecimiento primario un crecimiento secundario, que da origen a un eje leñoso o porción perenne que forma parte de la corona. Es importante destacar que la corona no es una estructura simple sino que es una zona compleja que incluye varias estructuras separadas (Tueber y Brick, 1988), cuya función principal es el almacenamiento de sustancias de reservas y sede de yemas, a partir de donde se desarrollaran los rebrotes de la planta (Basigalup y Rossanigo, 2007). Los tallos son de consistencia maciza aunque pueden encontrarse tallos huecos, en su parte herbácea presentan nudos desde donde nacen las hojas. El número de tallos depende de la edad y vigor de la planta y pueden llegar a 20. Las primeras hojas de alfalfa son unifoliadas y de forma orbicular, mientras que cuando la planta ya está desarrollada son trifoliales, compuestas de tres folíolos, unidos al tallo a través del peciolo. El borde de los folíolos es dentado, usualmente solo en el tercio superior, aunque puede extenderse hasta la mitad superior o incluso el tercio inferior. Pueden encontrarse también hojas tetrafoliadas, pentafoliadas o de más folíolos, que reciben el nombre de hojas multifoliadas (Basigalup y Rossanigo, 2007).

Las flores se desarrollan cuando el ápice del tallo pasa del estado de crecimiento vegetativo al reproductivo. Estas son completas y están formadas por el cáliz, la corola, los estambres y el gineceo. Pertenecen a la subfamilia *Papilionoidea*, es decir que poseen una corola papilionada en forma de mariposa. Son de color púrpura, con extremos que van desde el violeta claro al morado oscuro, aunque también pueden encontrarse flores blancas, azuladas, amarillas y variadas, que son mezclas de colores o tonalidades que van cambiando a medida que la flor se desarrolla (Del Pozo Iñáñez, 1977). El fruto es del tipo legumbre o vaina, monocarpelar, seco e indehiscente, generalmente alargado y comprimido, con las semillas alargadas en la hilera ventral. La vaina, por encorvamiento desarrolla un espiral que generalmente posee una espira con autofecundación (Basigalup y Rossanigo, 2007).

### 2.5.3. Fenología.

**Emergencia:** La alfalfa germina en poco tiempo, alrededor de una semana. Primero aparecen los cotiledones por encima de la superficie del suelo y seguidamente una primera hoja simple; después siguen las hojas normales trifoliadas. Durante este tiempo la planta vive en un principio a expensas de las reservas acumuladas en la semilla. Esta fase sólo se observa durante el primer año de la plantación, posteriormente debe suplantarse por la observación de la fase de botón floral.

Las condiciones climáticas influyen de manera decisiva en el futuro del cultivo.

**Botón floral:** Aparecen los primeros botones florales. La planta ya adquirió autonomía propia al formarse las nudosidades en las raíces, los órganos verdes, en el primer año no se produce la acumulación de reservas en las raíces: las sustancias nutritivas elaboradas se utilizan en la constitución de los nuevos órganos vegetativos.

**Floración:** Aparece la primera flor. En el primer año en esta fase es cuando se efectúa la acumulación de reservas en las raíces. En el año de la implantación no se debe segar el corte. Nunca antes de la floración.

La flor puede fecundarse con el propio polen (autogamia) o con el polen procedente de otra flor (alogamia). La fecundación cruzada se da en el 80-90% de los casos, favorecida por la acción de los insectos especialmente las abejas.

**Maduración:** En alfalfa para uso forrajero se registra la fecha de corte; si el propósito es la producción de semilla, la madurez fisiológica se manifiesta por el oscurecimiento de las vainas.

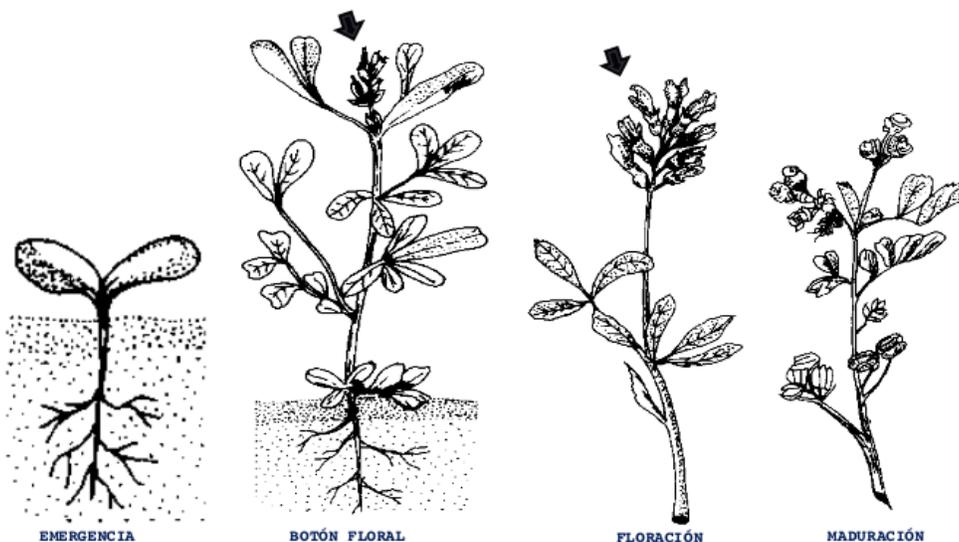


Figura 15.- Fases fenológicas de la alfalfa.

El corte de la alfalfa para producción de forraje debe darse inmediatamente después de producida la floración, es el momento que coincide con el máximo de reservas acumuladas en la raíz. Esto asegura un buen desarrollo de la parte aérea para el siguiente periodo de cosecha.

#### 2.5.4. Importancia nutrimental y económica.

La importancia del cultivo de la alfalfa va desde su interés como fuente natural de proteínas, fibra, vitaminas y minerales; así como su contribución paisajística y su utilidad como cultivo conservacionista de la fauna. Además de la importante reducción energética que supone la fijación simbiótica del nitrógeno para el propio cultivo y para los siguientes en las rotaciones de las que forma parte (InfoAgro, 2019).

Su cultivo, se encuentra muy extendido en los países de clima templado, y ha sido la ganadería intensiva la que ha demandado de forma regular a dicho cultivo, cuya finalidad es abastecer a la industria de los piensos. Por su adaptación a un amplio rango de condiciones agroclimáticas y su capacidad de producir elevada cantidad de pasto y forraje, sigue siendo una de las especies forrajeras más importantes a nivel mundial (Prosperi, et al., 2006).

El aumento de los rendimientos y la implantación de cultivos mejorados seguirá siendo una constante por parte de los productores ganaderos, porque a la fecha los principales criterios de selección son el aumento en el rendimiento del forraje, la persistencia y la resistencia a múltiples plagas y enfermedades, como así también, variedades adaptadas a ambientes restrictivos desde el punto de vista abiótico, dado que el avance de las zonas de pastoreo ha ido desplazando las zonas de cultivo hacia zonas con limitaciones edafoclimáticas en las que, problemas como la salinidad, acidez, sequías y anegamientos, requieren el uso de especies que puedan sobrevivir a dichas condiciones (Basigalup y Rossanigo, 2007).

Este forraje, uno de los más nutritivos, es rico en proteínas, minerales y vitaminas. Debido a que su raíz se introduce en la tierra a gran profundidad, puede alcanzar muchos nutrientes y soportar sequías extremas. El uso de la alfalfa como heno, o seca, es característico de regiones con muchas horas de sol, poca lluvia y elevadas temperaturas durante el periodo productivo. El proceso de henificado implica cambios físicos, químicos y microbiológicos que producen alteraciones en la digestibilidad del forraje en comparación a cuando está verde (SIAP, 2019).

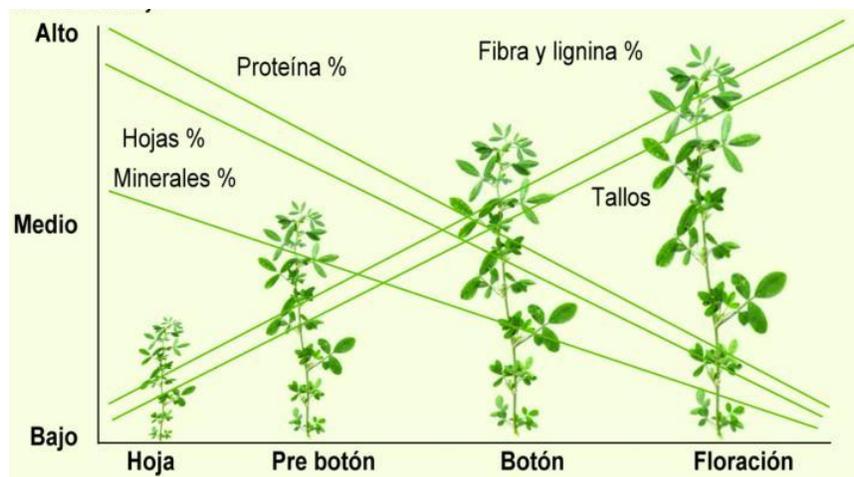


Figura 16.- Calidad del forraje.

Cuadro 9.- Composición nutrimental de la alfalfa (100 g deshidratada).

Vitaminas	3%
Minerales	10%
Hidratos de carbono	40%
Fibras	25%
Proteína	20%
Grasas salubre	2%

Tomado de: (Avci, Cinar, & Inal, 2010).

La alfalfa posee más del doble de proteína, cuatro veces más de calcio y dos veces más hierro que la mayoría de los vegetales (hablando de polvo – base seca). También contiene vitaminas como A, B1, B2, B6, C, D, E y K entre otras.

#### 2.5.5. Producción.

En México la producción de alfalfa en 2018 fue 38.729 millones de toneladas, 2.4% más que en 2016. Las exportaciones del forraje se comercializan principalmente con Estados Unidos y Emiratos Árabes Unidos, mismos que adquirieron 89.2% y 10% del volumen exportado, respectivamente (SADER, 2019), con un rendimiento promedio anual por hectárea de 86 toneladas de materia verde.

La alfalfa se cultiva en México desde el siglo XVI, era ocupada principalmente tanto para alimentar al ganado bovino como para elaborar alimentos balanceados para otros animales. Actualmente es cultivada en 26 estados del país. Los estados con mayor productividad de alfalfa con: Chihuahua, Guanajuato, Hidalgo, Baja California Norte, Sonora, Durango, Coahuila y Puebla; en conjunto aportan alrededor del 70% de la producción nacional de alfalfa, con una superficie sembrada de 386,325 ha y un rendimiento promedio de 75 ton/ha de forraje verde (INIFAB, 2014). El Valle de Mexicali obtuvo una producción de 510,358

toneladas de alfalfa henificada con un rendimiento promedio de 15 toneladas con 908 kilos por hectárea (SADER, 2019).

El estado de Jalisco en el 2018, obtuvo una producción con sistema de riego de 6631.1 ton de alfalfa verde (SIAP, 2018).

#### 2.5.6. Características agronómicas del cultivo de alfalfa.

La temperatura ambiental es un factor de suma importancia para su adecuado desarrollo. La semilla puede germinar desde una temperatura de 2 o 3°C, pero si es más alta, la germinación es más rápida. La óptima va de 28 a 30°C. Por otro lado, si la temperatura es excesivamente cálida, superior a los 38° C, las plantas mueren. Cuando empieza el invierno la alfalfa detiene su crecimiento hasta que llega la primavera, cuando brota de nuevo. Existen variedades que toleran temperaturas muy bajas, incluso 10°C bajo cero. La temperatura media anual para la producción forrajera está en torno a los 15°C.

Las pasturas de alfalfa bien implantadas y adecuadamente manejadas, convierten diariamente la energía solar en materia seca, dependiendo de los niveles de productividad propios de cada ambiente. Para llevar a cabo esto, es necesario la disponibilidad de agua y nutrientes. Los nutrientes son aportados principalmente por el suelo, siendo los más importantes: el nitrógeno, el fósforo y en menor medida el azufre y el boro. Además de estos, la alfalfa tiene grandes requerimientos de calcio y una gran sensibilidad a la acidez de los suelos.

El nitrógeno es aportado en su mayoría desde la atmósfera, a través de la simbiosis con la bacteria *Sinorhizobium meliloti*, siempre y cuando el proceso de fijación se lleve a cabo en óptimas condiciones y se logre una buena inoculación de las semillas. Dado que el nitrógeno es el principal constituyente de las proteínas, una adecuada nutrición nitrogenada de la planta, contribuye a la expansión del área foliar y a una mejor calidad de forraje.

En cuanto al fósforo, es fundamental en la nutrición de la planta, dado que interviene en múltiples procesos, como en el desarrollo de la biomasa aérea y radical, la capacidad de nodulación y de fijación del nitrógeno atmosférico, la fotosíntesis, la transferencia de energía, etc. Este elemento, no solo es importante para la nutrición de la planta, sino también para la tolerancia a factores de estrés y su persistencia.

El azufre, posee funciones similares al nitrógeno, ya que integra varias proteínas, y por lo tanto contribuye a la calidad del forraje, aportando proteínas esenciales para la nutrición animal.

El potasio, además de intervenir en procesos metabólicos, tiene un rol importante en el equilibrio hídrico de las plantas, en la regulación del pH, participa en numerosos procesos metabólicos y en la acción de numerosas enzimas. Otro de los cationes importantes es el magnesio, que tiene un rol crítico en la síntesis de clorofila (Basigalup y Rossanigo, 2007).

El suelo, debe contar con los nutrientes necesarios y ser profundo, dado que la alfalfa puede llegar a desarrollar raíces de entre 2 y 5 metros, por lo que suelos con menos de 60 cm de profundidad no son aconsejables para este cultivo (Basigalup y Rossanigo, 2007). En cuanto al pH, la limitante para la alfalfa es la acidez, excepto en la germinación, pudiendo desarrollarse ésta hasta con pH 4. El pH óptimo es de 7,2 por lo que se requieren suelos con un pH cercano a la neutralidad. No solo influye en el desarrollo del cultivo, sino también sobre las bacterias nodulantes de alfalfa (*Sinorhizobium meliloti*), que en pH menores a 5 dejan de reproducirse, poniendo de manifiesto una deficiencia en el contenido de nitrógeno.

Además de la sensibilidad a la acidez, la alfalfa presenta gran sensibilidad a la salinidad, que se manifiesta con la palidez de algunos tejidos, la disminución del tamaño de las hojas y desequilibrios entre la raíz y la parte aérea.

#### 2.5.7. Tipo de vegetación reportada para el municipio de Zacoalco de Torres.

##### Vegetación.

La agricultura es el uso de suelo predominante en el municipio de Zacoalco de Torres con un 39.3% del territorio. Un 36.0% está cubierto por selva y el 6.5% corresponde a bosque, pastizal y otros tipos de vegetación (IIEG, 2018). Los bosques están cubiertos por pino y encino, en la parte baja se encuentra selva baja espinosa, con especies de huizache, palo dulce y granjero; vegetación baja espinosa como maguey y nopal. También se pueden encontrar plantas halófilas. A continuación solo se describe brevemente los tipos de vegetación halófila y bosque espinoso.

##### Vegetación halófila.

La vegetación halófila es la que ocupa la mayor área de distribución en el predio. Las más representadas son *Poaceae* y *Chenopidaceae*, las especies más abundantes las de pastos salados (*Distichlis spicata*, *Eragrostis cilianensis* y *Sporobolus pyramidatus*), además de especies como el romerito (*Suaeda torreyana*), cenicilla (*Sessuvium portulacastrum*), el tule (*Scirpus sp.*), verdolaga de puerco (*Trianthema portulacastrum*); *Distichlis spicata* y *Suaeda torreyana* se adaptan muy bien a sustratos salinos y son indicadoras de suelo con contenido alto de sales. Algunas de las otras especies son aparentemente halófilas obligadas aunque con tolerancias diversas, algunas otras prosperan en suelos con exceso de sales. A menudo en zacatal está entremezclado con manchones de bosque espinoso de mezquite (*Prosopis leavigata*), nopal (*Opuntia atropes*), granjero (*Celtis pallida*) y *Lycium carolinianum* (Macías Rodríguez, 2004).

#### 2.5.8. Bosque espinoso.

Este tipo de vegetación se distribuye en los terrenos planos o poco inclinados con suelos arcillosos, pH alcalino, drenaje deficiente (por lo que se inunda en el temporal de lluvias) (Rzedowski, 1987). El predio El Llano y las áreas circundantes en su mayor parte esta compuesta por árboles espinosos de baja altura entre 4 y 5 metros. Las especies que constituyen a esta comunidad son principalmente mezquite (*Prosopis laevigata*), con menor frecuencia guamúchil (*Pithecellobium dulce*), alfilerillo (*Pereskiaopsis diguetii*), huizache (*Acacia farnesiana*) y tomatillo (*Solanum ferrugineum*) (Macias Rodriguez, 2004).

### **3. JUSTIFICACIÓN.**

La salinidad y la sodicidad natural o antropogénica en los suelos limita la producción agrícola a nivel mundial, en México las regiones norte y centro son las que se han visto más afectadas, principalmente las zonas áridas y semiáridas en las que la agricultura intensiva es la que predomina. La salinidad es la causa principal de degradación química de los suelos agrícolas.

Para la recuperación de estos suelos afectados por sales existen diversos métodos que van desde los físicos, eléctricos, hidrotécnicos, químicos y biológicos; aunque aplicados a grandes extensiones resultan muy costosos. Una alternativa es la aplicación de microorganismos benéficos que den capacidad de tolerancia a la sal y el uso de cultivos forrajeros, ambos representan una alternativa económica y sustentable, que además puede ser aprovechados como cultivos de amplia cobertura para la disminución de la erosión del suelo.

Emplear microorganismos promotores del crecimiento vegetal en la inoculación de semillas de alfalfa (*Medicago sativa*) que movilicen los nutrientes en la rizosfera y brinden capacidad de tolerancia a la planta para desarrollarse en suelos marginales como los salino - sódicos.

El empleo de residuos orgánicos brinda un aumento en la actividad biológica y la disponibilidad de muchos nutrimentos para las plantas, e incrementa la fertilidad del suelo al devolverle su capacidad para absorber y almacenar agua.

### **4. HIPÓTESIS.**

La inoculación de semillas de alfalfa (*Medicago sativa*) con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) aisladas de suelo salino - sódicos, incrementan la tolerancia al estrés salino, así como sus parámetros productivos.

## **5. OBJETIVOS.**

### **5.1. OBJETIVO GENERAL.**

Evaluar el efecto de un consorcio microbiano aislado de suelo salino - sódico y materia orgánica en la tolerancia a la salinidad en el cultivo de alfalfa (*Medicago sativa*).

### **5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

Caracterizar morfológicamente las bacterias aislados de suelo salino - sódico.

Determinar el potencial de actividad promotora del crecimiento vegetal (BPCV) en los aislamientos, mediante la evaluación de actividades enzimáticas, antagónicas a fitopatógenos, producción de fitohormonas como el ácido indolacético.

Caracterizar molecularmente los microorganismos aislados mediante la secuenciación de una región del rDNA.

Evaluar los efectos del consorcio microbiano y la incorporación de materia orgánica en la tolerancia y rendimiento de la alfalfa (*Medicago sativa*).

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS.

En el siguiente se presenta de manera general las actividades realizadas durante el proyecto.

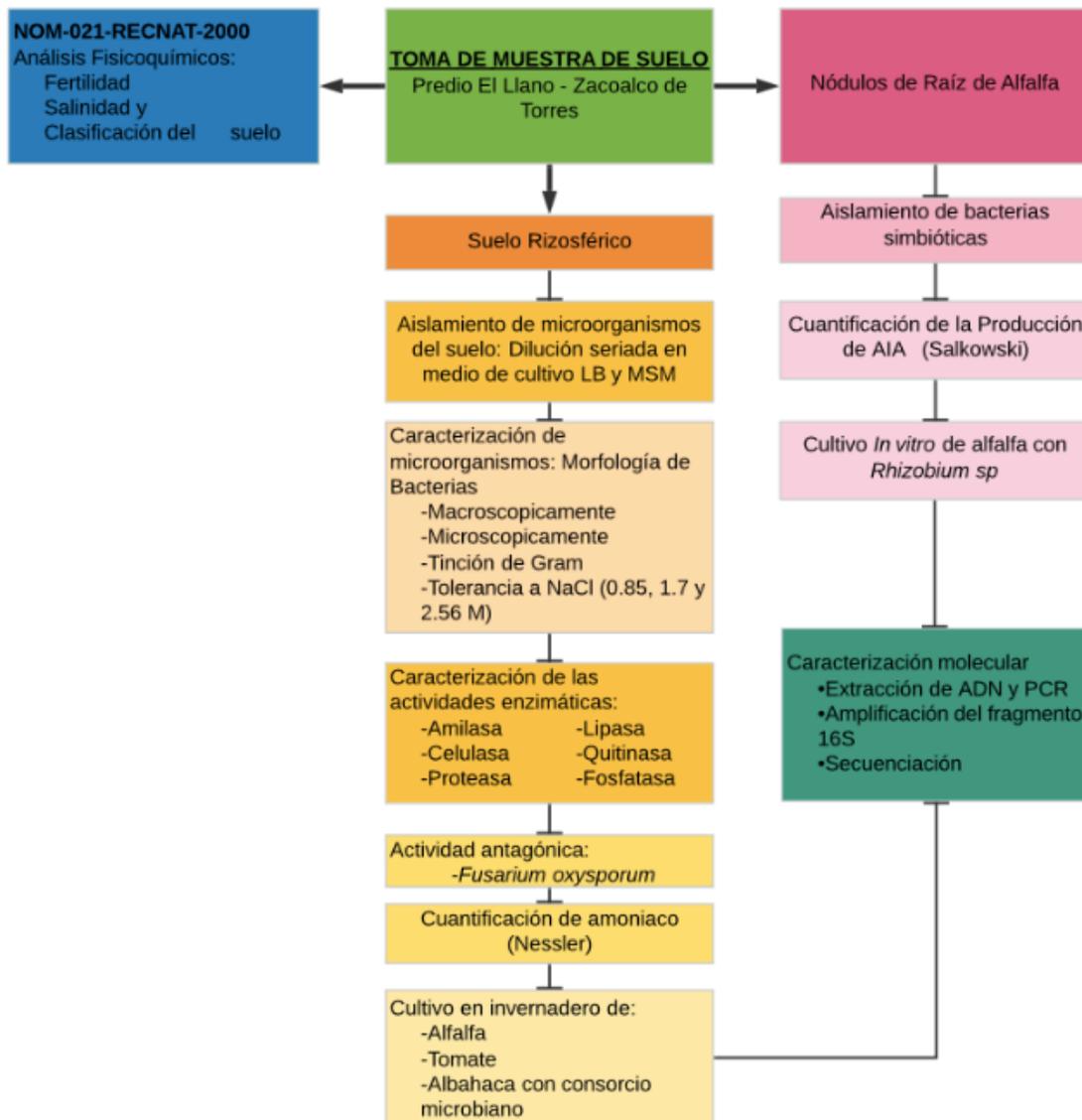


Figura 17.- Diagrama general de trabajo.

## 6.1. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO.

### 6.1.1. Ubicación geográfica.

Las muestras de suelo para el aislamiento de los microorganismos se tomaron en el predio El Llano el cual cuenta con una superficie de 10.2 ha, esta ubicado entre las coordenadas 20° 17' 83" y 20° 17' 87" latitud norte y entre 103° 51' 44" y 103° 51' 60" longitud oeste, en el municipio de Zacoalco de Torres en el estado de Jalisco. El municipio se encuentra a una altura que oscila entre los 1340 msnm en la parte mas baja y hasta los 2430 msnm en la parte mas alta de la Sierra del Tigre y la Sierra de Tapalpa. La superficie del terreno es plana con una pendiente menor a 5°. La precipitación media anual es de 828 mm, el suelo predominante en el predio es el arcilloso, con pH alcalino, drenaje deficiente, por lo que suele inundarse en el temporal de lluvias (IIEG , 2018).

### 6.1.2. Clima.

En el municipio de Zacoalco de Torres predomina el clima semiárido cálido en un 63.6%, seguido de semicálido - semihúmedo con 30.9% y templado subhúmedo con 5.6% del territorio del municipio. La temperatura media anual es de 20.2° C, la máxima promedio es de 31.1° C y una mínima promedio de 8.6° C. Los vientos dominantes son de dirección noreste a suroeste, se pueden presentar heladas en los meses de enero y febrero (IIEG , 2018).

## 6.2. MUESTREO Y CARACTERIZACIÓN DEL SUELO.

### 6.2.1. Toma de muestras.

La unidad de muestreo denominada como predio El Llano, en el municipio de Zacoalco de Torres, estado de Jalisco, tiene una extensión de 10.2 ha. Es aparentemente homogénea en cuanto a textura, color, pendiente, cultivo y manejo. Las muestras de suelo para los análisis físicos y químicos se tomaron en el mes de julio, de acuerdo con los puntos 6.1, 6.2 y 6.3 de la Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis.

**Toma de muestra para determinar fertilidad del suelo (M1):** se procedió a tomar submuestras en un muestreo en zigzag, a lo largo de una línea dentro de la unidad de muestreo, para posteriormente obtener las muestras representativa y determinar la fertilidad del suelo, estas submuestras se tomaron a una profundidad de cero a cinco cm, después de haber removido los residuos orgánicos no descompuestos. La muestra se tomo a esa profundidad ya que se trata de un suelo con sales.

**Toma de muestra para determinar salinidad y/o sodicidad (M2):** se tomaron muestra simples representativas del terreno a una profundidad de 0-20 cm. De acuerdo con la observación realizada en campo de la exploración radical de la vegetación ahí establecida. Se toman muestras simples ya que se trata de evaluar la salinidad de un suelo.

**Toma de muestra para la clasificación del suelo (M3):** se realizó la excavación tomando muestras individuales de cada una de las capas, anotando color, estructura, consistencia, porosidad, etc. Cabe señalar que no se realizaron todas las determinaciones descritas en el punto 5.3 de la norma, únicamente se realizaron las necesaria para suelos con exceso de sales. Todas las muestras fueron de aproximadamente un kg de peso, y se etiquetaron con los datos correspondientes para su identificación de acuerdo con la norma.

**Toma de muestra para el aislamiento de microorganismos del suelo (M4):** Se colectaron muestras de la rizósfera del suelo bajo la zona de la raíz de diferentes plantas en el sitio de estudio, a una profundidad de 0-10 cm (la vegetación existente es pasto, verdolagas, nopales, etc.). Se utilizaron bolsas de polietileno de dos kg, para colocar las muestras individuales de aproximadamente 1kg y se transportaron en una hielera al laboratorio. Se mantuvieron en refrigeración a 4° C hasta su uso para el aislamiento de microorganismos. La siguiente figura 18 se muestran imágenes de la toma de muestras.



Figura 18.- Toma de muestras (M1, M2, M3 y M4) en el predio El Llano, en el municipio de Zacoalco de Torres.

**Toma de muestra para el aislamiento de microorganismos de nódulos de raíz (M5):** Se colectaron plantas de *Medicago sativa* cultivadas en el predio El Casco, ubicado entre las coordenadas 20° 10' 54" y 20° 10' 56" latitud norte y entre 103° 53' 75" y 103° 53' 88" longitud oeste, en la cercanía al predio El Llano en el municipio de Zacoalco de Torres. Se seleccionaron plantas vigorosas, con hojas verde y sanas y con la ayuda de pico y pala se extrajeron teniendo cuidado de extraer toda la raíz, se depositaron en bolsas de plástico para su traslado al laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Tlajomulco

para realizar el aislamiento de microorganismos de nódulos de la raíz de alfalfa. Ver figura 19.



Figura 19.- Toma de muestra para el aislamiento de microorganismos de nódulos de raíz de alfalfa (M5).

#### 6.2.2. Análisis físicos y químicos del suelo.

Los análisis fisicoquímicos del suelo se realizaron en el laboratorio de suelos, aguas y plantas del Instituto Tecnológico de Tlajomulco, siguiendo las metodologías establecidas en la NOM-021-RECNAT-2000, en las siguientes determinaciones de la fertilidad, salinidad y clasificación del suelo, que se mencionan a continuación:

Preparación de la muestra, pH: medido en agua, contenido de materia orgánica, textura del suelo, fósforo extraíble, capacidad de intercambio catiónico y cationes intercambiables (calcio, magnesio, sodio y potasio), contenido de micronutrientes disponibles (magnesio, cobre, zinc y hierro), contenido de boro, medición de la conductividad eléctrica, cationes solubles (carbonatos de calcio equivalentes), aniones solubles (azufre  $SO_4$ )), Porcentaje de Saturación de Bases (PSB), Relación de Adsorción de Sodio (RAS) y Porcentaje de Sodio Intercambiable (PSI).

Los nutrientes (fósforo, magnesio, potasio, calcio y nitrógeno amoniacal) se determinaron por el método (Mehlich, 1984).

A continuación, se describen los procesos de preparación de la muestra y la determinación de pH.

### 6.2.3. Preparación de la muestra del suelo.

Una vez obtenidas las muestras y trasladadas al laboratorio, se procedió con el secado de estas, esto con la finalidad de facilitar el manejo de la muestra, mejorar la homogenización y disminuir los cambios químicos indeseable. El secado se realizó extendiendo la muestra del suelo mas o menos unos 2.5 cm de espesor sobre papel, a la sombra y a temperatura ambiente.

Posteriormente se realizó la molienda del suelo con un mazo de madera (previamente se retiraron las rocas y el material orgánico visible). Ya que se tenía la muestra molida se paso por un tamiz con abertura de dos mm de diámetro (malla 10) de acero inoxidable. Para las determinaciones química y físicas en la caracterización del suelo desde el punto de vista de su fertilidad. Se homogeniza la muestra y se procede a pesar las submuestras en una balanza de precisión para continuar con las determinaciones analíticas.

### 6.2.4. Determinación de pH.

La determinación de pH del suelo medido en agua se realizó a través del método AS-02 de la NOM-021-RECNAT-2000.

Se realizó basándonos en la determinación de la actividad del ion H mediante el uso de un electrodo cuya membrana es sensitiva al H. En el caso de las muestras de suelo se midió potenciométricamente en una suspensión sobrenadante de una mezcla de relación suelo:agua 1:2.

Se pesaron 10 g de suelo en un vaso de precipitado con capacidad de 50 mL y se le agregaron 20 mL de agua destilada, con una varilla de vidrio se agito manualmente la mezcla de suelo:agua a intervalos de 5 minutos durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo se dejo reposar 15 minutos. Se calibra el medidor de pH con las soluciones 4.00, 7.00 y 10.00 para realizar la medición. Se agito nuevamente la suspensión y se introdujo el electrodo. Se clasificó de acuerdo con los valores del cuadro 10.

Cuadro 10.- Clasificación del suelo en cuanto a su valor de pH.

<b>Clasificación</b>	<b>pH</b>
Fuertemente ácido	< 5.0
Moderadamente ácido	5.1 – 6.5
Neutro	6.6 – 7.3
Medianamente alcalino	7.4 – 8.5
Fuertemente alcalino	> 8.5

Tomado de: (NOM-021-RECNAT-2000).

### 6.3. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS.

#### 6.3.1. Aislamiento y caracterización morfológica de microorganismos del suelo.

El aislamiento se realizó mediante la técnica de dilución seriada en placa de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ . Se tomó un 1 g de suelo y se diluyó en 9 mL de solución salina estéril al 0.85% de NaCl. De las diluciones  $10^5$  y  $10^6$  se tomó una alícuota 500  $\mu$ L y se inoculó sobre placas con medios de cultivo LB (Luria-Bertani) (Sezonov, et al., 2007) y medio mínimo de sales MMS (Aquihuatl Ramos & Perez Chabela, 2004) por duplicado (ver anexo 1 Medios de cultivo), y se incubó a temperatura ambiente durante 24 a 48 horas. Las cepas crecidas se contabilizaron y se seleccionaron según la tasa de crecimiento y la morfología de la colonia (tamaño, forma, elevación, borde, color, superficie, densidad, consistencia), se purificaron por estría cruzada en agar medio LB. Posteriormente se identificaron microscópicamente con base en la tinción de Gram (López-Jácom, et al., 2014). Los cultivos puros se conservaron mediante resiembras periódicas en medio LB y solución de glicerol al 30% a  $-70^{\circ}$  C para su evaluación enzimática.

#### 6.3.2. Aislamiento de microorganismos de raíz.

Las plantas fueron sumergidas en agua para retirar la tierra adherida a las raíces. Posteriormente se realizó un análisis de las nodulaciones radicales con la ayuda de un estereoscopio, teniendo en cuenta los parámetros: tamaño de nódulos, cantidad, distribución y color externo como interno, lo anterior para seleccionar nódulos vivos de buen tamaño, libres de heridas y los que presenten un color rosado. Se seleccionaron 15 nódulos por planta.

Para la desinfección de los nódulos se pasaron por cloro al 10% por un minuto, después por etanol al 70% por cinco minutos en agitación, se enjuagaron cinco veces con agua destilada estéril y se maceraron en mortero estéril en campana de flujo laminar con una solución de NaCl al 0.85%. Enseguida se sembraron en medio levadura manitol-agar (LMA, ver anexo 1 Medios de Cultivos) (CIAT, 1988) por estría cruzada con la ayuda de un asa bacteriológica, se incubaron a  $28^{\circ}$  C en posición invertida, se observó diariamente el crecimiento de las colonias características de rizobios de acuerdo al manual CIAT, en un lapso de 10 días. Se seleccionó una colonia individual y se resembró en el mismo medio para purificar la cepa, se conservaron en glicerol al 30% a  $-70^{\circ}$  C, para su posterior evaluación en la producción de ácido indolacético.

### 6.3.3. Extracción de ADN bacteriano.

Las cepas que presentaron alguna actividad enzimática, toleraron mayor concentración de NaCl y los aislados de los nódulos de raíz de alfalfa, se identificaron genéticamente por análisis de secuenciación de la región 16S rRNA.

La obtención del DNA genómico se realizó tomando una colonia previamente crecida en agar LB y posteriormente se inoculó en cultivo fresco de caldo LB (3 mL), después se mantuvieron en agitación a 28 °C durante 18 a 24 horas. Se recuperó la biomasa por centrifuga (FA-45-18-11, modelo 5418) a 7000 rpm por 3 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en 500µL de amortiguador de lisis (que contenía SDS 1% (p/v), NaCl 100 mM, TRITON X100 y Tris-HCl 10 mM pH 8) y 10 µL de proteína K a una concentración de 20 mg mL<sup>-1</sup>, se agitó vigorosamente y se incubó a 65 °C por 30 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación se agregaron 400µL de fenol buferizado mezclando vigorosamente y se centrifugó a 14000 rpm en un rotor FA-45-18-11, modelo 5418 durante 10 minutos. Se recuperó la fase acuosa en un tubo eppendorf nuevo, se agregaron 2µL de RNAsa y se incubó 30 min a 37 °C. Después de la incubación se agregó un volumen de cloroformo y se mezcló perfectamente, para centrifugar a 14000 rpm en un rotor FA-45-18-11 durante 5 minutos. Se recuperó nuevamente la fase acuosa y se adicionó 200 µL de acetato de amonio 7.5 M mezclando vigorosamente. Se incubó a -20 °C por 10 minutos. Se agregó un volumen de isopropanol frío e invertió el tubo gentilmente. Se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos en Centrifuge 5417R. Mantener en incubación a -20°C por 2 horas, posteriormente centrifugar a 14000 rpm durante 5 minutos. Se retiró el alcohol y se lavó la pastilla con 500µL etanol al 70 % frío, se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla de DNA a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendió la pastilla en 30 µL de agua inyectable y se congeló a -20 °C para su posterior electroforesis.

### 6.3.4. Amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA.

La identificación genética de las cepas puras, se llevó a cabo por la amplificación de un fragmento del gen 16S rRNA, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando los siguientes iniciadores universales: PLB 16-F 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' y MLB 16-R 5'-GGC TGC TGG CAC GTA GTT AG-3'. Las muestras fueron preparadas de acuerdo al kit comercial Invitrogen® DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific), la mezcla de reacción contenía 1 µL de cada oligonucleótido (10 mM), 0.5 µL de dNTP's (10 mM), 2.5 µL de Dream Taq Buffer 10X, 3 µL de DNA, 0.6 µL de Dream Taq DNA Polimerasa y 16.4 µL de agua inyectable para tener un volumen de reacción final de 25 µL. La amplificación se llevó a cabo en las condiciones del ciclo térmico con una pre-desnaturalización de 5 min (95 °C); desnaturalización de 30 seg (95 °C); alineamiento 30 seg (56 °C); elongación 2 min (72 °C); se repitieron 35 ciclos y al final un ciclo de post-elongación de 7 min a 72 °C, utilizando un termociclador Select BioProducts Modelo Select Cyler.

Los fragmentos amplificados se visualizaron en gel de agarosa al 1%, utilizando como buffer de corrida SB 1X a un voltaje constante de 100 volts, durante 30 minutos. El gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio, se utilizó un marcador de peso molecular de 1 Kb y se observó en un fotodocumentador bajo luz ultravioleta. Los productos de esta amplificación fueron purificados utilizando el kit Gel DNA Extraction Kit Roche Diagnostics GmbH Mannheim Germany, y fueron enviados a secuenciación mediante un servicio externo a la Distribuidora Química y Hospitalaria GAP. Posteriormente, se compararon las secuencias obtenidas con las encontradas en el banco de genes NCBI (National Center for Biotechnology Information). Se buscaron secuencias altamente similares a las obtenidas de la página web del GenBank mediante la herramienta BLAST (BasicLocal Alignment Search Tool) de la base de datos del NCBI, usando como medida un porcentaje de identidad, el cual es mayor a medida que las secuencias sean altamente parecidas. Las secuencias de nucleótidos que codifican los genes del 16S DNAr de bacterias fueron depositadas en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

#### 6.3.5. Clasificación de los aislados en la tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl.

Para clasificar a los microorganismos de acuerdo con su comportamiento hacia la sal, se utilizó la clasificación descrita (Kushner, 1978), quien definió diferentes categorías: halófilos débiles, como lo son la mayoría de los organismos marinos, considerando que el agua de mar contiene cerca del 3% (p/v) de NaCl, halófilos moderados (organismos que crecen de manera óptima entre 0.5 y 2.5 M de NaCl (3 al 15% (p/v)), microorganismos halotolerantes que no muestran un requerimiento absoluto de sal para su crecimiento pero crecen bien hasta concentraciones de sal a menudo muy altas (considerados extremadamente halotolerantes si el rango de crecimiento se extiende por encima de 2.5 M de NaCl (15% (p/v)) y halófilos extremos (que crecen mejor en medios que contienen sal de 2.5 a 5.2 M (25% (p/v) de NaCl), halófilos extremos limítrofes (crecen en medios que contienen sal 1.5 a 4.0 M) (Aharon, 2008).

Los aislados seleccionados fueron sometidos a diferentes concentraciones de NaCl para medir su tolerancia y poderlos clasificar de acuerdo con su comportamiento hacia la sal. Se utilizaron placas con 15 g/L de agar en medio LB (Luria-Bertani) adicionado con 5% (50 g/l), 10% (100 g/l) y 15% (150 g/l) de NaCl y pH  $7 \pm 0.2$ , se sembraron ocho aislados en cada placa y se incubaron a temperatura ambiente por 72 horas con monitoreo constante. Para establecer la concentración óptima de NaCl para el desarrollo de las cepas se estableció considerando aquellas concentraciones en la cual el crecimiento fue más abundante. Los que tuvieron un crecimiento entre 10 a 35% en la placa se les clasificó como débil, asignando un signo de +, los que crecieron de 36 a 65% se consideran como moderados y se les asignó ++ y se consideran como fuerte los que crecieron de 66 a 99% y se les asignó +++.

### 6.3.6. Caracterización bioquímica de las cepas.

Para la caracterización bioquímica de los aislados de suelo salino, se realizó con diversos ensayos en medios sólidos para evaluar las actividades enzimáticas extracelulares como amilasa, celulasa, proteasa, quitinasa, lipasa y fosfatasa. Las sales de los distintos medios se ajustaron a pH 7.5 y se agregaron 15 g de agar (ver anexo 1 Medios de cultivo), las placas se dividieron en seis secciones y se inocularon con la ayuda de una asa bacteriológica haciendo un pequeño punto de 2 mm de diámetro, se incubaron a 28 °C en posición invertida y se monitorearon constante durante 10 días. La formación de halos translúcidos alrededor de la colonia se interpretó como resultado positivo.

Después de transcurrido el tiempo de incubación algunos medios se revelaron para apreciar el halo traslucido de la actividad. Las soluciones de revelado se describen en el anexo 1 Medios de cultivo.

### 6.3.7. Actividad antagónica contra *Fusarium oxysporum*.

Para determinar la actividad antagónica de las 40 cepas aisladas del suelo salino ante fitopatógenos como *Fusarium oxysporum* que afecta a los cultivos de alfalfa. Se realizaron experimentos de antagonismo *in vitro* en cajas petri, se utilizaron cepas del hongo fitopatógeno que fueron tomadas del cepario del laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Tlajomulco y se conservaron por resiembras periódicas en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA)(ver anexo 1 Medios de cultivo), a 4 °C. Para determinar la actividad los hongos se sembraron previamente en cajas de petri con medio de cultivo PDA, colocando un disco de 5 mm de diámetro del borde de la colonia miceliana del fitopatógeno en el centro de la placa y se incubaron a 28 °C durante tres días. Posteriormente, se realizó la siembra de la cepa bacteriana, con la ayuda del asa bacteriológica se colocó la bacteria formando una línea de un centímetro de longitud, de tal forma que se sembraron cuatro cepas bacterianas por cada caja. Se incubaron a 28 °C durante 7 días, se realizaron dos repeticiones por cada cepa. El efecto antagónico de las bacterias fue determinado a través de la fórmula utilizada por (Suárez, Fernández, Valero, Gámez, & Páez, 2008), en comparación con un tratamiento control donde no se aplicó el antagonista bacteriano. Las placas petri utilizadas fueron de 9 cm de diámetro.

### 6.3.8. Producción de ácido indolacético (AIA).

Para la cuantificación de la producción de ácido indolacético por las bacterias aisladas de los nódulos de la raíz de alfalfa, se llevó a cabo mediante la técnica espectrofotométrica empleando el reactivo de Salkowski (Glickmann & Dessaux, 1995). Las cepas aisladas se incubaron en una agitadora modelo ZHWY-200D durante 72 horas en medio de cultivo LMA adicionado con L-Triptófano (2 g L<sup>-1</sup>), se centrifugaron 1.5 mL del cultivo a 7000 rpm en un

rotor FA-45-18-11 modelo 5418 durante cinco minutos, se tomaron 150  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  del reactivo de Salkowski (Anexo 1 Medios de Cultivo). La mezcla se incubó durante 30 minutos a 25  $^{\circ}\text{C}$  y se midió la absorbancia con un espectrofotómetro UV-VIS (Thermo Scientific Multiskan GO) a 530 nm en una microplaca de 96 pocillos, las mediciones se realizaron por triplicado. Para obtener la curva de calibración se prepararon concentraciones conocidas de ácido indol acético (AIA) comercial (Sigma) (0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 35 y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

#### 6.3.9. Prueba de efectividad biológica en alfalfa in vitro.

Para evaluar la efectividad biológica de las cepas de rizobio sobre un cultivo de alfalfa *in vitro* se preparó medio de cultivo MS (Murashige y Skoog) (ver Anexo 1 Medios de Cultivo) a la quinta parte, el stock que no se dividió a la quinta parte es el que contiene  $\text{CaCl}_2$  esto para que se pudiera gelificar, se ajustó el pH 5.7 con 0.1 M de HCl o NaOH, no se agregaron reguladores de crecimiento ni vitaminas. Después de esterilizar el medio se vació en cajas petri aproximadamente 25 mL en cada caja. Para desinfectar las semillas se preparó una solución con 4 g/L de un bactericida agrícola (Oxitetraciclina (Clorhidrato de oxitetraciclina) + Cobre (Oxicloruro de cobre) 37.7% + 45% 350), a esta solución se agregaron las semillas y se colocaron en una agitadora modelo ZHWY-200D durante 30 minutos, después se retiró el líquido y se agregó agua estéril con una gota de Tween 20 durante 15 minutos, nuevamente se enjuagó con agua estéril y se agregó etanol al 70% durante cinco minutos, después cloro al 20% durante 20 minutos, durante todo el proceso las muestras se mantuvieron en agitación constante. Por último, se enjuagaron tres veces con agua estéril y se sembraron en cajas con medio MS. Las diez semillas se colocaron en una línea recta a 1.5 cm del borde de la caja. Las cajas se incubaron en posición vertical, a los 8 días después de la siembra de la semilla se colocaron las ocho bacterias, una por caja y tres repeticiones con un asa bacteriológica, haciendo una línea horizontal a un centímetro por debajo de la raíz del cultivo.

#### 6.3.10. Cuantificación de amoníaco.

El proceso de nitrificación se compone de procesos impulsados por distintos microorganismos, que incluyen asimilación, amonificación, nitrificación, desnitrificación, fijación de nitrógeno y oxidación anaerobia del amoníaco (Andrade Ochoa, et al., 2015). La nitrificación la conversión biológica de amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) a nitrato ( $\text{NO}_3$ ) vía nitrito ( $\text{NO}_2$ ), es un componente central del ciclo del nitrógeno.

El reactivo de Neesler es una solución que contiene  $\text{K}_2\text{HgI}_4$  y KOH, es un reactivo químico utilizado para detectar pequeñas cantidades de amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) o el catión amonio ( $\text{HN}_4^+$ ). Los iones de yoduro y mercurio reaccionan con el amoníaco en condiciones alcalinas. El método consiste en que la sal de  $\text{HN}_4^+$  disuelta, reacciona con el reactivo de Neesler alcalino, elevándose el pH del medio, por el cual se obtiene amonio. Esta reacción produce una coloración gradual de amarillo a pardo a medida que aumenta la concentración de

amoníaco. El ensayo se estandarizó en microplacas de 96 pocillos utilizando como estándar cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ). La absorbancia se midió a 414 nm de longitud en espectrofotómetro UV-VIS (Thermo Scientific Multiskan GO) realizando mediciones por triplicado. Para obtener la curva de calibración con el reactivo de Neesler se preparó una solución patrón a concentraciones conocidas de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 y 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Las 40 cepas aisladas se crecieron en medio de cultivo líquido LB incubando en una agitadora modelo ZHWY-200D durante 24 horas, posteriormente se centrifugaron 1.5 mL del cultivo a 7000 rpm en un rotor FA-45-18-11 modelo 5418 durante cinco minutos, se tomaron 150  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  del reactivo de Neesler (marca BIOPACK). La mezcla se incubó durante 30 minutos a 25 °C y se midió la absorbancia con un espectrofotómetro UV-VIS (Thermo Scientific Multiskan GO). A los promedios de los valores de absorbancia obtenidos se le restó el promedio de la muestra control para obtener la absorbancia real y la desviación estándar.

#### 6.3.11. Selección de cepas promisorias.

Cinco cepas fueron seleccionadas como BPCV para conformar el consorcio microbiano e inocular las semillas de alfalfa. Para esto, se consideraron los resultados de las actividades enzimáticas y antagónica descritas en el cuadro 18, así como también se consideró la producción de AIA y la cuantificación de amoníaco. También se tomó en consideración elegir el género de las cepas aisladas, ya que cinco de las bacterias identificadas están consideradas por otros autores como BPCV. En la selección de la bacteria del consorcio se realizó una prueba de confrontación para comprobar que no existiera inhibición de alguna bacteria sobre la otra. Para ello se preparó medio de cultivo Agar LB (ver Anexo 1 Medios de cultivo) se vació en cajas petri, posteriormente se seccionaron las cajas y se sembraron las cinco bacterias con la ayuda de un asa bacteriológica, se incubaron a 28 °C en posición invertida, se observaron diariamente durante cinco días.

#### 6.3.12. Pruebas realizadas en cultivo de alfalfa, albahaca y tomate en invernadero con suelo salino - sódico.

Las pruebas se realizaron en cultivos de alfalfa (*Medicago sativa*), albahaca (*Ocimum basilicum*) y tomate (*Solanum lycopersicum*). Se implementó un diseño experimental para todos los cultivos que consistió en utilizar suelo salino – sódico del lugar de estudio con 5 y 10% de materia orgánica composteada, el diseño consistió en seis tratamientos y cinco repeticiones en unidades experimentales en vasos de poliestireno con capacidad de 1000 mL para los cultivos de tomate y albahaca, para el cultivo de alfalfa se utilizaron bolsas negras con capacidad de 5 kg. En los cultivos de la albahaca y tomate se sembró una semilla por vaso y para el caso de la alfalfa se sembraron 40 semillas inoculadas con el consorcio al momento de la siembra. Se evaluó el efecto del consorcio microbiano con el número de semillas germinadas, altura de la planta, número de hojas y longitud de la raíz. El periodo de tiempo en el que se evaluó el proyecto fue de dos meses.

Cuadro 11.- Diseño experimental para cultivos de alfalfa, tomate y albahaca.

Tratamiento	Materia orgánica compostada	Solución	
		bacterina 1X10 <sup>8</sup> UFC mL	Repeticiones
T <sub>0</sub>	0%	-	5
T <sub>1</sub>	0%	10	5
T <sub>2</sub>	5%	10	5
T <sub>3</sub>	5%	10	5
T <sub>4</sub>	10%	10	5
T <sub>5</sub>	10%	10	5

Para la inoculación de las semillas se preparó caldo nutritivo marca Difco™ (Anexo 1 Medios de cultivo) se vació en matraces de 100 mL y con un asa bacteriológica se inoculó, posteriormente se incubaron en una agitadora modelo ZHWY-200D durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se vació el inoculó a un matraz de 500 mL y se incubó nuevamente en agitación durante 24 horas. Esto se hizo para cada una de las bacterias que conformaron el consorcio microbiano. Para la bacteria aislada de los nódulos de la raíz de alfalfa se preparó medio LMA y se hicieron los pasos anteriores. Todo se trabajó en condiciones asépticas. Se realizó un conteo por medio de la cámara de Neubauer para garantizar que el número de bacterias por mililitro si fuera el establecido, el conteo se realizó bajo microscopio óptico.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### **Determinaciones fisicoquímicas del suelo.**

Se tomaron 12 submuestras para obtener dos muestras compuestas para las determinaciones de fertilidad (M1), dos muestras simples para determinar la salinidad (M2), tres muestras para la clasificación del suelo (M3) y por último se tomaron muestras de la rizósfera de pastos, verdolagas y nopales (vegetación existente en el sitio) (M4).

De acuerdo con los datos obtenidos en la determinación de textura, con el procedimiento de Bouyoucos a través del método AS-09 de la norma, los porcentajes de limo, arena y arcilla de las muestras corresponden (dentro del triángulo textural establecido por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos), a un suelo franco arcilloso (Cr). Con una CE de  $4.12 \text{ dS/m}^{-1}$  relación 1:5, entrando en los límites de un suelo salino y salino-sódico, un pH de 10.5, y de acuerdo con lo descrito en el cuadro 11 se interpreta que se trata de un suelo fuertemente alcalino obtener una lectura mayor a 8.5, esto de acuerdo a la interpretación de la NOM-021-RECNAT-2000, con un PSI de 60.55 y de acuerdo con la clasificación de suelos afectados por sales del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, 1954), PSB de 80.52 y una RAS de 12.86, corresponde a un suelo salino-sódico. El porcentaje de concentración de materia orgánica en el suelo es bajo, es decir menor de 1.5 de acuerdo con la norma. En cuanto a los micronutrientes se tiene un suelo en su mayoría deficiente, en los nutrientes el calcio aparece muy alto y el potasio y el nitrógeno amoniacal muy bajos, con una capacidad de intercambio catiónico (CIC) de  $37.8 \text{ Cmolkg}^{-1}$  dentro de la categoría le corresponde al alta (25 – 40), los cationes (magnesio, potasio y calcio) de acuerdo con la interpretación de la normatividad se clasifican en baja a media.

Cuadro 12.- Fertilidad, salinidad y clasificación del suelo (muestras M1, M2 y M3).

MUESTRA	DETERMINACIÓN		MÉTODO	UNIDADES		INTERPRETACIÓN NOM-021-RECNAT-2000
	CATIONES:			ppm	cmol/Kg	
M1, M3	Calcio (Ca)		AS-12 (Acetato de Amonio)	1,142.57	5.7	Media
M1, M3	Magnesio (Mg)		AS-12 (Acetato de Amonio)	75.85	0.624	Baja
M1, M3	Sodio (Na)		AS-12 (Acetato de Amonio)	526.7	22.9	No aplica
M1, M3	Potasio (K)		AS-12 (Acetato de Amonio)	10.92	0.28	Baja
M1, M3	C.I.C.		AS-12 (Acetato de Amonio)	NO APLICA	37.8	Alto
M3	Azufre (SO4)		AS-20	178.22	3.71	No aplica
DETERMINACIÓN		MÉTODO	UNIDADES		NOM-021-RECNAT-2000	
M2, M3	Porentaje de Saturación de Bases		AS-21	cmol/Kg	80.52	Muy Alto
M2, M3	Porcentaje de Sodio Intercambiable (PSI)		AS-21	cmol/Kg	60.55	Extremadamente sódico
M2, M3	Relación de Adsorción de sodio (RAS)		AS-21	cmol/Kg	12.86	Sódico
MICRONUTRIENTES:		MÉTODO	UNIDADES		NOM-021-RECNAT-2000	
M1	Manganeso (Mn)		AS-14 (DTPA)	ppm	0.79	Deficiente
M1	Cobre (Cu)		AS-14 (DTPA)	ppm	0.15	Deficiente
M1	Zinc (Zn)		AS-14 (DTPA)	ppm	0.33	Deficiente
M1	Hierro (Fe)		AS-14 (DTPA)	ppm	1.56	Deficiente
M1	Boro (B)		AS-15 (Azometina-H)	ppm	7.2	Muy Alto
M2, M3	Carbonatos de Calcio Equivalentes		AS-19 Neutralización Ácida	%	20.83	Alto
MUESTRA	DETERMINACIÓN	UNIDADES	MÉTODO	NOM-021-RECNAT-2000		
M1	Clasificación textural		%	Bouyoucos	Cr	
M2, M3	Conductividad Eléctrica 1:5 Ms cm-1		dS m-1 a 25°C	Electrométrico	4.12	Suelo salino
M1	pH en agua relación 1:2		Unidades	Potenciométrico	10.5	Muy Alcalino
M1, M3	Materia orgánica		%	Walkley-Black	0.896	Bajo
NUTRIENTES:						
M1	Fósforo		ppm	Olsen	6.7	Bajo
M1	Magnesio		ppm	Mehlich III	485	Medio
M1	Potasio		ppm	Mehlich III	60	Muy Bajo
M1	Calcio		ppm	Mehlich III	2386	Muy Alto
M1	Nitrógeno amoniacal		ppm	Kjeldahl	6	Muy Bajo

Cr = Franco Arcilloso

### Morfología de aislados de suelo y raíz.

Se contabilizaron las colonias crecidas en las placas de medio Lb y MMS, obteniendo en promedio 412 UFC/mL procedentes de suelos salinos, se seleccionaron 40 aislados que presentaron macroscópicamente morfología diferente y se caracterizaron microscópicamente empleando tinción de Gram, observando que la mayoría de las bacterias aisladas del suelo fueron Gram positivo en un 85%, el 97.5% presentó una morfología bacilar (ver cuadro 13).

Se seleccionaron ocho cepas puras crecidas en placas con medio de cultivo LMA que presentaron características morfológicas propias de rizobios, la tinción de Gram reveló que todas son Gram negativas y de tipo bacilar.

### Caracterización molecular

En la caracterización molecular de los aislados, se amplificó y secuenció un fragmento del gen 16S ribosomal. En la figura 20 se observa el amplicón de aproximadamente 400 pb, empleado para su secuenciación e identificación genética, comparada con las bases de datos existentes.

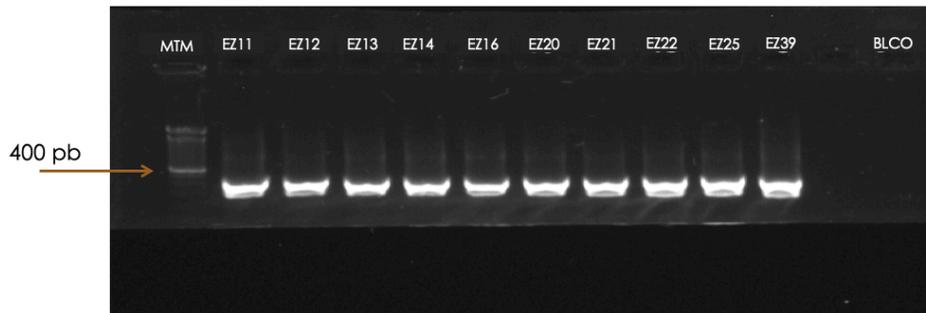


Figura 20.- Reamplificación del gen 16S del rRNA de cepas aisladas del suelo salino.

Una vez obtenidas las secuencias del gen 16S rRNA:

Las cepas bacterianas seleccionadas se identificaron mediante análisis de secuenciación del gen 16S rRNA para su identificación genética. Las secuencias de nucleótidos recuperadas de estas cepas bacterianas se sometieron a homología en la base de datos NCBI, mostrando que las 43 cepas bacterianas aisladas de suelo salino y de nódulos de raíz pertenecen a seis géneros diferentes, 26 cepas (EZ10, EZ11, EZ14, EZ15, EZ16, EZ17, EZ20, EZ23, EZ24, EZ25, EZ26, EZ27, EZ28, EZ29, EZ31, EZ33, EZ34, EZ35, EZ37, EZ40, EZ41, EZ42, EZ44, EZ45, EZ46 y EZ47), mostraron un promedio 92% en la cobertura y un 99.27% en la identidad con las secuencias del gen 16S rRNA del género *Bacillus*, 6 cepas (EZ12, EZ13, EZ18, EZ22, EZ30 y EZ32) mostraron un promedio 91% en la cobertura y un 99.21% en la identidad con el género *Brevibacterium sp.*, 4 cepas (EZLA, EZR2, EZR3 y EZR4) mostraron un promedio 74% en la cobertura y un 99.18% en la identidad con *Sinorhizobium*, 1 cepa (EZLM) mostró 83% en la cobertura y un 99.07% en la identidad con *Ensifer adhaerens*, 1 cepa (EZ19) mostró 99% en la cobertura y un 99.19% en la identidad con *Azospirillum lipoferum* y 1 cepa (EZ36) mostró 81% en la cobertura y un 97.11% en la identidad con *Agrobacterium sp.* (Cuadro 13). Cuatro de las cepas que se mandaron secuenciar no se reportan ya que se catalogaron como no válidas (EZ21, EZ38, RZ39 y EZ43), sí aparecen en las siguientes caracterizaciones bioquímicas y de confrontación.

Cuadro 13.- Secuenciación del gen 16S rRNA para la identificación genética de cepas aisladas de suelo salino – sódico del predio El Llano, en el municipio de Zacoalco de Torres, Jalisco.

Aislado	Forma	Gram	Especie GeneBank	% Cobertura	% Ident	Accesión Referencia
EZ10	Bacilar	+	<i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i>	99%	99.60%	gi 1206483401 MF101086.1
EZ11	Bacilar	+	<i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i>	99%	98.98%	gi 1206483419 MF101104.1
EZ12	Bacilar	+	<i>Brevibacterium sp.</i>	99%	99.37%	gi 1050774998 KX099273.1
EZ13	Bacilar	+	<i>Brevibacterium sp.</i>	99%	99.19%	gi 1207321079 KY492049.1
EZ14	Bacilar	+	<i>Bacillus tequilensis</i>	82%	99.59%	gi 1465463679 MG733515.1
EZ15	Bacilar	+	<i>Bacillus sp.</i>	83%	99%	gi 1479547925 MG470748.1
EZ16	Bacilar	+	<i>Bacillus subtilis</i>	98%	99.39%	gi 241822414 MF950890.1
EZ17	Bacilar	+	<i>Bacillus subtilis</i>	75%	99.39%	gi 1227367176 MF590158.1
EZ18	Bacilar	+	<i>Brevibacterium sp.</i>	83%	99.39%	gi 1207321079 KY492049.1
EZ19	Bacilar	-	<i>Azospirillum lipoferum</i>	99%	99.19%	gi 652794142 LK391704.1
EZ20	Bacilar	+	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	99.40%	gi 1376192276 MH187609.1
EZ22	Bacilar	+	<i>Brevibacterium sp.</i>	82%	98.79%	gi 1207321079 KY492049.1
EZ23	Bacilar	+	<i>Bacillus sp.</i>	99%	99.80%	gi 1595588112 MK660033.1
EZ24	Bacilar	+	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	99.60%	gi 1376192314 MH187647.1
EZ25	Bacilar	+	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	98.79%	gi 1377699334 MH211601.1
EZ26	Bacilar	+	<i>Bacillus subtilis</i>	98%	99.19%	gi 1465463409 MG892900.1
EZ27	Bacilar	+	<i>Bacillus subtilis</i>	98%	98.99%	gi 1547527512 MK367793.1
EZ28	Bacilar	+	<i>Bacillus subtilis</i>	98%	99.20%	gi 1591223477 MK629825.1
EZ29	Bacilar	+	<i>Bacillus sp.</i>	99%	98.99%	gi 1479547834 MG470657.1
EZ30	Bacilar	+	<i>Brevibacterium sp.</i>	93%	99.15%	gi 1207321079 KY492049.1
EZ31	Bacilar	+	<i>Bacillaceae bacterium</i>	97%	99.79%	gi 1356683790 MH036315.1
EZ32	Bacilar	+	<i>Brevibacterium sp.</i>	91%	99.39%	gi 1207321104 KY492052.1
EZ33	Bacilar	+	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	52%	99.40%	gi 1194627833 MF125280.1
EZ34	Bacilar	+	<i>Bacillus sp.</i>	99%	99.79%	gi 1023530258 KU159190.1
EZ35	Bacilar	+	<i>Bacillus megaterium</i>	78%	98.99%	gi 451964194 KC441754.1
EZ36	Bacilar	-	<i>Agrobacterium sp.</i>	81%	97.11%	gi 665824671 KM114621.1
EZ37	Bacilar	+	<i>Bacillus velezensis</i>	68%	96.59%	gi 1493546720 MK070084.1
EZ40	Bacilar	+	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	97.99%	gi 1587067531 MK605992.1
EZ41	Bacilar	+	<i>Bacillus megaterium</i>	98%	99.19%	gi 451964194 KC441754.1
EZ42	Bacilar	+	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	99.40%	gi 1288606276 MG601162.1
EZ44	Bacilar	+	<i>Bacillus licheniformis</i>	96%	100%	gi 237512202 FJ914624.1
EZ45	Bacilar	+	<i>Bacillus sp.</i>	98%	100%	gi 1631964011 MH234003.1
EZ46	Bacilar	+	<i>Bacillus sp.</i>	99%	100%	gi 1132626594 KX214612.1
EZ47	Bacilar	+	<i>Bacillus sp.</i>	92%	100%	gi 1339502997 MG896886.1
EZLA	Bacilar	-	<i>Sinorhizobium sp.</i>	83%	98.84%	gi 570554463 KF735789.1
EZLM	Bacilar	-	<i>Ensifer adhaerens</i>	83%	99.07%	gi 1206483142 KY753211.1
EZR2	Bacilar	-	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	68%	99.76%	gi 1540565266 MK326562.1
EZR3	Bacilar	-	<i>Sinorhizobium sp.</i>	70%	99.06%	gi 570554463 KF735789.1
EZR4	Bacilar	-	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	75%	99.06%	gi 1375384437 MF077152.1

Se observó que las bacterias del género *Bacillus sp.*, *Azospirillum sp.*, *Brevibacterium sp.* y *Sinorhizobium sp.* son cepas reportadas en la base de datos como BPCV. Muchas especies de *Bacillus* y formas relacionadas son posibles agentes de control biológico contra varios microbios patógenos de plantas. Su capacidad de formación de esporas los convierte en un candidato ideal para desarrollar productos biopesticidas eficientes desde el punto de vista tecnológico (Kumar, et al., 2011). (Rodríguez, et al., 2004) reportan la producción de ácido glucónico y la reducción del pH para por *A. lipoferum*. Al igual que detectaron halos de limpieza en placas de medio sólido con fosfato de calcio. Este es el primer informe de producción de ácido glucónico *in vitro* y solubilización directa de fosfato por *A. lipoferum*. Esto se suma al amplio espectro de habilidades de promoción de crecimiento de plantas de este género. Las características que promueven el crecimiento de las plantas de la cepa *Brevibacterium casei* y su capacidad para mejorar la absorción de metal por la mostaza blanca y su supervivencia a largo plazo en el suelo, así como su impacto temporal en los microorganismos autóctonos hacen que la cepa sea un candidato adecuado para la promoción del crecimiento de las plantas y la eficiencia de la fitoextracción (Płociniczak, et al., 2016).

La *Agrobacterium sp.* es un patógeno reconocido de plantas y tiene la capacidad de integrar establemente parte de su material genético dentro del genoma de su hospedero, ocasionando a la planta tumores lo que ha permitido que sea utilizada como una herramienta en la ingeniería genética de plantas (Tzfira y Citovsky, 2000).

Algunas de estas especies estimulan directamente el crecimiento de las plantas, ya sea mediante la mejora en la adquisición de nutrientes o mediante la estimulación de los mecanismos de defensa de la planta huésped antes de la infección; otras especies pueden inhibir o suprimir las poblaciones de microorganismos patógenos y/o plagas.

Según lo reportado por (Płociniczak, et al., 2016), las *Brevibacterium casei* exhibió la capacidad de producir amoníaco, 1-amino-ciclopropano-1-ácido carboxílico desaminasa, ácido indol 3-acético y HCN, pero no pudo solubilizar fosfato inorgánico y producir sideróforos. La introducción de *Brevibacterium casei* en el suelo aumentó significativamente la biomasa de *S. alba* y la acumulación de Cd (208%), Zn (86%) y Cu (39%) en los brotes de las plantas en comparación con los cultivados en suelos no inoculados. Introducida en el suelo, *Brevibacterium casei* pudo ingresar a la planta y se encontró en las raíces y hojas de las plantas inoculadas, lo que indica sus características endofíticas.

Cuadro 14.- Características morfológicas de bacterias aisladas de suelo salino.

Cepa	Morfología	Gram	Color	Forma	Consistencia	Nombre del organismo	Cepa	Morfología	Gram	Color	Forma	Consistencia	Nombre del organismo
EZ10	Bacilos	+	Beige	Irregular	Viscosa	<i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i>	EZ30	Bacilos	+	Beige	Irregular	Rugosa	<i>Brevibacterium sp.</i>
EZ11	Bacilos	+	Beige	Irregular	Viscosa	<i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i>	EZ31	Bacilos	+	Beige	Rizoide	Viscosa	<i>Bacillaceae bacterium</i>
EZ12	Bacilos	+	Beige	Rizoide	Viscosa	<i>Brevibacterium sp.</i>	EZ32	Bacilos	+	Beige	Circular	Viscosa	<i>Brevibacterium sp.</i>
EZ13	Bacilos	+	Beige	Irregular	Viscosa	<i>Brevibacterium sp.</i>	EZ33	Bacilos	+	Beige	Circular	Rugosa	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
EZ14	Bacilos	+	Beige	Irregular	Creмосa	<i>Bacillus tequilensis</i>	EZ34	Bacilos	+	Beige	Irregular	Rugosa	<i>Bacillus sp.</i>
EZ15	Bacilos	+	Beige	Rizoide	Rugosa	<i>Bacillus sp.</i>	EZ35	Bacilos	+	Beige	Circular	Creмосa	<i>Bacillus megaterium</i>
EZ16	Bacilos	+	Beige	Irregular	Creмосa	<i>Bacillus subtilis</i>	EZ36	Bacilos	-	Beige	Rizoide	Rugosa	<i>Agrobacterium sp.</i>
EZ17	Bacilos	+	Beige	Irregular	Rugosa	<i>Bacillus subtilis</i>	EZ37	Bacilos	+	Beige	Rizoide	Rugosa	<i>Bacillus velezensis</i>
EZ18	Bacilos	+	Beige	Rizoide	Rugosa	<i>Brevibacterium sp.</i>	EZ38	Bacilos	+	Beige	Rizoide	Rugosa	No válida
EZ19	Bacilos	-	Beige	Rizoide	Rugosa	<i>Azospirillum lipoferum</i>	EZ39	Cocos	-	Amarilla	Circular	Creмосa	No válida
EZ20	Bacilos	+	Beige	Irregular	Rugosa	<i>Bacillus subtilis</i>	EZ40	Bacilos	+	Beige	Irregular	Rugosa	<i>Bacillus subtilis</i>
EZ21	Bacilos	-	Beige	Irregular	Rugosa	No válida	EZ41	Bacilos	+	Beige	Circular	Creмосa	<i>Bacillus megaterium</i>
EZ22	Bacilos	+	Beige	Rizoide	Rugosa	<i>Brevibacterium sp.</i>	EZ42	Bacilos	+	Beige	Irregular	Viscosa	<i>Bacillus subtilis</i>
EZ23	Bacilos	+	Beige	Irregular	Creмосa	<i>Bacillus sp.</i>	EZ43	Bacilos	+	Beige	Irregular	Viscosa	No válida
EZ24	Bacilos	+	Beige	Circular	Viscosa	<i>Bacillus sp.</i>	EZ44	Bacilos	+	Beige	Irregular	Viscosa	<i>Bacillus licheniformis</i>
EZ25	Bacilos	+	Beige	Irregular	Viscosa	<i>Bacillus sp.</i>	EZ45	Bacilos	+	Beige	Circular	Creмосa	<i>Bacillus sp.</i>
EZ26	Bacilos	+	Beige	Circular	Rugosa	<i>Bacillus sp.</i>	EZ46	Bacilos	+	Beige	Circular	Rugosa	<i>Bacillus sp.</i>
EZ27	Bacilos	+	Beige	Irregular	Viscosa	<i>Bacillus sp.</i>	EZ47	Bacilos	+	Beige	Circular	Viscosa	<i>Bacillus sp.</i>
EZ28	Bacilos	+	Beige	Irregular	Viscosa	<i>Bacillus sp.</i>	EZ48	Bacilos	-	Beige	Irregular	Viscosa	No se secuenciaron
EZ29	Bacilos	+	Beige	Irregular	Rugosa	<i>Bacillus sp.</i>	EZ49	Bacilos	-	Beige	Irregular	Viscosa	No se secuenciaron

Cuadro 15.- Características morfológicas de bacterias aisladas de nódulos de raíz de alfalfa.

Cepa	Morfología	Gram	Color	Forma	Consistencia	Nombre del organismo
EZRB	Bacilos	-	Beige	Irregular	Creмосa	No se secuenciaron
EZR1	Bacilos	-	Traslúcida	Irregular	Viscosa	No se secuenciaron
EZR2	Bacilos	-	Traslúcida	Circular	Viscosa	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
EZR3	Bacilos	-	Traslúcida	Circular	Viscosa	<i>Sinorhizobium sp.</i>
EZR4	Bacilos	-	Traslúcida	Circular	Viscosa	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
EZR5	Bacilos	-	Traslúcida	Circular	Viscosa	No se secuenciaron
RZLA	Bacilos	-	Semitraslúcida	Irregular	Creмосa	<i>Sinorhizobium sp.</i>
RZLM	Bacilos	-	Semitraslúcida	Irregular	Creмосa	<i>Ensifer adhaerens</i>

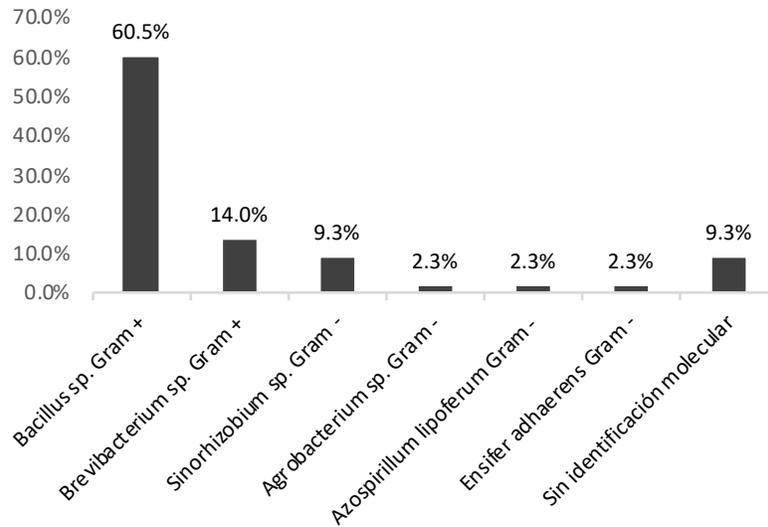


Figura 21.- Porcentaje de morfología de microorganismos aislados de suelo salino mediante tinción de Gram.

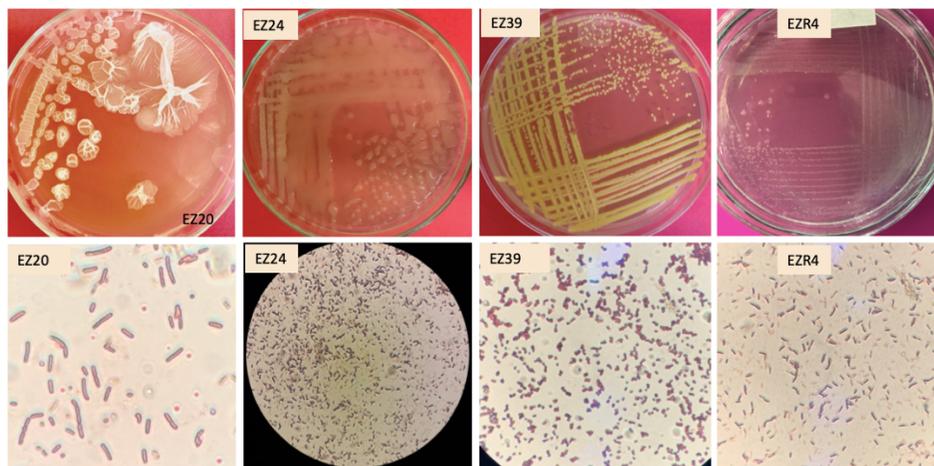


Figura 22.- Ejemplo de morfología macroscópica y microscópica (tinción de Gram) de bacterias aisladas de suelo salino y raíz. EZ20 y EZ24 son *Bacillus subtilis* Gram (+), EZ39 Cocos Gram (-) (No secuenciada) bacterias que crecieron en medio LB. EZR4 es Sinorhizobi.

Se identificaron microscópicamente por tinción de Gram 11 cepas de bacilos Gram (-), 35 cepas de bacilos Gram (+) y dos cepa de cocos Gram (-).

Los suelos que presentan mayor contenido de cloruro de sodio, son un hábitat propicio para lograr el aislamiento de microorganismos halófilos moderados. La morfología bacteriana más común para los halófilos encontrados correspondió a bacilos y cocos, las cuales han sido reportadas anteriormente por diversos autores para halófilos. Finalmente, las características metabólicas de las cepas evaluadas fueron similares a las reportadas para halófilas moderadas del género *Halomonas*, el cual es empleado en la degradación de materiales derivados de almidón, por lo que las cepas aisladas en el presente estudio podrían ser usadas con fines de biorremediación (Castro Piña, et al., 2011).

### Tolerancia de las cepas a las concentraciones de NaCl.

Siguiendo con la caracterización de los microorganismos del suelo, los resultados obtenidos en la tolerancia a las concentraciones de NaCl, obtuvo que todos los aislados crecieron de manera óptima en el medio Lb (Luria-Bertani) adicionado con 5% de NaCl (0.85 M), es decir el 100%, el 75% creció en una concentración de 10% de NaCl (1.7 M) y de acuerdo con la clasificación de Donn Kushner entran en la categoría de halófilos moderados. Solo el 10% creció en una concentración 15% de NaCl (2.56 M) por lo que se consideran microorganismos halotolerantes, es decir no muestran un requerimiento absoluto de sal para su crecimiento pero crecen bien hasta concentraciones de sal a menudo muy altas (considerados extremadamente halotolerantes si el rango de crecimiento se extiende por encima de 2.5 M de NaCl (15% (p/v))).

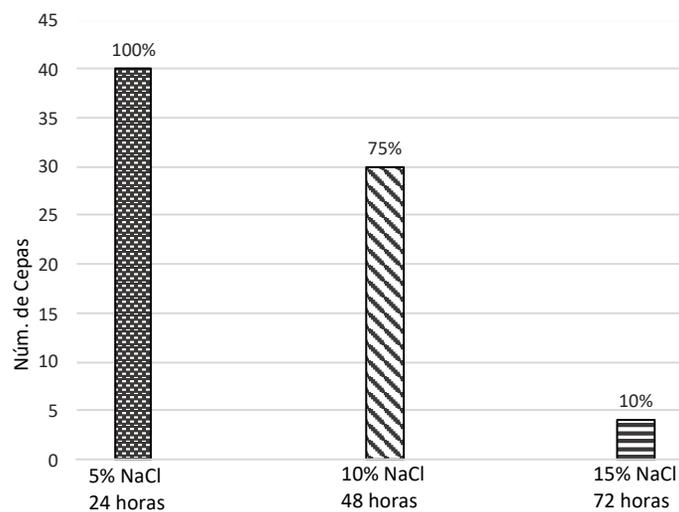


Figura 23.- Aislados que crecieron en concentraciones de 0.85, 1.7 y 2.56 M de NaCl. Porcentaje de aislados que crecieron de manera óptima 100, 75 y 10% respectivamente.

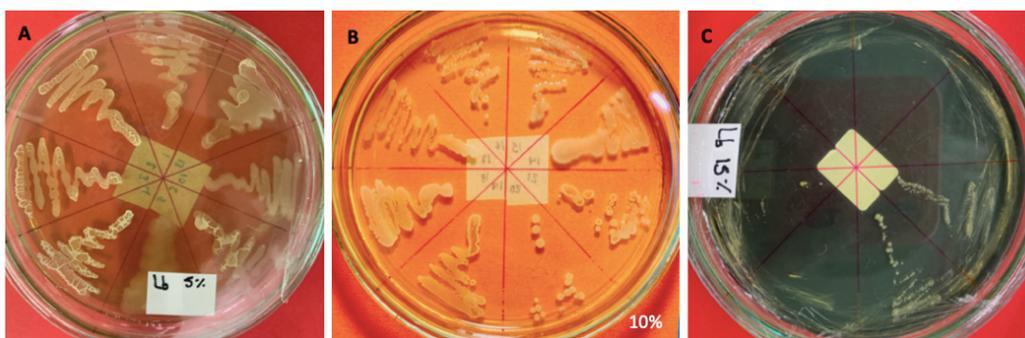


Figura 24.- Ejemplo de aislados que crecieron A. 5% 24 horas, B. 10% 48 horas y C. 15% (p/v) de NaCl a 72 horas posteriores a la siembra.

Los aislados incubados con las concentraciones de 0.85 M (5%), 1.7 M (10%) y 2.56 M (15%) de NaCl se monitorearon constantemente haciendo anotaciones a las 24, 48 y 72 horas, de acuerdo con las observaciones realizadas a las placas se clasificaron por su grado de crecimiento (tolerancia) como débil (+), moderado (++) y fuerte (+++), Ver cuadro 16.

Cuadro 16.- Grado de crecimiento de las bacterias incubadas con las concentraciones de 0.85 M, 1.7 M y 2.56 M de NaCl a las 24, 48 y 72 horas.

Cepas	Nombre del organismo	5%	10%	15%	Cepas	Nombre del organismo	5%	10%	15%
		24	48	72			24	48	72
EZ10	<i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i>	+++	+++		EZ30	<i>Brevibacterium sp.</i>	+++	+++	++
EZ11	<i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i>	+++	+++		EZ31	<i>Bacillaceae bacterium</i>	+++	+++	+
EZ12	<i>Brevibacterium sp.</i>	+++	+++		EZ32	<i>Brevibacterium sp.</i>	+++		
EZ13	<i>Brevibacterium sp.</i>	+++	+++		EZ33	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	+++	+++	
EZ14	<i>Bacillus tequilensis</i>	+++	+++		EZ34	<i>Bacillus sp.</i>	+++	+++	
EZ15	<i>Bacillus sp.</i>	+++	+		EZ35	<i>Bacillus megaterium</i>	+++		
EZ16	<i>Bacillus subtilis</i>	+++	+++		EZ36	<i>Agrobacterium sp.</i>	+++		
EZ17	<i>Bacillus subtilis</i>	+++	++		EZ37	<i>Bacillus velezensis</i>	+++	+++	
EZ18	<i>Brevibacterium sp.</i>	+++	+++		EZ38	No válida	+++		
EZ19	<i>Azospirillum lipoferum</i>	+++	+++		EZ39	No válida	+++		
EZ20	<i>Bacillus subtilis</i>	+++	+++		EZ40	<i>Bacillus subtilis</i>	+++		
EZ21	No válida	+++	+++		EZ41	<i>Bacillus megaterium</i>	+++		
EZ22	<i>Brevibacterium sp.</i>	+++	+++		EZ42	<i>Bacillus subtilis</i>	+++	+++	
EZ23	<i>Bacillus sp.</i>	+++	+++		EZ43	No válida	+++	+++	
EZ24	<i>Bacillus sp.</i>	+++	++		EZ44	<i>Bacillus licheniformis</i>	+++	+++	
EZ25	<i>Bacillus sp.</i>	+++	+++	+	EZ45	<i>Bacillus sp.</i>	+		
EZ26	<i>Bacillus sp.</i>	+++	+++		EZ46	<i>Bacillus sp.</i>	+++	+++	
EZ27	<i>Bacillus sp.</i>	+++	+++		EZ47	<i>Bacillus sp.</i>	+++	+++	
EZ28	<i>Bacillus sp.</i>	+++	+++		EZ48	No se secuenciaron	+++		
EZ29	<i>Bacillus sp.</i>	+++	+++	++	EZ49	No se secuenciaron	+++		

Dónde: Fuerte (+++); Moderado (++); Débil (+)

Las cepas bacterianas halotolerantes seleccionadas se identificaron mediante análisis de secuenciación del gen 16S rRNA. Las secuencias de nucleótidos recuperadas de estas cepas bacterianas se sometieron a homología en la base de datos NCBI, mostrando que las 34 cepas bacterianas halotolerantes representativas pertenecen a seis géneros diferentes *Bacillus sp.*, *Azospirillum sp.*, *Brevibacterium sp.* y *Sinorhizobium sp.*, *Ensifer adhaerens* y *Agrobacterium sp.*

Si bien el 75 % de las cepas crecieron libremente en concentraciones 1.7 M de NaCl, las bacterias *Bacillaceae bacterium* EZ31, *Brevibacterium sp.* EZ32, *Bacillus megaterium* EZ35, *Agrobacterium sp.* EZ36, EZ38, EZ39 (no identificadas), *Bacillus subtilis* EZ40, *Bacillus megaterium* EZ41, *Bacillus sp.* EZ45, EZ48 y EZ49 (no identificadas), no crecieron en esta concentración, pero si lo hicieron en concentraciones inferiores. Las cepas que tuvieron un crecimiento catalogado como fuerte (+++) en esta concentración de 1.7 M y las cepas que presentaron un crecimiento débil y moderado en la concentración de 2.56 M NaCl podrían lograr crecer libremente hasta concentraciones de 2 M de NaCl. Para lograr un crecimiento

y desarrollo óptimo de los microorganismos sería conveniente trabajar en suelos con concentraciones menores o hasta de 2 M de NaCl.

El crecimiento de *Bacillus subtilis* en la concentración de 1.7 M de NaCl en el presente estudio concuerda con lo reportados por (Ashibil & Burhan , 2008) *Bacillus sp.* fue Gram positivo, en forma de varilla, móvil, catalasa positiva, formadora de esporas y aeróbico. Sobre la base de diversas características morfológicas y bioquímicas, se identificó como *Bacillus sp.* El crecimiento observado entre pH 6 y 12 en presencia de NaCl varió de 3 a 15%, temperaturas de 45 °C. La síntesis enzimática óptima se produjo a 37 °C y pH 9 en agar CMC.

Las cepas bacterianas aisladas de suelo salino pueden sobrevivir a concentraciones de sal como el 14% de NaCl, lo que indica que estas cepas son bacterias moderadamente halófilas. El crecimiento de estas cepas a una concentración de NaCl del 14% sugiere que el cloruro de sodio influye en sus actividades metabólicas (Delgado-García, y otros, 2013).

### Actividades enzimáticas de los aislados.

De las muestras tomadas de suelo salino se seleccionaron 40 cepas que fueron evaluadas en sus actividades enzimáticas, se observó que todas produjeron algún tipo de enzima. El 93 % de las cepas expresaron celulasas, 68 % amilasas, 60 % lipasas, 33 % proteasas, 15 % fosfatasa y 5 % quitinasas (Figura 25). El 30 % de las cepas presentaron 4 de las actividades, estos resultados son relevantes desde el punto de vista industrial y agronómico porque son enzimas que podrían ser utilizadas en procesos de carácter agrobiotecnológicos.

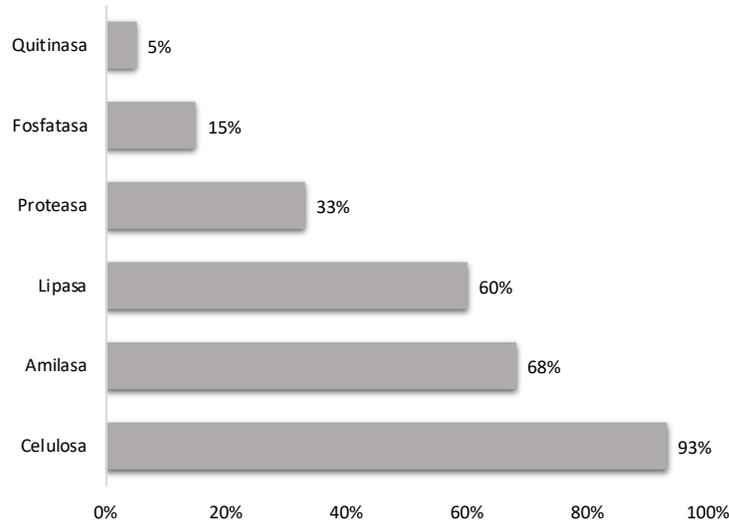


Figura 25.- Actividad enzimática extracelular.

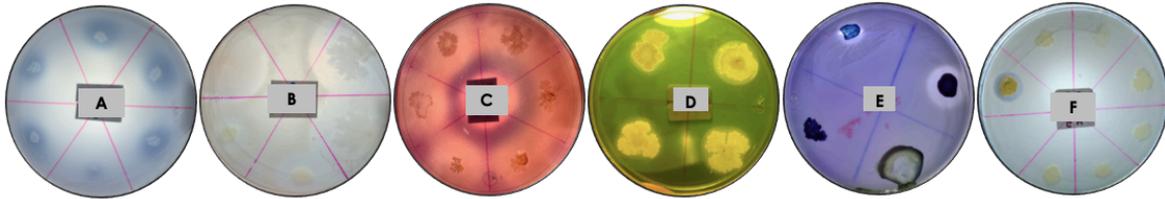


Figura 26.- Actividad enzimática extracelular de cepas aisladas de suelo salino. A) Amilasa en agar almidón, B) Proteasa en agar caseína, C) Celulasa en agar carboximetilcelulosa, D) Lipasa en agar Tween 80, E) Fosfatasa en agar Pikovskaya y F) Quitinasa en agar.

En el predio El Llano, en el municipio de Zacoalco de Torres se encontró que los microorganismos con mayor actividad enzimáticas extracelulares fueron producidas por las enzimas de celulasa, amilasa y lipasa, seguido de la proteasa, fosfatasa y quitinasa.

En la última década, los microorganismos se han utilizado como una de las principales fuentes de enzimas del suelo, sus actividades enzimáticas desempeñan un papel muy importante por su relación con la evolución y los procesos degradativos de materia orgánica, con los ciclos de elementos como nitrógeno, fósforo, carbono, azufre; así como el metabolismo intracelular, pudiendo ser considerados como catalizadores que generan información importante para la comprensión del ecosistema del suelo (Avellaneda-Torres, et al., 2012). En los procesos industriales han ganado considerable atención ya están sustituyendo a los catalizadores químicos en diversos productos alimenticios, farmacéuticos, textiles, entre otros.

La celulasa es una enzima extracelular producida por algunos microorganismos, que poseen acción catalítica de forma específica para estos sustratos (Hattori, 1998). El producto de la degradación de la celulosa es la glucosa, que es una importante fuente de carbono para el metabolismo celular de los microorganismos. La degradación enzimática de la celulosa nativa requiere la acción sinérgica de tres tipos de enzimas celulolíticas, clasificadas como: endoglucanasas, celobiosa hidrolasas y beta glucosidasas. El alto grado de sinergia entre las celulasas diferentes pero complementarias aumenta el grado de hidrólisis de forma muy superior a la acción de las enzimas por separado (Szijártó, et al., 2004).

La quitina es una enzima capaz de hidrolizar quitina en sus componentes oligo y monoméricos. Los quito-oligosacáridos, el dímero acetilquitobiosa y los monómeros de N-acetilglucosamina son de gran interés para la industria debido a su amplio rango de aplicaciones médicas, agrícolas e industriales (Castro, et al., 2011). La quitina es el polímero mas abundante en la naturaleza, después de la celulosa.

Las bacterias recurren a la secreción de enzimas quitinolíticas con diferente especificidad para trasformarla o hidrolizarla como única fuente de carbono y nitrógeno.

Los quito-oligosacáridos producidos por hidrólisis enzimática de quitina han estimulado recientemente la investigación debido a su amplio rango de aplicaciones y propiedades médicas, agrícolas e industriales. El interés comercial en la utilización de quitina y sus derivados ha llevado a la necesidad de buscar fuentes estables, seguras y baratas de

enzimas quitinolíticas aisladas de organismos, como alternativa a los métodos químicos. Es una enzima potencialmente defensiva contra patógenos quitinosos.

Las lipasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces éster presentes en los acilgliceroles in vivo. Además, pueden catalizar la hidrólisis o síntesis de un grupo amplio de ésteres carboxílicos (Bornscheuer, et al., 1994). Estas enzimas están ampliamente distribuidas en la naturaleza, y se encuentran en microorganismos, plantas y animales. Una característica peculiar de las lipasas es que son enzimas solubles en agua que actúan sobre sustratos insolubles y agregados, por lo que operan unidas a interfaces lípido-agua (González-Bacerio, et al., 2010).

Es notable el impacto que han tenido las lipasas en la producción de fármacos más selectivos y efectivos, con efectos secundarios menores, y en la obtención de pesticidas de menor toxicidad, todo ello mediante la síntesis de compuestos ópticamente puros y la resolución de mezclas racémicas.

*B. subtilis* es una bacteria Gram positiva comúnmente encontrada en el suelo, para la cual se ha mencionado que confiere resistencia a las plantas frente a estrés biótico y abiótico (Das & Mukherjee, 2007). Así mismo, para especies del género *Bacillus* se ha encontrado actividad de promotora del crecimiento vegetal (principalmente mediante solubilización de fosfatos) y de biodegradación de xenobióticos en suelos (Rodríguez & Fraga, 1999) (Rodríguez y Fraga, 1999).

La mayor actividad enzimática reportada para *Bacillus sp.* se observó a una concentración de NaCl al 20% en un 132% y la enzima retuvo el 75 y el 70% de su actividad original durante 1 y 6 h, respectivamente. La enzima era termoestable, altamente alcalina, halófila, adecuada para su aplicación en industrias como la producción de bebidas, textiles y etanol a partir de material celulósico (Ashibil y Burhan, 2008).

De acuerdo con las observaciones de los ensayos en placa, las bacterias se clasificaron por su grado de producción como débil (+), productor moderado (++) y productor fuerte (+++) tomando en cuenta el diámetro del halo alrededor de la colonia. En el cuadro 18 se muestran las bacterias que tuvieron mayor productividad en una o varias actividades enzimáticas.

Cuadro 17.- Análisis cualitativo de actividad enzimática extracelular en bacterias aisladas de suelo salino.

CLAVE	Cepa	Nombre del organismo	Antagónicas						Fosfatasa
			contra <i>F. Oxysporum</i>	Celulolíticas	Amilolíticas	Lipolíticas	Proteolítica	Quitinolítica	
EZ1	EZ10	<i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i>	+++	+++	++	++			
EZ16	EZ20	<i>Bacillus subtilis</i>	+++	+++	+++		++		
EZ17	EZ21	No identificada	+++	+++	+++	+++	++		
EZ19	EZ23	<i>Bacillus sp.</i>	+++	+++		+++	++	++	
EZ20	EZ24	<i>Bacillus subtilis</i>	+++	+++		+++	++	++	
EZ23	EZ27	<i>Bacillus subtilis</i>	+++	+++	+++		++		
EZ24	EZ28	<i>Bacillus subtilis</i>	+++	+++	+++	+++	++		
EZ27	EZ31	<i>Bacillaceae bacterium</i>	+++	+++	+++	+++			++
EZN	EZ42	<i>Bacillus subtilis</i>	+++	+++	++	++			++
EZU	EZ44	<i>Bacillus licheniformis</i>	+++	+++	+++		++		++
EZP	EZ45	<i>Bacillus sp.</i>	+		+++	+++			++
EZX	EZ46	<i>Bacillus sp.</i>	+++	+++	+++	+++			++
EZR	EZ47	<i>Bacillus sp.</i>	+	+++	++	+++	++		

Dónde + (0.5 - 1 cm), ++ (1.1 - 1.5 cm) y +++ (1.6 - 3-5 cm)

### Actividad antagónica contra *Fusarium oxysporum*.

La actividad antagónica de las cepas aisladas de suelo salino del predio El Llano en el municipio de Zacoalco de Torres ante el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* que afecta el cultivo de la alfalfa, se obtuvo que 31 de las 40 cepas confrontadas demostraron un efecto antagónico hacia el patógeno. Se observaron diferentes niveles en los porcentajes de inhibición (ver cuadro 18).

Cuadro 18.- Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del patógeno.

Cepas	Nombre del organismo	Radio del patógeno vs bacteria	Radio del patógeno o testigo	Inhibición de crecimiento micelial (%)	Cepas	Nombre del organismo	Radio del patógeno vs bacteria	Radio del patógeno o testigo	Inhibición de crecimiento micelial (%)	Inhibición de crecimiento micelial (%)
EZ10	<i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i>	2	3.5	43%	EZ30	<i>Brevibacterium sp.</i>	2.6	3.5	26	26%
EZ11	<i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i>	2.5	3.5	29%	EZ31	<i>Bacillaceae bacterium</i>	2	3.5	43	43%
EZ12	<i>Brevibacterium sp.</i>	2.2	3.5	37%	EZ32	<i>Brevibacterium sp.</i>	2.3	3.5	34	34%
EZ13	<i>Brevibacterium sp.</i>	2.2	3.5	37%	EZ33	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	2	3.5	43	43%
EZ14	<i>Bacillus tequilensis</i>	3	3.5	14%	EZ34	<i>Bacillus sp.</i>	1.7	3.5	51	51%
EZ15	<i>Bacillus sp.</i>	2.2	3.5	37%	EZ35	<i>Bacillus megaterium</i>	3	3.5	14	14%
EZ16	<i>Bacillus subtilis</i>	3	3.5	14%	EZ36	<i>Agrobacterium sp.</i>	1.9	3.5	46	46%
EZ17	<i>Bacillus subtilis</i>	3	3.5	14%	EZ37	<i>Bacillus velezensis</i>	2	3.5	43	43%
EZ18	<i>Brevibacterium sp.</i>	2	3.5	43%	EZ38	No válida	1.9	3.5	46	46%
EZ19	<i>Azospirillum lipoferum</i>	3.5	3.5	0	EZ39	No válida	3.5	3.5	0	0
EZ20	<i>Bacillus subtilis</i>	1.5	3.5	57%	EZ40	<i>Bacillus subtilis</i>	2.5	3.5	29	29%
EZ21	No válida	2.2	3.5	57%	EZ41	<i>Bacillus megaterium</i>	2.7	3.5	23	23%
EZ22	<i>Brevibacterium sp.</i>	1.9	3.5	46%	EZ42	<i>Bacillus subtilis</i>	2	3.5	43	43%
EZ23	<i>Bacillus sp.</i>	1.5	3.5	57%	EZ43	No válida	1.9	3.5	46	46%
EZ24	<i>Bacillus sp.</i>	2	3.5	43%	EZ44	<i>Bacillus licheniformis</i>	2	3.5	43	43%
EZ25	<i>Bacillus sp.</i>	2.2	3.5	37%	EZ45	<i>Bacillus sp.</i>	3	3.5	14	14%
EZ26	<i>Bacillus sp.</i>	2.5	3.5	29%	EZ46	<i>Bacillus sp.</i>	2	3.5	43	43%
EZ27	<i>Bacillus sp.</i>	2	3.5	43%	EZ47	<i>Bacillus sp.</i>	3	3.5	14	14%
EZ28	<i>Bacillus sp.</i>	1.9	3.5	46%	EZ48	No se secuenciaron	3.5	3.5	0	0
EZ29	<i>Bacillus sp.</i>	2	3.5	43%	EZ49	No se secuenciaron	1.8	3.5	49	49%

Las cepas con mayor porcentaje de inhibición del micelio del patógeno *Fusarium oxysporum* fueron *Bacillus subtilis* EZ20, EZ21 (no identificada) y *Bacillus sp.* EZ23 con un 57% cada una (Cuadro 17). Las cepas que no presentaron inhibición y que fueron cubiertas por el patógeno son *Azospirillum lipoferum* EZ19, EZ39 (no identificada) y EZ48 (no identificada).

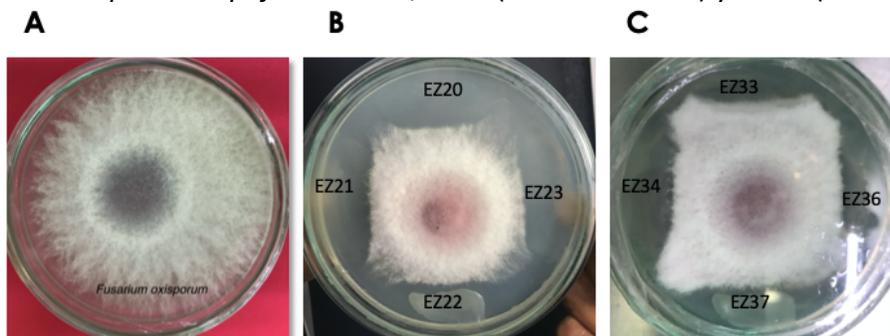


Figura 27.- Evaluación de la actividad antagonista. A: Control, B y C cepas con el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *F. oxysporum*.

Coincidiendo con lo reportado por otros autores el *Bacillus subtilis* fue la especie que demostró mayor capacidad antagonista (79.73 % PICR) y las características más destacadas de esta cepa fueron su velocidad de crecimiento (Castañeda Alvarez y Sánchez, 2016). El género *Bacillus* es uno de los más reportados para en el control biológico de hongos como *Fusarium sp.* el cual ataca un gran número de cultivos de interés económico para el sector agrícola.

### Cuantificación de la producción de ácido indolacético (AIA).

La auxina, el ácido indol-3-acético (AIA), es una fitohormona importante producida por varias cepas de BPCV y es bien sabido que el tratamiento de las rizobacterias productoras de AIA aumenta el crecimiento de las plantas (Amara, Khalid, & Hayat, 2015).

La planta bajo el tratamiento de AIA tiene raíces altamente desarrolladas, lo que a su vez le permite absorber mejor los nutrientes ayudando al crecimiento general de la planta. Las auxinas también están implicadas en la regulación de la dormancia y la germinación de ñas semillas. Alrededor del 80% de la flora bacteriana en la rizósfera produce AIA (Salisbury, 1994).

Para la cuantificación de la producción de ácido indolacético, se realizó una curva de calibración empleando un rango de 1 a 50 µg mL de AIA (Figura 28). Para esta prueba se utilizaron las bacterias aisladas de los nódulos de la raíz de alfalfa, en los resultados se comprobó que las de mayor producción de ácido indolacético fueron las aisladas de los nódulos de la raíz de la alfalfa. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 18.

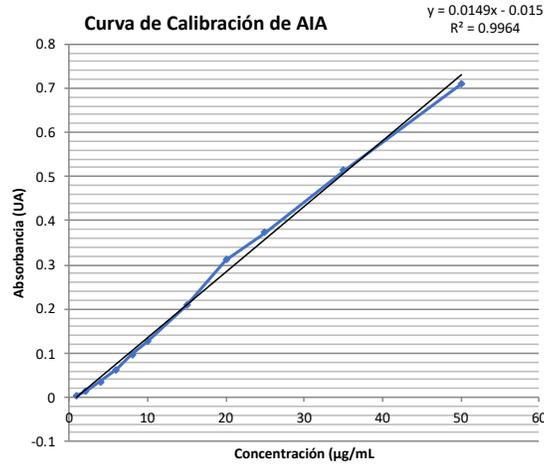


Figura 28.- Curva de calibración de ácido indolacético (AIA).

Cuadro 19.- Promedio de producción de AIA µg mL.

Cepa	Gram	Nombre del organismo	Promedio µg/mL
EZR1	-	No secuenciada	38.2
EZR2	-	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	91.4
EZR3	-	<i>Sinorhizobium sp.</i>	63.7
EZR4	-	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	66.2
EZR5	-	No secuenciada	72.3
EZRB		No secuenciada	38.2
RZLA	-	<i>Sinorhizobium sp.</i>	7.5
RZLM	-	<i>Ensifer adhaerens</i>	38.4

Las cantidades obtenidas de la producción de AIA de las rizobium aisladas de los nódulos de alfalfa son mayores a lo reportado por (Soler *et al.*, 2012) con 75.5 µg / ml, además se observó que todas las bacterias aisladas de los nódulos son Gram negativo, esto de acuerdo con lo reportado por (Datta y Basu, 2000) quien también aisló *Rhizobium sp.* de los nódulos de la raíz de un arbusto leguminoso *Cajanus cajan*, y encontró que producía grandes cantidades (99.7 µg / ml) de ácido indol acético (AIA) durante el crecimiento en medio basal suplementado con L-triptófano. Lo antes citado es similar con lo obtenido con la *Sinorhizobium meliloti* que tuvo una producción de 91.4 µg / ml. Se ha reportado que la producción de AIA por diversos organismos puede variar entre diferentes especies; las condiciones ambientales, el tipo de cultivo y sus etapas de crecimiento, así como la

disponibilidad de sustratos también influyen en su producción (Mutluru y Veera Mallaiiah, 2007).

El uso de bacterias del género *Azospirillum* que producen auxinas, principalmente ácido indolacético, que incrementa el tamaño de la raíz. Igual existen bacterias del género *Bacillus* que promueven el crecimiento de las plantas a través de la liberación de compuestos volátiles (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

Aunque son también de gran interés, la producción de giberelinas por los PGPR es rara, habiendo solo dos especies documentadas que las han producido como son *Bacillus pumilus* y *Bacillus licheniformis* (Gutierrez-Mañero, et al., 2011).

### Efectividad biológica in vitro con alfalfa.

En la prueba de efectividad biológica realizada en el cultivo de alfalfa *in vitro*, en medio de cultivo MS a la quinta parte, se realizó la inoculación con cepas de bacterias aisladas de nódulos de raíz de alfalfa, a las cuales se les cuantificó la producción de AIA, hormona vegetal que pertenece al grupo de las auxinas, y que participa en el desarrollo de raíces en las plantas, por lo que los microorganismos que producen estos compuestos promueven el crecimiento vegetal (Datta y Basu, 2000). Los resultados obtenidos fueron 80% de germinación de las semillas durante de cinco a ocho días, apareciendo los cotiledones, después de la inoculación con la bacteria aislada de los nódulos de la raíz de alfalfa, apareció la primera hoja simple, después las hojas trifoliadas y se obtuvo un crecimiento abundante de raíz en comparación con los controles. La raíz de las plantas inoculadas presentaron una longitud de más de 6 cm en promedio (ver figura 29 y cuadro 20).

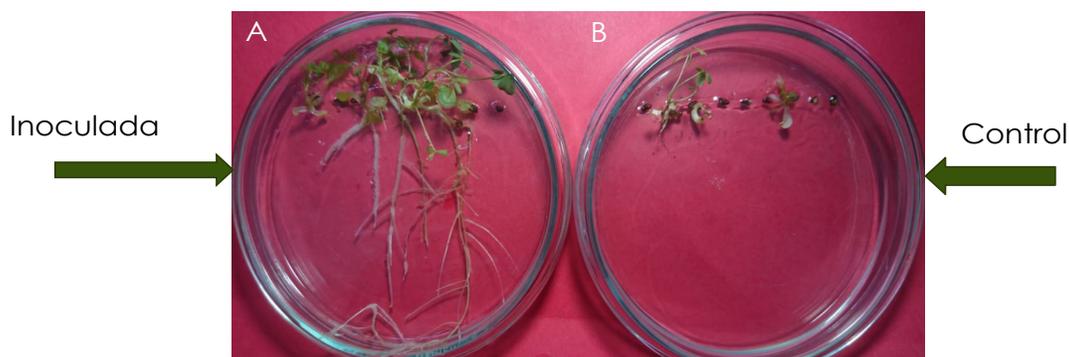


Figura 29.- A) Semillas de alfalfa inoculadas con bacterias aisladas de nódulos de raíz de alfalfa, 12 días posteriores a la inoculación con la rizobio *Sinorhizobium meliloti*, B) control.

Cuadro 20.- Crecimiento vegetal de alfalfa inoculada con bacterias aisladas de nódulos de raíz de alfalfa.

Nombre del organismo	Porcentaje de germinación de semillas	Promedio de longitud de raíz
<i>Sinorhizobium sp.</i>	86	5.4
Control	85	4.3
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	86	5.7
Control	80	4.0
<i>Sinorhizobium sp.</i>	90	6.3
Control	79	3.6
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	82	6.5
Control	70	4.5
<i>Ensifer adhaerens</i>	73	6.5
Control	70	4.0

Las cepas con mayor producción de AIA, fueron las utilizadas para la inoculación de las semillas en el cultivo *in vitro* de la alfalfa, a los 12 días posteriores a la inoculación no hay una diferencia importante en la longitud de la raíz de las cajas que fueron inoculadas con la rizobio *Sinorhizobium meliloti* que tuvo un 91.4 µg/mL de AIA frente a las otras que tuvieron cantidades menores de producción de AIA, los promedios obtenidos son muy parecidos a los de la *Sinorhizobium meliloti*. Las cajas control si muestran una mínima diferencia en el porcentaje de germinación y una diferencia en el promedio de la longitud de la raíz respecto a las que fueron inoculadas con los rizobio.

Al evaluar el efecto de la inoculación con cepas de *Rhizobium leguminosarum* sobre el desarrollo y rendimiento de leguminosas se concluye que el uso de inoculantes con cepas altamente efectivas ha demostrado tener un gran potencial para mejorar el rendimiento, a un menor costo de producción al reducir la cantidad de fertilizante utilizado (Acuña y Uribe, 1996).

#### **Concentración de amonio.**

En el presente trabajo se utilizó el reactivo de Neesler, para la cuantificación del amonio en el cultivo de bacterias aisladas de suelo salino. El reactivo produce una coloración gradual de amarillo a pardo, a medida que aumenta la concentración amoniacal. El color amarillo indica bajas concentraciones de amoníaco (0.4 a 5 ppm). El color pardo rojizo es típico de concentraciones de aproximadamente 10 ppm de amoníaco. Para la concentración de amoníaco, se realizó una curva de calibración empleando un rango de 1 a 25 µg/mL de cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl) y se reveló con el reactivo de Neesler (Figura 30). Posterior a la calibración se midió la concentración de amonio de las bacterias aisladas del suelo salino, (ver cuadro 20).

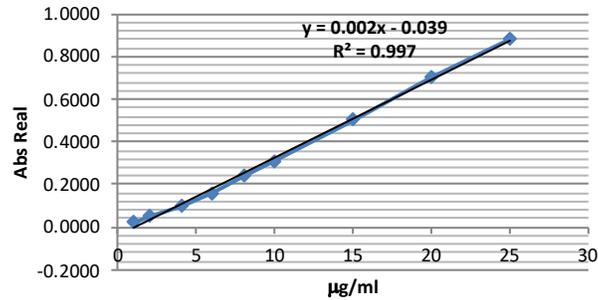


Figura 30.- Curva de calibración del reactivo de Neesler.

En la cuantificación de la producción de amoníaco por las bacterias aisladas de suelo salino, de las 40 bacterias 19 tuvieron una producción promedio igual o mayor a uno mg/mL, la bacteria con mayor producción fue la EZ24 que corresponde a *Bacillus subtilis* con 2.49 mg/mL y la de menor producción fue EZ41 que corresponde a *Bacillus megaterium* con 0.05 mg/mL, la bacteria control que pertenece al grupo de bacterias desnitrificantes la *Pseudomona* spp sobresalió con un promedio de 7.92 mg/mL (ver cuadro 21).

Cuadro 21.- Promedio de concentración de amoníaco mg/mL.

Aislados Bacterianos	Nombre del organismo	Promedio mg/mL	Deriviación estándar	Aislados Bacterianos	Nombre del organismo	Promedio mg/mL	Deriviación estándar
EZ10	<a href="#">Bacillus subtilis subsp. spizizenii</a>	2.03	0.05	EZ26	<a href="#">Bacillus subtilis</a>	1.03	0.13
EZ11	<a href="#">Bacillus subtilis subsp. spizizenii</a>	1.72	0.07	EZ27	<a href="#">Bacillus subtilis</a>	1.20	0.08
EZ14	<a href="#">Bacillus tequilensis</a>	1.28	0.05	EZ31	<a href="#">Bacillaceae bacterium</a>	1.10	0.07
EZ19	<a href="#">Azospirillum lipoferum</a>	1.44	0.09	EZ32	<a href="#">Brevibacterium sp.</a>	1.07	0.03
EZ20	<a href="#">Bacillus subtilis</a>	2.16	0.04	EZ33	<a href="#">Bacillus amyloliquefaciens</a>	1.37	0.03
EZ21	No identificada	1.00	0.04	EZ34	<a href="#">Bacillus sp.</a>	1.16	0.05
EZ22	<a href="#">Brevibacterium sp.</a>	1.43	0.04	Control	<i>Pseudomonas</i>	7.92	0.08
EZ23	<a href="#">Bacillus sp.</a>	1.74	0.10	EZ42	<a href="#">Bacillus subtilis</a>	1.95	0.07
EZ24	<a href="#">Bacillus subtilis</a>	2.49	0.11	EZ43	No identificada	1.59	0.05
EZ25	<a href="#">Bacillus subtilis</a>	1.11	0.06	EZ47	<a href="#">Bacillus sp.</a>	1.23	0.04

La oxidación de amonio por bacterias autótrofas oxidantes de amoníaco (AOB) es un proceso clave en los ecosistemas agrícolas y naturales y tiene un gran impacto global. En el pasado, la ecología y la fisiología de AOB no se entendían bien porque estos organismos son notoriamente difíciles de cultivar (Okano, et al, 2004).

### Cepas promisorias.

Se seleccionaron cuatro bacterias considerando las actividades descritas en el cuadro 18, y una bacteria aislada de los nódulos de la raíz de alfalfa. En cuanto a la prueba de confrontación no se presentó inhibición del crecimiento entre cuatro de las bacterias del consorcio, se observó que la rizobium no creció en el medio LB, efecto de la salinidad en el crecimiento y la supervivencia de *Rhizobium spp*, aunque el crecimiento se vio afectado por la salinidad, cuatro cepas seleccionadas de la tasa de crecimiento podrían sobrevivir en concentraciones extremadamente altas de sal, con tasas de crecimiento relativamente no afectadas por la sal se inocularon en soluciones con conductividades eléctricas de hasta 43.0 mS cm<sup>-1</sup> (92% equivalente de agua de mar) (Singleton, et al., 1982). Las cuales fueron: *Bacillus subtilis* EZ24 esta bacteria presentó cuatro de las actividades enzimáticas como celulasa, lipasa, proteasa y quitinasa además de que presentó actividad antagónica contra *F. Oxysporum*, *Bacillus lincheniformis* EZ44 presentó actividad antagónica contra *F. Oxysporum*, celulasa, amilasa, proteasa y fosfatasa. Se seleccionaron tres bacterias en base al género a *Brevibacterium sp.*, *Azospirillum lipoferum* y *Sinorhizobium meliloti*.

Entre algunos mecanismos promotores de crecimiento identificados en el género *Bacillus*, se encuentran la solubilización de fosfato (Chatli et al., 2008), la síntesis de fitohormonas como el ácido indol acético (Vessey, 2003) y la capacidad de controlar algunos hongos patógenos en la rizósfera (Larrea, 2001). Las *Brevibacterium casei* exhibió la capacidad de producir amoníaco, 1-amino-ciclopropano-1-ácido carboxílico desaminasa, ácido indol 3-acético y HCN, pero no pudo solubilizar fosfato inorgánico y producir sideróforos. (Płociniczak, et al., 2016).

### Cultivos experimentales.

El promedio de bacterias por mililitro fue de  $4 \times 10^4$

En el experimento con la albahaca (*Ocimum basilicum*) los resultados obtenidos fueron: Germinación del 100%, teniendo una planta por semilla.



Figura 31.- En las graficas se muestran los promedios de altura de las plantas, longitud de raíz y número de hojas.



Figura 32.- La imagen muestran los tratamientos del cultivo de la albahaca y se observa el color amarillo y verde oscuro en las hojas.

Después de los dos meses del tratamiento las plantas de albahaca detuvieron su crecimiento y se manifestó la clorosis y necrosis principalmente en los bordes de las hojas, esta es una respuesta típica en la vegetación expuesta a las condiciones de salinidad, en donde se manifiesta el estrés abiótico causado por sales. La necrosis inició en el tratamiento  $T_0$  y en forma sucesiva hasta el tratamiento  $T_5$  esto debido a que se incremento la materia orgánica y el consorcio microbiano se estableció en la rizosfera del cultivo. El 10% de las plantas murieron antes de los 60 días. Las hojas en los cultivos de albahaca y tomate presentaron hojas en tonos de color verde oscuro, esto es común ya que las células del tejido de la hoja continúan dividiéndose, pero no se alargan. La aparición de más células por unidad de área foliar explica el color típicamente verde oscuro de las plantas estresadas osmóticamente (Strawn, 2015).

En el experimento con tomate (*Solanum lycopersicum*), los resultados obtenidos fueron: Germinación del 100%, teniendo una planta por semilla.

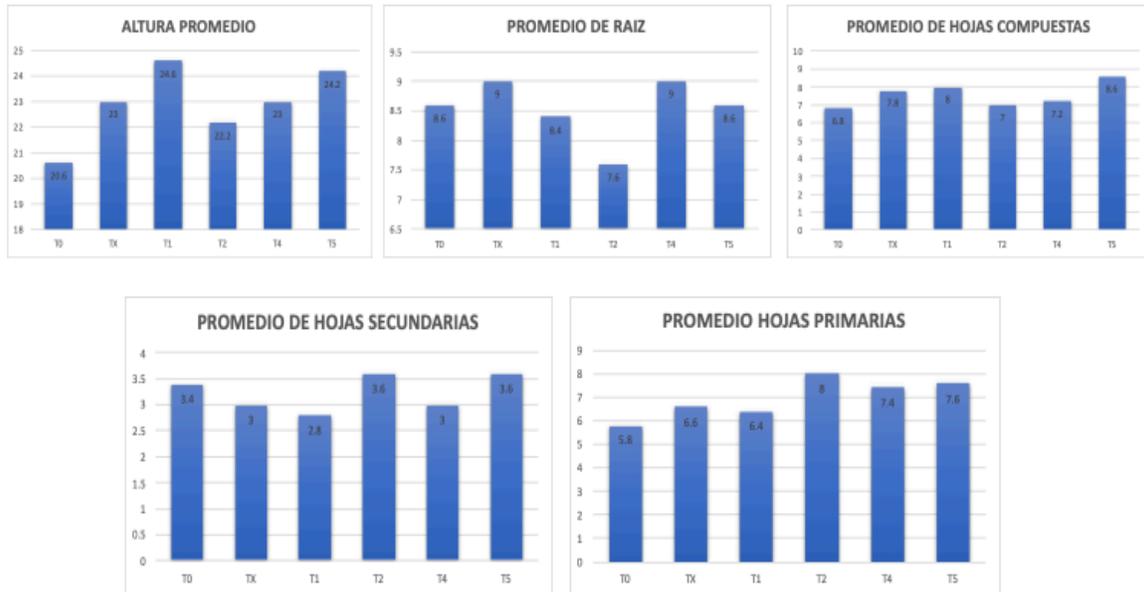


Figura 33.- En las graficas se muestran los promedios de altura de las plantas, longitud de raíz, número de hojas compuestas, hojas secundarias y primarias.



Figura 34.- La figura muestran los tratamientos del cultivo de la tomate y observa el color verde obscuro y morado en las hojas. La letra A corresponde a la planta control.

Los tratamientos del cultivo de tomate presentaron un crecimiento mucho mas lento que el control, la planta control presentó 5 cm más que los promedios de altura de los otros tratamientos. La parte aérea de las plantas de tomates igualmente se ve afectada por la salinidad: las plantas alcanzan una menor altura, las hojas se presentan en menor número y a la vez manifiestan una disminución en su densidad estomática en la cara adaxial (Romero Aranda, Soria, & Cuartero, 2001).

En el experimento con alfalfa (*Medicago sativa*) los resultados obtenidos fueron: Germinación del 100%, teniendo una planta por semilla.

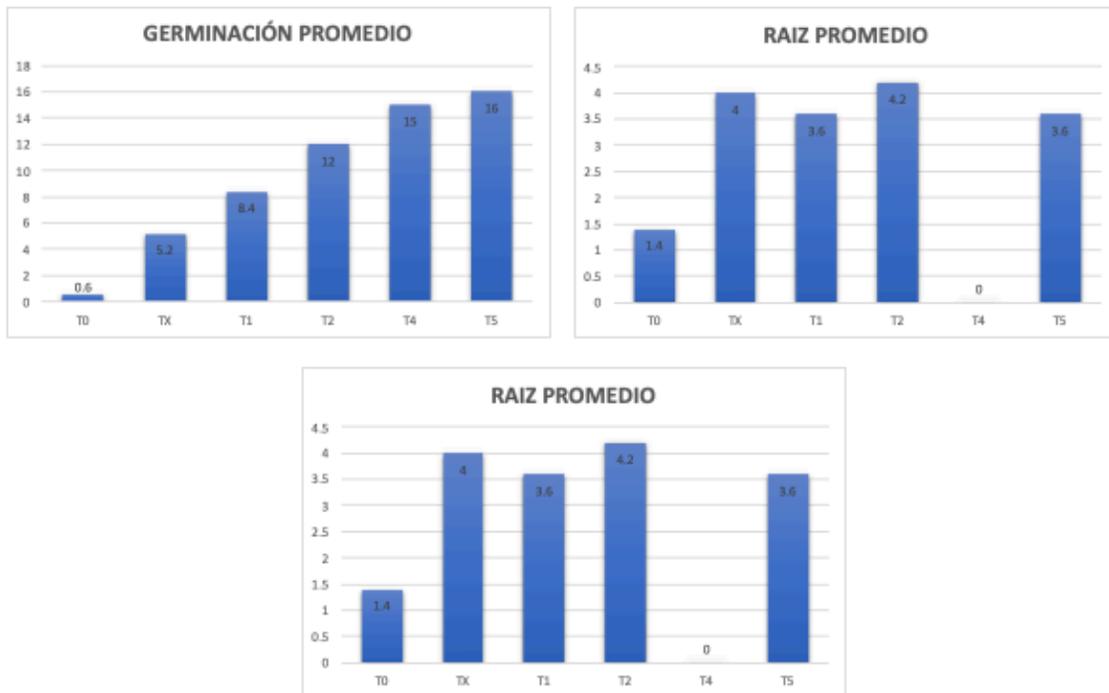


Figura 35.- En las graficas se muestran los promedios de germinación, altura de la planta y longitud de raíz de la alfalfa.



Figura 36.- La imagen muestran los promedios de germinación, altura de la planta y longitud de raíz.

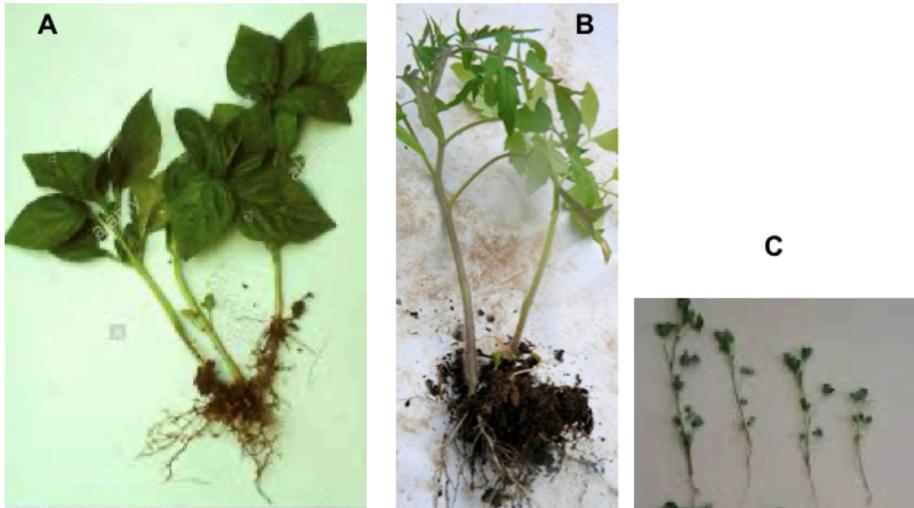


Figura 37.- La imagen muestran la raíz de los cultivos a los dos meses del tratamiento.

La longitud de la raíz no se desarrollo debido a la compactación del suelo. A nivel de raíces, las sales alteran la absorción de agua afectando el crecimiento de estos órganos; también actúan produciendo efectos tóxicos. La magnitud de las respuestas de las plantas se encuentra estrechamente relacionada a la concentración de las sales, a la duración del estrés a que están expuestas y a la especie o cultivar de que se trate (Romero Aranda, Soria, & Cuartero, 2001).

## 8. CONCLUSIONES

Se aislaron 40 cepas bacterianas a partir de suelos salinos del predio El Llano en el municipio de Zacoalco de Torres, todas las cepas produjeron algún tipo de enzima y 31 cepa demostraron actividad antagónica hacia hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. Las bacterias se clasificaron como halófilos moderados y halotolerantes. De las ocho bacterias aisladas de los nódulos de la raíz de alfalfa la *Sinorhizobium meliloti* tuvo una producción de 91.4 µg / ml de ácido indol acético (AIA) y se comprobó que al inocular semillas de alfalfa con esta bacteria se tenía un mayor promedio en el crecimiento de la raíz en un cultivo *in vitro*. Del total de las bacterias aisladas en su caracterización molecular se tuvo que el 96% presentaron morfología bacilar y solo el 4% fueron cocos. De la homología en la base de datos NCBI se identificaron seis géneros: *Bacillus sp.*, *Brevibacterium sp.*, *Sinorhizobium sp.*, *Ensifer adhaerens sp.*, *Azospirillum lipoferum sp.* y *Agrobacterium sp.* A partir de los resultados del presente trabajo, concluimos que el consorcio microbiano seleccionado pueden ayudar a la planta a establecerse al estimular la germinación de semillas y proporcionándole tolerancia y adaptabilidad en los suelos salino – sódicos.

## 9. RECOMENDACIONES

Para garantizar el éxito en la adaptabilidad de los cultivos en los suelos salinos – sódicos , es necesario incorporar materia orgánica al suelo, seleccionar un cultivo tolerante a las concentraciones de sales y elegir a los microorganismos (BPCV) que mejor se adapten a cada cultivo para tener mayor porcentaje en la colonización de los tejidos y por consiguiente un efecto promotor del crecimiento en los cultivos que se inoculen.

## 10. ANEXOS 1

### 10.1. Anexo medios de cultivo

#### Medio LB (Luria-Bertani)

Para preparar 1 litro: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl y 1 litro de agua destilada; se ajusto el pH a 7.0 con NaOH 1 N y se adicionaron 15 g de agar; se autoclaveo la mezcla durante 25 minutos a 121 °C a 15 PSI. La triptona utilizada es un digerido pancreático de caseína de la leche de vaca, y el extracto de levadura utilizado es una levadura de *Sacharomyces cerevisiae* (Sezonov, Joseleau-Petit, & D'Ari, 2007).

#### Medio mínimo de sales MMS

Para preparar 1 litro: (10 g glucosa, 5 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.1 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). Disolver cuidadosamente las sales en el orden indicado, excepto la glucosa y ajustar el pH en el medio de sales a 6.5 – 7.0. La glucosa se debe disolver en recipiente separado de las sales. Agregar 15 g de agar y calentar a ebullición durante 1 minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 25 minutos las dos soluciones. Dejar enfriar a 40 °C en la campana de flujo laminar y cerca de del mechero mezclar las soluciones (Aquiahuatl Ramos & Perez Chabela, 2004).

#### Medio levadura manitol-agar (LMA)

0.5 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.2 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 g de NaCl, 10 g de manitol, 0.2 g de extracto de levadura, agua destilada 1000 mL, se ajusto el pH a 6.8 con NaOH y 15g de agar. Se disuelve el agar por un minuto en microondas y se autoclavea durante 25 minutos a 121 °C (CIAT, 1988). Utilizar agua destilada.

#### Medio Agar Carboximetilcelulosa para la evaluación de actividad celulolítica

Prepara 1 litro de solución amortiguadora de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 0.05M y ajustar el pH a 7.5, a 800 mL se le adicionaron 15 g de agar, se calento hasta ebullición por un minuto y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 25 minutos. En los 200 mL restantes se agregó 20 g de carboximetilcelulosa y se puso a baño maria por 10 minutos a 95 °C. Se dejo enfriar ambas soluciones a 40 °C y se mezclaron. Vaciar 25 mL en cada caja de Petri.

Celulosa: Seguido de la incubación, las placas se revelaron con 3 mL de rojo congo al 0.1% por 15 minutos, después 2 mL de NaCl 1M por 1 h, y por último se agregaron 3 mL de ácido acético al 2% por 30 minutos.

#### Medio Agar Almidón para medir la actividad amilolítica

Prepara 1 litro de solución amortiguadora de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 0.05M y ajustar el pH a 7.5, a 800 mL se le adicionaron 15 g de agar, se calento hasta ebullición por un minuto y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 25 minutos. En los 200 mL restantes se agregó 20 g de almidón

y se puso a baño maria por 10 minutos a 95 °C. Se dejo enfriar ambas soluciones a 40 °C y se mezclaron. Vaciar 25 mL en cada caja de Petri. Para este medio no fue necesario agregar solución reveladora.

Medio Agar quitina para medir la actividad quitinolítica

Prepara 1000 mL de solución amortiguadora de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 0.05M y ajustar el pH a 7.5, a 800 mL se le adicionaron 15 g de agar, se calentó hasta ebullición por un minuto y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 25 minutos. En los 200 mL restantes se agregó 2% de quitina coloidal y se puso a baño maria por 10 minutos a 95 °C. Se dejo enfriar ambas soluciones a 40 °C y se mezclaron. Vaciar en cajas de Petri. Para este medio no fue necesario agregar solución reveladora (Castro, et al, 2011).

Medio Agar caseína para detección de actividad proteolítica.

Prepara 1 litro de solución amortiguadora de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 0.05 M y ajustar el pH a 7.5, a 800 mL se le adicionaron 15 g de agar, se calentó hasta ebullición por un minuto y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 25 minutos. En los 200 mL restantes se agregó 20 g de leche svelty y se puso a baño maria por 10 minutos a 95 °C. Se dejo enfriar ambas soluciones a 40 °C y se mezclaron. Vaciar 25 mL en cada caja de Petri. Para evitar la contaminación de este medio se utilizó agua destilada estéril y la leche se dejo hasta ebullición. Para el revelado se prepararon 50 mL de una solución que contenía 0.16 g de I (Yodo) y 0.33 g de KI, se mezcló y se agregaron 5 mL a cada caja de Petri y se dejo actuar durante una hora.

Medio lipasa (Agar tween 80) para detección de actividad lipolítica.

Solución A: 10 g de peptona, 5 g NaCl, 0.1 g de  $\text{CaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 15 g de agar, 900 mL de agua destilada. Solución B: 10 g de Tween 80, agua destilada 100 mL. Autoclavear a 121 °C durante 25 minutos a 15 psi las soluciones A y B por separado y después mezclar cuando tengan una temperatura de aproximada de 50 °C.

Medio de cultivo Pikovskaya-agar modificado para medir la actividad fosfatasa.

Consistió en una solución de 10 g de glucosa, 5 g de  $\text{Ca}(\text{PO}_4)_2$ , 0.5 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.2 g de NaCl, 0.1 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.2 g de KCl, 0.5 g de extracto de levadura, 0.004 g de  $\text{MnSO}_4$ , 0.002 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 15 g de agar y agua destilada 1000 mL. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 25 minutos a 15 psi. Vertir en cajas Petri formando una capa delgada (Hernández-Leal, et al., 2011).

Papa Dextrosa Agar (PDA)

Es un medio muy usado que sirve para aislar todo tipo de hongos. El cual consiste en 200 g de papa sin pelar, 10 g de dextrosa, 15 g de agar y 1000 mL de agua destilada. Lavar las papas, cortarlas y hervirlas en un litro de agua destilada por 20 minutos, pasar por un colador y disolver en el líquido la dextrosa y el agar. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 25 minutos a 15 psi. Vertir en cajas Petri.

#### Reactivo de Salkowski

1 mL de  $\text{FeCl}_3$  0.5 M, 50 mL de ácido perclórico a 35%, mezclar es homogenizada y llevada a baño maría a 65 °C durante cinco minutos.

#### MS Murashige y Skoog

Preparación a partir de soluciones stock concentradas solución stock X10 de macronutrientes 100 ml/L. 1.65 g/l de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 1.9 g/l de  $\text{KNO}_3$ , 0.37 g/l de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.33 g/l de  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{aq}$ , 0.17 g/l de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , la composición de la solución estock de los micronutrientes a X100, 10 ml/L. 0.83 mg/l de KI, 6.2 mg/l de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 22.3 mg/l de  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 8.6 mg/l de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.25 mg/l de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.025 mg/l de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.025 mg/l de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Hierro stock X200, 5 ml/L, 37.3 mg/l de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 27.8 mg/l de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Vitaminas stock X200, 5 ml/L, 100 de Inositol, 0.5 de Acido Nicotínico, 0.5 de Piridoxina HCl, 0.1 de Tiamina HCl, 2 de Glicina. Ajustar el pH a 5.7 con la solución 0.1 M de HCl o OHNa, añadir el phytigel y disolver en microondas y esterilizar en autoclave a 121 °C (15 psi), durante 20 minutos.

#### Caldo nutritivo (Difco™)

5 g de Peptona de carne, 3 g Extrato de carne y 1000 mL de agua destilada. Disolver y esterilizar en autoclave a 121 °C (15 psi), durante 20 minutos.

## 11. ANEXOS 2

### 12.1 Secuenciación por SANGER productos de PCR

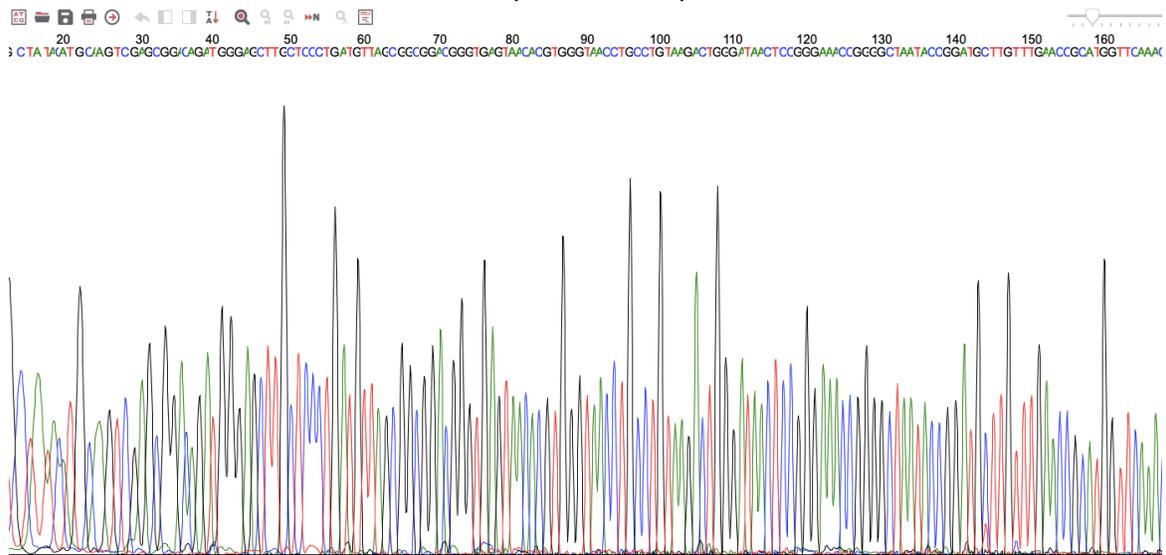


Figura 38.- Ejemplo de cromatograma obtenido de la secuenciación.

## 11.1. Obtención de la secuencia en formato FASTA

EZ23\_pPLB16-F

```
AGCATGCGCGTGCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTG
GGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAAATCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAA
GGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGC
CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATG
GACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGT
TCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTCCCAGCAGCCA
```

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

**Bacillus sp. (in: Bacteria) strain J6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence**

Sequence ID: [MK660033.1](#) Length: **1012** Number of Matches: **1**

Range 1: 2 to 497 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
911 bits(493)	0.0	495/496(99%)	0/496(0%)	Plus/Plus	
Query 2		GCATGCGCGTGCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTA			61
Sbjct 2		GCATGCGCGTGCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTA			61
Query 62		GCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGA			121
Sbjct 62		GCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGA			121
Query 122		AACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTT			181
Sbjct 122		AACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTT			181
Query 182		CGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC			241
Sbjct 182		CGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC			241
Query 242		CAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG			301
Sbjct 242		CAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG			301
Query 302		GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACG			361
Sbjct 302		GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACG			361
Query 362		GAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGA			421
Sbjct 362		GAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGA			421
Query 422		ACAAGTACCGTTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAA			481
Sbjct 422		ACAAGTACCGTTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAA			481
Query 482		CTACGTCCCAGCAGCC 497			
Sbjct 482		CTACGTGCCAGCAGCC 497			

Figura 39.- Ejemplo de resultado mostrando la alta homología de la secuencia obtenida 99% con la reportada.

## LITERATURA CITADA.

- Castillo Carvajal, L., y Barragan Huerta, B. E. (2011). Aplicaciones biotecnológicas de microorganismos halófilos. *Sistemas Ambientales*, 4(2), 3-6.
- Castro Piña, L., Flores Gallegos, A. C., Rodríguez Vidal, A., Aguilar González, M. A., Aguilar González, C. N., y Rodríguez Herrera, R. (2011). Aislamiento y caracterización de microorganismos halófilos de suelos salinos de cuatro ciénegas Coahuila, México. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 3(5), 33-43.
- Castro, R., Álvarez, A., Machado, E., Mendoza, M., Gómez, R., y García, P. (Abril-junio de 2011). Caracterización de una quitinasa extracelular producida por *Serratia* sp. BIOMI-363706 usando quitina coloidal como sustrato. *SciELO*, 77(2).
- Castro, R., Álvarez, A., Machado, E., Mendoza, M., Gómez, R., y García, P. (04 de Enero de 2011). Caracterización de una quitinasa extracelular producida por *Serratia* sp. BIOMI-363706 Usando quitina coloidal como sustrato. *Scielo*, 77(2), 101-108.
- Cedeño Garcia, G. A. (2018). Tolerancia a estrés hídrico y promoción del crecimiento en alfalfa (*Medicago sativa*) inoculada con bacterias de la rizósfera. Chillan, Chile.
- CIAT. (abril de 1988). Manual de Métodos de Evaluación, Selección y Manejo Agronómico. Calí, Colombia.
- Compant, S., Duffy, B., Nowa, J., Clement, C., y Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 4951-4959.
- Lopez, A. L., Davila, G. V., Leon, E. B., Villegas, E. G., y Gallardo, J. V. (30 de abril de 2010). Tequila vinasses: generation and full scale treatment processes. Guadalajara, Jalisco, Mexico.
- CUCBA. (18 de junio de 2013). Universidad de Guadalajara. Obtenido de Dos mil hectáreas de Jalisco sufren procesos de desertificación: <http://www.udg.mx/es/noticia/dos-mil-hectareas-de-jalisco-sufren-proceso-de-desertificacion>
- Lugtenberg, B., y Kamilova, F. (2009). Plant-growth promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, 541-556.
- ChunJuan, W., YaHui, G., Chao, W., HongXia, L., DongDong, N., YunPeng, W., y JianHua, G. (2012). Enhancement of tomato (*Lycopersicon esculentum*) tolerance to drought stress by plant-growth-promoting rhizobacterium (PGPR) *Bacillus cereus* AR156. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 20, 1097-1105.
- López Bermúdez, F. (1994). Degradación del suelo ¿Fatalidad climática o mala gestión humana? hacia una gestión sostenible del recurso en el contexto mediterráneo. *Papeles de geografía*(20), 49-64.
- Curiel Ballesteros, A. (18 de junio de 2013). Dos mil hectáreas de Jalisco sufren procesos de desertificación. (M. E. Loera, Entrevistador)
- López-Jácom, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., y Franco-Cendejas, R. (Enero-marzo de 2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Medigraphic*, 3(1), 10-18.
- Alexander, M. (1977). Introduction to soil microbiology. *Soil Science*.
- Alexander, M. (1980). *Introducción a la microbiología del suelo* (Vol. 2). (AGT, Ed.) México.
- Acuña, A. J., Pucci, G. N., y Pucci, O. H. (2010). Caracterización de tres cepas bacterianas capaces de fijar nitrógeno y biodegradar hidrocarburos aisladas de un suelo de la patagonia. *Ecosistemas*, 19, 125-136.
- Acuña, O., y Uribe, L. (1996). Inoculación del frijol común con tres cepas seleccionadas de *Rhizobium leguminosarum* bv. Phaseoli. *Agronomía Mesoamericana*, 7, 35-40.
- Aeron, A., Kumar, S., Pandey, P., y Maheshwari, D. K. (2011). Emerging role of plant growth promoting rhizobacteria in agrobiología. *Springer Berlin Heidelberg*, 1-36.

- Aharon, O. (15 de Apr de 2008). Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *BioMed Central*, 4(2).
- Ahmad, P., y Prasad, M. N. (2011). Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change. *Springer Science y Business Media*.
- Amara, U., Khalid, R., y Hayat, R. (2015). Soil bacteria and phytohormones for sustainable crop production. *Bacterial metabolites in sustainable agroecosystem. Springer International.*, 87-103.
- Andrade Ochoa, S., Erosa de la Vega, G., y Nevárez Moorillón, G. (julio-septiembre de 2015). Amonio-oxidasas bacterianas y arqueales involucradas en el ciclo del nitrógeno. *SciELO*, 33(3).
- Antoun, H., y Prevost, D. (2006). Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. *Springer Netherlands. PGPR: Biocontrol and biofertilization*, 1-38.
- Aquihuatl Ramos, M. D., y Perez Chabela, M. D. (4 de noviembre de 2004). Manual de prácticas de laboratorio de microbiología general. Cd. de México, México.
- Argüelles, R. I. (31 de marzo de 2010). Que es la biorremediación. *Dirección Genral de Divulgación de la Ciencia*, 11-12.
- Arshad, M., y Frankenberger, W. (1998). Plant growth-regulating substances in the rhizosphere: Microbial production and functions. *Advances in Agronomy*(62), 46-152.
- Ashibil, A., y Burhan , A. (2008). A New Halo-alkaliphilic, Thermostable Endoglucanase from Moderately Halophilic Bacillus sp. C14 Isolated from Van Soda Lake. *International Journal of Agriculture y Biology*, 369-374.
- Avci, M. S., Cinar, C., y Inal, I. (2010). Evaluation of some selected alfalfa (*Medicago sativa* L.) lines for herbage yield and forage quality. . *Food. Agr. Environ*, 545-549.
- Avellaneda-Torres, L. M., Melgarejo Muñoz, L. M., Narvárez Cuenca, C. E., y Sánchez Nieves, J. (09 de mayo de 2012). Actividades Enzimáticas en Consorcios Bacterianos de Suelos Bajo Cultivo de Papa con Manejo Convencional y Bajo Pastizal. *SciELO*, 65(1), 6349-6360.
- Barba, G., y Güitrón, M. (2003). *Ficha Informativa de los Humedales de Ramsar (FIR)*. Ficha Informativa, RAMSAR, Sayula.
- Barbosa Amaya, H. F. (2011). Remediación de Suelos. Edo de México, México.
- Bashan, Y., Salazar, B., Puente, M. E., Bacilio, M., y Linderman, R. (2009). Enhanced establishment and growth of giant cardon cactus in an eroded field in the Sonora Desert using native legume trees as nurse plants aided by plant growth-promoting microorganisms and compost. *Biology and Fertility of Soils*, 585-594.
- Basigalup, D. H., y Rossanigo, R. (2007). *El cultivo de la alfalfa en la Argentina*. D.R. Basigalup. INTA.
- Benintende, S., y Sanchez, C. (septiembre de 2019). Microorganismos del suelo. Parana, Entre Rios, Argentina.
- Birch, P. R., y Kamoun, S. (2000). Studying interaction transcriptomes: coordinated analyses of gene expression during plant-microorganism interactions. *Elsevier Science*, 77-82.
- Bohn, H. L., McNeal, B. L., y O'Connor, G. A. (2001). *Soil Chemistry*. New York: John Wiley y Sons, Inc.
- Bornscheuer, U., Reif, O. W., Lausch, R., Freitag, R., Scheper, T., Kolisis, F. N., y Menge, U. (1994). Lipase of *Pseudomonas cepacia* for biotechnological purposes: purification, crystallization and characterization. . *Biochim Biophys*, 55-60.
- Das, K., y Mukherjee, A. K. (2007). Crude petroleum- oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology Bioresource Technology*, 1339-1345.

- Datta, C., y Basu, P. (2000). Indole acetic acid production by a Rhizobium species from root nodules of a leguminous shrub *Cajanus cojan*. *Microbiology Research*, 123-127.
- Del Pozo Iñañez, M. (1977). *La alfalfa, su cultivo y aprovechamiento* (Vol. 2 ed.). Madrid, España: Mundi-Prensa.
- Delgado-García, M., De la Garza-Rodríguez, I., Cruz Hernández, M. A., Balagurusamy, N., Aguilar, C., y Rodríguez-Herrera, R. (June de 2013). Characterization and selection of halophilic microorganisms isolated from Mexican soils. *ARPN Journal of Agricultural and Biological Science*, 8(6), 457-464.
- Dutta, S., y Podile, A. R. (2010). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): The bugs to debug the root zone. *Critical Reviews in Microbiology*, 232-244.
- El-Meilegi, M. A., Omar, A. F., Rogaibah, A. A., y Ibrahim, G. H. (2017). Efficacy of Bacilli Strains in Growth Promotion and Biological Control of Soilborne Rhizoctonia and Fusarium on Alfalfa (*Medicago sativa* L.) and Potato (*Solanum tuberosum* L.). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 1(27), 85-92.
- Espinosa Palomeque, B., Moreno Reséndez, A., Cano Ríos, P., Álvarez Reyna, V. D., Sáenz Mata, J., Sánchez Galván, H., y González Rodríguez, G. (2017). Inoculación de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cv. afrodita en invernadero. *Terra Latinoamericana*, 35(2), 169-178.
- Ezziyyani, M., Pérez, S. C., Requena, M. E., Rubio, L., y Candela, M. E. (2004). Biocontrol por *Streptomyces rochei* –Ziyani–, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología*, 69-78.
- Flores-Delgado, D. F. (2015). La Alfalfa (*Medicago sativa*): Origen, manejo y producción. *CONEXAGRO JDC*, 5, 27-43.
- FAO. (2004). *FAO. Carbon sequestration in dryland soils. World Soils Resources Reports Nº 102. FAO. Rome 2004*. Recuperado el octubre de 2019, de [www.fao.org/docrep/007/y5738e/y5738e00.htm](http://www.fao.org/docrep/007/y5738e/y5738e00.htm)
- FAO. (2015). *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación*. Recuperado el octubre de 2019, de Base referencial mundial del recurso suelo 2014: <http://www.fao.org/3/a-a0510s.pdf>
- FAO. (8 de junio de 2018). *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. (FAO, Editor) Recuperado el 8 de junio de 2018, de FAO: <http://www.fao.org/soils-portal/about/definiciones/es/>
- FAO. (15 de octubre de 2019). *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. Obtenido de Portal de Suelo de la FAO: <http://www.fao.org/soils-portal/soil-degradation-restoration/evaluacion-de-los-indicadores-globales-de-la-salud-del-suelo/salud-del-suelo-biologica-y-quimica/es/>
- FAO. (3 de octubre de 2019). *Portal de Suelo de la FAO*. Obtenido de Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura: <http://www.fao.org/soils-portal/soil-degradation-restoration/es/>
- FAO. (2019). *Portal de Suelos de la FAO*. Obtenido de Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura: <http://www.fao.org/soils-portal/soil-biodiversity/datosygrafias/es/>
- FAO. (2019). *Salty soils*. Obtenido de Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura: <http://www.fao.org/3/r4082e/r4082e08.htm>
- Fatemeh Noori, Hassan Etesami, Najafi Zarini, H., Khoshkholgh-Sima, N. A., Hosseini Salekdeh, G., y Farshad Alishahi. (30 de octubre de 2018). Mining alfalfa (*Medicago sativa* L.) nodules for salinity tolerant non-rhizobial bacteria to improve growth of alfalfa under salinity stress. *ELSEVIER Ecotoxicology and Environmental Safety*, 162, 129-138.

- Glick, B. R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*(41), 109-117.
- Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169, 30-39.
- Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*(169), 30-39.
- García, E. (1988). *Modificaciones al sistema climático de Köppen adaptado para México*. México: Instituto de Geografía, UNAM.
- García-Olivares, J. G., Moreno-Medina, V. R., Rodríguez-Luna, I. C., Mendoza-Herrera, A., y Mayek-Perez, N. (2006). Biofertilización con *Azospirillum brasilense* en sorgo, en el norte de México. *Agricultura Técnica en México*(32), 135-141.
- Garg, B. K., y Gupta, I. C. (2011). *Salinity Tolerance in Plants: Methods, Mechanisms and Management*. Scientific Publishers (India).
- Gawel, E., Grzelak, M., y Janyszek, M. (2017). Lucerne (*Medicago sativa* L.) in the human diet-case reports and short reports. *Herb Med*, 8-16.
- González-Bacerio, J., Rodríguez Hernández, J., y Monte Martínez, A. (23 de junio de 2010). Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial. *Scielo*, 12(1), 124-140.
- Gonzalez Mancilla, A., Alaraz Suarez, J. J., Ferrera Cerrato, R., Rodriguez Guzman, M. D., Taboada Gaytan, O. R., Trinidad Santos, A., . . . Arteaga Garibay, R. I. (2016). Caracterización y selección de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de chile poblano (*Capsicum annum*L.). *Contaminación Ambiental*, 463-474.
- Goswami, D., Dhandhukia, P., Patel, P., y Thakker, J. N. (2014). Screening of PGPR from saline desert of Kutch: Growth promotion in *Arachis hypogea* by *Bacillus licheniformis* A2. *Microbiological Research*(169), 66-75.
- Goswami, D., Parmar, S., Vaghela, H., Dhandhukia, P., y Thakker, J. (2015). Describing *Paenibacillus mucilaginosus* strain N3 as an efficient plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *Cogent Food y Agriculture*, .
- Goswami, D., Patel, K., Parmar, S., Muley, N., y Dhandhukia, P. (2014). Elucidating multifaceted urease producing marine *Pseudomonas aeruginosa* BG as a cogent PGPR and bio-control agent. *Plant Growth Regulation*.
- Goswami, D., Thakker, J. N., y Dhandhukia, P. C. (19 de junio de 2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Journal Cogent Food y Agriculture*, 2(1).
- Govindasamy, V., Senthilkumar, M., Magheshwaran, V., Kumar, U., Bose, P., Sharma, V., y Annapurna, K. (2011). *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: Potential PGPR for sustainable agriculture. *Springer-Verlag. Plant growth and health promoting bacteria*, 33-364.
- Govindasamy, V., Senthilkumar, M., Magheshwaran, V., Kumar, U., Bose, P., Sharma, V., y Annapurna, K. (2011). *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: Potential PGPR for sustainable agriculture. . *Plant growth and health promoting bacteria*, 333-364.
- Gutierrez-Manero, F. J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Mehouchi, J., R.Tadeo, F., y Talon, M. (2001). The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. . *Physiologia Plantarum*, 206-211.
- Gutierrez-Mañero, F. J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Mehouchi, J., Tadeo, F. R., y Talon, M. (2011). The plant-growth promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol Plant*, 206-211.

- Haas, D., y Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 307-319.
- Hattori, H. (1998). Microbial activities in soil amended with sewage sludge. *Soil Sci Plant Nutr*, 34, 221-232.
- Hedden, P., y Phillips, A. L. (2000). Gibberellin metabolism: New insights revealed by the genes. *Trends in Plant Science*(5), 523-530.
- Hernández-Leal, T. I., Carrión, G., y Heredia, G. (Noviembre-Diciembre de 2011). Solubilización in vitro de fosfatos por una cepa de *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *SciELO*, 45(8), 351-365.
- Ibañez N, C. (2004). Elementos principales del suelo, geodinámica y dinámica de los principales componentes del suelo.
- IIEG . (mayo de 2018). *Instituto de Información Estadística y Geográfica*. Obtenido de Diagnóstico del municipio de Zacoalco de Torres:  
<https://iieg.gob.mx/contenido/Municipios/ZacoalcoDeTorres.pdf>
- INAFED. (2005). *Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México*. Obtenido de Jalisco:  
<http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM14jalisco/mediofisico.html>
- INEGI. (01 de enero de 2000). *Instituto Nacional de Estadística y Geografía*. (INEGI, Editor) Recuperado el 10 de junio de 2018, de INEGI:  
<http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/rencat/edafologia/doc/normedaf.pdf>
- INEGI. (29 de julio de 2007). [inegi.gob.mx](http://inegi.gob.mx). *INEGI. Conjunto de Datos Vectorial Edafológico, Serie II, escala 1: 250 000*. Cd. de México, México, México. Recuperado el septiembre de 2019, de INEGI. Conjunto de Datos Vectorial Edafológico, Serie II, escala 1:250 000:  
<https://www.inegi.org.mx/temas/edafologia/default.html#Descargas>
- INEGI. (11 de julio de 2011). *Estadística: Medio Ambiente*. Recuperado el 8 de junio de 2018, de INEGI: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/temas/default.aspx?s=estyc=21385>
- InfoAgro. (6 de octubre de 2019). *El cultivo de la alfalfa*. Obtenido de InfoAgro:  
<https://www.infoagro.com/herbaceos/forrajes/alfalfa.htm>
- Ingham, E. R. (2019). *Natural Resources Conservation Service Soils - Soil Bacteria*. Obtenido de United States Department of Agriculture:  
[https://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detailfull/soils/health/biology/?cid=nrcs142p2\\_053862](https://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detailfull/soils/health/biology/?cid=nrcs142p2_053862)
- INIFAB. (Septiembre de 2014). Paquete tecnológico para producir alfalfa en el estado de Chihuahua. Chihuahua, Chihuahua, México.
- IUSS. (2007). *Base Referencial Mundial del Recurso Suelo. Primera actualización 2007. Informes sobre Recursos Mundiales de Suelo N° 103*. Grupo de Trabajo WRB. Roma: FAO.
- Jha, C. K., y Saraf, M. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Journal of Agricultural Research and Development*, , 108-119.
- Jha, C. K., Patel, B., y Saraf, M. (2012). Stimulation of the growth of *Jatropha curcas* by the plant growth promoting bacterium *Enterobacter cancerogenus* MSA2. . *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 891-899.
- Kloepper, J. W., y Schroth, M. N. (1978). Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. *Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, 2, 879-882.
- Kloepper, J. W., Rodríguez-Kabana, R., McInroy, H. A., y Young, R. W. (January de 1992). Rhizosphere bacteria antagonistic to soybean cyst (*Heterodera glycines*) and root-knot (*Meloidogyne incognita*) nematodes: Identification by fatty acid analysis and frequency of biological control activity. *SpringerLink Plant and Soil*, 139, 75-84.
- Kloepper, J. W., Zabloticz, R. M., Tipping, B., y Lifshitz, R. (1991). Plant growth mediated by bacterial rhizosphere colonizers.

- Kennedy, A. (2019). *Natural Resources Conservation Service Soils*. Obtenido de United States Department of Agriculture (USDA): [https://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detailfull/soils/health/biology/?cid=nrcs142p2\\_053862](https://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detailfull/soils/health/biology/?cid=nrcs142p2_053862)
- Kobayashi, D. Y., Reedy, R. M., Bick, J., y Oudemans, P. (2002). Characterization of a chitinase gene from *Stenotrophomonas maltophilia* strain 3451 and its involvement in biological control. *Applied and Environmental Microbiology*, 1047-1054.
- Kumar, A., Prakash, A., y Johri, B. (03 de Marzo de 2011). Bacillus as PGPR in Crop Ecosystem. *Springer Bacteria in Agrobiolgy*, 37-59.
- Kushner, D. J. (1978). Life in high salt and solute concentrations. *Microbial Life in Extreme Environments*, 317-368.
- Maldonado-Cruz, E., Ocho-Martinez, D. L., y Tlapal-Bolaños, B. (2008). Efecto del ácido acético salicílico y *Bacillus subtilis* en la infección causada por Cucumber mosaic virus en calabacita. *Chapingo Serie Horticultura*(14), 55-59.
- Macías Rodríguez, M. A. (2004). *Vegetación y flora de la laguna de Sayula, Guía ilustrada*. Guadalajara, México: Universidad de Guadalajara - CONABIO.
- MacMillan, J. (2001). Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria. *Journal of Plant Growth Regulation*, 387-442.
- Maheshwari, D. K., Dheeman, S., y Agarwal, M. (2015). Phytohormone-producing PGPR for sustainable agriculture. *Bacterial metabolites in sustainable agroecosystem*, 159-182.
- May, S. T., Khai, A. A., Ayme, A., y Yu, S. S. (2016). Evaluation of endophytic bacteria from some rice varieties for plant growth promoting activities. *Journal of Scientific and Innovative Research*, 5(4), 144-148.
- Mehlich, A. (1984). Mehlich 3 soil test extractant: A modification of Mehlich 2 extractant. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 15(12), 1409-1416.
- Michael O., E., Simon C., G., y Grant, H. (21 de octubre de 2019). The Potential of *Medicago sativa* for Microbial-Enhanced Phytoremediation of Diesel Fuel Contaminated Sites. *Search and Discovery*.
- Mutluru, S., y Veera Mallaiah, K. (2007). Bioproduction of indole acetic acid by *Rhizobium* strains isolated from root nodules of green manure crop, *Sesbana sesban* (L.). *Merr, Iranian Journal of Biotechnology*, 5(3), 178-182.
- Narvaez M, H. (Agostos de 2014). Estimación de la salinidad en suelos del delta del río Sinú en Colombia, mediante modelos de regresión lineal múltiple. *SciELO*, 32(3), 2-5.
- Neiendam-Nielsen, M., y Sørensen, J. (1999). Chitinolytic activity of *Pseudomonas fluorescens* isolates from barley and sugar beet rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 217-227.
- Noumavo, P. A., Agbodjato, N. A., Baba-Moussa, F., Adjanohoun, A., y Baba-Moussa, L. (2016). Plant growth promoting rhizobacteria: Beneficial effects for healthy and sustainable agriculture. *African Journal of Biotechnology*, 1452-1463.
- Oberson, A., Frossard, E., Bühlman, C., Mayer, J., Mäder, P., y Lüscher, A. (2013). Nitrogen fixation and transfer in grass-clover leys under organic and conventional cropping systems. *Plant and Soil*, 237-255.
- Okano, Y., Leutenegger, C. M., Jackson, L. E., Ford Denison, R., Gebreyesus, B., Lebauer, D., y Scow, K. M. (febrero de 2004). Application of Real-Time PCR To Study Effects of Ammonium on Population Size of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 1008-1016.
- Ortiz-Castro, R., Valencia-Cantero, E., y López-Bucio, J. (2008). Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling. *Plant Signaling y Behavior*, 263-265.

- Płociniczak, T., Sinkkonen, A., Romantschuk, M., Sułowicz, S., y Piotrowska-Seget, Z. (16 de Febrero de 2016). Rhizospheric Bacterial Strain *Brevibacterium casei* MH8a Colonizes Plant Tissues and Enhances Cd, Zn, Cu Phytoextraction by White Mustard. *Frontiers in Plant Science*.
- Payne, S. M. (1994). Detection, isolation, and characterization of siderophores. *Methods in Enzymology*, 329-344.
- Pazos, M., Hernández, A., Paneque, M., y Santander, J. L. (2000). Caracterización de cepas del género *Azospirillum* aisladas de dos tipos de suelos de la localidad de San Nicolás de Bari. *Cultivos Tropicales*, 19-23.
- Prosperi, J. M., Jenczewski, E., Angevain, M., y Ronfort, J. (2006). Morphologic and agronomic diversity of wild genetic resources of *Medicago sativa* L. *Genetic Resources and Crop Evaluation*, 843-856.
- Quiros, C. F., y Bauchan, G. R. (1988). The Genus *Medicago* and the Origin of the *medicago sativa* Complex. *Agronomy Monograph*(29), 93-124.
- Ramirez D., N., Serrano R., J. A., y Sandoval T., H. (3 de julio-septiembre de 2006). Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(3), 54-65.
- Rodríguez, H., y Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*(17), 319-339.
- Rodriguez, H., y Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 319-339.
- Rodriguez, H., Gonzalez, T., Goire, I., y Bashan, Y. (2004). Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Springer*, 91, 552-555.
- Rojas-García, A. R., Torres-Salado, N., Joaquín-Cancino, S., Hernández-Garay, A., Maldonado-Peralta, M. d., y Sánchez-Santillán, P. (2017). Componentes del rendimiento en variedades de alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Agrociencia*, 51, 697-708.
- Rzedowski, J. (1987). *Atlas cultural de México*. México: Planeta e Instituto Nacional de Antropología e Historia.
- Salisbury, F. B. (1994). The role of plant hormones. *Plant–environment interactions*, 39-81.
- SADER. (14 de octubre de 2019). *Delegación SADER Baja California*. Obtenido de Gobierno de México: <https://www.gob.mx/agricultura%7Cbajacalifornia/articulos/reporta-sader-el-cierre-de-la-cosecha-del-cultivo-de-la-alfalfa-en-el-valle-de-mexicali-222982>
- SADER. (07 de julio de 2019). *Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural*. Obtenido de Gobierno de México: <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/alfalfa-la-planta-que-nos-alimenta-a-todos>
- Sadfi, N., Cherif, M., Fliss, I., Boudabbous, A., y Antoun, H. (2001). Evaluation of bacterial isolates from salty soils and *Bacillus thuringiensis* strains for the biocontrol of *Fusarium* dry rot of potato tubers. *Journal of Plant Pathology*, 101-117.
- SAGARPA. (14 de noviembre de 2010). Salinidad del suelo. México, Nayarit, México.
- Sarabia-Ochoa, M., Madrigal-Pedraza, R., Martínez-Trujillo, M., y Carreon-Abud, Y. (2010). Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Biológicas*, 65-71.
- Sayula. (mayo de 2018). *Sayula Diagnóstico del Municipio*. Recuperado el 7 de junio de 2018, de Instituto de Información Estadística y Geográfica: [www.iiieg.gob.mx](http://www.iiieg.gob.mx)
- SEMADET. (7 de octubre de 2016). *Secretaría de Medio Ambiente y Desarrollo Territorial*. (K. Zepeda, Editor) Recuperado el 7 de junio de 2018, de Medio Ambiente y Desarrollo Territorial: [semadet.jalisco.gob.mx](http://semadet.jalisco.gob.mx)

- SEMARNAT. (31 de Diciembre de 2002). NOM-021-RECNAT-2000, Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. (D. Oficial, Ed.) MÉXICO.
- SEMARNAT. (2007). *Superficie sin vegetación de las unidades de producción según condición del suelo*. Recuperado el Octubre de 2019, de SEMARNAT: [https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/compendio\\_2016/archivos/02\\_agrican/D2\\_AGRIGAN01\\_20.pdf](https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/compendio_2016/archivos/02_agrican/D2_AGRIGAN01_20.pdf)
- SEMARNAT. (03 de octubre de 2014). *El medio ambiente en México*. Obtenido de Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales: [https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/informe\\_resumen14/03\\_suelos/3\\_2.html](https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/informe_resumen14/03_suelos/3_2.html)
- SEMARNAT. (03 de octubre de 2014). *Suelos*. Obtenido de Semarnat: [https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/informe\\_12/pdf/Cap3\\_suelos.pdf](https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/informe_12/pdf/Cap3_suelos.pdf)
- SEMARNAT. (18 de mayo de 2018). *Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales*. (SEMARNAT, Editor) Recuperado el 8 de junio de 2018, de SEMARNAT: <https://www.gob.mx/semarnat/>
- SEMARNAT. (2018). Recuperado el octubre de 2019, de [semarnat.gob.mx](http://semarnat.gob.mx): [semarnat.gob.mx:8080/ibi\\_apps/WFServlet?IBIF\\_ex=D3\\_R\\_SUELO03](http://semarnat.gob.mx:8080/ibi_apps/WFServlet?IBIF_ex=D3_R_SUELO03)
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., y D'Ari, R. (Dec. de 2007). Escherichia coli Physiology in Luria-Bertani Broth. *Journal of Bacteriology*, 189(23), 8746-8749.
- Shen, X., Hu, H., Peng, H., Wang, W., y Zhang, X. (2013). Comparative genomic analysis of four representative plant growth-promoting rhizobacteria in Pseudomonas. *BMC Genomics*, 271.
- Silva, H. S., Romeiro, R. D., Macagnan, D., Halfeld-Vieira, B. D., Pereira, M. C., y Munteer, A. (2004). Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: Non-specific protection and increase in enzyme activities. *Biological Control*, 288-295.
- SIAP. (2018). *Estadística de Producción Agrícola*. Obtenido de Sistema de Información Agroalimentaria y Pesca: <http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos.php>
- SIAP. (22 de octubre de 2019). *Alfalfa (Medicago sativa)*. Obtenido de Gobierno de México: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/96128/Alfalfa\\_monografias.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/96128/Alfalfa_monografias.pdf)
- Siddikee, M. A., Chauhan, P. S., Anandham, R., Gwang-Hyun, H., y Tongmin, S. (15 de septiembre de 2010). Isolation, Characterization, and Use for Plant Growth Promotion Under Salt Stress, of ACC Deaminase-Producing Halotolerant Bacteria Derived from Coastal Soil. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 20(11), 1577-1584.
- Singleton, P. W., El Swaify, S. A., y Bohlool, B. B. (1982). Effect of Salinity on Rhizobium Growth and Survival. *American society for Microbiology*, 44(4), 884-890.
- Stacey, G., Burris, R. H., y Evans, H. J. (1992). Biological nitrogen fixation. *Springer Science y Business Media*.
- Strawn, D. G., Bohn, H. G., y O'Connor, G. A. (2015). *Soil Chemistry* (Vol. 4). Wiley Blackwell.
- Suárez, C., Fernández, R., Valero, N., Gámez, R., y Páez, A. (2008). Antagonismo in vitro de Trichoderma harzianum Rifai sobre Fusarium solani (Mart.) Sacc. Asociado a la marchitez en maracuyá. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 35-43.
- Szijártó, N., Szengyel, Z., Lidén, G., y Réczey, K. (2004). Dynamics of Cellulase Production by Glucose Grown Cultures of Trichoderma reesei Rut-C30 as a Response to Addition of Cellulose. *Biochem Biotechnol*, 113-116.
- Tao, J. J., Chen, H. W., Ma, B., Zhang, W. K., Chen, S. Y., y Zhang, J. S. (2015). The Role of Ethylene in Plants Under Salinity Stress. *Front. Plant Sci*, 1059.

- Thakker, J. N., Patel, S., y Dhandhukia, P. C. (2012). Induction of defense-related enzymes in banana plants: Effect of live and dead pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *ISRN Biotechnology*. .
- Tueber, L. R., y Brick, M. A. (1988). ). *Morphology and Anatomy*. Madison.
- Tzfira, T., y Citovsky, V. (2000). From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction. *Molecular Plant Pathology*, 1(4), 202-212.
- USDA. (1954). *Diagnosis and Improvement of Saline and Alkali Soils* (Vol. Nº 60). Washington, U. S.: Agriculture Handbook .
- USDA. (1954). *Diagnosis and Improvement of Saline and alkali soils* (Vol. Agriculture Handbook Nº 60). (L. A. Richards, Ed.) Washington, U. S.
- USDA. (1954). *Diagnosis and Improvement of saline and alkali soils*. (Vol. 60). (L. A. Richards, Ed.) Washington, U. S.
- USDA. (2019). *Natural Resources Concervation Service Soils - Soil Bacteria*. Recuperado el octubre de 2019, de United States Department of Agriculture: [https://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detailfull/soils/health/biology/?cid=nrcs142p2\\_053862](https://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detailfull/soils/health/biology/?cid=nrcs142p2_053862)
- USDA. (2019). *United States Department of Agriculture*. Recuperado el octubre de 2019, de Natural Resources Concervation Service Soils: [https://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detailfull/soils/health/biology/?cid=nrcs142p2\\_053862](https://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detailfull/soils/health/biology/?cid=nrcs142p2_053862)
- Vance, C. P. (2008). Carbon and Nitrogen metabolism in legume nodules. En: Nitrogen-Fixating leguminous symbioses. *Springer. Dordrecht, the netherlands*, 293-320.
- van Loon, L. C., Bakker, P. A., y Pieterse, C. M. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 453-483.
- Vandenbussche, F., y Van Der Straeten, D. (2012). The Role of Ethylene in Plant Growth and Development. *The Plant Hormone Ethylene*, 44.
- Vassey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 571-586.
- Venieraki, A., Dimou, M., Pergalis, P., Kefalogianni, I., Chatzipavlidis, I., y Katinakis, P. (2011). he genetic diversity of culturable nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of wheat. *Microb Ecol*, 277-285.
- Volkov, V., y Beilby, M. (2017). *Salinity tolerance in plants: Mechanisms and regulation of ion transport* (Vol. 8). (O. Vicente, Ed.) Valencia, Spain: Salinity Tolerance in Plants.
- Zahedi, A. M., Fazeli, I., Zavareh, M., Dorry, H., y Gerayeli, N. (2012). Evaluation of the sensitive components in seedling growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) affected by salinity. *Asian Journal of Crop Science*(4), 159-164.
- Zahid, M., Abbasi, M. K., Hameed, S., y Rahim, N. (2015). Isolation and identification of indigenous plant growth promoting rhizobacteria from Hi-malayan region of Kashmir and their effect on improving growth and nutrient contents of mai-ze (*Zea mays*L.). . *Front Microbiol*, 207-209.
- Zahran, H. H. (septiembre de 1997). Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. *Springer*, 25, 2-5.