

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Instituto de Ingeniería

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



*“POTENCIAL DE CHLORELLA VULGARIS Y AZOSPIRILLUM BRASILENSE
COMO BIOFERTILIZANTES EN CULTIVOS HIDROPÓNICOS DE TOMATE
(SOLANUM LYCOPERSICUM)”*

TESIS PROFESIONAL QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN INGENIERÍA P R E S E N T A **DANIEL CORTÉS JIMÉNEZ**

DIRECTOR: Dr. Froylán Mario Espinoza Escalante

CODIRECTOR: Dra. Gisela Montero Alpírez

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Metabolismo Microbiano de la Universidad Autónoma de Guadalajara a cargo del Dr. Froylán Mario Espinoza Escalante, en conjunto con el Instituto de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California. Con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Un poco de ciencia aleja de Dios, pero mucha ciencia devuelve a Él.
Louis Pasteur

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por todo lo que soy, vivo y tengo.

A mi Director y Amigo Dr. Froylán Mario Espinoza Escalante, por la oportunidad, sus conocimientos, su paciencia y su confianza.

A la Dra. Gisela Montero Alpírez por su valiosa colaboración en la elaboración y revisión de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado para continuar con mi formación académica.



ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
RESUMEN.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
 1. INTRODUCCIÓN.....	 1
2. ANTECEDENTES	
2.1 <i>Azospirillum Spp.</i>	
a) Bacterias Promotoras del Crecimiento en Plantas (BPCP).....	4
b) El Género <i>Azospirillum</i>	5
c) Efecto de <i>Azospirillum</i> sobre las plantas.....	7
d) Posibles mecanismos de acción.....	9
e) <i>Azospirillum brasileense</i> y la sobreexpresión de Trehalosa.....	10
2.2 Microalgas:	
a) Características metabólicas y subproductos.....	12
b) <i>Chlorella sp. (Chlorophyceae)</i>	13
2.3 Simbiosis microalga-bacteria.....	14
2.4 Biodiesel y Bioetanol a partir de microalgas.....	19
2.5 Los microorganismos como fuente de biofertilizante.....	21
2.6 Efecto de la salinidad en cultivo de plantas superiores.....	23
2.7 Tomate (<i>Solanum Lycopersicum</i>).....	25
 3. JUSTIFICACIÓN.....	 27
 4. OBJETIVOS.....	 28
 5. HIPÓTESIS.....	 29



6. MATERIALES Y MÉTODOS

I. Medios Empleados.....	30
II. Microorganismos y Cultivo	
a) Microalgas.....	30
b) Bacteria Promotora del Crecimiento en Plantas (BPCP).....	31
c) Germinación y establecimiento de las plantas de tomate.....	32
III. Diseño de Experimento	
Células Libres.....	33
Co-inmovilización con microorganismos en alginato.....	35
Análisis Estadístico.....	38

7. RESULTADOS

Células libres

Experimento I

7.1 Longitud del Tallo.....	39
7.2 Longitud de la Raíz.....	44
7.3 Generación de Hojas.....	46
7.4 Efecto del Medio.....	49

Experimento II

7.5 Longitud del Tallo.....	53
7.6 Longitud de la Raíz.....	56
7.7 Generación de Hojas.....	58

Inmovilizados

Experimento III

7.8 Longitud del Tallo.....	62
7.9 Longitud de la Raíz.....	67
7.10 Generación de Hojas.....	72



8. DISCUSIÓN.....	76
9. CONCLUSIONES.....	81
10. BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	83

ANEXOS

<i>Anexo I</i>	103
<i>Anexo II</i>	103
<i>Anexo III</i>	105
<i>Anexo IV</i>	105

OTROS PRODUCTOS ACADÉMICOS	106
----------------------------------	-----

- a) Carta de aceptación en el Brazilian Journal of Microbiology*
- b) Borrador del Artículo aceptado en el Brazilian Journal of Microbioloy (a publicar en diciembre 2013).*



➤ ÍNDICE DE FIGURAS

Página

1. Para el experimento se utilizaron plántulas de 10 días de edad, debido a que se observó que en esta etapa no genera hojas, y es fácil evidenciar su desarrollo.....	32
2. Tubos cónicos con plántulas en desarrollo.....	34
3. Proceso de elaboración de los cultivos co-inmovilizados en alginato de sodio.....	37
4. Gráfica de ANOVA donde se observa el desarrollo del tallo en función del microorganismo.....	41
5. Gráfica de ANOVA donde se observa la respuesta en la formación de tallo en relación con la concentración salina.....	41
6. Gráfica de Interacción Microorganismo-Salinidad en cuanto a la longitud del Tallo.....	42
7. Gráfica de Interacción Tiempo-Salinidad en relación a la longitud del Tallo.....	42
8. Gráfica de ANOVA donde se observa la respuesta en la formación de raíz en relación con la concentración salina.....	45
9. Gráfica de interacción sobre el efecto de la salinidad en el desarrollo de la raíz a través del tiempo.....	46
10. Gráfica de ANOVA sobre generación de hojas conforme al microorganismo asociado.....	48



11. Gráfica de ANOVA sobre generación de hojas con respecto a las concentraciones de NaCl empleadas.....	49
12. Gráfica de interacción sobre la generación de hojas en función de la salinidad y el tiempo.....	49
13. Imagen de los 4 tratamientos en medio MS (de derecha a izquierda) <i>Chlorella Vulgaris</i> , <i>Azospirillum brasilense</i> BIF, <i>Azospirillum Brasilense</i> CD y Control.....	50
14. Gráfica de interacciones para Medio-Microorganismos en la longitud del tallo.....	51
15. Gráfica de interacciones para Medio-Microorganismos en la longitud de la raíz.....	51
16. Gráfica de interacciones para Medio-Microorganismos en el número de hojas.....	52
17. Gráfica de ANOVA para el promedio de longitud de tallo en plantas en asociación con diferentes microorganismos en medio hidropónico.....	54
18. Gráfica de interacciones de longitud del tallo en plantas en relación con las concentraciones de NaCl utilizando diferentes asociaciones microbianas en medio hidropónico.....	55
19. Gráfica de interacciones de longitud del raíz en plantas en relación con las concentraciones de NaCl utilizando diferentes asociaciones microbianas en medio hidropónico.....	57



20. Gráfica de interacciones de longitud del raíz en plantas crecidas con diferentes asociaciones microbianas en medio hidropónico durante los tres periodos de tiempo contemplados en los experimentos.....	58
21. Gráfica de ANOVA para el promedio de número de hojas generadas en plantas de tomate asociadas con diferentes microorganismos en medio hidropónicos.....	60
22. Gráfica de interacciones de número de hojas generadas en plantas crecidas con diferentes asociaciones microbianas en medio hidropónico con 6 niveles de salinidad.....	60
23. Gráfica de interacciones de número de hojas generadas en plantas crecidas con diferentes asociaciones microbianas en medio hidropónico durante los tres periodos de tiempo contemplados en los experimentos...	61
24. Gráfica de ANOVA para el promedio longitud de tallo en plantas de tomate asociadas con diferentes microorganismos inmovilizados en medio hidropónico.....	64
25. Gráfica de ANOVA para el promedio longitud de tallo en los periodos de tiempo monitoreados.....	64
26. Gráfica de interacciones para longitud de tallo en función de la salinidad, donde se muestra la respuesta de los tratamientos con <i>A. brasilense</i> BIF simple (AB) y en asociación con <i>C. vulgaris</i> (ABCV)...	65



27. Gráfica de interacciones para longitud de tallo en función de la salinidad, donde se muestra la respuesta de los tratamientos con <i>A. brasilense</i> CD simple (AW) y en asociación con <i>C. vulgaris</i> (AWCV)...	66
28. Gráfica de interacciones para longitud de tallo en función de la salinidad, donde se muestra la respuesta de los tratamientos con el microorganismo simple <i>C. vulgaris</i> (CV) en comparación con el control.....	66
29. Gráfica de ANOVA para el promedio de longitud de raíz en plantas de tomate asociadas con diferentes microorganismos inmovilizados en medio hidropónico.....	68
30. Gráfica de ANOVA para el promedio de longitud de raíz en plantas de tomate asociadas con diferentes microorganismos inmovilizados en medio hidropónico.....	69
31. Gráfica de ANOVA para el promedio de longitud de raíz conforme al nivel de salinidad en cultivos inmovilizados en medio hidropónico.....	70
32. Gráfica de interacciones para el promedio de longitud de raíz en los tratamientos con <i>A. brasilense</i> BIF simple y asociado con <i>C. vulgaris</i> , con los diferentes niveles de NaCl.....	71
33. Gráfica de interacciones para el promedio de longitud de raíz en los tratamientos con <i>A. brasilense</i> Cd simple y asociado con <i>C. vulgaris</i> , con los diferentes niveles de NaCl.....	71



34. Gráfica de interacciones para el promedio de longitud de raíz en los tratamientos con <i>C. vulgaris</i> , con los diferentes niveles de NaCl, en comparación con el control.....	72
35. Gráfica de ANOVA para de número de hojas en plantas de tomate asociadas con diferentes microorganismos inmovilizados en medio hidropónico.....	74
36. Gráfica de ANOVA para el promedio de número de hojas generadas en plantas de tomate a través de los periodos de tiempo muestreados.....	75
37. Gráfica de interacciones de número de hojas generadas en plantas crecidas con diferentes asociaciones microbianas en inmovilizados durante los tres periodos de tiempo contemplados en los experimentos.	75



➤ ÍNDICE DE TABLAS

Página

1. Correlación de salinidades como NaCl y conductividad eléctrica.....	33
2. Matriz de diseño experimental multifactorial 2x3x6.....	34
3. Diseño experimental multifactorial 5x6 para cultivos microbianos libres e inmovilizados en medio hidropónico.....	36
4. Análisis de varianza para longitud del tallo (4 factores).....	40
5. Diseño experimental y resultados para longitud del tallo (4 factores).....	40
6. Análisis de varianza para longitud de raíz (4 factores).....	44
7. Diseño experimental y resultados para longitud de raíz (4 factores).....	45
8. Análisis de varianza para número de hojas (4 factores).....	47
9. Diseño experimental y resultados para número de hojas (4 factores).....	47
10. Análisis de varianza para longitud de tallo (células libres).....	53
11. Diseño experimental y resultados para longitud del tallo (células libres).	54
12. Análisis de varianza para longitud de raíz (células libres).....	56
13. Diseño experimental y resultados para longitud de raíz (células libres)...	57
14. Análisis de varianza para número de hojas (células libres).....	59
15. Diseño experimental y resultados para número de hojas (células libres)..	59
16. Análisis de varianza para longitud del tallo (cultivos inmovilizados).....	63
17. Diseño experimental y resultados para longitud del tallo (cultivos inmovilizados).....	63



18. Análisis de varianza para longitud de raíz (cultivos inmovilizados).....	67
19. Diseño experimental y resultados para longitud de raíz (cultivos inmovilizados).....	68
20. Análisis de varianza para número de hojas (cultivos inmovilizados).....	73
21. Diseño experimental y resultados para número de hojas (cultivos inmovilizados).....	73



RESUMEN

Menos del 0.5% del total del agua del mundo está disponible para el consumo humano y la agricultura. La mayor parte del agua del planeta es salada. La salinidad del suelo interfiere en la germinación de semillas y el desarrollo posterior de la planta. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de tres microorganismos en plantas de *Solanum lycopersicum* cultivadas en medio hidropónico o medio de Murashige y Skoog (MS). Con el fin de aumentar la osmotolerancia de tomate se utilizaron bacterias de *Azospirillum brasilense* Cd silvestres, *Azospirillum brasilense* Cd transformadas con un plásmido que permite la biosíntesis de trehalosa y *Chlorella vulgaris*. Se observó una interacción positiva entre la bacteria transformada de *Azospirillum*, *Chlorella vulgaris* y plantas de tomate. Las plantas de tomate mostraron una tolerancia a la concentración de sal, como cloruro de sodio, hasta de 200 mM.



ABSTRACT

Less than 0.5% of total water in the world is available for human consumption and agriculture. The major part of the world's water is saline. Soil's salinity interferes in seeds' germination and posterior development of the plant. The objective of this work was to determine the effect of three microorganisms on *Solanum lycopersicum* plants grown on saline hydroponic medium or Murashige and Skoog (MS) medium. In order to increase the osmotolerance of tomato, *Azospirillum brasilense* Cd, *Azospirillum brasilense* Cd transformed bacteria with a plasmid harboring a trehalose biosynthesis gene-fusion and *Chlorella vulgaris* were used. A positive interaction between transformed *Azospirillum* and *Chlorella vulagris* and tomato plants was observed. Tomato plant's showed a salt concentration tolerance, as sodium chloride, up to 200 mM.



1. INTRODUCCIÓN

La necesidad de sustituir los métodos agrícolas convencionales por una agricultura sostenible menos agresiva con el medio ambiente, ha llevado a la investigación y desarrollo de nuevas técnicas que sean biotecnológicamente viables con un impacto mínimo para el ecosistema y para la salud humana, permitiendo aumentar la calidad nutricional y rendimientos de los cultivos.

La necesidad de incrementar la producción de alimentos de origen vegetal, la restricción de tierras aptas para la producción agrícola, la escasez de agua o la mala calidad de ésta para usarla en la agricultura, fueron algunas de las causas que estimularon a diversos investigadores a buscar alternativas para el desarrollo de las plantas. Como resultado se generó la hidroponía a nivel comercial.

La germinación de las semillas es un proceso de gran trascendencia para el establecimiento y sobrevivencia de las plantas en condiciones naturales. Después de que una semilla ha germinado, las plántulas son extremadamente vulnerables a los cambios ambientales y su destino depende de que las condiciones le sean propicias para llegar a la madurez. El estrés salino es el mayor factor limitante de la productividad de los cultivos agrícolas, por lo que profundizar en el estudio de la tolerancia a la salinidad es un objetivo prioritario de la agricultura sostenible.



En las especies silvestres de tomate y en las cultivables se ha detectado variabilidad en la respuesta a salinidad, siendo algunas más tolerantes que otras, de modo que éstas pueden utilizarse como fuente de genes para su mejora genética. Entre los tomates silvestres de gran interés para el mejoramiento genético de las especies cultivadas se encuentran: *S. chilense*, *S. peruvianum*, *S. pennellii*, *S. cheesmanii* y *S. pimpinellifolium* en las cuales se han detectado accesiones con tolerancia a salinidad (Rick 1982).

La hidroponía es ampliamente usada en el mundo para la producción de los cultivos más rentables. El tomate es una de las especies hortícolas que más se produce en hidroponía, debido a su elevado potencial productivo (el cual no es explotado completamente en campo), a su demanda nacional y mundial, así como a su alto valor económico, principalmente cuando se produce en los periodos en que no existe en campo (Lara, 1999).

Existen diversos estudios que confirman el potencial de varios microorganismos potencializadores de crecimiento en plantas, entre los que se encuentran las bacterias pertenecientes al género *Azospirillum* y microalgas de agua dulce donde sobresale *Chlorella vulgaris* como una de las más empleadas. Asimismo, existe evidencia de que la asociación de dichos microorganismos es benéfica ya que la bacteria actúa como ayudante de la microalga en su proceso de eliminación de nitrógeno y fósforo, además que potencializa el crecimiento de *C. vulgaris* tanto en términos de densidad poblacional como en biomasa, y de manera recíproca la microalga produce exudados extracelulares



que parece proveen a *Azospirillum* del carbono requerido para su crecimiento (De-Bashan y col., 2002 y 2004; Lebsky et al. 2001;Nalewajko *et al.*, 1980).

Los dos microorganismos son unicelulares, lo cual los hace de fácil cultivo y mantenimiento en el laboratorio, aun en los casos que solo se cuente con una infraestructura básica. Las condiciones de cultivo para los dos microorganismos se han conocido por décadas, son simples y pueden ser tanto autotróficas como heterotróficas. Aunque en general los dos microorganismos consumen sales inorgánicas similares, cada uno puede consumir diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, lo cual crea numerosas oportunidades para la investigación (Bashan y Col., 2007).

El presente estudio tiene como finalidad determinar el potencial de *Chlorella vulgaris* y *Azospirillum brasilense* como osmoprotectores de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) en cultivos hidropónicos a diferentes concentraciones de sal y tanto en células libres como inmovilizadas. Y a su vez determinar el potencian de los microorganismos para ser utilizados en la generación de biodiesel y biofertilizante.



2. ANTECEDENTES

2.1 *Azospirillum* spp.

a) Bacteria Promotora del Crecimiento en Plantas (BPCP)

Las bacterias promotoras de crecimiento en plantas (BPCP) son un grupo de diferentes especies de bacterias que pueden incrementar el crecimiento y productividad vegetal. Entre los organismos más conocidos están las especies pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Pseudomonas* y *Azospirillum*. Las cuales pueden clasificarse en dos grupos: (i) Bacterias promotoras de crecimiento en plantas, donde la bacteria afecta a las plantas suprimiendo otros microorganismos. Los mecanismos que estas bacterias utilizan pueden ser a través de su propio metabolismo (solubilizando fosfatos, produciendo hormonas o fijando nitrógeno), afectando directamente el metabolismo de la planta (incrementando la toma de agua y minerales), mejorando el desarrollo radicular, incrementando la actividad enzimática de la planta o “ayudando” a otros microorganismos benéficos para que actúen de mejor manera sobre las plantas (Bashan y Holguin, 1998). (ii) Bacterias promotoras de crecimiento en plantas con capacidad de control biológico, las cuales promueven el crecimiento de la planta al suprimir los fitopatógenos (De-Bashan y col., 2007).

Desde su re-descubrimiento por Döbereiner y col. (1976), las especies de *Azospirillum* son las más estudiadas. A pesar de muchos experimentos exitosos, tanto en condiciones de invernadero como de campo, su aplicación a gran escala no ha sido fácil, debido a problemas como la inconsistencia y lo poco previsible de los resultados obtenidos en



campo, especialmente cuando los agricultores tienen poco tiempo o conocimiento acerca de la inoculación con bacterias (Okon y Labandera, 1994). Este hecho ha desanimado a los cultivadores y a la industria. Sin embargo, durante los últimos años varios inoculantes comerciales producidos a pequeña escala han entrado lentamente en el mercado internacional, tanto en Europa como en Sur América (De-Bashan, 2007).

b) El Género *Azospirillum*

El género *Azospirillum* pertenece a la subclase alfa de las proteobacterias (Young, 1992). *Azospirillum spp.* es una bacteria muy versátil, con amplia distribución geográfica alrededor del mundo (Givaudan y Bally, 1991). Tienen en común la habilidad para fijar nitrógeno atmosférico bajo condiciones microaeróbicas pero la mayoría de ellas también pueden desnitrificar cuando el oxígeno es limitado y a su vez, puede asimilar NH_4^+ , NO_3^- , o NO_2^- (Hartman y Zimmer, 1994). El uso de fuentes de carbono para la producción de energía y biomasa oscila entre polímeros, ácidos orgánicos y azúcares; incluso se ha reportado la quimioautotrofia (Hartmann y Zimmer, 1994). Actualmente son reconocidas seis especies en el género *Azospirillum*. Las dos primeras en ser descritas fueron *A. lipoferum* y *A. brasilense*, siendo éstas las más ampliamente estudiadas.

La primera especie de *Azospirillum* se aisló en Holanda por Beijerinck (1925) a partir de suelos arenosos pobres en nitrógeno, y originalmente se llamó *Spirillum lipoferum*. Esta bacteria posteriormente se aisló de suelo adherido a pastos marinos secos en Indonesia (Becking, 1982) y Döbereiner y col. (Beijerinck, 1925) aislaron la bacteria, siendo los



primeros en reportar su amplia distribución en la rizosfera de diversos pastos tropicales.

Desde entonces, se han aislado cepas de *Azospirillum* a partir de la filosfera (superficie de la planta que se encuentra expuesta al aire) (Agarwala, 1991; Becking, 1982; Singh, 1992) de raíces de numerosos pastos (silvestres y cultivados), cereales y de plantas de diversas familias, así como de suelos tropicales, subtropicales, templados y árticos (Nosko y col., 1994; Penot y col., 1992; Rangel-Lucio y col., 1991).

Tarrand y col. (1978) propusieron a *Azospirillum* como género con base en diferencias morfológicas y fisiológicas entre varias cepas y en experimentos sobre homología del ADN (Falk y col., 1986) distinguiendo dos especies: *Azospirillum brasilense* y *A. lipoferum*. Después se describieron tres especies más: *A. amazonense* (Falk y col., 1985; Magalhaes y col., 1983), aislada de pastos en el área del Amazonas en Brasil; la especie halo-tolerante *A. halopraeferans*, asociada exclusivamente a raíces del pasto Kallar (Reinhold y col., 1987) y la especie que degrada pectina, aislada a partir de raíces de arroz, (*A. irakense*) (Khammas y col., 1989; Khammas y Kaiser, 1991). Sin embargo, la mayoría de cepas aisladas en los últimos años pertenecen a las especies *A. brasilense* o *A. lipoferum* (Krieg y Döbereiner, 1986).

La bibliografía en general considera a *Azospirillum* como uno de los géneros de rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas (BPCP) más estudiados en la actualidad debido a su capacidad de mejorar significativamente el crecimiento y desarrollo, así como el rendimiento de numerosas especies vegetales de interés agrícola (Strzelczyk y col., 1994).



En los últimos años, la fijación del nitrógeno por especies del género *Azospirillum spp.* ha recibido considerable atención, por la capacidad de estos microorganismos de formar una estrecha relación con numerosas especies de plantas. La capacidad de *Azospirillum sp.* para estimular el crecimiento ha sido demostrada en decenas de experimentos, tanto de campo como de invernadero. Varios son los mecanismos que se han sugerido como responsables del efecto estimulador observado en las plantas inoculadas y en numerosos estudios de inoculación con esta bacteria., además del mejor crecimiento de las plantas, fueron observados incrementos en el contenido de aceites, principal materia prima para la producción de biodiesel (Bashan y col., 2003; Tien y col., 1979; Barea y col., 1976; Cassán y col., 2003; Horemans y col., 1986).

c) Efecto de *Azospirillum* sobre las plantas

La inoculación de plantas con *Azospirillum* puede dar como resultado un cambio significativo en varios parámetros de crecimiento, los cuales pueden afectar o no el rendimiento de la cosecha. El (los) mecanismo(s) de acción de *Azospirillum* sobre las plantas no ha(n) sido todavía elucidado(s). La mayoría de los estudios sobre la asociación *Azospirillum*-planta se han llevado a cabo en cereales y pastos (Patriquin y col., 1983) y, en menor grado, en otras familias de plantas (Bashan y col., 1989; Crossman y Hill, 1987; Dayakar y col., 1991; Puente y Bashan, 1993; Russel y Ifiorah, 1995). Los estudios han demostrado los siguientes resultados: i) incremento en peso seco total, concentración de nitrógeno en follaje y grano, número total de espigas, espigas fértiles, y mazorcas; ii) floración y aparición de espigas más temprana; iii) incremento



en el número de espigas y granos por espiga; iv) plantas más altas e incremento en el tamaño de la hoja y v) tasas de germinación más altas (Carrillo-Garcia y col. 2000; Ozturk y col. 2003; Saubidet y col. 2002).

En algunos estudios de campo realizados con cereales se ha llegado a observar una promoción del crecimiento vegetativo (Kapulnik y col., 1983). También se ha reportado un efecto a simple vista sobre el crecimiento de varios vegetales como tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), berenjena (*Solanum melongena* L.), pimiento (*Capsicum annuum*) y algodón (*Gossypium barbadense*) (Bashan y col., 1989).

El incremento en el rendimiento total de plantas crecidas en el campo por efecto de la inoculación con *Azospirillum*, varió entre 10 y 30% (Fulchieri y Frion, 1994; Rao y col., 1983; Watanabe y Lin, 1984).

También se ha observado un incremento en el desarrollo del sistema de raíces, tanto en longitud como en volumen (De-Bashan y col., 2007). Dos factores básicos que contribuyen a la complejidad de la respuesta de la planta a la inoculación son la variedad de la planta cultivada, ya que cada una responde de distinta manera a la inoculación (Arsac y col., 1990; Bouton y Zuberer, 1979).

Los efectos más sobresalientes de la inoculación vegetal con *Azospirillum* son los diversos cambios morfológicos que sufre el sistema radicular. Estos cambios se encuentran directamente relacionados con la concentración del inóculo; cuando éste es superior a los niveles óptimos tiene efectos inhibitorios, mientras que dosis bajas no



causan efecto. El nivel de inoculación óptimo en semillas y plántulas para muchos cereales, y en vegetales y plantas de cultivo comerciales, se ha observado que es de alrededor de 105-106 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) (Bashan, 1986; Bashan y Levanony, 1989; Smith y col., 1984), mientras que para el maíz es de 107 UFC/mL (Fallik y col., 1988). Una concentración de inóculo de 108-1010 UFC/mL generalmente inhibe el desarrollo radicular (Barbieri y col., 1986; Bashan, 1986; Bashan, 1990). Estos datos no han revelado cuántas células bacterianas por semilla o plántula se requieren para obtener una respuesta vegetal positiva. (tomado de De-Bashan y col., 2007).

d) Posibles mecanismos de acción

No se ha definido el mecanismo principal por medio del cual *Azospirillum* promueve el crecimiento vegetal. Sin embargo, se han propuesto algunos mecanismos de acción: i) fijación de nitrógeno, lo cual contribuye con nitrógeno a la planta; ii) efectos hormonales, los cuales promueven el metabolismo y crecimiento vegetal; iii) incremento en el crecimiento del sistema completo de raíces, lo cual puede estar relacionado con cambios hormonales y que origina una mayor capacidad de absorción de agua y minerales; iv) alteración del funcionamiento de la membrana por medio de moléculas de comunicación celular (moléculas de este tipo de bajo peso molecular, pueden ser responsables de alterar actividad y funciones de membrana relacionadas con la absorción de iones); y v) la hipótesis aditiva, la cual propone la intervención de todos los mecanismos mencionados arriba. Se desconoce si estos mecanismos se expresan dependiendo de la cepa de *Azospirillum*. Sin embargo, ya que se ha demostrado que, en



la mayoría de los casos, las cepas alteran la proporción brotes/raíces (peso seco) de la planta; se propone que las bacterias de este género ejercen un efecto multiparamétrico sobre la planta (Bashan y Dubrovsky, 1996; Bashan y Holguin, 1997).

Varios estudios refieren que el principal mecanismo que la promoción del crecimiento vegetal, está relacionado con la capacidad de este microorganismo para producir o metabolizar compuestos de tipo fitohormonas, tales como ácido indol acético; citocininas (Tien y col., 1979); gibberelinas (Bottini y col., 1989) y etileno (Strzelczyk y col., 1994), así como de otras moléculas reguladoras del crecimiento vegetal, tales como el ácido abscísico (ABA) (Perring y col. 2007) y la diamina cadaverina (CAD) (Cassán y col., 2003; Kapulnik y col., 1983; Canto y col., 2004). Recientemente, un tipo de cepa *A. brasilense* se ha descubierto que es capaz de promover diversos parámetros de crecimiento en la microalga unicelular *Chlorella spp.*, y cambia la citología y la producción de lípidos y de pigmentos por la microalga (De-Bashan y col., 2004).

e) *Azospirillum brasilense* y la sobreexpresión de Trehalosa

La bacteria *Azospirillum brasilense* promueve el crecimiento de muchos cultivos de importancia agrícola debido a que sintetiza sustancias que son útiles para las plantas y que promueven la elongación de las raíces, lo que hace más eficiente la absorción de agua y nutrientes minerales.

Bajo exposición a algún tipo de estrés, las plantas exhiben un amplio rango de mecanismos adaptativos moleculares y bioquímicos. Estos comprenden cambios en la



morfología y desarrollo, tales como la inhibición del crecimiento de la raíz y ajustes metabólicos, entre otros, los cuales involucran la síntesis de solutos compatibles (osmoprotectores) que contrarrestan la deshidratación al proteger las membranas, enzimas y otras estructuras subcelulares contra el daño irreversible, desnaturalización y agregación de proteínas sin afectar las funciones fisiológicas.

Entre los diferentes osmoprotectores, la trehalosa es uno de los más efectivos para contrarrestar diversos tipos de estrés abiótico. La trehalosa (α -D-glucopiranosil-1,1- α -D-glucopiranosido) es un disacárido no reductor presente en una amplia variedad de organismos conocidos como anhidrobiontes, los cuales incluyen ciertas especies de plantas, hongos, bacterias e invertebrados, que son capaces de “revivir” en presencia de agua en unas cuantas horas después de haber estado completamente deshidratados por meses o años. Se conocen 5 vías para la biosíntesis de la trehalosa, pero la mejor caracterizada y presente en muchas bacterias y plantas consiste en la condensación de UDP-glucosa y glucosa-6-fosfato mediante la trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS) para formar trehalosa-6-fosfato, la cual es subsecuentemente defosforilada a trehalosa por la trehalosa-6-fosfato fosfatasa (TPP) (Rodríguez-Salazar y col., 2009).

Es por lo anterior que se han realizado estudios en los cuales analizó el efecto en pruebas de invernadero, de la inoculación de plantas con la bacteria *Azospirillum brasilense* silvestre (Cd) y modificada genéticamente para sobreproducir trehalosa (BIF), esto con la finalidad de verificar la posible tolerancia al estrés. Algunos de estos estudios son los efectuados por Zarazua y col. (2009) donde se concluyó que la inoculación con



Azospirillum brasilense en plantas de caña y maíz genera mayor peso y longitud; y el de (Rodríguez-Salazar y col., 2009) donde reportan que las plantas de maíz inoculadas con las diferentes cepas de *A. brasilense* se recuperaron mucho mejor que las plantas no inoculadas y la relación observada entre la acumulación de trehalosa en *A. brasilense* y el incremento significativo en la biomasa de las plantas.

2.2 Microalgas

a) Características metabólicas y subproductos.

Las microalgas son un conjunto heterogéneo de microorganismos fotosintéticos unicelulares procariontes (cianobacterias) y eucariontes, que se localizan en hábitats diversos tales como aguas marinas, dulces, salobres, residuales o en el suelo, bajo un amplio rango de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes; se les considera responsables de la producción del 50% del oxígeno y de la fijación del 50% del carbono en el planeta. Su biodiversidad es enorme, se han identificado alrededor de 40,000 especies aunque se estima que existen más de 100,000 de las cuales con frecuencia se desconoce su composición bioquímica y metabolismo. Las microalgas se clasifican de acuerdo a varios parámetros tales como pigmentación, ciclo de vida, morfología y estructura celular. Las especies más estudiadas para aplicaciones biotecnológicas corresponden a las algas verdes y a las diatomeas (Arredondo y Vázquez-Duhalt, 1991; Sheehan y col., 1998; Hu y col., 2008).



Desde la antigüedad las microalgas se han usado como alimento humano, sin embargo es hasta ahora que han atraído la atención para la investigación de su potencial biotecnológico; recientemente, la atención se ha enfocado a su alto valor químico y farmacéutico como son las ficobiliproteínas obtenidas de las algas rojas y cianobacterias, agentes anticancerígenos de las cianobacterias, β -carotenos de la *Dunaliella*, xantofilas de las algas verdes y diatomeas, ácidos grasos poliinsaturados (por ejemplo ácido eicosapentaenoico, ácido docosahexaenoico y ácido araquidónico) de las diatomeas y criptofitas y astaxantinas obtenidas de *Haematococcus* (Chen., 1996; Ip y Chen, 2005).

b) *Chlorella sp. (Chlorophyceae)*

Chlorella sp. es una microalga acuática, unicelular, no motil. Fue una de las primeras en ser aisladas como cultivo puro por Beijerinck en 1890 (Oh-Hama y Miyachi, 1992). Ha sido ampliamente utilizada en estudios de fotosíntesis y respiración. (Ilangoanet y col. 1998) y mucho del conocimiento en la producción de carbohidratos por las microalgas se ha obtenido de esta especie (Hosono y col. 1994; Ramazanov y Ramazanov 2006). Desde finales de los años 1940s, la atención científica se ha encauzado hacia el potencial del cultivo masivo esta microalga para la producción de compuestos de alto valor económico y bajo volumen, tales como pigmentos para la industria alimenticia y para el mercado de productos para la salud (Richmond 1990), y su aplicación en el tratamiento de aguas residuales (Oswald 1992).

Recientes investigaciones han revelado que la microalga *Chlorella spp.*, la cual crece rápidamente y acumula cantidades significativas de caroteinoides secundarios en la



oscuridad, es un candidato potencial para la producción de astaxantinas a gran escala; los carotenoides antioxidativos se producen con la finalidad de proteger a la célula contra el daño oxidativo; lo que implica que la luz no es un potencializador obligatorio para la carotenogénesis, así como para otros metabolitos, lo cual se ha demostrado en diversos trabajos (Arredondo y Vázquez-Duhalt, 1991; Sheehan y col., 1998). El quetocarotenoide rojo astaxantina es un fuerte antioxidante que puede ser empleado en la prevención de ciertos tipos de cánceres, y mejora la capacidad reproductiva y el sistema inmune (Ip y Chen, 2005).

Las microalgas con elevadas productividades lipídicas son deseables para la elaboración de biodiesel, razón por la cual la cantidad de lípidos contenidos en la biomasa y la velocidad de crecimiento, sumados a la eficiencia metabólica y la robustez del microorganismo, son parámetros relevantes para su selección, y entre ellas se encuentran las microalgas de especies *Diatomeas* y *Chlorellas* (Chisti, 2007; Rosenberg y col., 2008), de cuyas especies sobresale *Chlorella vulgaris* por ser un microorganismo utilizado comúnmente en varias aplicaciones industriales (De-Bashan y col., 2004).

2.3 Simbiosis microalga-bacteria.

En ambientes naturales, las microalgas están siempre asociadas a bacterias (Mouget y col., 1995). Se ha comprobado que muchas de estas bacterias son promotoras de crecimiento en plantas, y como las microalgas se consideran plantas unicelulares, estas bacterias podrían aumentar su crecimiento y su actividad metabólica (Arredondo y Vázquez-Duhalt, 1991). En tal sentido, el uso de *Azospirillum sp.*, una bacteria



promotora del crecimiento de plantas (BPCP) de origen agrícola, está a la vanguardia de este tipo de estudios. *Azospirillum sp.* es la BPCP más estudiada, no es específica de alguna planta en particular y puede colonizar eficientemente raíces sumergidas en soluciones de crecimiento, y en consecuencia aumentar el crecimiento de las plantas (Bashan y Holguín, 1997).

Los estudios básicos de las interacciones entre la bacteria promotora de crecimiento de plantas *Azospirillum* y plantas (realizados principalmente con cereales) son difíciles debido a las múltiples funciones de los tejidos vegetales y a las numerosas posibles interacciones. De esta manera, existe una significativa mayor cantidad de información sobre la bacteria que sobre la interacción misma (Steenhoudt y Vanderleyden 2000; Spaepen y col. 2007).

De acuerdo a los estudios realizados, la microalga responde a la presencia de *Azospirillum* de manera similar a las plantas superiores, aumentando su crecimiento y cambiando su metabolismo (Mazur y col., 2001); esto se puede explicar debido a que la definición básica de plantas verdes es que tienen clorofila *a* y *b*, almidón como material de almacenamiento dentro del cloroplasto y pared celular celulósica (Raven y col. 1992); Como tal, las microalgas verdes cumplen con los requisitos básicos de una planta verde, además hay entre un 70 a 98% de similitud genética entre las plantas superiores y las algas (Devereux y col. 1990); en consecuencia, una planta unicelular puede considerarse una planta; de igual forma, las mismas fitohormonas que afectan a las plantas afectan a las microalgas (AIA, AIB, Ácido jasmónico, giberelinas, citocininas) (Dibb-Fuller y



Morris 1992; Mazur y col. 2001; Oh-Hama y Miyachi 1992; Stirk y col. 2002);y uno de los principales mecanismos propuestos en la actualidad para explicar la promoción del crecimiento vegetal en plantas inoculadas con *Azospirillum spp.* se relaciona con su capacidad de producir y metabolizar compuestos reguladores del crecimiento vegetal o fitohormonas (Okon y Labandera-González 1994), entre los que se encuentran:

Auxinas: Varias auxinas de ocurrencia vegetal han sido descritas en la literatura como producto del metabolismo bacteriano. En cultivos puros de *Azospirillum spp.*, además de la forma principal, el ácido indol-3-acético (AIA), se han identificado otros compuestos indólicos de interés, tales como el ácido indol-butírico (IBA) (Costacurta y col., 1994), indol láctico (Crozier y col., 1988), indol acetamida (Hartmann y col., 1983), indol acetaldehído (Costacurta y col., 1994), indol etanol e indol metano, triptamina, antranilato y otros compuestos indólicos no caracterizados aún (Crozier y col., 1988).

Las auxinas de origen microbiano y en particular, las producidas por *Azospirillum spp.* podrían tener un interés significativo para la industria agrícola. Estos compuestos producidos en forma continua en baja concentración en el exterior de las raíces o en el interior de la planta proveen una dosis hormonal constante que resulta suplementaria y beneficiosa para el crecimiento vegetal y un sistema mejorador a la aplicación exógena de formas sintéticas en el suelo cultivado (Cassán y col., 2003).



Gibberalinas: Se han determinado la capacidad de varias cepas de *Azospirillum* de producir compuestos tipo GA₁, GA₃, iso-GA₃, GA₅, GA₉, GA₁₉ y GA₂₀ (Piccolli y Bonitti., 1996; Piccolli y col., 1998).

Citocininas: Son compuestos que en presencia de concentraciones de auxinas, inducen la división celular en cultivos o tejidos vegetales; por lo que esto nos lleva a la conclusión de que atribuir el fenómeno promotor del crecimiento solo a una sustancia por parte del microorganismo, resulta un tanto simplista, sobre todo considerando la variabilidad de la respuesta y las numerosas especies que responden positivamente a la inoculación (Cassán y col., 2007).

Muchos de los organismos de la rizósfera, entre los que se detallan bacterias son capaces de sintetizar citocininas. Berea y col. (1976) encontraron que al menos el 90% de las bacterias aisladas de la rizosfera de cultivos de interés agronómico, pueden producir compuestos tipo-citocininas. En particular, la producción de citocininas por *Azospirillum* ha sido mayormente estudiada en *A. brasilense*, donde se ha determinado su capacidad para producir moléculas tipo-citocininas, entre las que se encuentran iP, (9R) iP y Z (Cacciari y col., 1989; Horemans y col., 1986).

Etileno: Junto con auxinas, gibberalinas y citocininas, el etileno es una hormona muy importante en el crecimiento desarrollo de las plantas (Burg, 1962). Existe muy poca información disponible, relacionada a la producción de etileno por *Azospirillum* y su efecto sobre el crecimiento vegetal. Trabajos de Primrose y Dilworth (1976)



determinaron la capacidad de *Azospirillum* de producir etileno en medio de cultivo químicamente definido, y posteriormente Strzelczyk y col. (1994) comprobó la capacidad de este microorganismo para producir este compuesto *in vitro* sobre diferentes fuentes carbonatadas. Los resultados determinaron que la bacteria podía sintetizar etileno.

Ácido Abscísico (ABA): Es una hormona vegetal, involucrada en diferentes procesos fisiológicos del crecimiento y desarrollo de la planta, como la dormición de las yemas y semillas, la maduración de los frutos y en situaciones de estrés ambiental desfavorables como déficit hídricos o estrés salinos; el ABA favorece la economía del agua dentro de la planta, por su efecto regulador sobre la apertura y cierre de estomas a nivel de las hojas (Davies, 1995).

Es muy escasa la información documentada sobre la identificación de ABA en cultivos *in vitro* de *Azospirillum* y su correlación al crecimiento de la planta. Algunos trabajos como el de Kolb y Martin (1985) y Rahman y col. (2002) reportan la producción de ABA por *A. brasilense*; y otros como reportan un aumento en la producción de etileno significativamente superior a los controles, al evaluar la respuesta en el crecimiento de plántulas de tomate inoculadas con *A. brasilense*.

Por otro lado, recientes estudios han demostrado que la co-inmovilización de *Chorella vulgaris* con *Azospirillum brasilense* incrementa el crecimiento y prolonga el periodo de vida de la microalga, aunque los cambios más profundos ocurren a un nivel celular con



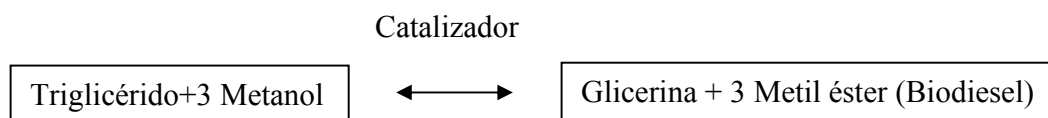
una acumulación de lípidos, los cuales contienen una gran variedad de ácidos grasos; las células se multiplican más rápidamente, creando poblaciones de microalgas significativamente más grandes. También aumenta la concentración de pigmentos de la microalga, característica importante para los organismos fotosintetizadores que derivan su energía de la luz, y el nivel de lípidos, permitiendo una mayor supervivencia de la microalga en el agua (Bashan y col., 2003; González y Bashan 2000; Lebsky y col. 2001).

Algunos estudios como el de Lebsky y col. (2001) reportan que en presencia de *A. brasilense* la microalga permaneció en fase de crecimiento exponencial. Al parecer, hay interacciones comensalísticas entre la microalga y la BPCP.

La idea de utilizar BPCP para mejorar el crecimiento de microorganismos acuáticos de uso económico es relativamente nueva e inexplorada. La forma en que las BPCP afectan el crecimiento de estos microorganismos es aún desconocida. (De-Bashan y Bashan, 2007).

2.4 Biodiesel y Bioetanol a partir de microalgas.

Según Campbell (2008), el biodiesel es un combustible que consiste de ésteres monoalquílicos que son derivados de aceites orgánicos, plantas o animales, a través del proceso de transesterificación. La reacción de transesterificación del biodiesel es muy simple:



El triglicérido es una molécula muy compleja que las plantas y animales usan para almacenar energía (Campbell, 2008).

La sustentabilidad de la industria del biodiesel requiere de materias primas alternas que permitan operar continuamente y a gran escala (Liu y Zhao, 2007); por ello, una alternativa prometedora es la obtención de aceites a partir de cultivos de microalgas.

Los lípidos comprendidos en las microalgas por lo general constituyen del 20 al 50% de su peso seco, sin embargo se han reportado valores en un rango del 1 al 80%, o incluso superiores (Arredondo y Vázquez-Duhalt, 1991; Chisti, 2007). El contenido oleaginoso y el perfil de composición lipídica de las microalgas, puede ser controlado en función de las condiciones de cultivo, principalmente mediante la limitación de nutrientes (Hu y col., 2008; Schenk y col., 2008).

La producción de biodiesel a partir de microalgas es un proceso conformado, en términos generales, por las etapas elementales de producción de biomasa rica en lípidos, recuperación o cosecha de la biomasa, extracción de lípidos y transesterificación (Chisti, 2008; Schenk y col., 2008). Adicionalmente, existe la posibilidad de obtener subproductos (proteína, carbohidratos, biopolímeros, pigmentos, biogás, etc.) a partir de la biomasa microalgal residual una vez que los lípidos han sido extraídos (Gouveia y



Oliveira, 2009). Inclusive, resulta factible el empleo de algunos de estos residuos en la alimentación humana o animal y en la producción de fertilizantes o de otros biocombustibles (Arredondo y Vázquez-Duhalt, 1991).

La ventaja competitiva más importante del biodiesel de microalgas, consiste en los rendimientos lipídicos por unidad de área considerablemente superiores a los obtenidos con plantas oleaginosas (Li y col., 2007; Williams, 2007; Dismukes y col., 2008; Hu y col., 2008; Rittmann, 2008; Schenk y col., 2008; Meng y col., 2009; Rodolfi y col., 2009; Waltz, 2009).

2.5 Los microorganismos como fuente de biofertilizante.

Ante el uso indiscriminado de los fertilizantes químicos que ha ocasionado tierras improductivas o con altos niveles de contaminación y sin potencial agrícola; se plantea el uso de biofertilizantes que no contaminan ni degradan la capacidad productiva del suelo, son regeneradores de su población microbiana y tienen una función protectora del sistema radicular de la planta contra microorganismos patógenos.

Los biofertilizantes son preparados de microorganismos aplicados al suelo y/o planta con el fin de sustituir parcial o totalmente la fertilización sintética así como disminuir la contaminación generada por los agroquímicos. Los microorganismos utilizados en los biofertilizantes son clasificados dentro de dos grupos: El primer grupo incluye microorganismos que tienen la capacidad de sintetizar sustancias que promueven el crecimiento de la planta, fijando nitrógeno atmosférico, solubilizando hierro y fósforo



inorgánico y mejorando la tolerancia al stress por sequía, salinidad, metales tóxicos y exceso de pesticidas, por parte de la planta. El segundo grupo incluye microorganismos los cuales son capaces de disminuir o prevenir los efectos de deterioro de microorganismos patógenos (Bashan y Holguin, 1998; Lucy y col., 2004). Puede haber microorganismos que puedan estar en los dos grupos, que además de promover el crecimiento de la planta, inhiba los efectos de microorganismos patógenos (Kloepper y col., 1980).

Son utilizados especialmente en cultivos de agricultura intensiva; no es más que la mezcla de microorganismo, agua y enzimas. Dicha mezcla se calienta y, al alcanzar una determinada temperatura, los microorganismos se rompen y liberan los aminoácidos. Cuando se suministra este abono sobre los cultivos, la planta absorbe los aminoácidos y evitándose que esta los genere y siendo su crecimiento mucho más rápido.

Estos nuevos “biofertilizantes”, al ser de origen natural, mejoran la resistencia de las plantas y su calidad sin hacerles daño. Esto es posible porque los microorganismos contienen una alta concentración de aminoácidos, fitohormonas, oligoelementos, antioxidantes y polisacáridos y, por lo tanto, es un complemento biológico excelente (Arshad y Frankenberger, 1991).

Para la elaboración de los biofertilizantes generalmente se extraen todas las sustancias a través de procedimientos respetuosos del medio ambiente y, por ende, el resultado es un



producto muy natural. Todas estas sustancias actúan sobre las células en el crecimiento de las plantas, sobre el tejido radicular secundario, sobre la multiplicación de los nuevos brotes, sobre las flores y obtienen frutos mucho más consistentes y uniformes.

Existen antecedentes de biofertilizantes elaborados con la bacteria *Azospirillum brasilense*, los cuales lograron incrementar hasta en 30 por ciento la producción de gramíneas, mediante la estimulación del crecimiento de las plantas agrícolas.

Por lo anterior se considera, como uno de los objetivos de este trabajo, determinar el potencial de los microorganismos empleados (*Azospirillum brasilense* y *Chlorella vulgaris*) en los cultivos hidropónicos como biofertilizantes.

2.6 Efecto de la salinidad en cultivo de plantas superiores

El impacto negativo de la salinidad en el crecimiento de las plantas en zonas de regadío y en regiones áridas del mundo sigue siendo un problema importante (Meloni y col., 2008; Nasr y col., 2012; Ríos-Gómez y col., 2010; Velardey col., 2003). La salinización es un proceso de enriquecimiento del suelo con sales más solubles que el sulfato de calcio, que son por lo general cloruros y sulfatos de sodio y magnesio. Esto ocasiona que los valores de la presión osmótica del suelo se incrementen, con evidentes repercusiones sobre la vegetación, lo que interfiere con el crecimiento de la mayoría de los cultivos (Porta y col., 1999).



Las plantas desarrollan una gran cantidad de mecanismos bioquímicos y moleculares para hacer frente al estrés salino. Estos procesos incluyen: compartimentación de solutos compatibles, el cambio en la ruta fotosintética, y la alteración en la estructura de la membrana, la inducción de enzimas antioxidantes y la inducción de hormonas de las plantas (Abd- El y col., 2008) y muchas otras plantas hacen redirigir su crecimiento cuando se exponen a estrés. La hipótesis es que esas respuestas morfogenéticas son parte de una estrategia general de aclimatación que constituye una respuesta de «defensa» de las plantas (Potters y col., 2007). Los efectos iniciales de aumento de la salinidad del suelo son muy similares a las observadas cuando las plantas están expuestas a la sequía. Las reducciones en el potencial hídrico foliar reducirán la conductancia estomática y, finalmente, inhiben el metabolismo fotosintético (Zribi y col., 2009).

Numerosos estudios han argumentado que en ambientes salinos, la adaptación a la salinidad durante la germinación y las primeras etapas de crecimiento de las plántulas, son fundamentales para determinar el éxito del establecimiento. Incluso en las últimas etapas de desarrollo, la salinidad puede afectar a la distribución de plantas en ciertas especies (Tobe y col., 2000). Los requisitos térmicos y agua para la germinación varían entre las especies, y que es el punto que determina cuándo y dónde comienza el crecimiento de las plantas (Guttermann, 1993). Además, la etapa de plántula es el más vulnerable en el ciclo de vida de las plantas, de acuerdo con esto, la respuesta de la germinación de las diferentes especies a los parámetros ambientales, determinar su distribución en ambientes salinos. El efecto de la salinidad sobre la germinación de semillas en muchas especies es no sólo en la disminución del porcentaje de germinación,



sino también en el aumento de tiempo requerido para la germinación completa (Ayers y col., 1952).

La salinidad en los suelos para cultivo se ha visto incrementada debido a las aguas de riego empleadas, a la excesiva fertilización y al proceso de desertificación, por lo que es necesario desarrollar estrategias que incluyan tanto cultivos resistentes como técnicas para disminuir el estrés ocasionado por la salinidad (Bacilio y col., 2004).

2.7 Tomate (*Solanum Lycopersicum*)

El tomate es la hortaliza más cultivada en el mundo, con una superficie total de cultivo que ronda los 2,5 millones de hectáreas y representa uno de los componentes más frecuentes de la dieta alimenticia Mexicana. Basta revisar los anuarios estadísticos para constatar que es mundialmente consumido y apreciado. Su empleo está generalizado en el arte culinario por su color, aroma y sabor. Por su apetencia y alto nivel de consumo se considera una de las principales fuentes de vitaminas y minerales de muchos países (Santiago y col., 1998).

La producción de tomate en México representa una derrama económica muy importante, misma que arrojó una producción total en el año 2012 de 2'838,369.87 toneladas, equivalente a un valor de producción de \$13'146,384.35 de miles de pesos, sobresaliendo en su producción el estado de Sinaloa (1'039,367.64 tons), seguido en



importancia los estados de Baja California (189,635.96 tons), Michoacan (171,038.52 tons), Jalisco (156,660.03 tons) y Zacatecas (139,131.08 tons) (SAGARPA, 2013).

Diversos estudios hidropónicos han demostrado que el desarrollo de tomate se ve poco afectado por la salinidad. En contraste, los datos derivados de las plantas que crecen en suelos salinos pueden mostrar que inducen reducciones de hasta el 50% en la longitud de las raíces (Cortés y Saavedra, 2007). El potencial de la salinidad para inhibir la extensión de la raíz está demostrado por la evidencia de que la salinidad puede reducir directamente la extensibilidad de la pared celular, además que algunos análisis anatómicos y bioquímicos del tejido de la raíz han demostrado que la salinidad y el estrés osmótico acelera el proceso de maduración (Snapp y Shennan, 1992).

Dentro de los números factores que determinan el desarrollo y producción del tomate, la nutrición es uno de los fundamentales. El cultivo es exigente en niveles de nutrición mineral apropiados debido al gran volumen de frutos producidos por unidad de superficie. La cantidad de nutrientes encontrados en los frutos cosechados es relativamente superior cuando se les compara con otras hortalizas, especialmente en potasio (Menezes Dos Santos, 1992).



3. JUSTIFICACIÓN

La salinidad del suelo como resultado del empleo excesivo de pesticidas, monocultivos y la utilización de aguas residuales, aunado con la creciente escases de agua dulce para consumo humano y para la agricultura, exige la búsqueda de técnicas alternativas que permitan el uso de sustratos con altas concentraciones de sales y que a su vez promuevan el desarrollo de las plantas aumentando su osmotolerancia.

Dichas técnicas deben proporcionar soluciones amigables con el medio ambiente, y en este sentido la utilización de microorganismos cuya presencia es natural en una variedad de hábitats como es el caso de *Azospirillum brasiliense* y *Chlorella vulgaris*, ofrecen un alternativa cuyo potencial abarca no solo la promoción del crecimiento de las plantas superiores, sino también un efecto colateral benéfico: el posible incremento en la generación de aceite de origen microalgal.



4. OBJETIVOS

Determinar el potencial de *Chlorella vulgaris* y *Azospirillum brasilense* como osmoprotectores de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) en cultivos hidropónicos a diferentes concentraciones de sal.

Objetivos Particulares

- Determinar el efecto de *Azospirillum brasilense* Cd silvestre y modificada genéticamente en las características morfológicas de las plantas de tomate crecidas en diferentes concentraciones de sal.
- Evaluar el efecto de *Chlorella vulgaris* en las características morfológicas de las plantas de tomate crecidas en diferentes concentraciones de sal.
- Comparar el efecto de los microorganismos libres e inmovilizados en las características morfológicas de las plantas de tomate crecidas en diferentes concentraciones de sal.
- Establecer si el tipo de medio de cultivo: Murashige y Skoog o hidropónico tiene un efecto en el desarrollo vegetal.



5. HIPÓTESIS

La asociación microbiana, *Chlorella vulgaris* o *Azospirillum brasilense* Cd, tiene un efecto positivo en cultivos hidropónicos salinos de tomate (*Solanum lycopersicum*).



6. MATERIALES Y MÉTODOS

I. Medios empleados: El experimento se realizó utilizando dos tipos de medio frecuentemente utilizados en el cultivo vegetal: MS (Murashige y Skoog, 1962) e Hidropónico (Jensen y Malter, 1995), esto con la finalidad de realizar una comparación y determinar el mayor desarrollo (planta/microorganismo), ver anexos I y II.

II. Microorganismos y Cultivo

a) Microalgas. Previo al montaje de los experimentos, los cultivos de la microalga *Chlorella vulgaris* (UTEX 2714) (Cv) fueron purificados de sus bacterias asociadas de la siguiente manera (González y Bashan, 2000):

Se tomó 1mL del cultivo y se centrifugó a 10,300g por dos minutos. El pellet resultante fue suspendido en 1 mL de Medio Basal Bold (Stein, 1973), ver anexo III, suplementado con una mezcla de 300 µg/mL de una mezcla de antibióticos: ampicilina, penicilina y tetraciclina, sigma®, St. Louis, Mo., e incubado en oscuridad por 72 horas.

Este procedimiento fue repetido 3 veces hasta que no se presentó ningún crecimiento bacterial asociado con la microalga (la actividad antibiótica no inhibe la capacidad de crecimiento microalgal, e incluso la población microalgal se incrementa durante el proceso de purificación, evitando que ésta se vuelva endófito con las posibles bacterias presentes).



Posteriormente se efectuó el lavado de las colonias con el mismo medio estéril y por último se agregaron 40mL de medio Basal Bold estéril dejándolas en crecimiento exponencial en matraces Erlenmeyer por un periodo de 14 días (2000 lux, 16/8 horas luz/oscuridad $30\pm 2^{\circ}\text{C}$), hasta alcanzar una concentración de 1×10^6 cel/mL, misma que fue verificada mediante conteo en cámara Neubauer o por espectrofotometría a una longitud de onda de 550 nm.

b) Bacteria Promotora del Crecimiento en Plantas (BPCP): Las bacterias *Azospirillum brasilense* Cd cepas silvestre DSMZ-1843 (AW) y modificada con el plásmido pBBR1M:BIF (AB), obtenidas del CEIB-UAEM, se crecieron a 2000 lux y 30°C por 72 horas en medio rojo Congo (Rodríguez-Cáceres, 1982), ver anexo IV, sólido y líquido suplementado con ampicilina (400 $\mu\text{l/l}$ de una solución a 40 mg/ml) y gentamicina (380 $\mu\text{l/l}$ de una solución a 40 mg/ml), este último para asegurar la expresión del gen ReOtsA presente en la cepa modificada, y el cual permite la acumulación de trehalosa en exceso (Rodríguez-Salazar y col., 2009; Wang y col., 2004). Posteriormente las cepas fueron probadas en placas de agar Rojo Congo. La concentración celular fue ajustada a 1×10^9 cels/mL a $30\pm 2^{\circ}\text{C}$. antes de su uso como inoculante.



c) Germinación y establecimiento de las plantas de Tomate: Las semillas de *Solanum Lycopersicum* var. Cherry fueron desinfectadas y germinadas con previa eliminación de la cubierta o testa; estas se sumergieron en agua desionizada estéril, con cloro (1/3 parte) y una gota de jabón por 15 minutos; posteriormente se realizaron enjuagues con 3 baños de agua desionizada estéril (10 min., 5min. y 1 min.).

Una vez realizada la desinfección de las semillas se procedió a colocarlas en cajas de Petri plásticas estériles con medio MS estéril por 10 días a 2000 lux en periodos de luz/oscuridad 16/8 h, ya que es el lapso en el que se observó la germinación del embrión y el inicio de la formación de estructuras como raíz y hojas (Figura 1).



Figura 1: Para el experimento se utilizaron plántulas de 10 días de edad, debido a que se observó que en esta etapa no genera hojas, y es fácil evidenciar su desarrollo.



III. Diseño del Experimento:

Células Libres: Se realizaron tres grupos de diseños experimentales. El primero fue un diseño multifactorial 2x3x6 con dos tipos de medio de cultivo (Murashige y Skoog e Hidropónico), tres microorganismos [*Chlorella vulgaris* (CV), *Azospirillum brasilense* Cd (AW) y *Azospirillum brasilense* BIF (AB)] y seis salinidades como cloruro de sodio (0, 50, 100, 150, 200 y 250 mM), ver Tabla 1. En esta etapa las células microbianas se cultivaron de manera libre en el medio. Para determinar el efecto de los parámetros anteriores en el medio de cultivo, se utilizaron cuatro plántulas de tomate Cherry de 10 días de germinadas en cada tratamiento (Tabla 2).

Cada unidad experimental estuvo compuesta por un tubo cónico con cuatro plántulas (Figura 2), 13.5 mL del medio correspondiente (MS o Medio Basal Bold) con el nivel de concentración salina y 1.5 mL del microorganismo en cuestión (Cv o Azb).

TABLA 1: Correlación de salinidades como NaCl y conductividad eléctrica

Salinidad (mM)		NaCl (gr/100 mL)	Conductividad (mS)
T ₁	0	0	4.96
T ₂	50	0.2925	6.85
T ₃	100	0.585	13.32
T ₄	150	0.8775	18.56
T ₅	200	1.17	22.6
T ₆	250	1.4625	28.8



TABLA 2: Matriz de diseño experimental multifactorial 2x3x6

Medio	Salinidad	Microorganismo		
MS	0	Azb-Cd	Azb-BIF	CV
	50	Azb-Cd	Azb-BIF	CV
	100	Azb-Cd	Azb-BIF	CV
	150	Azb-Cd	Azb-BIF	CV
	200	Azb-Cd	Azb-BIF	CV
	250	Azb-Cd	Azb-BIF	CV
Hidropónico	0	Azb-Cd	Azb-BIF	CV
	50	Azb-Cd	Azb-BIF	CV
	100	Azb-Cd	Azb-BIF	CV
	150	Azb-Cd	Azb-BIF	CV
	200	Azb-Cd	Azb-BIF	CV
	250	Azb-Cd	Azb-BIF	CV

Los experimentos fueron montados en tubos cónicos estériles de 50 mL (Figura 2).

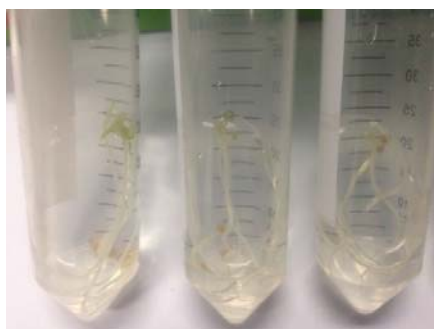


Figura 2: Tubos cónicos con plántulas en desarrollo.

Los experimentos fueron colocados a temperatura ambiente y 2000 lux 16/8 horas luz/oscuridad, mismos que fueron monitoreados a los 10, 20 y 30 días, en cuyos periodos se sacrificó cada repetición para registrar las características morfológicas de la planta en cuanto a longitud del tallo, longitud y número de raíces y longitud y número de hojas. Los tubos cónicos con los microorganismos fueron congelados a -18 °C para posteriormente recuperar la biomasa y determinar las diferencias de antes y después de montado el experimento.



En un segundo grupo de experimentos se realizó también en células libres con un factorial 5x6; se utilizó solamente el medio hidropónico ya que fue el que arrojó los mejores resultados experimentales en cuanto a desarrollo vegetal. Para realizar este experimento se probaron nuevamente seis salinidades (0, 50, 100, 150, 200 y 250 mM como NaCl) y cinco tratamientos microbianos (*Chlorella vulgaris*, *Azospirillum brasilense* Cd, *Azospirillum brasilense* BIF y las combinaciones *Chlorella vulgaris* + *Azospirillum brasilense* Cd y *Chlorella vulgaris* *Azospirillum brasilense* BIF) y el monitoreo se efectuó en los mismos periodos de tiempo (10, 20 y 30 días, ver Tabla 3.

El tercer grupo de experimentos consistió en un factorial 5x6 igual al anterior, solamente que esta vez los microorganismos se inmovilizaron en perlas de alginato de calcio como se indica a continuación, ver Tabla 3.

Co-Inmovilización de microorganismos con alginato (De-Bashan y col., 2004).

Con la finalidad de realizar un comparativo entre cultivos con células libres e inmovilizadas en cuanto al crecimiento de plántulas de tomate, se repitieron los tratamientos utilizados para células libres, pero incluyendo tratamientos extras en los que se emplearon la combinación de los microorganismos, ver Tabla 3.



TABLA 3

Diseño experimental multifactorial 5x6 para cultivos microbianos libres e inmovilizados en medio hidropónico

	Salinidad	Microorganismo				
		Azb-Cd	Azb-BIF	CV	CV+Azb	CV+BIF
Células Libres	0	Azb-Cd	Azb-BIF	CV	CV+Azb	CV+BIF
	50	Azb-Cd	Azb-BIF	CV	CV+Azb	CV+BIF
	100	Azb-Cd	Azb-BIF	CV	CV+Azb	CV+BIF
	150	Azb-Cd	Azb-BIF	CV	CV+Azb	CV+BIF
	200	Azb-Cd	Azb-BIF	CV	CV+Azb	CV+BIF
	250	Azb-Cd	Azb-BIF	CV	CV+Azb	CV+BIF
Inmovilizados	0	Azb-Cd	Azb-BIF	CV	CV+Azb	CV+BIF
	50	Azb-Cd	Azb-BIF	CV	CV+Azb	CV+BIF
	100	Azb-Cd	Azb-BIF	CV	CV+Azb	CV+BIF
	150	Azb-Cd	Azb-BIF	CV	CV+Azb	CV+BIF
	200	Azb-Cd	Azb-BIF	CV	CV+Azb	CV+BIF
	250	Azb-Cd	Azb-BIF	CV	CV+Azb	CV+BIF

Los co-inmovilizados en alginato de sodio se realizaron de la siguiente manera:

Se calentaron 200 ml de agua a 60°C y se agregaron 3g de alginato de sodio, solución que se utilizó para inmovilizar. La solución de alginato se esterilizó y se agregaron 20 mL de la solución del(los) microorganismo(s) axenizado(s) correspondiente(s), manteniendo en agitación constante por 5 minutos para homogenizar la mezcla. Posteriormente se goteó la solución anterior en una solución estéril de CaCl₂ al 0.1 M utilizando una jeringa estéril para formar las esferas de inmovilización (de aproximadamente 2mm de diámetro) dentro de la campana de flujo laminar (Figura 3a). Las esferas se reposaron 60 minutos (Figura 3b) y se lavaron cuatro veces con agua destilada estéril para eliminar los iones de calcio en exceso.

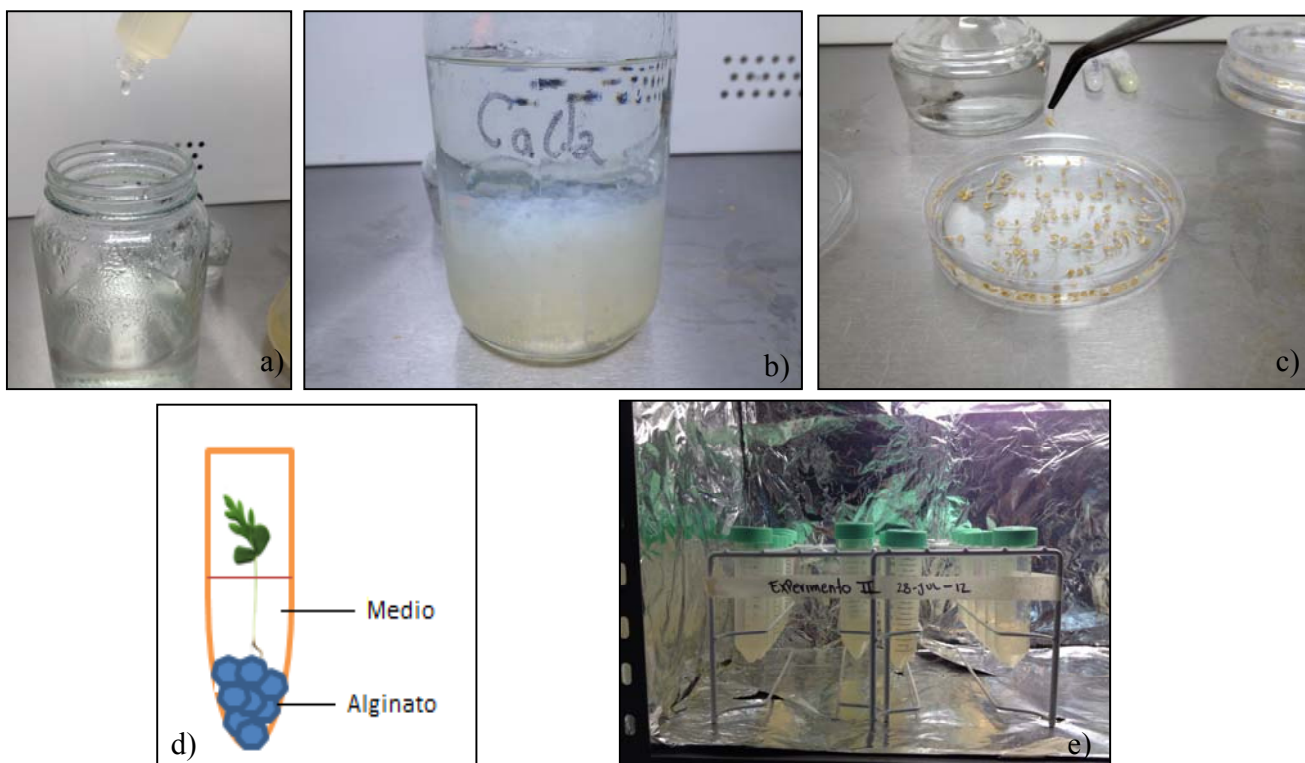


Figura 3: Proceso de elaboración de los cultivos co-inmovilizados en alginato de sodio.

Después se tomaron 13.5 ml de esferas con los microorganismos inmovilizados y se agregaron a los tubos cónicos (50 ml de capacidad) previamente esterilizados con 2.5 ml de medio hidropónico con la concentración salina mencionada en la Tabla 3. A cada tubo cónico con las esferas y el medio se le colocaron 4 plántulas de tomate (Figura 3c); esto representó la unidad experimental (Ver Figura 3d).

Al igual que con células libres, los experimentos con inmovilizados contemplaron el monitoreo a los 10, 20 y 30 días en las mismas condiciones de desarrollo



(luz/temperatura), en cuyos periodos se sacrificó cada repetición para registrar las características morfológicas de la planta en cuanto a longitud del tallo, longitud y número de raíces, longitud y número de hojas. Los tubos cónicos con los microorganismos fueron congelados a -18 °C para posteriormente recuperar la biomasa y proceder con el análisis de lípidos.

a. Análisis Estadístico:

Los datos fueron analizados utilizando un ANOVA y la mínima diferencia estadística (LSD) a un nivel de confianza de 0.05 para cada uno de los diseños experimentales considerando como variables de respuesta las características morfológicas de las plantas de tomate: longitud del tallo, longitud de la raíz y número de hojas. En el primer diseño experimental se analizó el efecto del medio de cultivo, la concentración de sal, el microorganismo asociado y el tiempo transcurrido en interacción. En el segundo y tercer diseño experimental se evaluaron los mismos factores exceptuando el medio de cultivo.



7. RESULTADOS

CÉLULAS LIBRES:

Dos conjuntos de experimentos fueron efectuados. En el primer grupo, fueron analizados dos medios (Hidropónico y Murashige and Skoog), tres periodos de tiempo (10, 20 y 30 días), seis concentraciones de NaCl (0 a 250mM) y tres microorganismos *A. brasilense* Cd (AW), *A. brasilense* Cd-BIF (AB) y *C. Vulgaris* (CV). En el segundo grupo, basado en los resultados del primero, solo el medio hidropónico fue utilizado y se analizó la asociación microbial tanto en células individuales como combinadas.

Experimento I.

7.1 Longitud del Tallo. El análisis ANOVA indica que los efectos que mostraron ser estadísticamente significativos son Microorganismo, Tiempo y Salinidad, lo que implica que el tipo de medio no representa un factor importante en los resultados obtenidos (Tabla 4 y 5). Es notorio que conforme se incrementó la concentración de NaCl de 0 a 250mM la longitud del tallo disminuyó, en cualquier caso *A. brasilense* BIF promovió tallos más largos en las plantas. *C. vulgaris* tuvo los segundos mejores resultados en su medición (Figura 4).

En lo referente a la salinidad, se observaron dos grupos claramente diferenciados, Grupo I: concentraciones de NaCl 0, 50 y 100 mM con promedios en las longitudes de tallo de 22.7 ± 0.6 mm y Grupo II: concentraciones de NaCl 150, 200 y 250 mM con promedios en las longitudes de tallo de 17.8 ± 0.6 mm (Figura 5 y 6).



TABLA 4

Análisis de Varianza para Longitud de Tallo (mm) - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Medio	123.032	1	123.032	1.65	0.1994
B:Microorganismo	816.284	3	272.095	3.65	0.0125
C:Tiempo (d)	2507.08	2	1253.54	16.82	0.0000
D:Salinidad (mM)	3225.35	5	645.07	8.65	0.0000
INTERACCIONES					
AB	1622.35	3	540.782	7.25	0.0001
AC	874.577	2	437.288	5.87	0.0030
AD	203.654	5	40.7308	0.55	0.7411
BC	2396.98	6	399.496	5.36	0.0000
BD	1541.21	15	102.747	1.38	0.1523
CD	2943.12	10	294.312	3.95	0.0000
RESIDUOS	40997.7	550	74.5413		
TOTAL (CORREGIDO)	58917.4	602			

TABLA 5

Diseño Experimental y Resultados para longitud del tallo (mm).

Medio	Tratamiento	Tiempo (d)	Salinidad (mM)					
			0	50	100	150	200	250
MS	Control	10	26.5±0.25	21.7±0.29	23.7±0.35	20.3±0.45	9.3±0.15	22.5±0.35
	Azb	10	38.3±0.29	15.0±0.58	ND	ND	ND	ND
	Azb-BIF	10	25.±0.50	42.5±0.50	33.8±0.25	27.5±0.35	ND	ND
	Cv	10	22.5±0.29	41.7±0.29	34.0±0.17	15.5±0.10	15.0±0.41	ND
	Control	20	12.5±0.50	17.5±0.50	15.0±0.87	16.3±0.48	17.5±0.50	20.0±0.41
	Azb	20	17.5±0.65	16.3±0.48	21.7±0.29	13.8±0.25	15.0±0.41	18.8±0.25
	Azb-BIF	20	17.5±0.65	25.0±0.41	22.5±0.65	22.5±0.29	22.5±0.29	22.5±0.29
	Cv	20	23.3±0.29	23.8±0.48	17.5±0.50	18.0±0.81	20.0±0.00	20.0±0.00
	Control	30	23.8±0.75	17.5±0.50	11.3±0.25	10.0±0.00	16.7±0.29	6.3±0.75
	Azb	30	27.5±0.65	27.5±0.29	27.5±0.29	20.0±0.91	13.3±0.29	13.8±0.48
	Azb-BIF	30	23.8±0.48	18.8±0.63	16.3±0.48	13.8±0.25	13.3±0.29	15.0±0.50
	Cv	30	23.3±0.29	15.0±0.41	17.5±0.65	18.3±0.29	21.7±0.29	15.0±0.41
Hydroponic	Control	10	27.5±0.75	30.0±0.38	28.8±0.62	18.1±0.59	14.2±1.07	16.9±0.70
	Azb	10	21.3±0.25	16.7±0.76	20.0±0.00	18.8±0.63	15.0±0.50	15.0±0.71
	Azb-BIF	10	22.5±0.65	26.7±1.04	26.3±0.75	23.8±0.48	20.0±0.41	23.8±0.75
	Cv	10	20.0±0.41	11.7±0.29	25.0±1.41	16.7±0.76	15.0±0.41	22.5±0.29
	Control	20	16.3±0.48	25.7±1.10	21.4±0.90	15.7±0.53	15.0±0.61	19.2±1.03
	Azb	20	17.5±0.65	16.3±0.48	18.8±0.63	13.8±0.25	15.0±0.41	18.8±0.25
	Azb-BIF	20	17.5±0.65	25.0±0.41	22.5±0.65	22.5±0.29	22.5±0.29	22.5±0.29
	Cv	20	23.3±0.29	23.8±0.48	20.0±00.00	18.0±0.81	20.0±0.00	20.0±0.00
	Control	30	30.0±0.53	26.9±0.59	17.5±0.53	14.4±0.42	20.0±0.58	20.0±0.71
	Azb	30	27.5±0.65	27.5±0.29	27.5±0.29	20.0±0.91	13.3±0.29	13.8±0.48
	Azb-BIF	30	23.8±0.48	18.8±0.63	16.3±0.48	13.8±0.25	13.3±0.29	18.8±0.85
	Cv	30	16.9±0.70	15.0±0.41	17.5±0.65	18.3±0.29	21.7±0.29	13.8±0.25

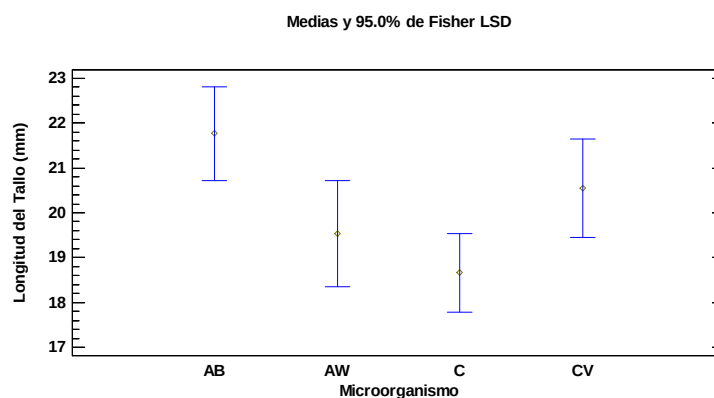


Figura 4: Gráfica de ANOVA donde se observa el desarrollo del tallo en función del microorganismo.

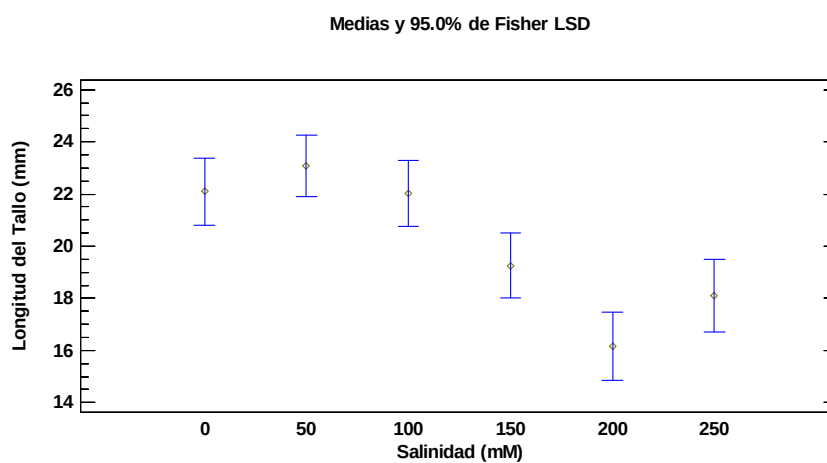


Figura 5: Gráfica de ANOVA donde se observa la respuesta en la formación de tallo en relación con la concentración salina.

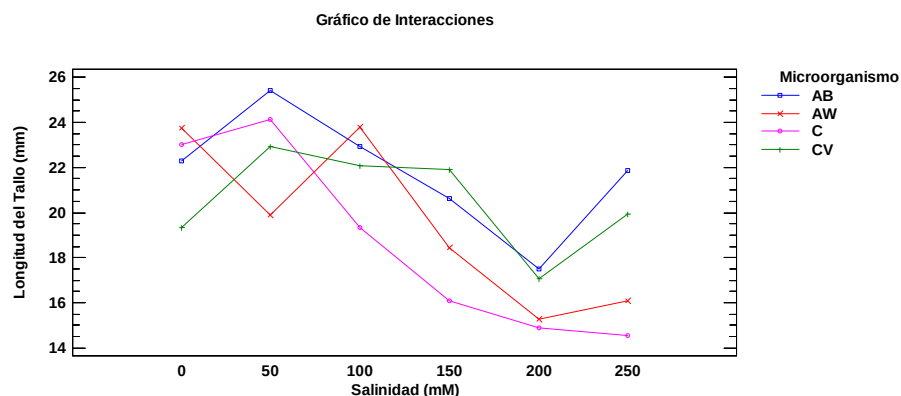


Figura 6: Gráfica de Interacción Microorganismo-Salinidad en cuanto a la longitud del Tallo.

Al considerar el tiempo como un segundo factor, es evidente que conforme al tiempo pasó las plantas fueron menos tolerantes a la salinidad, y presentaron longitudes de tallo más cortas ~15 y 20 mm en comparación con los primeros 10 días donde la longitud del tallo estuvo en el rango de 25 a 28 mm (Figura 7).

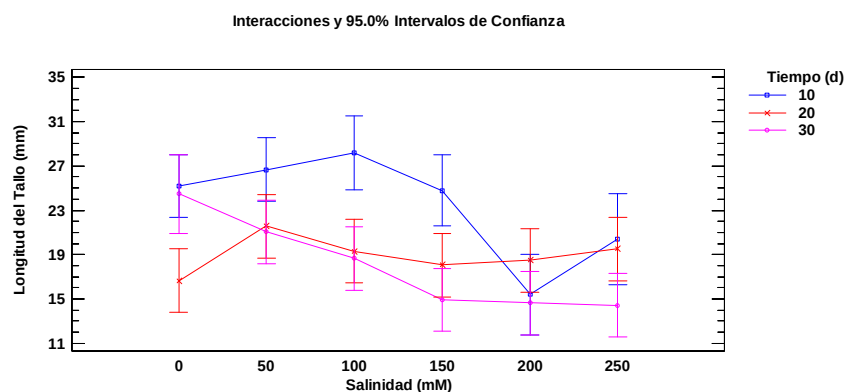


Figura 7: Gráfica de Interacción Tiempo-Salinidad en relación a la longitud del Tallo.



En general, aquellas plantas que crecieron con cualquier microorganismo asociado presentaron tallos más largos en comparación con el control, donde no se utilizó ningún microorganismo, lo que implica que la tolerancia a la salinidad es favorecida por la asociación de la planta con el microorganismo.

Considerando el promedio de elongación a través de los tres periodos de tiempo, *A. brasilense* BIF mostró la mayor elongación de los tallos (21.8 ± 0.07 mm) en comparación con los otros tratamientos microbianos [lo que no es de sorprender, debido a la resistencia que el plásmido confiere a la bacteria modificada, y a una posible generación de fitohormonas], seguido de *Chlorella vulgaris* (CV) (20.5 ± 0.7 mm), con quien forma un grupo homogéneo sin presentar una diferencia estadística significativa. Sin embargo, al final del periodo de 30 días los tallos fueron más cortos que aquellos observados a los 10 días, y esto se presentó en casi todos los casos, excepto para *A. brasilense* Cd donde las longitudes de los tallos (22.3 ± 0.12 mm) fueron significativamente más largos ($p < 0.05$) que los otros tratamientos después de los 30 días (Figura 7).



7.2 *Longitud de la Raíz.* Al contrario que con la longitud del tallo, la asociación microbiana no tuvo diferencia estadística ($p < 0.05$), sin embargo el tipo de medio, el tiempo y la salinidad mostraron tener un efecto significativo en el desarrollo de la raíz (Tabla 6). Las plantas que se desarrollaron en medio MS presentaron un promedio de longitud de raíz mayor (12.9 ± 0.03 mm) en comparación con aquellas plantas que crecieron en medio hidropónico (11.3 ± 0.03 mm), ver tabla 7.

En lo referente a la salinidad, se observaron los mismos grupos homogéneos que en el caso del desarrollo del tallo (Figura 8), donde aquellas plantas crecidas a concentraciones de NaCl de 50 y 100 mM mostraron raíces más largas, 13.0 ± 0.05 y 14.0 ± 0.05 mm respectivamente, en comparación con el resto de los tratamientos. En los primeros 10 días, se observó que los tratamientos con 50 y 100 mM de NaCl promovieron raíces más largas y su patrón de crecimiento fue consistente para los siguientes 10 días posteriormente el tamaño se vio disminuido y esta tendencia continuó hasta los 30 días (Figura 9).

TABLA 6

Análisis de Varianza para Longitud de Raíz (mm) - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Medio	327.38	1	327.38	12.00	0.0006
B:Microorganismo	39.631	3	13.2103	0.48	0.6934
C:Tiempo (d)	1323.4	2	661.7	24.25	0.0000
D:Salinidad (mM)	602.291	5	120.458	4.41	0.0006
INTERACCIONES					
AB	15.5871	3	5.19569	0.19	0.9029
AC	492.756	2	246.378	9.03	0.0001
AD	48.4882	5	9.69763	0.36	0.8788
BC	1708.04	6	284.674	10.43	0.0000
BD	488.164	15	32.5443	1.19	0.2726
CD	578.008	10	57.8008	2.12	0.0215
RESIDUOS	15007.4	550	27.2862		
TOTAL (CORREGIDO)	21197.2	602			



TABLA 7

Diseño Experimental y Resultados para longitud del raíz (mm).

Medio	Tratamiento	Tiempo (d)	Salinidad (mM)					
			0	50	100	150	200	250
MS	Control	10	14.5±0.17	15.8±0.30	20.0±0.00	21.3±0.25	16.3±0.48	10.0±0.00
	Azb	10	13.8±0.25	17.5±0.87	ND	ND	ND	ND
	Azb-BIF	10	15.0±0.41	20.0±0.41	16.3±0.25	17.5±0.65	ND	ND
	Cv	10	17.5±0.29	27.5±1.32	20.0±0.00	12.5±0.29	15.0±0.41	ND
	Control	20	12.5±0.29	10.0±0.00	18.8±0.85	13.8±1.11	17.5±0.65	23.8±0.85
	Azb	20	8.80±0.25	10.0±0.00	11.3±0.25	6.30±0.25	8.80±0.48	12.5±0.29
	Azb-BIF	20	13.8±0.25	16.3±0.25	11.8±0.24	11.3±0.25	11.3±0.25	10.0±0.00
	Cv	20	10.0±0.71	13.8±0.25	16.3±0.48	11.3±0.48	10.0±0.00	10.0±0.00
	Control	30	7.50±0.29	7.8±0.15	4.50±0.10	5.00±0.58	5.00±1.00	5.00±1.00
	Azb	30	15.0±0.41	10.0±0.00	20.0±0.00	15.0±0.00	12.5±0.50	10.0±0.00
Hydroponico	Azb-BIF	30	13.8±0.25	10.0±0.00	8.80±0.25	10.0±0.00	6.30±0.48	11.3±0.25
	Cv	30	ND	10.0±0.00	10.0±0.00	8.80±0.63	10.0±0.00	10.0±0.00
	Control	10	14.6±0.66	17.5±0.93	12.5±0.71	15.6±0.94	9.30±0.53	11.9±0.46
	Azb	10	11.3±0.25	10.0±0.00	10.0±0.00	8.80±0.48	6.30±0.12	12.5±0.35
	Azb-BIF	10	11.3±0.25	10.0±0.00	22.5±0.50	11.8±0.24	11.3±0.63	12.5±0.50
	Cv	10	12.5±0.29	8.80±0.48	17.5±1.06	6.70±0.29	11.3±0.63	17.5±0.29
	Control	20	9.00±0.42	9.60±0.49	11.3±0.99	9.90±0.84	11.9±0.75	15.1±1.08
	Azb	20	8.80±0.25	10.0±0.00	11.3±0.25	6.30±0.25	8.80±0.48	12.5±0.29
	Azb-BIF	20	13.8±0.25	16.3±0.25	11.8±0.24	11.3±0.25	11.3±0.25	10.0±0.00
	Cv	20	10.0±0.71	13.8±0.25	16.3±0.48	1.30±0.48	10.0±0.00	10.0±0.00
	Control	30	10.0±0.00	7.60±0.21	6.60±0.29	12.0±0.68	14.0±0.42	11.0±0.65
	Azb	30	10.0±0.00	10.0±0.00	20.0±0.00	15.0±0.00	12.5±0.50	10.0±0.00
	Azb-BIF	30	15.0±0.41	10.0±0.00	8.80±0.25	10.0±0.00	6.30±0.48	11.3±0.25
	Cv	30	13.8±0.25	10.0±0.00	10.0±0.00	8.80±0.63	10.0±0.00	10.0±0.00

Medias y 95.0% de Fisher LSD

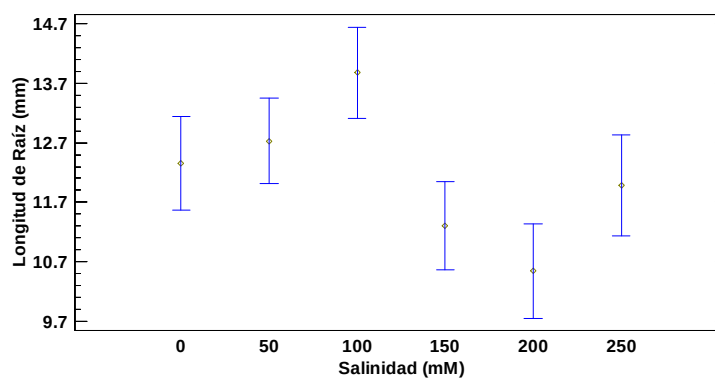


Figura 8: Gráfica de ANOVA donde se observa la respuesta en la formación de raíz en relación con la concentración salina.

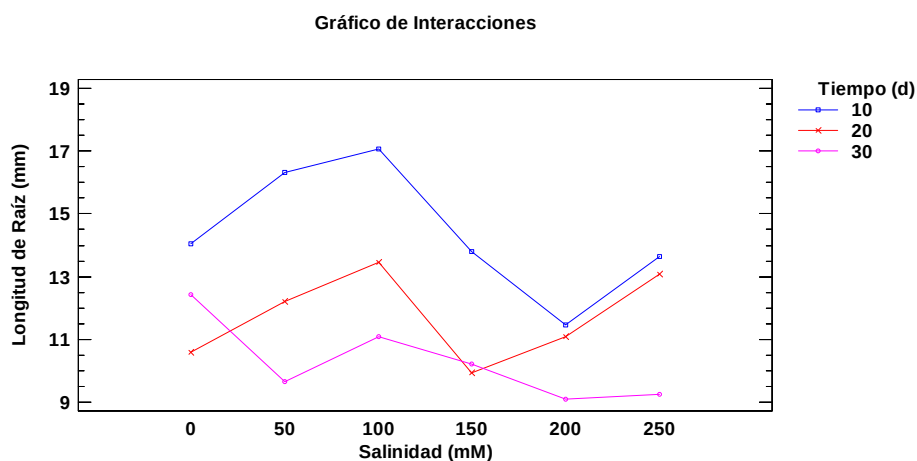


Figura 9: Gráfica de interacción sobre el efecto de la salinidad en el desarrollo de la raíz a través del tiempo.

7.3 *Generación de hojas.* Se determinó que el desarrollo de las estructuras superiores de la planta se ve influenciado tanto por el microorganismo empleado, como por la salinidad y el tiempo, esto conforme al análisis ANOVA obtenido ($p < 0.05$), mostrando que el medio no representan diferencia significativa en cuanto al número de hojas generadas, ver tabla 8 y 9.



TABLA 8

Análisis de Varianza para Número de Hojas - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Medio	0.978205	1	0.978205	2.14	0.1442
B:Microorganismo	37.0566	3	12.3522	27.01	0.0000
C:Tiempo (d)	5.17051	2	2.58525	5.65	0.0037
D:Salinidad (mM)	16.5715	5	3.31431	7.25	0.0000
INTERACCIONES					
AB	1.67486	3	0.558285	1.22	0.3014
AC	5.28989	2	2.64495	5.78	0.0033
AD	1.68851	5	0.337703	0.74	0.5949
BC	22.548	6	3.758	8.22	0.0000
BD	33.7662	15	2.25108	4.92	0.0000
CD	40.9093	10	4.09093	8.94	0.0000
RESIDUOS	251.097	549	0.457371		
TOTAL (CORREGIDO)	415.196	601			

TABLA 9

Diseño Experimental y Resultados para Número de Hojas.

Medio	Tratamiento	Tiempo (d)	Salinidad (mM)					
			0	50	100	150	200	250
MS	Control	10	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	0.05±1.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	Azb	10	1.50±1.00	2.50±0.50	2.00±0.00	ND	ND	ND
	Azb-BIF	10	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	ND	2.00±0.00
	Cv	10	2.00±0.00	1.75±0.50	2.00±0.00	0.00±0.00	0.25±0.50	ND
	Control	20	1.00±1.54	2.00±0.00	2.00±0.00	1.50±1.00	1.50±1.00	2.00±0.00
	Azb	20	1.00±1.54	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	1.50±1.00
	Azb-BIF	20	1.50±1.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00
	Cv	20	1.50±1.00	2.00±0.00	2.00±0.00	1.00±1.54	2.00±0.00	2.00±0.00
	Control	30	1.50±0.57	0.50±1.00	0.50±1.00	0.50±0.57	0.25±0.50	0.12±0.25
	Azb	30	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	1.50±1.00
Hydroponic	Azb-BIF	30	2.00±0.00	1.50±1.00	1.50±1.00	2.00±0.00	1.00±1.54	2.00±0.00
	Cv	30	ND	2.00±0.00	2.00±0.00	1.50±1.00	2.00±0.00	1.50±1.00
	Control	10	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00
	Azb	10	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00
	Azb-BIF	10	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	0.50±1.00	2.00±0.00
	Cv	10	2.00±0.00	0.50±1.00	1.00±1.41	0.50±1.00	0.50±1.00	2.00±0.00
	Control	20	1.00±1.54	2.00±0.00	2.00±0.00	1.50±1.00	1.50±1.00	2.00±0.00
	Azb	20	1.00±1.54	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	1.50±1.00
	Azb-BIF	20	1.50±1.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00
	Cv	20	1.50±1.00	2.00±0.00	2.00±0.00	1.00±1.54	2.00±0.00	2.00±0.00
	Control	30	2.00±0.00	0.50±1.00	0.50±1.00	0.50±0.57	0.25±0.50	0.12±0.25
	Azb	30	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	1.50±1.00
	Azb-BIF	30	2.00±0.00	1.50±1.00	0.50±1.00	2.00±0.00	1.00±1.54	2.00±0.00
	Cv	30	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	1.50±1.00	2.00±0.00	1.50±1.00



Se observó que la generación de hojas fue mayor en todos los tratamientos en los que se emplearon microorganismos, sobresaliendo la asociación con *A. brasilense* en cualquiera de sus cepas (silvestre o modificada), con una media de 1.77394 ± 0.05 y 1.73376 ± 0.06 hojas respectivamente, mismas que formaron un grupo homogéneo, seguido de *C. vulgaris* (1.61759 ± 0.06) y por último el Control con el menor número de hojas desarrolladas por planta (1.17251 ± 0.04), ver figura 10.

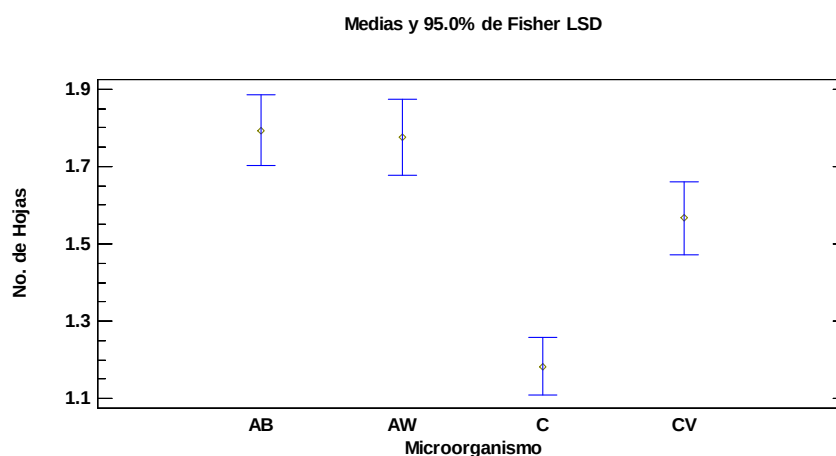


Figura 10: Gráfica de ANOVA sobre generación de hojas conforme al microorganismo asociado.

En lo referente a la salinidad, se siguió observando la misma tendencia en cuanto a la formación de dos grupos, donde aquellas plantas crecidas a concentraciones de NaCl de 50 y 100 mM mostraron un mayor número de hojas, 1.69502 ± 0.06 y 1.75956 ± 0.07 respectivamente, en comparación con el resto de los tratamientos (Figura 11 y 12).

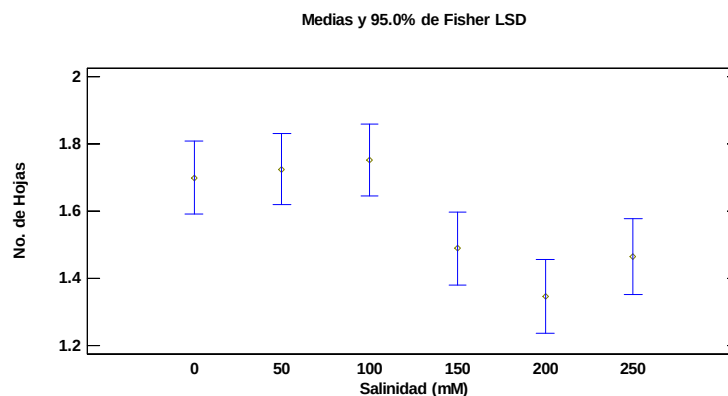


Figura 11: Gráfica de ANOVA sobre generación de hojas con respecto a las concentraciones de NaCl empleadas.

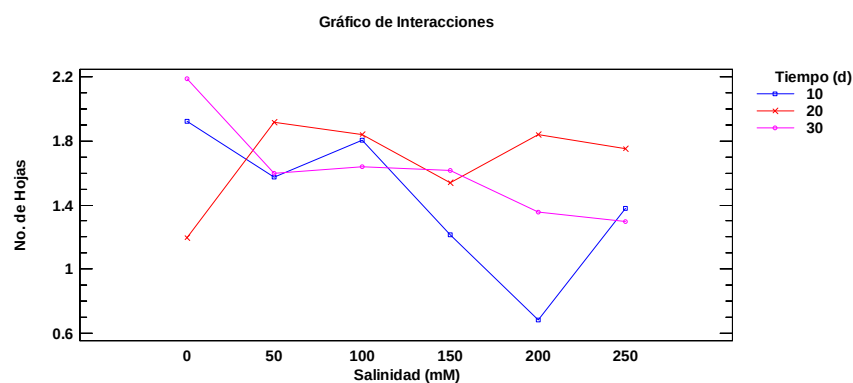


Figura 12: Gráfica de interacción sobre la generación de hojas en función de la salinidad y el tiempo.

7.4 Efecto del Medio. En lo relacionado al tipo de medio empleado, se observó una decoloración muy notoria a partir de 100 mM en el medio MS, sobretodo en el control (quizás debida al choque osmótico), lo que indica que cualquiera de los organismos confiere cierta resistencia a la salinidad a diferencia de aquellas plantas con ausencia de estos. De igual manera, se observó un alto índice de contaminación



en este medio sobre todo en los tratamientos con *Chlorella vulgaris*, esto debido quizás al hecho de las microalgas no cuentan con las enzimas requeridas para asimilar los altos índices de sacarosa presente en el medio, dando como resultado la desintegración celular (ver figura 13).

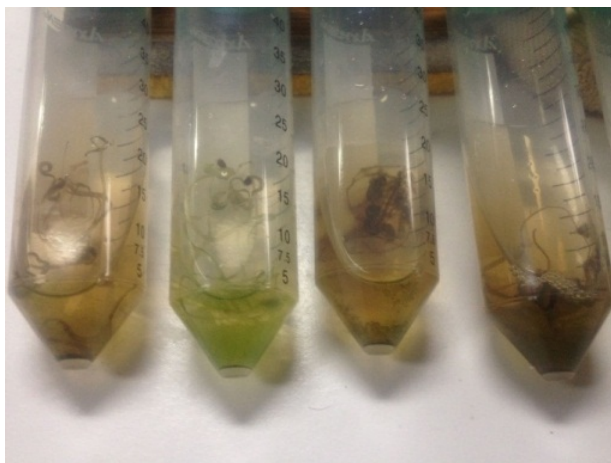


Figura 13: Imagen de los 4 tratamientos en medio MS (de derecha a izquierda) *Chlorella Vulgaris*, *Azospirillum brasilense* BIF, *Azospirillum Brasilense* CD y Control.

Sin embargo, al realizar la comparación en cuanto a los medios empleados y el microorganismo, se observó que los tratamientos con medio MS presentan un efecto superior a aquellos en medio hidropónico (20.6 ± 0.5 y 19.6 ± 0.4 mm, en longitud de tallo y para longitud de raíz 12.9 ± 0.3 y 11.34 ± 0.2 mm, respectivamente), sobresaliendo los tratamientos con los microorganismos *Azospirillum brasilense* BIF (AB) y *Chlorella vulgaris* (CV), mismos que no presentaron diferencias significativas en cuanto al desarrollo de la planta, seguidos de *Azospirillum brasilense* CD (AW) y Control (C), los cuales forman otro grupo homogéneo. Los



tratamientos en medio Hidropónico, presentaron una respuesta más constante en comparación con aquellos en que se utilizó el medio MS (Figura 14 y 15).

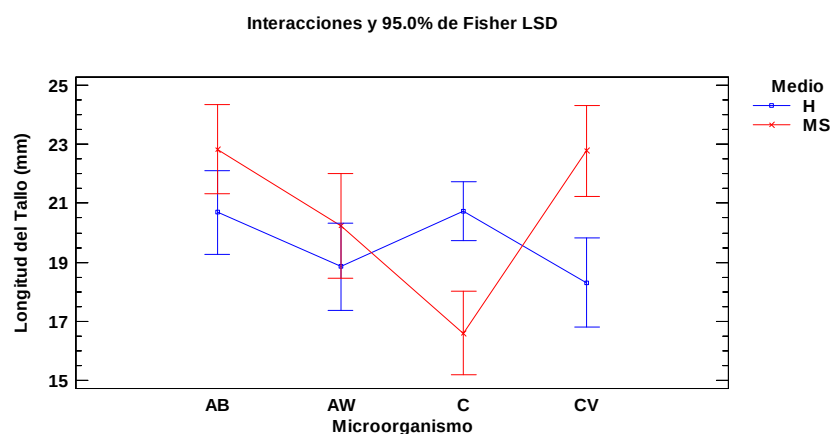


Figura 14: Gráfica de interacciones para Medio-Microorganismos en la longitud del tallo.

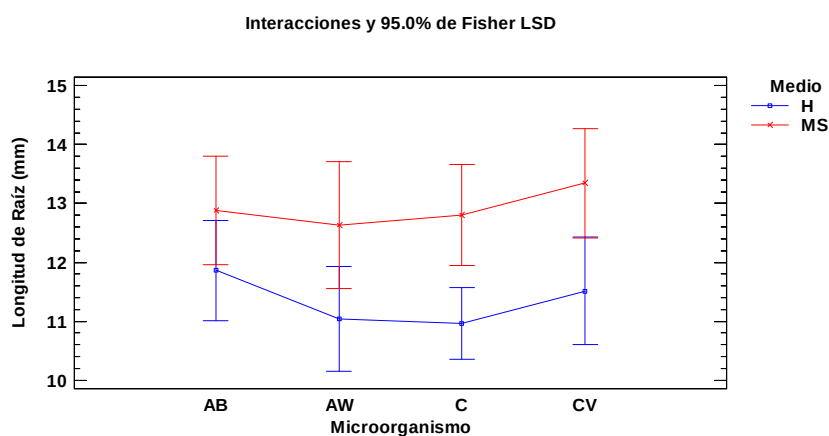


Figura 15: Gráfica de interacciones para Medio-Microorganismos en la longitud de la raíz.



Como se puede observar en las gráficas de interacción, el medio MS presenta mayor fluctuación en cuanto a sus tratamientos y su efecto es más notorio debido a las altas concentraciones salinas en su composición, a diferencia del Hidropónico.

En relación a la generación de hojas, se presentó una tendencia muy similar en los dos medios, presentándose una media ligeramente mayor en los tratamientos con medio Hidropónico) sobre el medio MS (1.61751 ± 0.03 y 1.53138 ± 0.04 , respectivamente), ver figura 16.

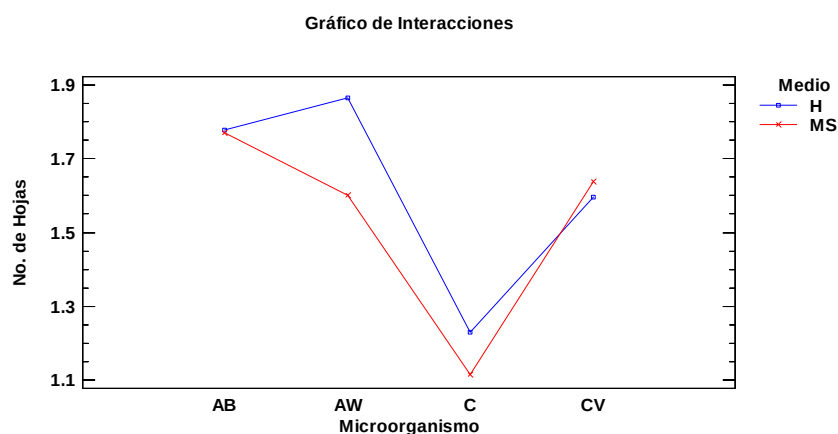


Figura 16: Gráfica de interacciones para Medio-Microorganismos en el número de hojas.



Experimento II.

7.5 Longitud del Tallo. En el segundo conjunto de experimentos se analizó la combinación de microorganismos y de acuerdo con el análisis ANOVA (Tabla 10 y 11), donde el tiempo no tuvo un efecto significativo, la combinación de *A. brasilense* Cd y *C. vulgaris* (AWCV) tuvo un mayor impacto en el crecimiento del tallo (25.3 ± 0.7 mm) seguido por la asociación de *A. brasilense* BIF y *C. vulgaris* (ABCV) (23.3 ± 0.8 mm) (Figura 17).

Los tallos más grandes se observaron a los 20 días de desarrollo en aquellas plantas asociadas con *A. brasilense* Cd y *C. vulgaris* (AWCV) (29.8 ± 1.3 mm), mostrando incluso mayores resultados a concentraciones por debajo de 100 mM (más de 30.6 ± 1.7 mm), pero al igual que en los experimentos anteriores, en general la tendencia de crecimiento del tallo fue a decrecer en tamaño conforme la concentración de NaCl se veía incrementada. Sin embargo, las plantas asociadas con ABCV mostraron tallos más grandes que cualquier otro tratamiento a 250 mM de NaCl (25.7 ± 3.3 mm) (Figura 18).

TABLA 10

Análisis de Varianza para Longitud de Tallo (mm) - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P	
EFECTOS PRINCIPALES						
A:Microorganismos	649.549	5	129.91	2.25	0.0487	
B:Tiempo (días)	140.321	2	70.16	1.21	0.2978	
C:Salinidad (mM)	2178.01	5	435.602	7.54	0.0000	
INTERACCIONES						
AB	1433.61	10	143.361	2.48	0.0067	
AC	2367.36	25	94.6944	1.64	0.0280	
BC	101.392	10	10.1392	1.76	0.0667	
RESIDUOS	24487.5	424	57.7536			
TOTAL (CORREGIDO)	33364.1	481				



TABLA 11

Diseño Experimental y Resultados para longitud de tallo.

		0	50	100	150	200	250
CÉLULAS LIBRES EN MEDIO HIDROPÓNICO	Control	31.2±0.85	32.5±0.28	27.5±0.28	2.12±1.21	23.3±0.57	22.5±0.28
	AW	21.2±0.25	16.6±0.76	20.0±0.00	1.87±0.62	15.0±0.50	15.0±0.70
	AB	22.5±0.64	22.5±1.19	26.2±0.75	2.37±0.47	20.0±0.40	23.7±0.75
	CV	20.0±0.40	16.2±0.94	25.0±1.41	1.66±0.76	15.0±0.40	22.5±0.28
	AWCV	28.7±0.25	19.2±1.37	20.0±0.40	2.21±0.85	13.0±0.67	12.5±0.86
	ABCV	22.5±1.04	21.2±0.25	20.0±0.40	1.62±0.25	28.75±0.75	ND
	Control	16.2±0.94	32.5±0.86	23.7±1.03	2.25±0.86	23.7±1.10	25.0±0.91
	AW	17.5±0.64	16.2±0.47	18.7±0.62	1.37±0.25	15.0±0.40	18.7±0.25
	AB	17.5±0.64	25.0±0.40	22.5±0.64	2.25±0.28	22.5±0.28	22.5±0.28
	CV	17.5±1.19	23.7±0.47	17.5±0.50	1.80±0.81	20.0±0.00	20.0±0.00
	AWCV	32.5±1.19	27.5±1.19	16.2±1.88	2.12±1.43	11.2±1.62	16.2±0.47
	ABCV	21.2±0.85	25.0±0.40	27.5±0.28	2.50±0.40	20.0±0.00	ND
	Control	31.2±0.25	22.5±0.50	13.7±0.25	1.25±0.28	15.0±1.08	07.5±0.95
	AW	27.5±0.64	27.5±0.28	2.75±0.28	2.00±0.91	17.5±0.86	13.7±0.47

Medias y 95 % Intervalos de Confianza

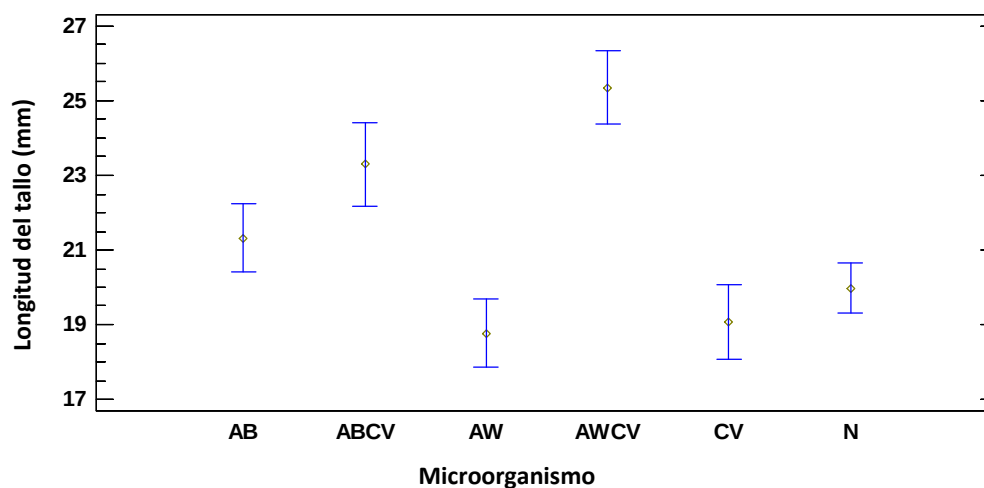


Figura 17: Gráfica de ANOVA para el promedio de longitud de tallo en plantas en asociación con diferentes microorganismos en medio hidropónico.

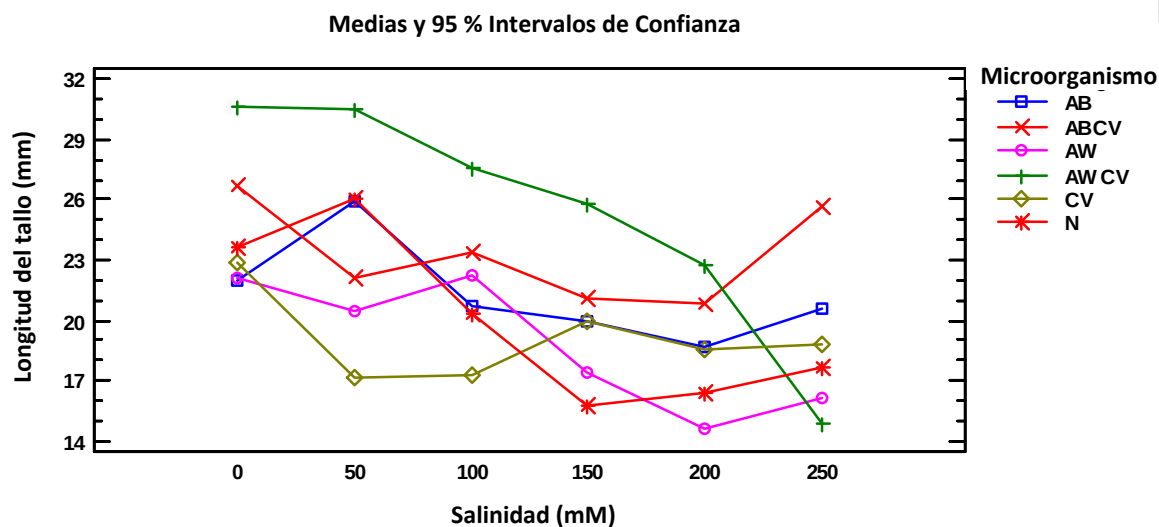


Figura 18: Gráfica de interacciones de longitud del tallo en plantas en relación con las concentraciones de NaCl utilizando diferentes asociaciones microbianas en medio hidropónico.

Las plantas en medio hidropónico presentan una respuesta más homogénea en el desarrollo del tallo en aquellos tratamientos con *Azospirillum brasilense* (sea CD o BIF) ó *Chlorella vulgaris* (CV) a 100 mM, donde incluso se presentaron plantas con resistencia hasta 250 mM en el tratamiento combinado con *Azospirillum brasilense* BIF y *Chlorella vulgaris* (ABCV) a los 30 días de establecimiento.



7.6 Longitud de la Raíz. En el segundo conjunto de experimentos donde se empleó únicamente el medio hidropónico, el tiempo no tuvo un efecto significativo en el desarrollo de la raíz, a diferencia de los microorganismos asociados y la salinidad, que si presentaron diferencias significativas (Tabla 12 y 13). De acuerdo con el análisis de varianza, aquellas plantas asociadas con *C. vulgaris* fueron diferentes al control obteniendo raíces más largas (12 ± 0.4 mm) (Figura 19). Incluso cuando los efectos de la concentración de NaCl no se pueden diferenciar en grupos tan fácilmente como en el caso del tallo, en el desarrollo de raíz es notable la influencia de la concentración de 100 mM de NaCl en el desarrollo de raíces más grandes (12.6 ± 0.4 mm).

Concomitantemente, AW tuvo un efecto marcado en la elongación de la raíz después de 30 días (13.2 ± 0.7 mm), similar a lo observado para CV al final del periodo de 10 días (13.2 ± 0.08 mm) con el control, mostrando raíces más cortas después de los 20 y 30 días de tratamiento (Figura 20).

TABLA 12

Análisis de Varianza para Longitud de Raíz (mm) - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Microorganismos	136.578	5	27.3155	1.70	0.0317
B:Tiempo (días)	5.9548	2	2.9774	2.48	0.7633
C:Salinidad (mM)	229.184	5	45.8329	2.30	0.0011
INTERACCIONES					
AB	737.614	10	73.7614	3.61	0
AC	531.986	25	21.2795	0.80	0.0053
BC	412.965	10	41.2965	1.01	0.0001
RESIDUOS	3888.76	353	11.0163		
TOTAL (CORREGIDO)	5785.52	410			



TABLA 13

Diseño Experimental y Resultados para longitud de raíz (mm).

		0	50	100	150	200	250
CÉLULAS LIBRES EN MEDIO HIDROPÓNICO	Control	17.5±0.86	25.0±0.70	16.2±0.75	22.5±0.86	16.2±0.25	15.0±0.40
	AW	11.2±0.25	10.0±0.00	10.0±0.00	8.7±0.47	8.5±0.44	12.5±0.35
	AB	11.2±0.25	10.0±0.00	22.5±0.50	11.7±0.23	11.2±0.62	12.5±0.50
	CV	12.5±0.28	8.7±0.47	17.5±1.06	6.6±0.28	11.2±0.62	17.5±0.28
	AWCV	11.7±0.23	9.2±0.43	9.7±0.20	11.2±0.25	7.5±0.28	7.5±0.28
	ABCV	11.2±0.25	11.2±0.25	11.2±0.25	8.7±0.25	13.7±0.47	ND
	Control	12.5±0.28	13.7±0.25	18.7±0.85	13.7±1.10	17.5±0.64	23.7±0.85
	AW	8.7±0.25	10.0±0.00	11.2±0.25	6.2±0.25	8.7±0.47	12.5±0.28
	AB	13.7±0.25	16.2±0.25	11.7±0.23	11.2±0.25	11.2±0.25	10.0±0.00
	CV	10.0±0.70	13.7±0.25	16.2±0.47	11.2±0.47	10.0±0.00	10.0±0.00
	AWCV	11.2±0.25	10.5±0.42	5.5±0.64	8.5±0.57	6.2±0.75	10.5±0.42
	ABCV	11.2±0.25	12.5±0.28	13.7±0.25	10.0±0.00	10.5±0.10	ND
	Control	10.0±0.00	7.7±0.15	4.5±0.10	10.0±1.15	5.0±0.00	5.0±1.00
	AW	15.0±0.40	10.0±0.00	20.0±0.00	15.0±0.00	12.5±0.50	10.0±0.00
	AB	13.7±0.25	10.0±0.00	8.7±0.25	10.0±0.00	6.2±0.47	11.2±0.25
	CV	ND	10.0±0.00	10.0±0.00	8.7±0.62	10.0±0.00	10.0±0.00
	AWCV	11.2±0.20	11.7±0.47	8.7±0.75	10.5±0.42	10.0±0.81	8.7±0.25
	ABCV	10.0±0.40	8.7±0.25	10.5±0.10	10.0±0.40	8.7±0.25	11.2±0.25

Medias y 95 % Intervalos de Confianza

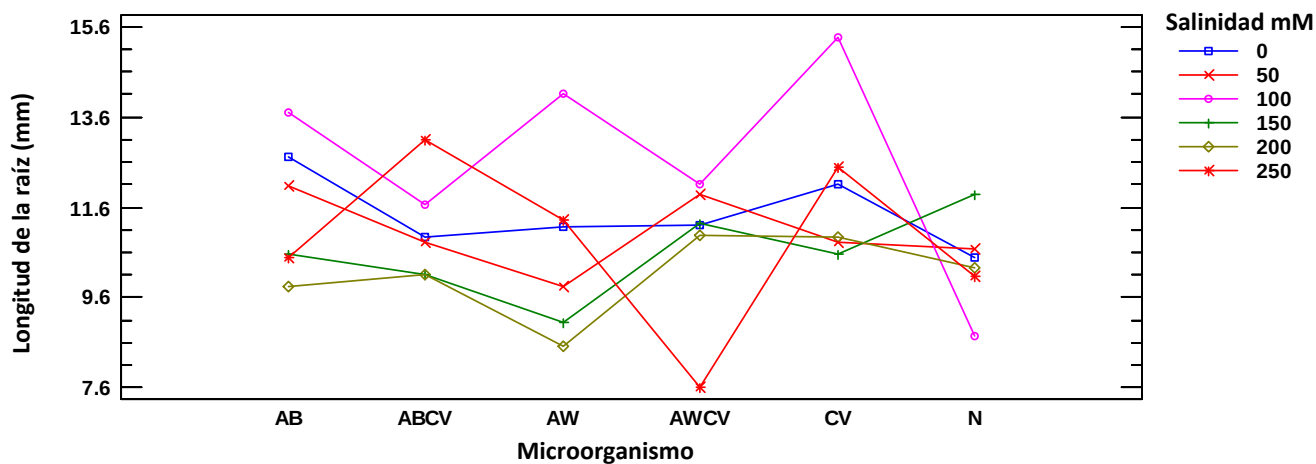


Figura 19: Gráfica de interacciones de longitud del raíz en plantas en relación con las concentraciones de NaCl utilizando diferentes asociaciones microbianas en medio hidropónico.

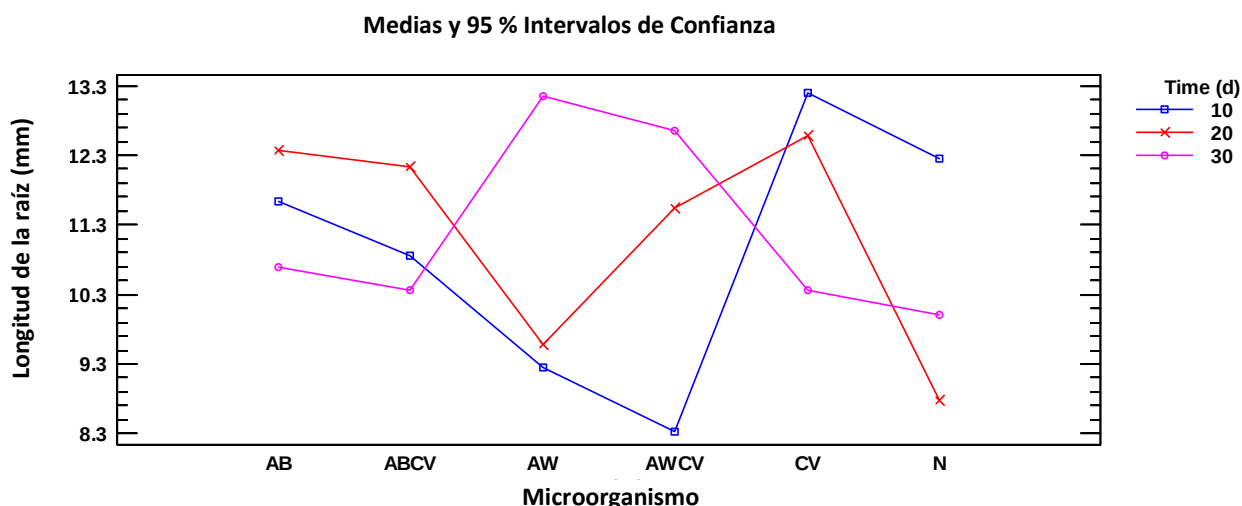


Figura 20: Gráfica de interacciones de longitud del raíz en plantas crecidas con diferentes asociaciones microbianas en medio hidropónico durante los tres periodos de tiempo contemplados en los experimentos.

7.7 Generación de Hojas. Al igual que en el caso de longitud de tallo y raíz, el análisis ANOVA indica que el tiempo no representó un efecto significativo para la generación de hojas, y se observó la misma tendencia, mostrando que los tratamientos con *A. brasilense* Cd (AW), BIF (AB) y *C. vulgaris* (CV) presentaron el mayor número de hojas (ver tablas 14 y 15).

Es notoria la formación de dos grupos homogéneos, el primero conformado por AW, AB y CV, con medias de 1.88 ± 0.09 , 1.77 ± 0.09 y 1.56 ± 0.10 mm,



respectivamente, y el segundo, el cual incluye los tratamientos con los microorganismos combinados mismos que originaron un número inferior de hojas, lo que no represento significancia estadística importante (AWCV 11.3 ± 0.09 y ABCV 0.9 ± 0.11 mm) junto con el control (1.2 ± 0.06 mm) (ver figura 21 y 22).

TABLA 14

Análisis de Varianza para Número de Hojas - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Microorganismos	47.685	5	9.53701	14.86	0.0000
B:Tiempo (días)	2.12534	2	1.06267	1.66	0.1922
C:Salinidad (mM)	8.01442	5	1.60288	2.50	0.0303
INTERACCIONES					
AB	20.7583	10	2.07583	3.23	0.0005
AC	31.4271	25	1.25708	1.96	0.0042
BC	14.1563	10	1.41563	2.21	0.0167
RESIDUOS	272.758	425	0.641784		
TOTAL (CORREGIDO)	405.641	482			

TABLA 15

Diseño Experimental y Resultados para número de hojas.

		0	50	100	150	200	250
CÉLULAS LIBRES EN MEDIO HIDROPÓNICO	Control	2.00+0.00	2.00+0.00	2.00+0.00	2.00+0.00	2.00+0.00	2.00+0.00
	AW	2.00+0.00	2.00+0.00	2.00+0.00	2.00+0.00	2.00+0.00	2.00+0.00
	AB	2.00+0.00	2.00+0.00	2.00+0.00	2.00+0.00	0.50+1.00	2.00+0.00
	CV	2.00+0.00	0.50+1.00	1.00+1.41	0.00+0.00	0.50+1.00	2.00+0.00
	AWCV	2.00+0.00	1.00+1.15	2.00+0.00	1.00+1.50	1.00+1.54	0.12+0.25
	ABCV	0.50+1.00	0.00+0.00	1.50+1.00	0.00+0.00	0.00+0.00	ND
	Control	1.00+1.54	2.00+0.00	2.00+0.00	1.50+1.00	1.50+1.00	1.50+1.00
	AW	1.00+1.54	2.00+0.00	2.00+0.00	2.00+0.00	2.00+0.00	2.00+0.00
	AB	1.50+1.00	2.00+0.00	2.00+0.00	2.00+0.00	2.00+0.00	2.00+0.00
	CV	1.50+1.00	2.00+0.00	2.00+0.00	1.00+1.54	1.00+1.15	2.00+0.00
	AWCV	1.50+1.00	1.00+1.15	1.00+1.15	1.50+1.00	0.25+0.50	0.00+0.00
	ABCV	1.00+1.15	0.50+1.00	0.50+1.00	1.00+1.15	1.00+1.15	ND
	Control	2.00+0.00	0.50+1.00	0.50+1.00	0.50+0.57	0.25+0.50	0.12+0.25
	AW	2.00+0.00	2.00+0.00	2.00+0.00	2.00+0.00	2.00+0.00	1.50+1.00
	AB	2.00+0.00	1.50+1.00	1.50+1.00	2.00+0.00	1.00+1.15	2.00+0.00
	CV	ND	2.00+0.00	2.00+0.00	1.50+1.00	2.00+0.00	1.50+1.00
	AWCV	1.50+1.00	1.50+1.00	1.00+1.15	1.00+1.15	1.00+1.15	1.50+1.00
	ABCV	0.50+1.00	1.00+1.15	1.50+1.00	1.00+1.15	1.50+1.00	1.50+1.00

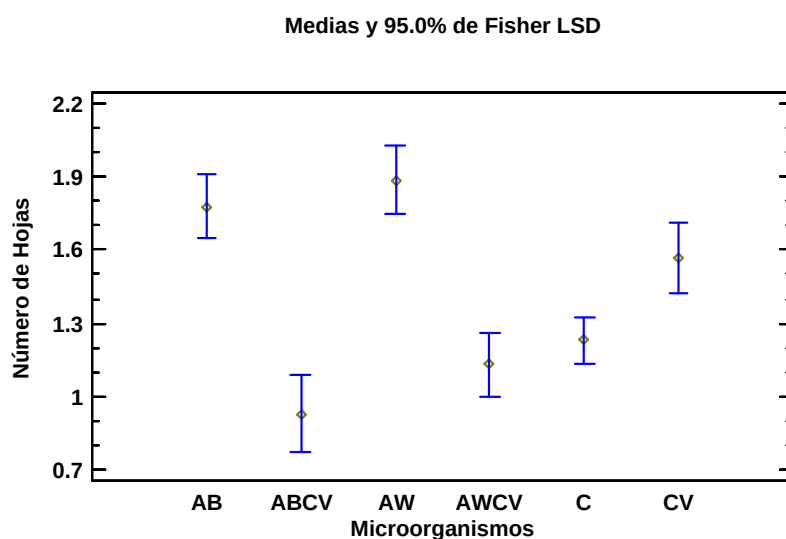


Figura 21: Gráfica de ANOVA para el promedio de numero de hojas generadas en plantas de tomate asociadas con diferentes microorganismos en medio hidropónico.

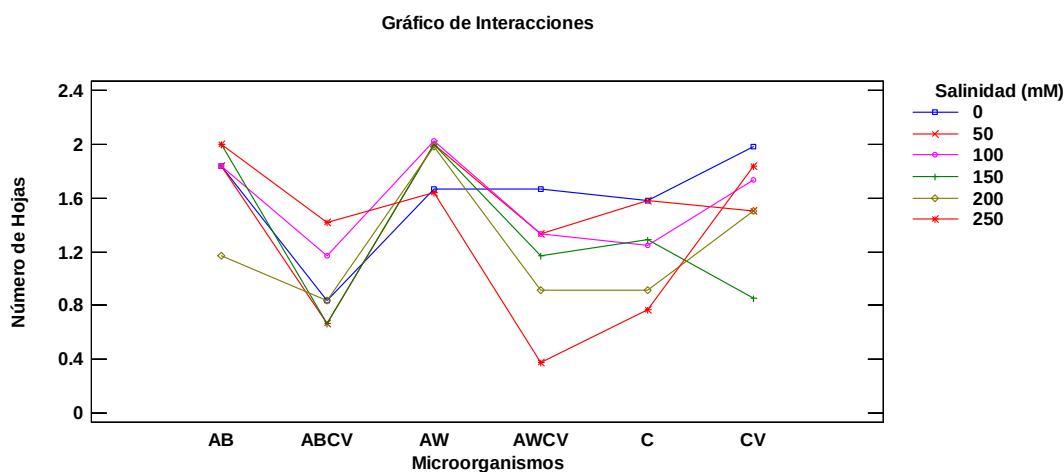


Figura 22: Gráfica de interacciones de número de hojas generadas en plantas crecidas con diferentes asociaciones microbianas en medio hidropónico con 6 niveles de salinidad.



En la figura 22 se observa claramente una respuesta homogénea en todos los tratamientos con 100 mM de NaCl en cuanto a la generación de número hojas resultante, con media de 15.5 ± 0.09 ; asimismo, el mayor número de estructuras se presentó en el periodo de 30 días (15.0 ± 0.06), ver figura 23.

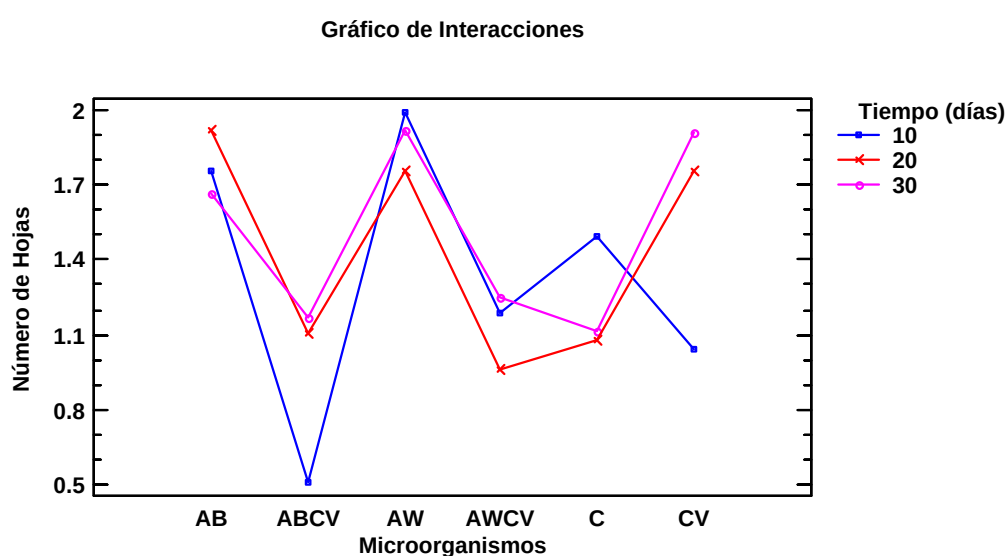


Figura 23: Gráfica de interacciones de número de hojas generadas en plantas crecidas con diferentes asociaciones microbianas en medio hidropónico durante los tres periodos de tiempo contemplados en los experimentos.



CULTIVOS CO-INMOVILIZADOS:

Experimento III.

7.8 Longitud del tallo: Debido a que en general se observó un decremento del tamaño de las plántulas a través del tiempo en los cultivos con células libres, cuestión que puede ser atribuida al efecto de la inmersión prolongada de la planta completa en medio salino, se procedió a la realización de experimentos en cultivos co-inmovilizados en medio hidropónico.

Los tratamientos con co-inmovilizados contemplaron las mismas condiciones de los experimentos en células libres [tres periodos de tiempo (10, 20 y 30), seis concentraciones de NaCl (0 a 250 mM) y los tres microorganismos *A. brasilense* Cd (AW), *A. brasilense* BIF (AB) y *C. vulgaris* (CV)]. De igual forma, se analizó la asociación microbial, así como las características morfológicas de las plántulas en dichos tratamientos.

El análisis de varianza indica que tanto el microorganismo como el tiempo y la salinidad tuvieron un efecto significativo en el desarrollo del tallo (Ver tabla 16 y 17), indicando que los mejores tratamientos son aquellos en los que se emplearon los microorganismos simples *Azospirillum brasilense* BIF (AB) y *Chlorella vulgaris* (CV), con promedios en la longitud del tallo de 48.28 ± 0.98 y 40.27 ± 0.98 mm, respectivamente; seguidos de la combinación *A. brasilense* CD y *C. vulgaris* (AWCV, 37.35 ± 1.01 mm).



Los tratamientos con la combinación *A. brasilense* BIF y *Chlorella vulgaris* (ABCV), junto con *A. brasilense* CD simple (AW) mostraron resultados por debajo del control, con medias de 31.23 ± 1.04 y 31.47 ± 0.99 mm, respectivamente (Figura 24).

TABLA 16

Análisis de Varianza para Longitud del tallo (mm) - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Microorganism(s)	29493.2	5	5898.64	40.50	0.0000
B:Time (d)	215867.	2	107933.	741.01	0.0000
C:Salinity (mM)	20011.4	5	4002.29	27.48	0.0000
INTERACCIONES					
AB	89110.2	10	8911.02	61.18	0.0000
AC	104459.	25	4178.38	28.69	0.0000
BC	32309.7	10	3230.97	22.18	0.0000
ABC	130496.	50	2609.91	17.92	0.0000
RESIDUOS	134296.	922	145.658		
TOTAL (CORREGIDO)	814323.	1029			

TABLA 17

Diseño Experimental y Resultados para longitud del tallo.

		0	50	100	150	200	250
INMOVILIZADOS EN MEDIO HIDROPÓNICO	Control	12.30±3.88	17.30±5.63	10.71±5.13	11.11±5.46	7.70±2.90	12.08±3.96
	CV	16.25±16.66	6.66±2.58	6.87±2.58	17.50±4.18	31.25±11.87	11.66±7.07
	AW	7.14±3.93	43.75±17.06	9.37±5.62	15.71±6.34	11.25±7.90	24.28±9.32
	AB	12.50±4.62	51.42±10.69	25.62±6.23	15.71±5.34	2.05±9.55	18.00±8.12
	AWCV	26.36±19.11	12.85±4.87	11.42±3.77	56.66±8.16	10.00±0.00	10.00±0.00
	ABCV	5.00±0.00	6.42±2.43	64.28±12.72	5.00±0.00	5.83±2.04	35.00±18.40
	Control	48.33±16.89	45.27±12.65	18.00±7.74	59.61±7.76	14.44±12.93	18.57±10.08
	CV	70.09±12.21	72.85±11.12	30.00±33.70	65.55±8.81	67.77±8.33	65.71±7.86
	AW	59.44±8.07	27.91±20.16	2.00±7.07	7.50±2.73	41.66±7.52	47.77±12.01
	AB	79.00±7.37	72.50±4.62	60.00±8.94	56.00±10.74	25.55±12.36	54.44±17.40
	AWCV	27.72±28.13	28.75±8.34	67.50±10.35	11.66±4.08	10.00±0.00	11.42±3.77
	ABCV	10.00±13.22	4.28±5.34	16.66±8.16	2.50±2.67	10.00±0.00	48.75±16.42
	Control	72.22±17.33	58.05±12.96	69.54±16.75	68.94±14.10	62.50±18.02	52.35±17.05
	CV	65.55±12.36	49.44±11.02	51.11±9.27	53.88±4.85	16.25±18.46	25.71±11.33

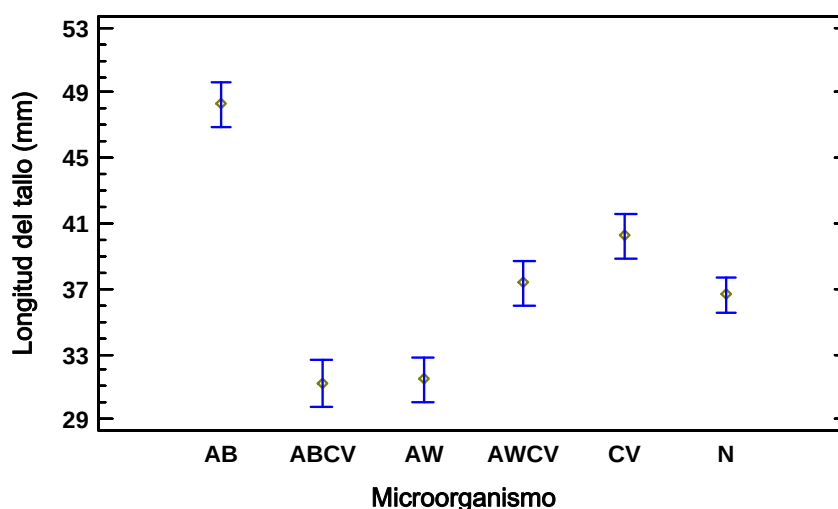


Figura 24: Gráfica de ANOVA para el promedio longitud de tallo en plantas de tomate asociadas con diferentes microorganismos inmovilizados en medio hidropónico.

Los tratamientos en inmovilizados presentaron un incremento en la longitud del tallo a través del tiempo [caso contrario a lo observado en los experimentos anteriores (I y II)], donde los tallos con mayor tamaño se presentaron a los 30 días de desarrollo con un promedio de 55.83 ± 0.66 mm (Ver figura 25).

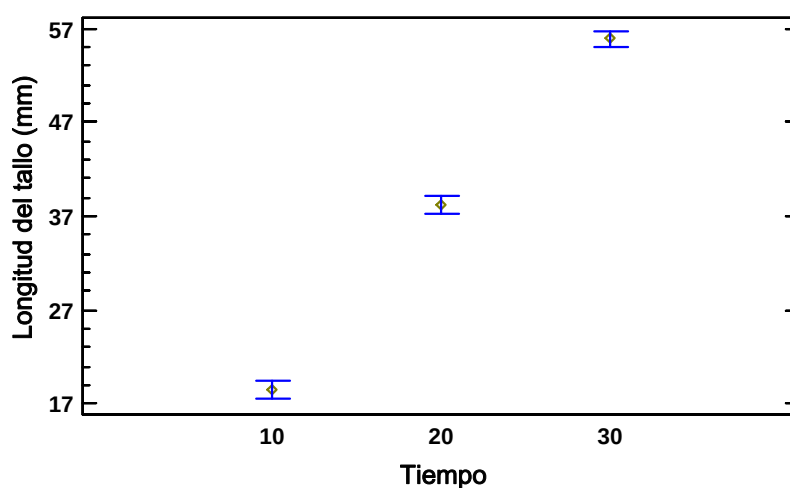


Figura 25: Gráfica de ANOVA para el promedio longitud de tallo en los periodos de tiempo monitoreados.



Los tratamientos en inmovilizados presentaron mayor variación en la respuesta observada con las combinaciones de microorganismos (ABCV y AWCV) y con *A. brasilense* CD simple (AW), al contrario de los tratamientos con *A. brasilense* BIF (AB) y *C. vulgaris* (CV). En general el mayor desarrollo se detectó en la concentración de 100 mM (40.17 ± 0.93 mm) arrojando promedios incluso mayores a los referidos en los experimentos con medio hidropónico en células libres (30.6 ± 1.7 mm); sin embargo los tratamientos donde se expuso al microorganismo *A. brasilense* BIF de manera simple o asociada (AB ó ABCV) presentaron una mayor resistencia a la salinidad, con plantas que presentaron desarrollo hasta en la concentración de 250 mM, con un promedio en la longitud de tallo de 50.70 ± 2.41 mm (Ver figuras 26-28).

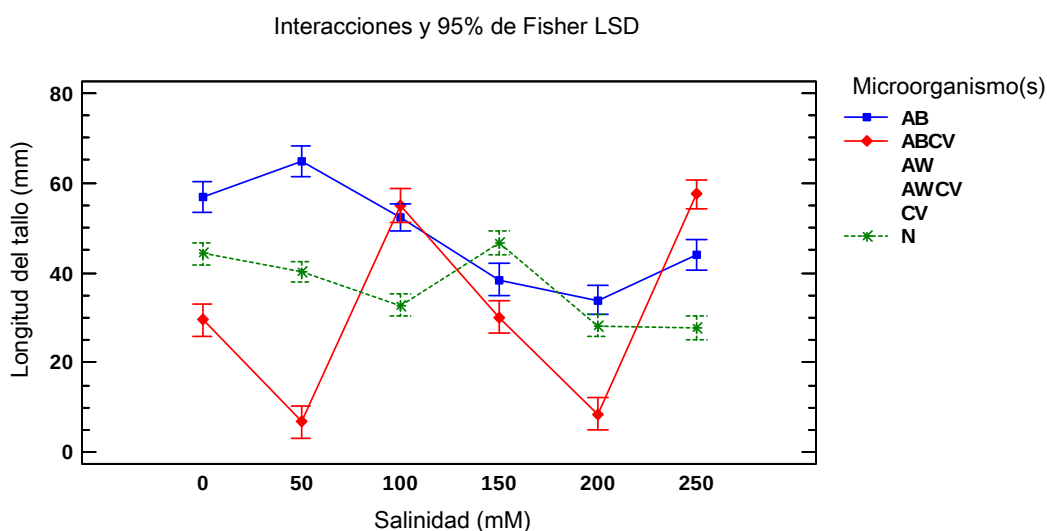


Figura 26: Gráfica de interacciones para longitud de tallo en función de la salinidad, donde se muestra la respuesta de los tratamientos con *A. brasilense* BIF simple (AB) y en asociación con *C. vulgaris* (ABCV).

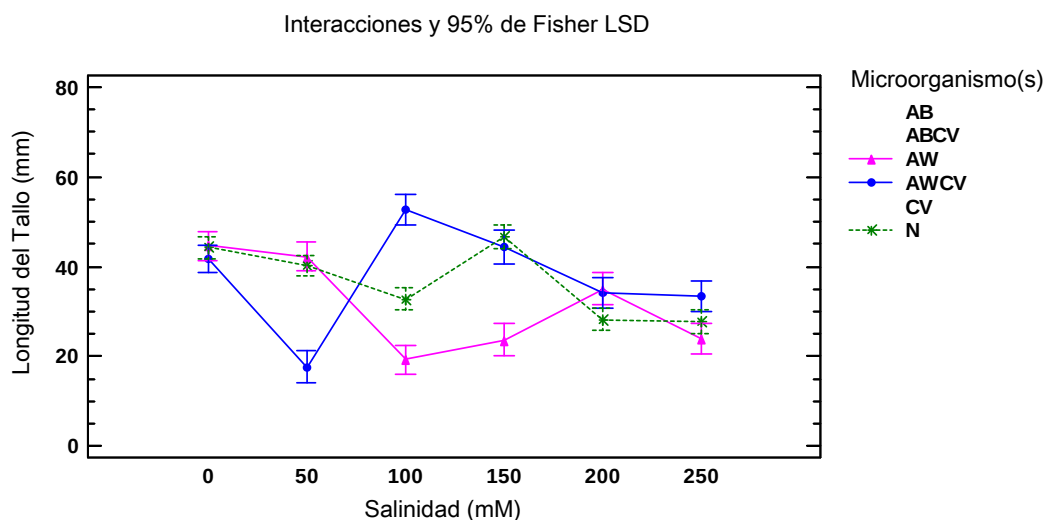


Figura 27: Gráfica de interacciones para longitud de tallo en función de la salinidad, donde se muestra la respuesta de los tratamientos con *A. brasilense* CD simple (AW) y en asociación con *C. vulgaris* (AWCV).

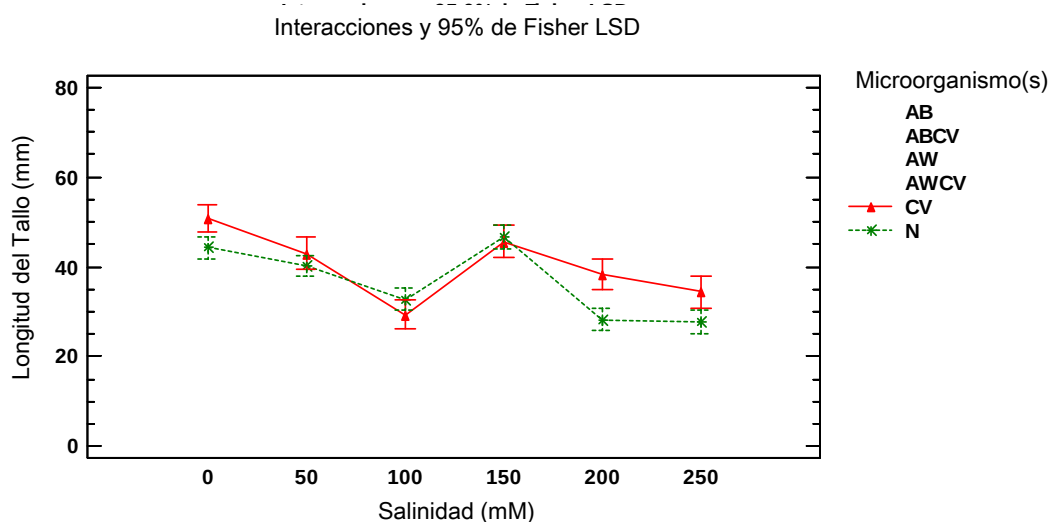


Figura 28: Gráfica de interacciones para longitud de tallo en función de la salinidad, donde se muestra la respuesta de los tratamientos con el microorganismo simple *C. vulgaris* (CV) en comparación con el control.



7.9 Longitud de Raíz: Los resultados de los tratamientos donde se emplearon los microorganismos inmovilizados indican que el desarrollo de la raíz se ve influenciado tanto por el tiempo como por los microorganismos asociados y la concentración de NaCl en cuestión (Ver tabla 18); y al igual que en el caso del desarrollo del tallo, los mejores tratamientos resultaron ser aquellos con el microorganismo *A. brasilense* BIF simple (AB) con promedio en las longitudes de raíz de 24.11 ± 0.60 mm, seguido de y *C. vulgaris* simple (CV) 20.77 ± 0.62 mm y los demás tratamientos (AW, AWCV y ABCV) que tuvieron desarrollos inferiores a los indicados por el Control (Ver tabla 19 y Figura 29).

TABLA 18

Análisis de Varianza para Longitud de raíz (mm) - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Time	25495.0	2	12747.5	224.90	0.0000
B:Microorganism(s)	10755.8	5	2151.16	37.95	0.0000
C:Salinity (mM)	655.556	5	131.111	2.31	0.0420
INTERACCIONES					
AB	20780.0	10	2078.0	36.66	0.0000
AC	5592.02	10	559.202	9.87	0.0000
BC	11683.4	25	467.336	8.24	0.0000
ABC	26929.9	50	538.598	9.50	0.0000
RESIDUOS	58608.9	1034	56.6818		
TOTAL (CORREGIDO)	166294.	1141			



TABLA 19

Diseño Experimental y Resultados para longitud de Raíz.

		0	50	100	150	200	250
INMOVILIZADOS EN MEDIO HIDROPÓNICO	Control	10.47+6.30	16.94+6.67	18.43+10.91	13.94+6.78	9.37+5.73	11.31+5.22
	CV	12.22+7.12	17.00+10.59	5.62+1.76	12.77+7.12	18.33+9.01	7.14+2.67
	AW	13.33+5.00	22.77+6.66	3.57+2.43	11.87+2.58	12.50+9.50	15.91+9.20
	AB	13.33+5.00	17.90+7.68	12.00+4.21	14.72+5.08	21.11+7.81	16.66+5.00
	AWCV	13.33+5.00	13.33+4.29	12.22+4.40	20.00+8.52	14.16+6.68	12.50+6.21
	ABCV	5.55+1.66	6.66+2.50	22.22+8.33	10.83+6.68	22.14+9.06	17.14+9.51
	Control	19.75+6.97	26.87+4.78	14.06+5.83	26.13+14.30	16.47+4.92	13.15+6.71
	CV	25.36+5.04	27.00+4.83	2.85+2.67	24.44+5.27	22.50+7.07	21.25+9.91
	AW	25.55+5.27	11.54+6.34	17.00+9.48	13.88+7.40	14.37+7.76	31.25+8.34
	AB	34.44+12.36	40.00+8.66	35.00+5.47	26.66+7.07	12.50+4.62	28.00+11.35
	AWCV	13.00+4.87	17.00+4.83	17.50+7.53	20.90+9.43	14.00+5.16	11.25+3.53
	ABCV	2.14+2.67	17.14+4.87	13.33+6.61	4.54+4.15	11.81+4.04	15.00+5.27
	Control	29.06+12.14	30.83+8.08	33.33+7.66	30.52+8.48	40.52+7.05	30.31+7.40
	CV	33.57+4.75	28.75+6.40	31.25+3.53	28.23+5.28	31.66+7.52	25.71+5.34
	AW	14.25+3.01	15.25+5.11	6.81+7.83	6.36+6.36	11.66+2.50	0.00+0.00
	AB	29.00+13.70	27.14+4.87	40.83+8.01	27.14+9.51	26.20+12.38	12.77+14.60
	AWCV	23.00+9.48	17.27+10.09	25.00+9.25	41.81+14.01	38.00+4.21	35.00+8.49
	ABCV	48.57+13.45	10.00+0.00	24.44+8.81	42.50+10.35	10.00+0.00	32.50+4.62

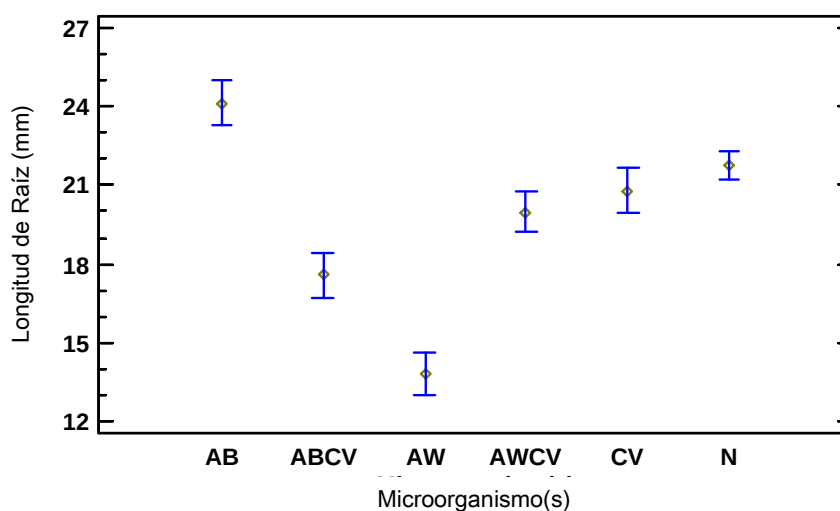


Figura 29: Gráfica de ANOVA para el promedio de longitud de raíz en plantas de tomate asociadas con diferentes microorganismos inmovilizados en medio hidropónico.



El desarrollo de la raíz siguió la misma tendencia que en el tallo, observándose que el mayor tamaño se alcanzó al final de experimento, con un promedio de elongación equivalente a $26.01 \pm 0.41 \text{ mm}$ e incluso se observaron plántulas tolerantes a la concentración de 250 mM de NaCl en el periodo de 30 días, como es el caso de todos los tratamientos en los que asoció *A. brasilense* BIF de forma simple o combinada (AB, $19.1481 \pm 1.42 \text{ mm}$ y ABCV, $21.54 \pm 1.52 \text{ mm}$); ver figura 30.

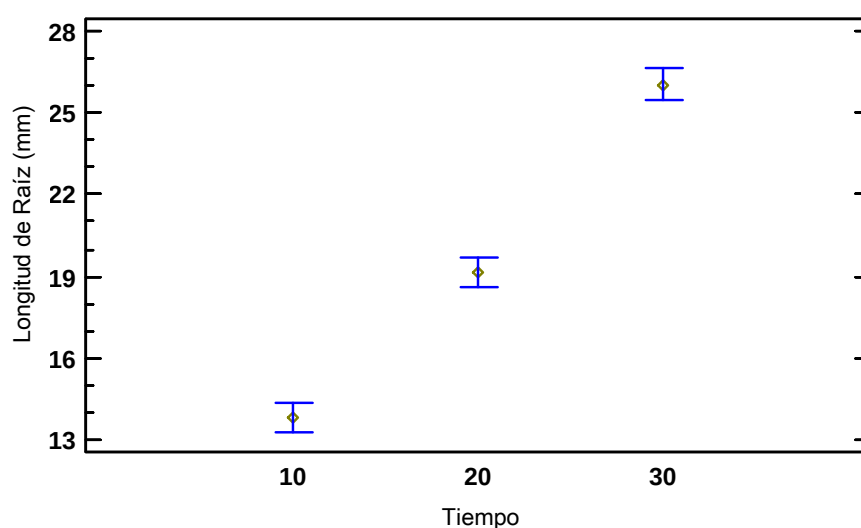


Figura 30: Gráfica de ANOVA para el promedio de longitud de raíz en plantas de tomate asociadas con diferentes microorganismos inmovilizados en medio hidropónico.

Lo anterior difiere de los resultados obtenidos en los experimentos con medio hidropónico en células libres, donde se observó que su mayor desarrollo se alcanzó a los 10 días (el tiempo no represento un efecto considerable), y cuyo promedio fue inferior al obtenido en inmovilizados en el mismo periodo de tiempo (con promedios de 11.7 ± 0.04 para células libres y $13.86 \pm 0.39 \text{ mm}$ en inmovilizados).



En lo referente a la salinidad se observaron dos grupos homogéneos bien definidos, el primero compuesto por las concentraciones de 0, 50 y 150 mg, el cual presenta el promedio de elongación de raíz más elevado ($20.41 \pm 1.68 \text{ mm}$); y el segundo conformado por los tratamientos con 100, 200 y 250 mM de NaCl mismos que arrojan resultados inferiores en el desarrollo de la raíz ($18.91 \pm 0.57 \text{ mm}$). Es notorio que el tratamiento con *A. brasilense* BIF (AB) sobresale en lo referente al tamaño de la raíz generada (Ver figura 31-34).

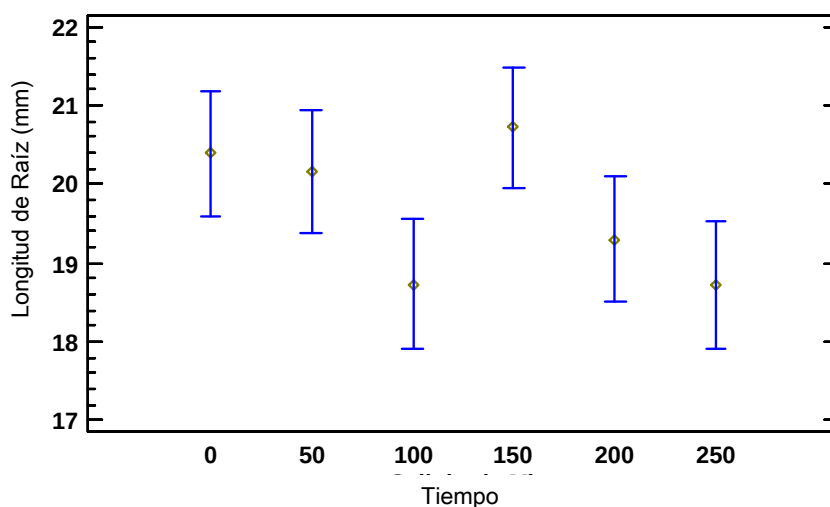


Figura 31: Gráfica de ANOVA para el promedio de longitud de raíz conforme al nivel de salinidad en cultivos inmovilizados en medio hidropónico.



Interacciones y 95.0% de Fisher LSD

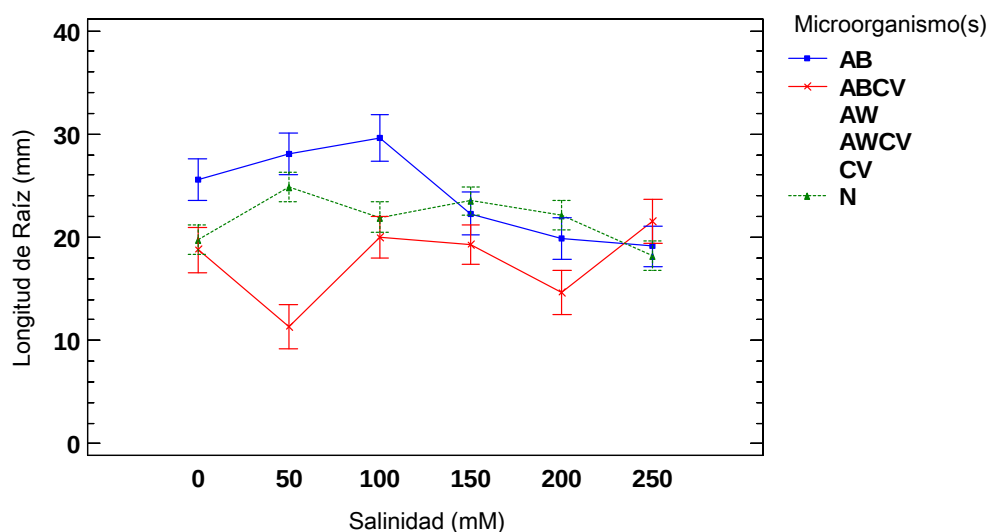


Figura 32: Gráfica de interacciones para el promedio de longitud de raíz en los tratamientos con *A. brasilense* BIF simple y asociado con *C. vulgaris*, con los diferentes niveles de NaCl.

Interacciones y 95.0% de Fisher LSD

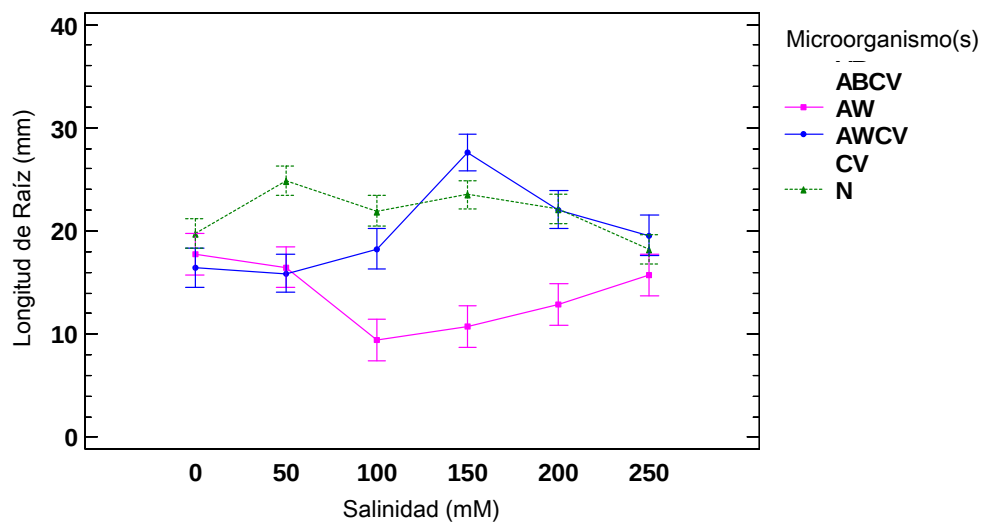


Figura 33: Gráfica de interacciones para el promedio de longitud de raíz en los tratamientos con *A. brasilense* Cd simple y asociado con *C. vulgaris*, con los diferentes niveles de NaCl.



Interacciones y 95.0% de Fisher LSD

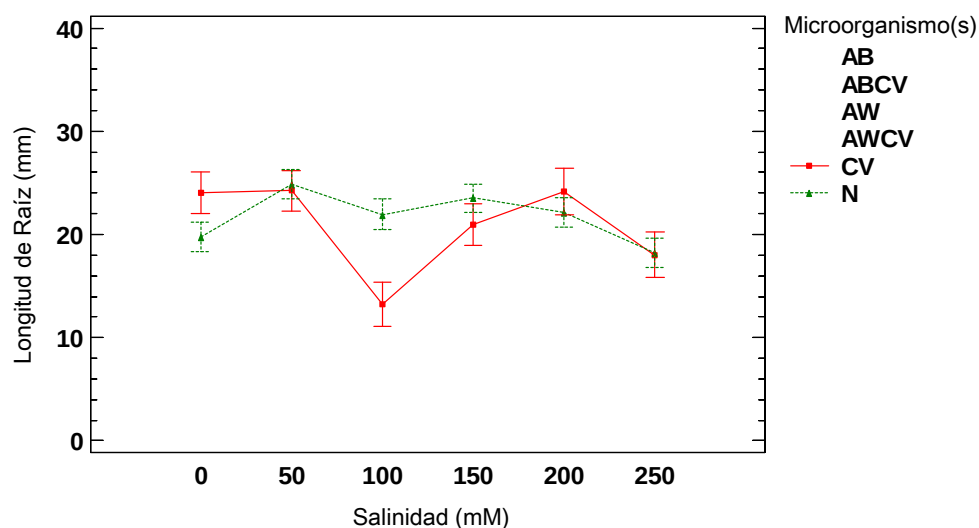


Figura 34: Gráfica de interacciones para el promedio de longitud de raíz en los tratamientos con *C. vulgaris*, con los diferentes niveles de NaCl, en comparación con el control.

7.10 Generación de hojas: El ANOVA indica que, a diferencia de los resultados obtenidos en el desarrollo del tallo y raíz, para el caso de número de hojas generadas la salinidad no represento un factor significativo, como lo indica la tabla 20, lo que implica que solo el tipo de microorganismo empleado y el tiempo intervinieron en el número de hojas obtenidas en cada tratamiento. Asimismo, los resultados arrojados indican la formación de tres grupos homogéneos, el primero conformado por el tratamiento con *A. brasilense* BIF (AB) con el mayor promedio (2.25 ± 0.07); el segundo grupo, conformado por los tratamientos con *C. vulgaris* y *A. Brasilense* BIF simples y asociados (CV, AW, AWCV), junto con el control, presentando un promedio de hojas generadas de 1.60 ± 0.06 ; y el



último grupo compuesto por el tratamiento de *A. brasilense* BIF asociado a *C. vulgaris* (ABCV), el cual presento el menor número de hojas, aún por debajo del control (1.25 ± 0.07); ver tabla 21 y figura 35.

TABLA 20

Análisis de Varianza para Número de hojas - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Microorganismo	116.515	5	23.303	18.23	0.0000
B:Tiempo	154.709	2	77.3544	60.51	0.0000
C:Salinidad	13.1021	5	2.62041	2.05	0.0691
INTERACCIONES					
AB	83.6409	10	8.36409	6.54	0.0000
AC	113.618	25	4.54472	3.56	0.0000
BC	52.3978	10	5.23978	4.10	0.0000
RESIDUOS	1858.78	1454	1.27839		
TOTAL (CORREGIDO)	2425.21	1511			

TABLA 21

Diseño Experimental y Resultados para Número de hojas

		0	50	100	150	200	250
INMOVILIZADOS EN MEDIO HIDROPÓNICO	Control	0.95+1.19	1.62+0.87	1.00+1.02	1.20+1.17	1.00+1.02	1.29+0.95
	CV	1.41+1.37	1.45+1.09	1.00+1.04	1.50+0.90	1.50+0.90	1.00+1.04
	AW	1.75+0.62	1.33+0.98	0.83+1.33	1.00+1.34	1.33+1.49	1.33+0.98
	AB	1.75+0.86	2.00+0.00	2.00+0.00	2.00+0.00	2.00+0.00	2.00+0.00
	AWCV	1.16+1.02	1.33+0.98	1.00+1.04	1.33+0.98	0.66+0.98	0.66+0.98
	ABCV	0.83+1.26	0.75+0.96	1.54+1.12	1.07+1.25	1.00+1.12	1.50+1.38
	Control	1.87+1.15	1.83+0.81	0.91+1.05	1.29+0.95	0.91+1.01	0.95+0.99
	CV	2.50+1.31	2.00+1.27	1.00+1.27	2.33+0.88	2.08+1.08	1.83+1.46
	AW	3.25+0.75	1.16+1.11	1.25+1.13	0.83+1.02	1.58+1.44	2.00+1.34
	AB	2.58+1.08	2.58+0.99	2.66+0.49	2.91+0.51	1.58+1.31	2.00+1.27
	AWCV	1.08+1.44	2.00+0.73	1.58+1.24	1.25+1.13	1.33+0.98	0.83+1.02
	ABCV	0.83+1.02	0.83+1.02	0.83+1.02	1.16+0.57	0.33+0.77	1.33+0.98
	Control	1.87+1.42	2.29+0.99	2.75+0.94	2.29+1.16	2.54+0.97	1.79+1.31
	CV	2.41+1.16	1.66+1.07	1.58+0.79	1.41+1.31	1.41+1.08	1.58+0.99
	AW	2.66+1.07	2.50+0.90	2.25+2.41	1.16+1.46	2.41+1.16	0.66+0.98
	AB	1.83+1.40	2.58+0.90	2.91+0.99	2.33+1.49	3.25+0.45	1.58+1.92
	AWCV	2.16+1.40	1.25+1.54	2.75+0.96	2.91+0.28	2.75+0.45	2.58+0.90
	ABCV	2.00+1.80	1.16+1.74	2.75+0.96	2.25+1.35	0.83+1.26	2.50+1.56

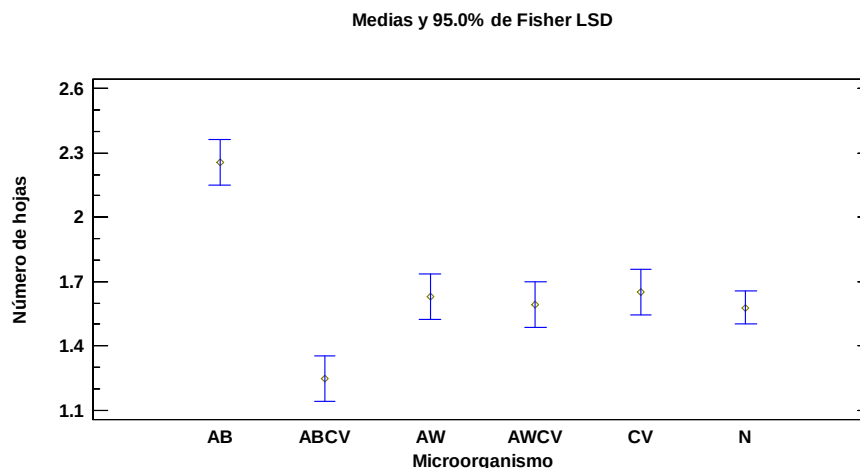


Figura 35: Gráfica de ANOVA para de número de hojas en plantas de tomate asociadas con diferentes microorganismos inmovilizados en medio hidropónico.

Los resultados mencionados coinciden con los obtenidos en las mediciones de longitud de tallo y raíz analizados anteriormente, donde el tratamiento con *A. brasilense* BIF (AB) fue el más efectivo en los tratamientos con inmovilizados; y de igual forma, la generación de hojas se vio incrementada a través del tiempo, alcanzando el mayor número a los 30 días (2.10 ± 0.05), cuestión que difiere de lo observado en los experimentos con células libres, en los cuales el mismo tratamiento AB presento un promedio inferior en la generación de hojas de ~ 0.48 (ver figuras 36 y 37).

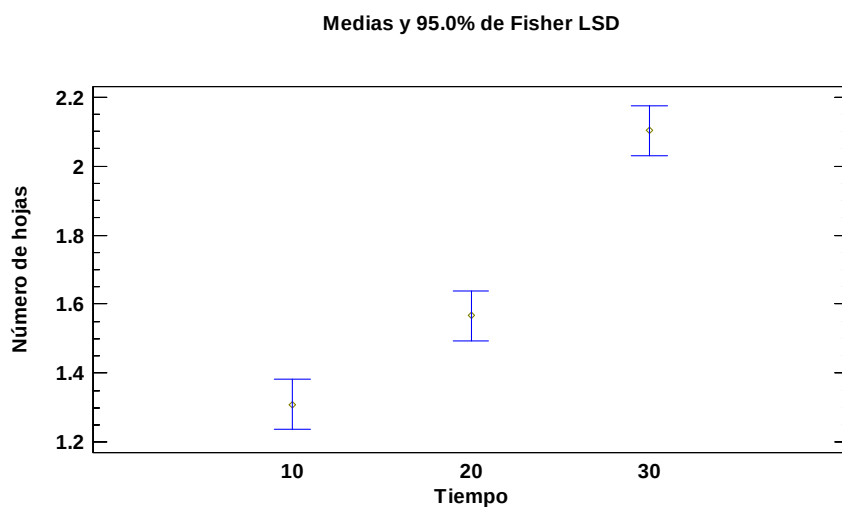


Figura 36: Gráfica de ANOVA para el promedio de número de hojas generadas en plantas de tomate a través de los periodos de tiempo muestreados.

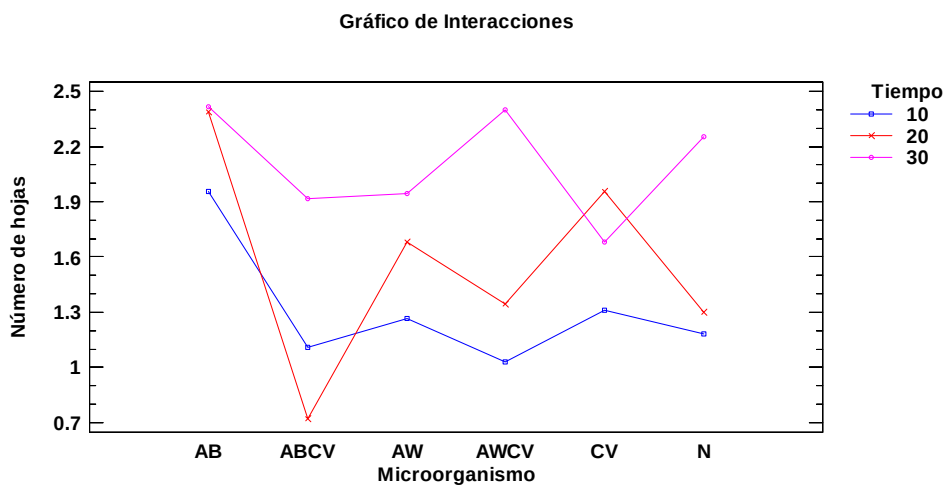


Figura 37: Gráfica de interacciones de número de hojas generadas en plantas crecidas con diferentes asociaciones microbianas en inmovilizados durante los tres periodos de tiempo contemplados en los experimentos.



8. DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados observados, *Azospirillum brasilense* BIF seguido por *Chlorella vulgaris* mostraron el mejor efecto en plantas, promoviendo el desarrollo de tallos más largos con resultados incluso a 250 mM de NaCl. Dado que las asociaciones microbianas mostraron en general mejores resultados para la elongación de tallos y las raíces, así como el número de hojas generadas en las plantas de tomate en comparación con el control, esto podría implicar que las plantas podrían ser irrigadas con agua de mar, al menos parcialmente, cuando se encuentren asociadas a cualquiera de estos microorganismos, ya que además de disminuir el uso de agua dulce, el riego con aguas salobres puede tener efectos positivos en los frutos de tomate, esto es, un aumento de los sólidos solubles, sólidos totales, carotenoides y acidez. Algunos de estos factores, como los sólidos solubles y carotenoides, al encontrarse en mayores niveles constituyen un atributo de interés o deseable para la agroindustria procesadora de esta hortaliza, dado que se reducirían costos de producción y a la vez la calidad de los productos se optimizaría (Vitelo y col., 2007).

Por otro lado, en otros estudios efectuados dentro del Laboratorio de Metabolismo Microbiano de la Universidad Autónoma de Guadalajara con microalgas del género *Dunaliella* en células libres, empleando ambos medios y ambos microorganismos pero con agua de mar en lugar de los niveles de salinidad establecidos, se observaron resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo, donde *Azospirillum brasilense* BIF presentó los mejores resultados, con promedios de longitud de tallo y de raíz



similares a los reportados, lo que implica que el rango de salinidad probado corresponde con la salinidad del agua de mar (datos no publicados).

Conforme a lo observado, si la concentración de NaCl se aumenta para aquellos plantas crecidas en medio hidropónico, el efecto de *A. brasilense* BIF será mejor; mientras que la triple asociación entre *A. brasilense* Cd, *C. vulgaris* y las plantas parece ser sensible a los incrementos de NaCl. Estos resultados están de acuerdo con los trabajos reportados previamente sobre *Azospirillum brasilense* BIF creciendo a concentraciones de hasta 200 mM de NaCl, donde no se observó ningún descenso en la tasa de crecimiento de bacterias, pero cuando se aumentó la concentración a 300 mM de NaCl, la tasa de crecimiento disminuyó en 66% (Rivarola y col., 1998). En nuestros resultados, *A. brasilense* Cd mostró casi el mismo comportamiento creciente, sin embargo suponemos que *A. brasilense* BIF podría crecer sin problemas incluso hasta 300 mM.

En trabajos anteriores con plantas de *Zea mays* bajo estrés osmótico, Rodríguez-Salazar y col. (2009) observaron un aumento de la biomasa, es decir, las raíces más gruesas, de esas plantas cultivadas en asociación con *A. brasilense* BIF. Otros trabajos con el maíz y el trigo reportan un fenómeno osmoadaptativo en las células vegetales asociadas con *A. brasilense* (Abd El-Samad y col. (2004), Nagarajan y col. (2007)]. Algunos otros ejemplos en el trigo y la cebada sugieren que la asociación planta-microorganismo es beneficiosa para la tolerancia a la sal de la planta debido a un aumento en su capacidad de crecimiento [Caballero-Mellado J (2006), Zawoznik y col. (2011)].



Por otro lado, Hiremath y Mathad (2010) demostraron que en *Chlorella vulgaris* se estimuló positivamente por hasta 200 mM de NaCl la producción de clorofila y prolina, pero cuando la concentración de la salinidad se incrementó hasta 300 mM se observó una reducción en la clorofila. Díaz y col. (1999) y Gill y col. (2002) reportaron que la prolina se acumula en las plantas en respuesta al aumento de la salinidad del medio ambiente, lo que podría explicar la mayor eficacia en los resultados de los tratamientos en medio MS; asimismo, Szekely (2004) refiere que en las plantas superiores se considera que la prolina desempeña un papel importante en el mecanismo de defensa de las células estresadas que proporcionan fuente de carbono, nitrógeno y energía después de un estrés por la degradación; esto apoya la evidencia mostrada aquí referente a *C. vulgaris* y su efecto sobre la tolerancia de las plantas como se mencionó anteriormente, donde aquellos tratamientos de *C. vulgaris* presentaron el segundo efecto marcado en tolerancia a la salinidad en plantas de tomate, ya que de acuerdo con Hong et al. (2000) el aumento de la resistencia al estrés oxidativo es debido a la acumulación de prolina y otros metabolitos (Parida y col., 2008; Hooijdonk y col., 2010; Sánchez-Rodríguez y col., 2012).

En general, las longitudes de los tallos y las raíces en células libres disminuyeron con el tiempo, a pesar del tratamiento aplicado y esto podría deberse a la inmersión prolongada de las plantas en las soluciones nutritivas, donde lógicamente el número de hojas desarrolladas en los tratamientos fueron inferiores a aquellas plantas establecidas en inmovilizados, debido a que todos los órganos de la parte aérea de las plantas de tomate se alteran con la salinidad. Los tallos alcanzan menor altura, las hojas disminuyen en



número, el área foliar igualmente se reduce y en los frutos se registra un menor número y peso. Al compararse estos resultados con cultivares de *L. esculentum* se detectó una gran heterogeneidad en la respuesta a este estrés, puesto que algunos cultivares fueron extremadamente sensibles y otros más tolerantes, incluso uno presentó un mejor comportamiento en la producción de frutos en estado de estrés, conforme a lo mencionado por Vitelio y col. (2007).

La inmovilización de los dos microorganismos dentro de la matriz de alginato, el cual es inocuo y no tóxico, provee un sostén necesario para las plantas gracias al cual emergen del medio, además que asegura el establecimiento de esta asociación artificial y el efecto mutuo, debido a que los microorganismos están atrapados dentro del gel, el movimiento de *A. brasilense* y *C. vulgaris* se ve limitado y los metabolitos generados, como es el caso de la trehalosa y ácido indolacético, quedan concentrados en las cavidades donde las raíces de las plantas establecidas tienen un contacto directo, aunado al hecho de que los nutrientes en el medio circundante se difunden libremente dentro del gel poroso esto conforme a lo reportado por Bashan y col., 2007, ventajas que se vieron reflejadas en los resultados obtenidos al compararlo con los tratamientos en células libres.

Después de observar los resultados de los tres experimentos, es obvia la utilidad de los experimentos para los estudios básicos de la compleja interacción que ocurre entre plantas y microorganismos potencializadores del desarrollo. El experimento presentado de la interacción entre los microorganismos, atrapados en una matriz de gel fue efectivo para el establecimiento de las plantas, generando un mayor tamaño y un desarrollo más



efectivo de las mismas conforme paso el tiempo y hasta el final de los periodos contemplados (30 días).

Conforme a lo mencionado anteriormente, el uso de cultivos inmovilizados no se restringe a la interacción *Chlorella vulgaris*-*Azospirillum brasilense* que engloba la mayoría de estudios hechos hasta ahora. Estas opciones abren la puerta a infinitas combinaciones de microalgas-PGPB considerando que hay numerosas especies de microalgas y PGPB para escoger (De-Bashan y col., 2007).

Por último cabe mencionar que todos los componentes son de bajo costo, los dos microorganismos son fácilmente cultivables y para su análisis se utilizan técnicas estándar de microbiología y es un sistema libre de suelo. La reproducibilidad es muy alta y una réplica es simplemente un tubo cónico de 50mL, lo que permite tener en un espacio reducido tantas réplicas como sean necesarias. Al analizar varios cientos de unidades experimentales, encontramos que el error estándar es muy bajo permitiendo de esta manera detectar efectos mínimos que ocurren entre los tres componentes (microorganismos, plantas y medio) durante la interacción.



9. CONCLUSIONES

- ▶ A partir de los resultados obtenidos con células libres se concluye que el tratamiento con *Azospirillum brasilense* BIF (AB), seguido por *Chlorella vulgaris* (CV) presentaron los mejores resultados en el desarrollo de tallo, raíz e incluso generación de hojas, con una salinidad de 100 mM en el periodo de 10 días, periodo después del cual se observó un decremento en el desarrollo de las plantas, derivando en oxidación y desintegración celular.
- ▶ Por lo anterior, se deduce que para conseguir una curva estable de crecimiento de la planta, sería conveniente utilizar los tratamientos de *Azb.* BIF y *Cv* a 100 mM hasta el periodo de 10 días, tiempo requerido por la planta para “aclimatarse a la salinidad del medio”, después del cual se podrían trasladar al medio hidropónico con una concentración de hasta 200 mM, con lo que se cree las plántulas continuarían su desarrollo sin problemas hasta los 30 días, a diferencia de los tratamientos microorganismos inmovilizados, los cuales presentaron desarrollo exponencial continuo hasta el final de los periodos establecidos.
- ▶ Los tratamientos con inmovilizados presentaron también los mejores resultados en *A. brasilense* BIF (AB), seguido por *Chlorella vulgaris* (CV) a 100mM, sin embargo el crecimiento de las plantas en esta variante fue exponencial hasta el final del experimento (30 días), observándose que los parámetros evaluados (elongación de tallo y raíz, y



número de hojas generadas) presentaron un desarrollo más acelerado, mayor tamaño y turgencia, además que se observaron plantas con tolerancia hasta 250mM.

- Nuestros resultados arrojan tolerancia por encima de 100mM (5.8 g/L) lo que sugieren que el uso de *A. brasilense* BIF y *C. vulgaris* es un enfoque viable para aumentar la tolerancia a la sal en plantas, su biomasa y la posible utilización parcial de agua de mar para el riego de plantas hortícolas.



10. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Abd- El Baky**, H.H.; Hussein, M.M.; El-Baroty, G.S. (2008). Algal extracts improve antioxidant defense abilities and salt tolerance of wheat plant irrigated with sea water. *African Journal of Biochemistry Research* 2(7): 151 –164.
- Abd El-Samad Hamdia M**, Shaddad MAK, Doaa MM (2004) Mechanisms of salt 291 tolerance and interactive effects of *Azospirillum brasilense* inoculation on maize 292 cultivars grown under salt stress conditions. *Plant Growth Regulation* 44: 165–174
- Agarwala**, Dutt R., K.V.B.R. Tilak y J.P.S. Rana. 1991. Isolation of *Azospirillum* from the interior of various parts of some graminaceous plants, *Z. Mikrobiol.* 146:217-219.
- Arredondo** BO y Vázquez-Duhalt R. 1991. “Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas”. *Ciencia y Desarrollo.* 17: 99-111.
- Arsac**, J.F., C. Lamothe, D. Mulard y J. Fages. 1990. Growth enhancement of Maize (*Zea mays* L) through *Azospirillum lipoferum* inoculation: effect of plant genotype and bacterial concentration. *Agronomie.* 10: 640-654.
- Arshad**, M., and Frankenberger Jr., W.T. 1991. Microbial production of plant hormones. *Plant and Soil.* 133:1-8. Arshad, M., and Frankenberger Jr., W.T. 1998. Plant growth- regulating substances in the rhizosphere: Microbial production and functions. *Advances in Agronomy.* 62:45-151.
- Ayers** A.D.; Brown, J.W.; Wadleigh, C.H. (1952). Salt tolerance of barley and wheat in soil plots receiving several salinization regimes. *Agron. J.* 44: 307-310.



- Bacilio M.**, Rodriguez H., Moreno M., Hernandez J.P.; Bashan Y. (2004). Mitigation of salt stress in wheat seedlings by a gfp-tagged *Azospirillum lipoferum*. *Biol. Fertil Soils* 40: 188-193.
- Barbieri**, P., T. Zanelli, E. Galli y G. Zanetti. 1986. Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. *FEMS Microbiol. Lett.* 36: 87-90.
- Barea J.**, Navarro M. y Montoya E. 1976. "Production of plant growth regulators by rhizosphere phosphate-solubilizing bacteria". *J. Appl. Bacteriol.* 40:129-134.
- Bashan L.E.**, Hernández J.P. y Bashan Y. 2003. "Utilidad de las bacterias de uso agrícola para el crecimiento de algas empleadas en el tratamiento de aguas residuales". *Gaceta Biomedica* 8: (4): 8-9.
- Bashan Y.** y G. Holguin. 1998. A proposal for the division of "plant growth-promoting rhizobacteria" into two classifications: biocontrol-plant growth-promoting bacteria and plant growth-promoting bacteria. *Soil Biol. Biochem.* 30: 1225-1228.
- Bashan Y.**, Holguín G. 1997. "Azospirillum-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996)". *Can. J. Microbiol* 43: 103-121.
- Bashan Y.**1990. Short exposure to *Azospirillum brasilense* Cd inoculation enhanced proton efflux in intact wheat roots. *Can. J. Microbiol.* 36:419-425.
- Bashan, Y.** y G. Holguin. 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Can. J. Microbiol.* 43: 103-121.
- Bashan, Y.** y H. Levanony. 1989. Wheat root tips as a vector for passive vertical transfer of *Azospirillum brasilense* Cd. *J. Gen. Microbiol.*135: 2899-2908.



- Bashan**, Y. y J.G. Dubrovsky. 1996. *Azospirillum* spp. participation in dry matter partitioning in grasses at the whole plant level. *Biol. Fertil. Soils* 23:435-440.
- Bashan**, Y., Y. Ream, H. Levanony y A. Sade. 1989. Nonspecific responses in plant growth, yield, and root colonization of noncereal crop plants to inoculation with *Azospirillum brasilense* Cd. *Can. J. Bot.* 67: 1317-1324.
- Becking**, J.H. 1982. *Azospirillum lipoferum*-a reappraisal. In: *Azospirillum*, Genetics, Physiology, Ecology, ed. W Klingmüller. pp. 130-149. Basel: Birkhäuser Verlag.
- Beijerinck**, M.W. 1925. Über ein Spirillum, welches freien Stickstoff binden kann? *Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkd. Infektionskr. Abt. 2*, 63: 353-359.
- Berea** J., Navarro M. y Montoya E. 1976. Production of plant growth regulators by rhizosphere phosphate-solubilizing bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 40:129-134.
- Bligh**, G.E. y Dyer, J.W. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37(3): 911-917.
- Borowitzka M.A.** 1997. Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints. *J. Appl. Phycol.* 9: 393-401.
- Bottini** R., Fulchieri M., Pearce D., Pharis R. 1989. Identification of gibberellins A1, A3, and Iso-A3 in cultures of *A. lipoferum*. *Plant Physiol.* 90: 45-47.
- Bouton**, J.H. y D.A. Zuberer. 1979. Response of *Panicum maximum* Jacq. to inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Plant Soil* 52: 585-590.
- Burg**, S. 1962. The physiology of ethylene formation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 13: 265-302.
- Caballero-Mellado** J (2006) Microbiología agrícola e interacciones microbianas con plantas. *Rev Latinoam Microb* 48(2): 154 – 161



- Cacciari I.**, Lippi D. and Pietrosanti T. 1989. Phytohormone-like substances produced by single and mixed diazotrophic cultures of *Azospirillum spp.* And *Arthrobacter*. Plant Soil 115: 151-153.
- Campbell**, M. N. 2008. Biodiesel: Algae as Renewable Source for Liquid Fuel. Guelph Engineering Journal (1) 2-7.
- Canto** M.J.C., Medina P.S. y Morales A.D. 2004. Efecto de la inoculación con *azospirillum spp.* em plantas de chile habanero (*Capsicum chinense jacquin*). Tropical and subtropical Agroecosystems. 4(01): 21-27.
- Carrillo-Garcia**, A., Bashan, Y., Diaz-Rivera, E., and Bethlenfalvay, G.J. 2000. Effects of resource - island soils, competition, and inoculation with *Azospirillum* on survival and growth of *Pachycereus pringlei*, the giant cactus of the Sonoran Desert. Restor. Ecol. **8**: 65-73.
- Cassán F.**, Piccoli P. y Bottini R. 2003. "Plant growth promotion by *Azospirillum sp.* An alternative model to increase crop yield". *Microbiología Agrícola: Un aporte de la Investigación Argentina para la Sociedad*. 157-158.
- Cassán F.**, Sgroy V., Perrig D. Masciarelli O. y Luna V. 2007. Producción de Fitohormonas por *Azospirillum sp.* Aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promocion del crecimiento vegetal. *Microbiología Agrícola: Un aporte de la Investigación Argentina para la Sociedad*. 61-86.
- Chen F.** y Johns M.R. 1996. A Strategy for high cell density culture of heterotrophic microalgae with inhibitors substrates. *Journal of Applied Phycology* 7:43-46.
- Chen G.** y Chen F. 2006. Growing phototrophic cells witout light. *Biotechnology Letters* 28: 607-616.



- Chisti Y.** 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25: 294-306.
- Chisti Y.** 2008. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol.* 26: 126-131.
- Cortés, V.G.; Saavedra, Del R.G.** (2007). Algunos efectos de la salinidad en el cultivo del tomate y prácticas agronómicas de su manejo. *Idesia* 25 (3): 47-58.
- Costacurta, A., Keijers V. y Vanderleyden.** 1994. Molecular cloning and sequense análisis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate deccarboxylase. *Mol. Gen. Genet.* 243: 463-472.
- Crossman, S.M. y W.A. Hill.** 1987. Inoculation of sweet potato with *Azospirillum*. *HortScience* 22: 420-422.
- Crozier A., Arruda P., Jasmim J.M., Monteiro A.M. y Sandberg G.** 1988. Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2833-2837.
- Davies P. (Ed).** 1995. Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Pp 833. Dordretch, Kluwer Acad. Press.
- Dayakar Yadav, B.R. y T.D. Nagendra Kumar** 1991. Response of mulberry (*Morus alba* var *local*) to inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Indian J. Microbiol.* 31: 109-111.
- De-Bashan L.E., Hernandez J. P., Morey T. y Bashan Y.** 2004. "Microalgae growth-promoting bacteria as «helpers» for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater". *Water Res.* 38:466-474.
- De-Bashan, L.E., Holguin, G., Glick, B.R. and Bashan, Y.** 2007. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propositos agricolas y ambientales. In:



Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo. (Eds.) Ferrera-Cerrato, R., and Alarcon, A. Chapter 8. Published by: Editorial Trillas, Mexico City, Mexico. pp. 170-224.

De-Bashan, L.E.; Bashan, Y; Moreno, M.; Lebsky, V.K.; Bustillos, J. J. 2002a. Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella* spp. when co-immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.* 48: 514-521.

De-Bashan, Luz E. y Bashan, Yoav. 2007. "Bacterias promotoras de crecimiento en plantas y microalgas verdes: un modelo conveniente para el estudio básico de las interacciones planta-bacteria". Capítulo 2. (CIBNOR).

Devereux, R., Loeblich, A. R. III., y Fox, G. E. 1990. Higher plant origins and the phylogeny of green algae. *J. Mol. Evol.* 31:18-24.

Díaz P, Borsani O, Monza J (1999) Acumulación de prolina en plantas en respuesta al estrés osmótico. *Agrociencia* 3(1):1-10.

Dismukes G.C., Carrieri D., Bennette N., Ananyev G. M. y Posewitz M. C. 2008. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19: 235- 240.

Döbereiner, J., I.E. Marriel y M. Nery. 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can. J. Microbiol.* 22: 1464-1473.

Falk, E.C., J.L. Johnson, V.L.D. Baldani, J. Döbereiner y N.R. Krieg. 1986. Deoxyribonucleic and ribonucleic acid homology studies of the genera *Azospirillum* and *Conglomeromonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36: 80-95.



- Falk**, E.C., J. Döbereiner, J.L. Johnson y N.R. Krieg. 1985. Deoxyribonucleic acid homology of *Azospirillum amazonense* Magalhães et.al. 1984 and emendation of the description of the genus *Azospirillum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35: 117-118.
- Fallik**, E., Y. Okon y M. Fischer. 1988. Growth response of maize roots to *Azospirillum* inoculation: Effect of soil organic matter content, number of rhizosphere bacteria and timing of inoculation. *Soil Biol. Biochem.* 20: 45-49.
- Fulchieri**, M. y L. Frion. 1994. *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays*): effect on yield in a field experiment in central Argentina. *Soil. Biol. Biochem.* 26: 921-923.
- Gill**, P.K., Sharma, A.D., Singh, P. and Bhullar, S.S., 2002. Osmotic stress induced changes in germination, growth and soluble sugar contents of *Sorghum bicolor* (L.) Moench seeds under various abiotic stresses. *Plant Physiol.* 128: 12 – 25.
- Givaudan** A. and Bally R. 1991. Similarities between large plasmids of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 78:245-252.
- González** L.E. y Bashan Y. 2000. Increased growth of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized and cocultured in alginate beads with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1537-1541.
- Gouveia**, L. y Oliveira A.C. 2009. Microalgae as raw material for biofuels production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36: 269-274.
- Guterman**, Y. (1993) Seed Germination in desert plants. Adaptations of desert organisms. Springer, Berlin, 253 pp.



- Harel M.**, Koven W., Lein I., Bar Y., Behrens P., Stubblefield J., Zohar Y. y Place A.R. 2002. Advanced DHA, EPA and ArA enrichment materials for marine aquaculture using single cell heterotrophs. *Aquaculture* 213: 347-362.
- Hartmann, A.**, y Zimmer, W. 1994. Physiology of *Azospirillum*. En Okon, Y. (ed), *Azospirillum/Plant Associations*. CRC Press. Boca Raton, FL. pp. 15-39.
- Henis, Y.** y Y. Bashan. 1986. Epiphytic survival of bacterial leaf pathogens. In: *Microbiology of the Phyllosphere*, ed. NJ Fokkema, J van den Heuvel, 252-268. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Hiremath S**, Mathad P (2010) Impact of salinity on the physiological and biochemical traits of *Chlorella vulgaris* Beijerinck. *J Algal Biomass Utiln* 1(2): 51-59.
- Holguín G.** y Glick B. 2001. Expresión of the ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4 in *Azospirillum brasilense*. *Microb Ecol.* 41:281-288.
- Hong, Z.**, K. Lakkineni, Z. Zhang and D.P.S. Verma, 2000 Removal of feedback inhibition of A1 – pyrroline - 5- carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiol.*, 122: 1129 – 1136.
- Hooijdonk, Van B.M.**; Woolley D.J; Warrington I.J. y Tustin D.S. (2010). Initial alteration of scion architecture by dwarfing apple rootstocks may involve shoot-root-shoot signaling by auxin, gibberallins and cytokinin. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology.* 85, 59-65.
- Horemans, S.**, Koninck, K., Neuray, J., Hermans, R. and Vlassak, K. 1986. “Production of plant growth substances by *Azospirillum* sp. and other rhizosphere bacteria”. *Symbiosis* 2: 341-346.



- Hosono, H.**, Uemura, Takumi, T., Nagamune, T., Toshiko, Y., Kishimoto, Nagashima, H., Shimomura, N., Natori, M., & Endo, I. 1994. Effect of culture temperature shift on the cellular sugar accumulation of *Chlorella vulgaris* SO-26. *J. Ferment. Bioeng.* 78:235–40.
- Hu Q**, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M y Darzins A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstock for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54:621-639.
- Hu, Q.** Sommerfeld M., Jarvis E., Ghirardi M., Posewitz M., Seibert M. y Darzins A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstock for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54:621-639.
- Ilangovan, K.**, Cañizares-Villanueva, R. O., González Moreno, S., & Voltolina, D. 1998. Effect of cadmium and zinc on respiration and photosynthesis in suspended and immobilized cultures of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60:936-943
- Ip P.** y Chen F. 2005. Employment of reactive oxygen species to enhance astaxanthin formation in *Chlorella zofingiensis* in heterotrophic culture. *Process Biochemistry.* 40 (2): 3491-3496
- Jensen, M. M.**, Malter, A. (1995). Protected Agriculture: A global review. World bank technical, paper #253. The world bank Washington, DC. EUA. pp.157.
- Kapulnik Y.**, Sarig S., Nur Y. y Okon Y. 1983. Effect of *azospirillum* inoculation on yield of field grown wheat. *Canadian Journal of Microbiology.* 29: 895-899.



- Kayombo** S., Mbvette T.S.A., Katima J.H.Y. y Jorgensen S.E. 2003. Effects of substrate concentrations on the growth of heterotrophic bacteria and algae in secondary facultative ponds. *Water Research* 37: 2937-2943.
- Khammas**, K.M. y P. Kaiser. 1991. Characterization of pectinolytic activity in *Azospirillum irakense*. *Plant Soil* 137: 75-79.
- Khammas**, K.M., E. Ageron, P.A.D. Grimont y P. Kaiser. 1989. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Res Microbiol* 140:679-693.
- Kloepper**, J. W., Schroth, M. N., and Miller, T. D. 1980. Effects of Rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology*. 70:1078-1082.
- Kolb** W. y Martin P. 1985. Response of Plant roots to inoculation with *Azospirillum brasilense* and to application of indolacetic acid in: Klingmüller, E. (Editor). *Azospirillum* III: Genetics, Physiology, Ecology. PP. 215-221. Springer-Verlag. Berlin.
- Krieg**, N.R. y J. Döbereiner. 1986. The genus *Azospirillum*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, eds. NR Krieg, JG Holt, 1:96-104, Baltimore: The Williams and Wilkins Co.
- Lara** H., A. 1999. Manejo de la solución nutritiva en la producción de tomate en hidroponía. *Terra*. Volumen 17 Numero 3.
- Lebsky** V.K., González-Bashan L.E. y Bashan Y. 2001. Ultraestructure of coinmobilization of the microalga *Chlorella vulgaris* with the plant growth – promoting bacterium *Azospirillum brasilense* and with its natural associative



- bacterium *Phyllobacterium myrsinacearum* in alginate beads. Can. J. Microbiol. 47:1-8.
- Lee** Y.K. 2001. Microalgal mass culture systems and methods: their limitation and potential. J. Appl. Phycol. 13: 307-315
- Li**, X. Xu H. y Wu Q. 2007. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 98: 764-771.
- Liu, B y Zhao Z.** 2007. Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial Biomass. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82: 775-780.
- Lucy**, M., Reed, E., Glick, B. R. 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 86, 1-25.
- Magalhães**, F.M.M., J.I. Baldani, S.M. Souto, J.R. Kuykendall y J. Döbereiner. 1983. A new acid tolerant *Azospirillum* species. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 55: 417-430
- Marsh** B.J. y Weinstein B.D. 1966. "Simple charring method for determination of lipids". *Journal of lipid research* 7, 574 – 576.
- Mazur**, A., Konop, A., y Synak, R. 2001. Indole-3-acetic acid in the culture medium of two axenic green microalgae. *J. Appl. Phycol.* 13:35-42.
- McHugh**, D. J. (2003). A guide to the seaweed industry. FAO Fisheries Technical Paper No 441, Rome, Italy, 105 pp.
- Meloni**, D., Gulotta, M., Martínez, C. (2008). Salinity tolerance in *Schinopsis quebracho colorado*: Seed germination, growth, ion relations and metabolic responses. *J. Arid Environm.* 72:1785-1792.



- Menezes** Dos Santos, J. Produccion de tomate en America Latina y el Caribe. En: FAO. Producción, Postcosecha, procesamiento y comercialización de ajo, cebolla y tomate. FAO. P173-215.
- Meng** X., Yang X., Xu X., Zhang L., Nie Q. y Xian M. 2009. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*. 34: 1-5.
- Mouget** J.L.; Dakhama A., Lavoine M.C., De la Noüe J. 1995. “Algal growth enhancement by bacteria: is consumption of photosynthetic oxygen involved?”. *FEMS Microbiology Ecology* 18: 35-44.
- Murashige**, T. y Skoog, F. 1962. “A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture”. *Physiol. Plant.* 15: 473-479.
- Nagarajan** T, Vanderleyden J, Kumar TK (2007) Identification of salt stress inducible 326 genes that control cell envelope related functions in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Mol 327 Genet Genomics* 278:43–51
- Nasr**, S.M.H., Parsakhoo, A., Skandari, S., Gojani H.J., Savad-Koohi, S.K. (2012). Investigation of Salinity Tolerance in *Dodonaea viscosa* L. *Journal of Applied Biological Sciences* 6 (1): 31-36.
- Nosko**, P., L.C. Bliss y F.D. Cook. 1994. The association of free-living nitrogen-fixing bacteria with the roots of high arctic graminoids. *Arct. Alp. Res.* 26: 180-186.
- Oh-Hama**, T., y Miyachi, S. 1992. *Chlorella*. En: Borowitzka, M. A. y Borowitzka, L. J. (eds.), *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp. 3-26.



- Okon** Y. y Labandera-González. 1994. Agronomic Applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil. Biol. Biochem.* 26:1591-1601
- Olaizola** M. 2003. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomol. Eng.* 20: 459-466.
- Oswald**, W. J. 1992. Micro-algae and waste-water treatment. En Borowitzka, M. A. & Borowitzka, L. J. (eds.), *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge. UK. pp. 305-328
- Ozturk**, A., Caglar, O., and Sahin, F. 2003. Yield response of wheat and barley to inoculation of plant growth promoting rhizobacteria at various levels of nitrogen fertilization. *J. Plant Nutr. Soil Sc.* **166**:262-266.
- Parida** A.K.; Dagaonkar V.S.; Phalak m.S. y Aurangabadkar L.P. (2008). Diferencial responses of the enzymes involved in proline biosynthesis and degradation in drought tolerant and sensitive cotton genotypes during drought stress recovery. *Acta Physiologiae Plantarum* 30, 619-627.
- Patriquin**, D.G. y J. Döbereiner y D.K. Jain 1983. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. *Can. J. Microbiol.* 29:900-915.
- Penot**, I., N. Berges, C. Guinguene, J. Fages. 1992. Characterization of *Azospirillum* associated with maize (*Zea mays*) in France, using biochemical tests and plasmid profiles. *Can. J. Microbiol.* 38: 798-803.
- Perring** D., Boiero L., Masciarelli O., Penna C., Cassán F. y Luna V. 2007. Plant growth promoting compounds produced by two agronomically important strains of



Azospirillum brasilense, and their implications for inoculant formulation. Applied Microbiology and Biotechnology. 75: 1143-1150.

Piccoli P. y Bonitti R. 1996. Gibberellins production in *A. lipoferum* cultures y enhanced by light. Biocell. 20:185-190.

Piccoli P., Lucangeli C., Schneider G. y Bottini R. 1998. Hydrolisis of 17, 17-[²H₂]-Gibberellin A₂₀-Glucoside and 17, 17-[²H₂]-Gibberellin A₂₀-Glucosyl ester by *Azospirillum lipoferum* cultured in nitrogen-free biotin-based chemically-defined medium. Plant Growth Regul. 23:179-182.

Porta C.; López-Acevedo R. y Roquero De L. (1999). Edafología. Mundi-Prensa, Madrid, p454; 657-705.

Potters, G., Pasternak, T.P., Guisez, Y., Palme, J.P. Jansen, M.A.K. (2007). Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? Trends in Plant Science. 12(3):98-105.

Primrose S. y Dilworth M. 1976. Ethylene production by bacteria. J. Gen. Microbiol. 93: 177-181.

Puente, M.E. y Y. Bashan. 1993. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* strains on the germination and seedlings growth of the giant columnar cardon cactus (*Pachycereus pringlei*). Symbiosis 15: 49-60.

Rahman A., Hosokawa S., Oono Y., Amakawa T., Goto N. y Tsurumi S. 2002. Auxin and ethylene response interactions during *Arabidopsis* root hair development diss. Plant Physiol. 130(4):1908-17



- Ramazanov, A., & Ramazanov, Z.** 2006. Isolation and characterization of a starchless mutant of *Chlorella pyrenoidosa* STL-PI with a high growth rate, and high protein and polyunsaturated fatty acid content. *Phycological Research* 54:255–259.
- Rangel-Lucio, J.A., R. Ferrera-Cerrato, J.D. Molina-Galan y N. Rodriguez-Mendoza.** 1991. Influencia de la variabilidad genética del maíz (*Zea mays* L.) sobre la actividad de *Azospirillum* sp, In: La investigación Edafológica en México 1990-1991. eds. JL Tovar, R. QuinteroLizaola. Memorias XXIV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, Pachuca, Hidalgo, México.
- Rao, J.L.N. y V.R. Rajamamohan Rao.** 1983. Nitrogenase activity in the rice rhizosphere soil as affected by *Azospirillum* inoculation and fertilizer nitrogen under upland conditions. *Curr. Sci.* 52: 686-688.
- Raven P.H., Evert R.H. y Eichhorn S.E.** 1992. *Biology of plants* 5th edition. Worth Publishers, NY.
- Reinhold, B., T. Hurek, I. Fendrik, B. Pot, M. Gillis, K. Kersters, S. Thielemans y J. De Ley.** 1987. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 43-51.
- Richmond, A.** 1990. *Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC Press Boca Raton, Florida, 528 pp.
- Rick CM.** The potential of exotic germplasm for tomato improvement. *Plant improvement and somatic cell genetics* 1982; p. 1-28.



- Ríos-Gómez, R.**, Salas-García, C.E., Monroy-Ata, A., Solano, E. (2010). Salinity effect on *Prosopis laevigata* Seedlings. *Terra Latinoamericana*. 28(2): 99-107.
- Rittmann, B. E.** 2008. Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.* 100: 203-212.
- Rivarola V**, Castro S, Mori G, Jofré E, Fabra A, Garnica R, Balegno H (1998) Response of *Azospirillum brasilense* Cd to sodium chloride stress. *Antonie van Leeuwenhoek* 73:255–261.
- Rodolfi L.**, Zittelli G. C., Bassi N., Padovani G., Biondi N., Bonini G. y Tredici M. R. 2009. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 102: 100-112.
- Rodríguez-Cáceres, E.A.** Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 44:990. 1982
- Rodríguez-Salazar, S.J.**, Suárez, R., Caballero-Mellado, J., Iturriaga, G. (2009). Trehalose accumulation in *Azospirillum* improves drought tolerance and biomass in maize plants. *FEMS Microbiology Letters* 296: 52-59.
- Rosenberg J. N.**, G.A. Oyler., L. Wilkinson and M. J. Betenbaugh. 2008. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Current Opinion in Biotechnology*. 19:430-436.
- Russel, S.** y C.C. Ifiorah. 1995. Occurrence of dinitrogen-fixing bacteria and acetylene reduction activity in a rhizosphere of five selected plants from tropics. *In: Azospirillum VI and Related Microorganisms, Genetics-Physiology-Ecology*, eds. I Fendrik, M Del Gallo, J Vanderleyden, M De Zamaroczy. G37: 549-554,



NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences, Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.

SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación), *Cierre de la producción agrícola por estado 2012*. Fecha de consulta 16-Oct-13. http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351

Sánchez-Rodríguez E; Rubio-Wilhelmi M.M.; Montesinos-Pereira D.; Romero L. y Ruíz J.M. (2012). Interactions between proline and polyamines pathways in tomato grafted plants under water stress conditions. *Physiologiae Plantarum Plant Science* 178, 30-40.

Santiago, J.M. y F. Borrero. 1998. Evaluación del tomate en invernadero: dos criterios fenológicos y fisiológicos. *Agronomía mesoamericana* 9(1):59-65.

Saubidet, M.I., Fatta, N., and Barneix, A.J. 2002. The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. *Plant Soil* **245**: 215-222.

Schenk, P.M., Thomas-Hall SR, Stephens E, Marx UC, Mussnug JH, Posten C, Kruse O y Hankamer B. 2008. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenerg. Res.* 1: 20-43.

Sheehan J, Dunahay T, Benemann J, y Roessler P. 1998. A look back to the US Department of Energy's Aquatic Species Program – biodiesel from algae. National Renewable Energy Laboratory, Golden CO; Report NREL/TP-580-24190, 328 p.

Singh, C.S. 1992. Prevalence of *Azospirillum* within the stem nodules of *Aeschynomene* spp. and *Neptunia* sp. *Z. Mikrobiol.* 147: 455-458



- Smith**, R.L., S.C. Schank y R.C. Littell. 1984. The influence of shading on associative N₂ fixation. *Plant Soil* 80: 43-52.
- Snapp**, S.S., Shennan C. (1992). Effects of salinity on root growth and death dynamics of tomato, *Lycopersicon esculentum* Mill. *New Phytol.* 121:71-79.
- Spaepen**, S., Vanderleyden, J., y Remans, R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* 31:425-448.
- Steenhoudt**, O. y Vanderleyden J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:487-506.
- Stein**, J.R. (1973). Handbook of phyiological methods. Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press, London, pp. 1-448.
- Stirk**, W. A., Ordog, V., Van Staden, J., y Jager, K. 2002. Cytokinin-and auxin-like activity in Cyanophyta and microalgae. *J. Appl. Phycol.* 14: 215-221.
- Strzelczyk** E., Kamper M. y Li C. 1994. Cytocinin-like-substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbón sources. *Microbiol. Res.* 149:55-60.
- Szekely** G 2004. The role of proline in *Arabidopsis thaliana* osmotic stress response. *Acta Biol Szeged* 48 : 81.
- Tarrand**, J.J., N.R. Krieg y J. Döbereiner. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 24: 967-980



- Tien**, T. M., M. H. Gaskins, and D. H. Hubbell. 1979. "Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.)". *Appl. Environ. Microbiol.* 37:1016-1024.
- Tobe**, K.; Li, X. y Omasa, K. (2000). Seed germination and radicle growth of a halophyte, *Kalidium capsicum* (Chenopodiaceae). *Annals of Botany* 85:391-396
- Velarde** M., Felker, P., Degano, C., (2003). Evaluation of Argentine and Peruvian *Prosopis* germplasm for growth at seawater salinities. *J. Arid Environ.* 55:515-531.
- Waltz** E. 2009. Biotech's new gold? *Nat. Biotechnol.* 27: 15-18.
- Wang** L.H., He Y, Gao Y. (2004) A bacterial cell-cell communication signal with crosskingdom structural analogues. *Mol Microbiol* 51:903-912.
- Watanabe**, I. y C. Lin. 1984. Response of wetly rice to inoculation with *Azospirillum lipoferum* and *Pseudomonas* sp. *Soil Sci. Plant Nutr.* 30: 117-124.
- Wen** Z.F. y Chen F. 2003. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnol. Adv.* 21:273-294.
- Williams**, P. J. 2007. Biofuel: microalgae cut the social and ecological costs. *Nature*, 450: 478.
- Young** J.P.W. 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms, p. 43-86. En G. Stacey, R. H. Burris, and H. J. Evans (ed.), *Biological Nitrogen Fixation*, Chapman and Hall, New York, N. Y.
- Zawoznik** MS, Ameneiros M, Benavides MP, Vázquez S, Groppa MD (2011) Response to saline stress and aquaporin expression in *Azospirillum*-inoculated barley seedlings. *Appl Microbiol Biotechnol* 90:1389-1397.



Zribi, L., Fatma, G., Fatma, R., Salwa, R., Hassan, N., Ne'jib., R.M. (2009).

Application of chlorophyll fluorescence for the diagnosis of salt stress in tomato (*Solanum lycopersicum*, variety Rio Grande). *Sci. Hort.* 120:367–372.



ANEXOS

ANEXO I: MEDIO MS (Murashige y Skoog, 1962)

Constituyente	Concentración de la solución madre (g/L)	Volumen de la solución madre por litro de medio
Macros		
NH ₄ NO ₃	16,5	100 ml
KNO ₃	19	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	4,4	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3,7	
KH ₂ PO ₄	1,7	
Micros		
MnSO ₄ ·H ₂ O	1,69	10 ml
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,86	
H ₃ BO ₃	0,62	
KI	0,083	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,025	
CuSO ₄ ·5H ₂ O		
10 ml de solución 25 mg/100ml		
CoCl ₂ ·6H ₂ O		10 ml
10 ml de solución 25 mg/100ml		
Fuente de hierro		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,00556	10 ml
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0,00746	
Vitaminas		
Inositol	10	10 ml
Nicotínico	0,05	
HCl-Piridoxina	0,05	
Glicina	0,2	
HCl-Tiamina	0,01	

Adicionar al medio 3% de sacarosa y 0.7% de agar.

ANEXO II: MEDIO HIDROPÓNICO (Jensen y Malter, 1995)

Composición en g/l: MgSO₄·7H₂O, 0.5; K₂HPO₄, 0.27; KNO₃, 0.2; K₂SO₄, 0.1; Ca(NO₃)₂, 0.5; EDTA, 0.25; 250 µl de minerales traza.

Minerales traza

Composición en g/l: H₃BO₃, 16.6; MgCl₂, 15.0; CuCl₂, 0.82; MoO₃, 0.33.



ANEXO III: MEDIO BASAL DE BOLD (BBM, Stein, 1973).

Recomendado para algas de agua dulce, especialmente: *Chlorella sp.*, *Volvox sp.* y *Scenedesmus sp.*

Fórmula:

* Soluciones Patrones de Macronutrientes.

Nitrato de Sodio.....	10 g
Cloruro de Calcio Dihidratado.....	1 g
Sulfato de Magnesio Heptahidratado...	3 g
Fosfato de Potasio, dibásico.....	7 g
Fosfato de Potasio, monobásico.....	3 g
Cloruro de Sodio.....	1 g

Método de preparación:

- 1) Disolver cada una de las sales en 400 mL de agua destilada o desmineralizada.
- 2) Almacenar las 6 soluciones en frascos color ámbar y en refrigeración.

* Solución patrón de Micronutrientes

Etilendiamintetracético.....	50 g
Hidróxido de Potasio.....	31 g
Agua.....	1000 mL
* Acido Bórico.....	11.42 g
Agua destilada.....	1000 mL

* Sulfato de Hierro Heptahidratado

Agua Acidificada.....	1000 mL (1 mL de Acido Sulfúrico por cada litro de agua).
* Sulfato de Zinc Heptahidratado.....	8.82 g
Cloruro de Manganeso Dihidratado.....	1.44 g
Trióxido de Molibdeno.....	0.71 g
Sulfato de Cobre Pentahidratado.....	1.57 g
Nitrato de Cobalto Hexahidratado.....	0.49 g
Agua.....	1000 mL

Método de preparación:

- 1) A 900 mL de agua destilada agregar 10 mL de cada una de las soluciones de macronutrientes y 1 mL de las soluciones de micronutrientes.
- 2) Ajustar el pH a 6.8-7.2
- 3) Esterilizar durante 15 minutos a 15 libras de presión (121 °C).



ANEXO IV: ROJO CONGO (Rodríguez-Cáceres, 1982)

Composición (g/l): K_2HPO_4 , 1.5; $MgSO_4$, 0.2; NaCl, 0.2; Fe_2Cl_2 , 0.15; extracto de levadura, 0.5, ácido málico, 5; KOH, 4.8; Agar, 15.

Después de esterilizar se agregaron 15 ml de solución rojo congo 1:400 y se ajustó el pH entre 6.8 y 7.0.



OTROS PRODUCTOS ACADÉMICOS

I. Artículo:

a) *Carta de aceptación en el Brazilian Journal of Microbiology*

b) *Borrador del artículo aceptado en el Brazilian Journal of Microbiology
(a ser publicado en Diciembre 2013).*

Decision Letter (BJM-2013-0623)**From:** pessoajr@usp.br**To:** froymario@gmail.com**CC:****Subject:** Brazilian Journal of Microbiology - Decision on Manuscript ID BJM-2013-0623**Body:** 11-Jun-2013

Dear Dr. Espinoza-Escalante:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Microorganisms associated to tomato seedlings growing in saline culture act as osmoprotectant" in its current form for publication in the Brazilian Journal of Microbiology.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Brazilian Journal of Microbiology, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Dr. Adalberto Pessoa Junior
Editor-in-Chief, Brazilian Journal of Microbiology
pessoajr@usp.br

Date Sent: 11-Jun-2013 Close Window



Microorganisms associated to tomato seedlings growing in saline culture act as osmoprotectant

Journal:	<i>Brazilian Journal of Microbiology</i>
Manuscript ID:	BJM-2013-0623
Manuscript Type:	Research paper
Date Submitted by the Author:	10-Jun-2013
Complete List of Authors:	Espinoza-Escalante, Froylan; Autonomous University of Guadalajara, Chemistry Cortés-Jiménez, Daniel; Universidad Autónoma de Baja California, Engineering Iturriaga, Gabriel; Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Centro de Investigación en Biotecnología Suarez, Ramon; Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Centro de Investigación en Biotecnología Gomez-Guzman, Abril; Universidad Autónoma de Baja California, Engineering Montero-Alpírez, Gisela; Universidad Autónoma de Baja California, Engineering
Keyword:	hydroponic culture, microbial association, salt tolerance, Trehalose
Section:	Environmental Microbiology: Microbial Ecology

SCHOLARONE™
Manuscripts

Microorganisms associated to tomato seedlings growing in saline culture act as osmoprotectant

Froylán M.E. Escalante^{a*}, Daniel Cortés-Jiménez^b, Abril Gómez-Guzmán^{a,b}, Gabriel Iturriaga, Ramón Suárez^c, Gisela Montero Alpírez^b

*Author to whom correspondence should be addressed.

^aAutonomous University of Guadalajara, Department of Chemistry, Laboratory of Microbial Processes, Av. Patria 1201, Lomas del Valle, Zapopan, Jalisco, 45110, Mexico. Tel. +52 (33) 36488824 ext. 32220 e-mail: froymario@edu.uag.mx

^bAutonomous University of Baja California, Department of Engineering. Calle de la Normal S/N, Insurgentes Este, Mexicali, Baja California, 21280, Mexico.

^cCentro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, 62209, Mexico.

Abstract

Less than 0.5% of total water in the world is available for human consumption and agriculture. The major part of the world's water is saline and salinity in soils interferes in germination of seeds and the posterior development of the plant. In order to increase the osmotolerance of tomato, seedlings were associated with *Azospirillum brasilense* Cd, *Azospirillum brasilense* Cd transformed bacteria with a plasmid harboring a trehalose biosynthesis gene-fusion or *Chlorella vulgaris*. Two plant culture media: Hydroponic and Murashige and Skoog were tested. In the first set of studies seedlings were associated to single free cells meanwhile in a second set single and combined free cells were studied. A positive interaction between transformed *Azospirillum* and *Chlorella vulgaris* and tomato plants was observed, this interaction was even more positive when alginate-immobilized cells were used. Seedlings showed a salt concentration tolerance, as sodium chloride, up to 200 mM. According to our results, the association of plants with *A. brasilense* Cd-BIF and *C. vulgaris* is a viable approach to increase their salt tolerance and biomass, as consequence the possible use of sea water to irrigate horticultural plants.

Keywords: *hydroponic culture, microbial association, salt tolerance, Trehalose.*

Abbreviations:

AW, *Azospirillum brasilense* Cd (wild type)

AB, *Azospirillum brasilense* Cd with plasmid pBBR1M:BIF

PGPB, Plant Growth Promoting Bacteria

CV, *Chlorella vulgaris*

1. Introduction

The negative impact of salinity on plant growth in irrigated and non-irrigated areas of the world's arid regions is a major problem for agriculture (17, 14, 21, 28). Salinization is a process of soil enrichment with salts more soluble than calcium sulfate, usually chlorides and sulfates of sodium and magnesium. This causes osmotic stress and plant intoxication, thus interfering with the growth of most crops (19). Plants develop a plethora of biochemical and molecular mechanisms to cope with salt stress. These processes include compartmentalization of compatible solutes, change in photosynthetic pathway, alteration in membrane structure, induction of antioxidative enzymes and plant hormones and as a consequence plants redirect their growth when exposed to stress (1). It is hypothesized that such morphogenic responses are part of a general acclimation strategy that constitutes the 'flight' response of plants (20). The initial effects of increasing soil salinity are very similar to those observed when plants are exposed to drought. Reductions in leaf water potential will reduce stomatal conductance and eventually inhibit photosynthetic metabolism (30).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Numerous studies have shown that in saline environments, adaptation to salinity during germination and early stages of seedling growth are crucial in determining the success of the establishment. Even in the late stages of development salinity may affect the distribution of plants in certain species (26).

Salinity tolerance and other adverse conditions in soils are currently overcome with an excess of irrigation water, thus given the increasingly shortage of fresh water at global level, it is necessary to develop strategies that include both salt-resistant crops and techniques to reduce stress injury (3). A major effort in research has been dedicated to organic fertilization or use of biofertilizers to increase plant development. Biofertilizers are best described as microbial communities that add, preserve and mobilize soil nutrients. *Azospirillum* is considered one of the most studied plant growth promoting bacteria (PGPB) given its ability to significantly increase not only plant growth development, but also the yield of numerous agricultural crops (9, 25). *Azospirillum brasilense* promotes growth due to the accumulation and transport of indole-3-acetic acid to the plant (27, 10) and other plant growth regulation molecules such as abscisic acid (ABA) and diamine cadaverine (CAD) (6, 18).

Azospirillum spp. colonizes the roots of a wide range of crops and can efficiently colonize roots submerged in growth solutions, and thus increase plant growth. The ability of *Azospirillum spp.* to stimulate plant growth has been widely demonstrated in experiments both field and greenhouse. Several mechanisms have been suggested to be responsible for the stimulatory effect observed in the inoculated plants in numerous studies and inoculation with *Azospirillum spp.*

In the last decade it has been demonstrated that *Azospirillum brasilense* increases the growth parameters not only of superior plants but unicellular microalgae *Chlorella* spp. by changing its cytology and metabolic parameters (7). This phenomena is also associated with the potential of *Azospirillum* spp. to produce plant growth regulators, because the microalga responds to the presence of *Azospirillum* similarly to higher plants, increasing their growth and changing its metabolism, due to the green microalgae meet the basic requirements of a higher plant (13, 24).

Recently, it has been shown that a recombinant *Azospirillum brasilsence* Cd strain expressing the omoprotectant trehalose is able to grow in salt stress conditions (23). The aim of this study is to find out if *Chlorella vulgaris*, *Azospirillum brasilsence* Cd and *Azospirillum brasilense* Cd-BIF, could increase the salt tolerance of tomato in hydroponic cultures.

2. Material and Methods

2.1 Microalgae and Bacteria

2.1.1 Microalgae. *Chlorella vulgaris* (UTEX 2714) was grown in axenic cultures of Basal Bold Medium (4) at 2000 lux illumination with light/dark periods of 16/8 h for 14 days prior to its use. The cell concentration was adjusted to 1×10^6 cells/ml prior to its use as inoculant.

2.1.2 Bacteria. *Azospirillum brasilense* Cd was grown in nutrient broth with ampicillin at 30 °C for 72 h prior to its use; *Azospirillum basilsence* Cd-BIF which enables the accumulation of trehalose in excess (23) was grown in nutrient broth supplied with ampicillin and gentamycin at 30 °C for 72 h prior to its use. The viability of the strains was tested on Congo Red agar plates. The cell concentration was adjusted to 1×10^9 cells/ml prior to its use as inoculant.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

103 **2.2 *In vitro* hydroponic culture**

104 2.2.1 *Hydroponic media composition.* Hydroponic media was modified from (12). Composition
105 in g/l: MgSO₄.7H₂O, 0.5; K₂HPO₄, 0.27; KNO₃, 0.2; K₂SO₄, 0.1; Ca(NO₃)₂, 0.5; EDTA, 0.25;
106 250 µl of trace minerals. Trace minerals composition in g/l: H₃BO₃, 16.6; MgCl₂, 15.0; CuCl₂,
107 0.82; MoO₃, 0.33.

108 2.2.2 *Tomato seeds germination.* Seeds of *Solanum lycopersicum* var. cherry were germinated
109 in sterile Petri dishes with hydroponic media for 10 days under light/dark periods of 16/8 h.

110
111 2.2.3 *Plant growth and development.* Tomato plants where placed axenically in plastic conical
112 tubes in groups of five under different sodium chloride concentrations: 0, 50, 100, 150, 200 y
113 250 mM using hydroponic medium (12) or Murashige and Skoog (MS) medium (15) as base.
114 Each group of treatments was supplied with one of the following free cells cultures: AW, AB,
115 CV, AWCV, ABCV, including a control treatment without microorganisms; note: combined
116 microbial treatments were tested only in hydroponic culture in a second set of experiments.
117 Tomato plants were placed in 13.5 ml of the corresponding media and 1.5 ml of the
118 corresponding microbial culture (Table 1). Plant growth and development was monitored after
119 10, 20 and 30 days of culture; every period stem and root length were measured.

120
121 **2.3 *Experimental Design and Statistical Analysis***

122 2.3.1 In order to compare the effect of media composition, time of culture and salt
123 concentration in stem and root elongation, a multifactorial design was used. Data was analyzed
124 using the ANOVA and Least Significant Difference (LSD) analysis at level 0.05 of confidence.

125
126

3. Results

Two sets of experiments were planned. In a first group, two mediums (Hydroponic and Murashige and Skoog), three periods of time (10, 20 and 30 days), six NaCl concentrations (0 to 250 mM) and three single cells *A. brasilense* Cd (AW), *A. brasilense* Cd-BIF (AB) and *C. vulgaris* (CV) were analyzed. In a second group, based on the results of group one, only hydroponic medium was used given its simplicity and microbial associations were tested with single or combined free cells.

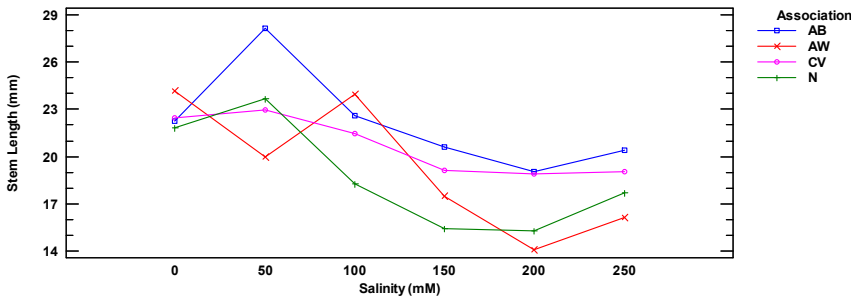
3.1 Stem length. The ANOVA analysis of the first set of experiments showed that the associated microorganism, elapsed time and salinity were the only significant factors for plant growth, despite of the used medium (MS or hydroponic), (Table 1). It is remarkable that as long as NaCl increased in concentration from 0 to 250 mM the stem length diminished, in any case *A. brasilense* Cd-BIF promoted longer stems in the seedlings. *C. vulgaris* had the second better results in this measure (Figure 1a). Regarding salinity, two groups are clearly differentiated, Group I: NaCl concentrations 0, 50 and 100 mM with stem lengths average of 22.7 ± 0.6 mm and Group II: NaCl concentrations 150, 200 and 250 with stem lengths average of 17.8 ± 0.6 mm. When considering time as a second factor, it can be seen that as long as time passed the seedlings were less tolerant to salt, as stem lengths were shorter ~15 and 20 mm in comparison to the first ten days where stem lengths were in the range of 25 to 26 mm (Figure 1b). In general, those seedlings growing with any microorganism associated showed longer stems in comparison to the control, where no microbial association was used, which means that salt tolerance is favored by plant microbial associations.

Table 1. Analysis of Variance for Stem Length (mm) for two growing media and simple free cells

Source	SS	df	MS	F-ratio	p-Value
MAIN EFFECTS					
A: Microbial					
Association	919.315	3	306.438	10.69	0.0000
B:Time (d)	1075.01	2	537.505	18.75	0.0000
C:Salinity (mM)	3148.09	5	629.618	21.96	0.0000
D:Medium	39.7511	1	39.7511	1.39	0.2396
INTERACTIONS					
AB	1628.29	6	271.381	9.46	0.0000
AC	1199.53	15	79.9689	2.79	0.0004
AD	538.267	3	179.422	6.26	0.0004
BC	2292.38	10	229.238	7.99	0.0000
BD	570.949	2	285.475	9.96	0.0001
CD	35.2102	5	7.04204	0.25	0.9419
RESIDUALS	13562.9	473	28.6743		
Total (Corrected)	25775.8	525			

If the average of stem elongation through the three periods of time is considered, *A. brasilense* Cd-BIF showed the major elongation in the stems (21.8 ± 0.07 mm) in comparison to the other microbial treatments. However, at the end of 30 days period the stems were shorter than those observed at 10 days, and this was true for almost all cases, except for *A. brasilense* Cd where the longitudes of the stems (22.3 ± 0.12 mm) were significantly larger ($p < 0.05$) than other treatments after 30 days (Figure 1b).

a



b

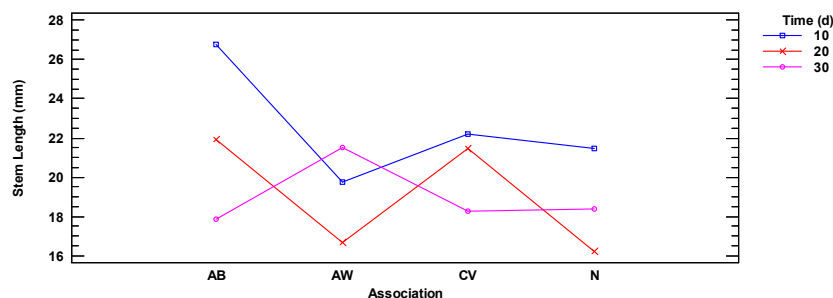


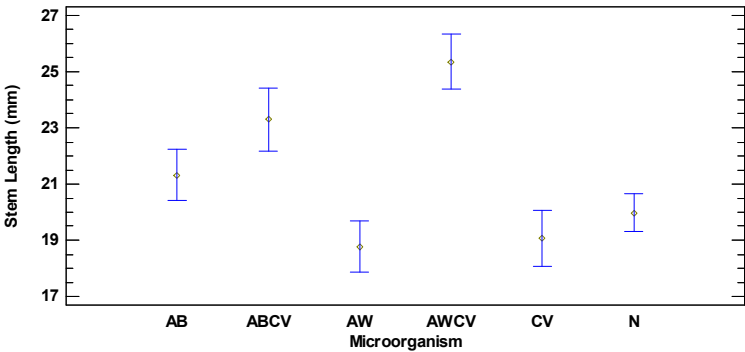
Figure 1. **a)** Stem lengths for seedlings in relation to NaCl concentrations using different microbial associations for MS and hydroponic media. **b)** Stem lengths for seedlings growing in different microbial associations in three periods of time.

For the second set of experiments, where combined microorganisms were tested, according to the ANOVA analysis (Table 2) the combination of *A. brasilense* Cd and *C. vulgaris* (AWCV) had a better impact on stem growth (25.3 ± 0.7 mm) followed by the associated *A. brasilense* Cd-BIF and *C. vulgaris* (ABCV) (23.3 ± 0.8 mm) (Figure 2a). Longer stems were observed at 20 days in those seedlings associated to *A. brasilense* Cd and *C. vulgaris* (AWCV) (29.8 ± 1.3 mm), showing even higher results at NaCl concentrations below 100 mM (up to 30.6 ± 1.7 mm), but as before, in general the tendency of stems was to decrease in size as long as NaCl concentration increased; nonetheless, seedlings associated with ABCV showed longer stems than any other treatment at 250 mM of NaCl (25.7 ± 3.3 mM) (Figure 2b).

Table 2. Analysis of Variance for Stem Length (mm) for hydroponic media and simple and combined cells

Source	SS	df	MS	F-ratio	p-Value
MAIN EFFECTS					
A: Microbial					
Association	1839.61	5	367.922	13.75	0.0000
B:Time (d)	73.1129	2	36.5565	1.37	0.2565
C:Salinity (mM)	1873.94	5	374.789	14.01	0.0000
INTERACTIONS					
AB	1878.47	10	187.847	7.02	0.0000
AC	2076.13	25	83.0454	3.1	0.0000
BC	602.975	10	60.2975	2.25	0.0147
RESIDUALS	9419.46	352	26.7598		
Total (Corrected)	18329.9	409			

a



b

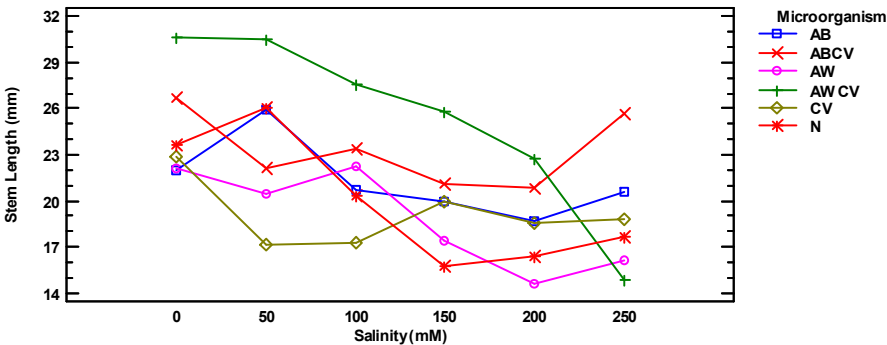


Figure 2. a) Confidence intervals ($\alpha=0.05$) for averaged stem lengths for seedlings growing in association with different microorganisms in hydroponic medium. b) Stem lengths for seedlings in

relation to NaCl concentrations using different microbial associations for hydroponic media in the second set of experiments.

3.2 Root length. Conversely with stem length, the microbial association had no statistical significant differences ($p < 0.05$) in root length but growing medium (Table 3). Those seedlings grown in MS medium averaged longer roots (1.29 ± 0.03 mM) in contrast to those seedlings grown in hydroponic medium (1.13 ± 0.03 mM). Time and salinity also were significant factors for root length; though, salinity effects cannot be grouped in two as before (Figure 3a).

Table 3. Analysis of Variance for Root Length (mm) for two growing media

Source	SS	df	MS	F-ratio	p-Value
MAIN EFFECTS					
A:					
Association	136.578	5	27.3155	2.48	0.0317
B:Time (d)	5.9548	2	2.9774	0.27	0.7633
C:Salinity (mM)	229.184	5	45.8369	4.16	0.0011
INTERACTIONS					
AB	737.614	10	73.7614	6.7	0
AC	531.986	25	21.2795	1.93	0.0053
BC	412.965	10	41.2965	3.75	0.0001
RESIDUALS	3888.76	353	11.0163		
Total (Corrected)	5785.52	410			

Regarding salinity, those seedlings grown in 50 and 100 mM NaCl showed the longer roots, 1.3 ± 0.05 and 1.4 ± 0.05 mm respectively, in comparison with the rest of the treatments. In the first 10 days, it can be observed that 50 and 100 mM of NaCl promoted longer roots and this growth pattern was consistent for the next 10 days but showing shorter roots and this is true until 30 days (Figure 3b).

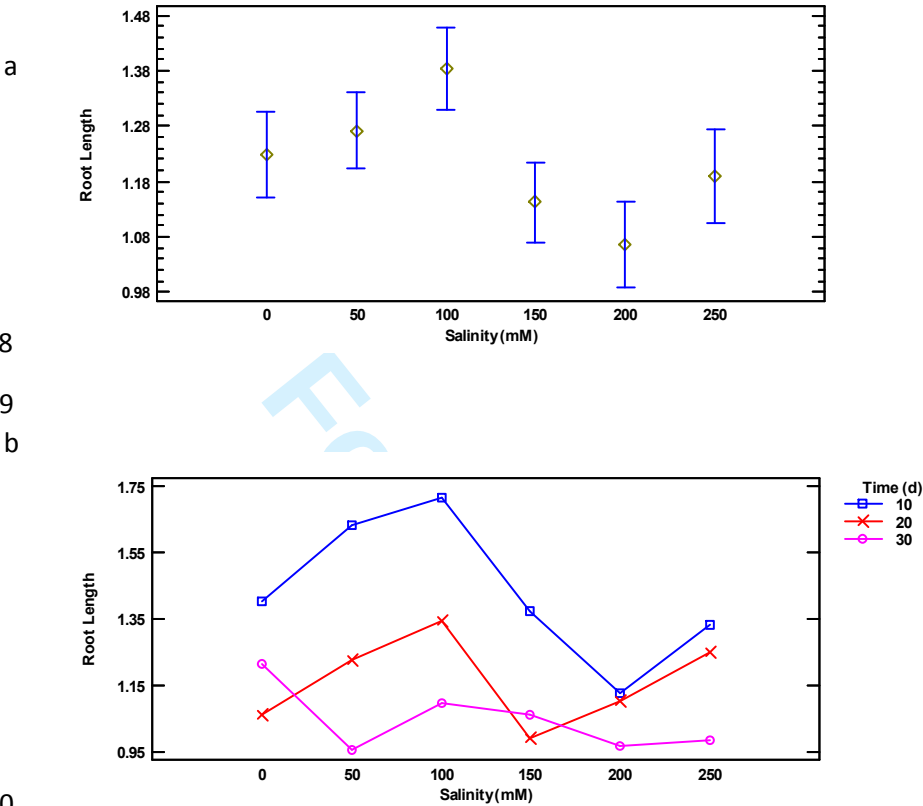
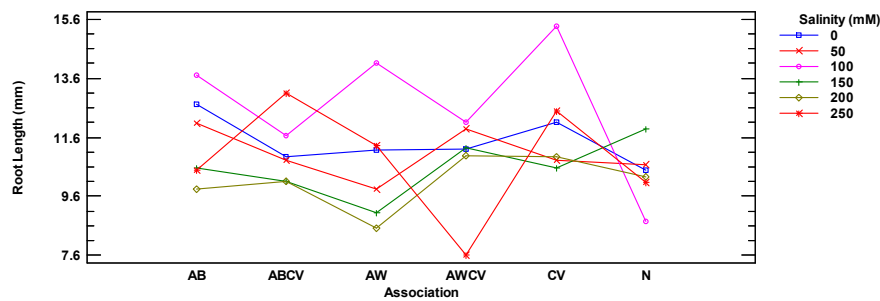


Figure 3. **a)** Confidence intervals ($\alpha=0.05$) for averaged stem lengths for seedlings growing at different NaCl concentrations in MS and hydroponic media. **b)** Effect of salinity concentration on root length through the time for MS and hydroponic media.

In the second set of experiments where hydroponic medium was the only one used, time had no statistical effect on root length, but associated microorganisms and salinity (Figure 4). According to the analysis of variance, those seedlings associated with *C. vulgaris* were different to control having longer roots (12 ± 0.4 mm) (Figure 4a). Even when the effects of NaCl concentration are not differentiated in groups as easily as with stems, in roots is noteworthy the influence of 100 mM of NaCl with longer roots (12.6 ± 0.4 mm).

Concomitantly, AW had a marked effect on root elongation after 30 days (13.2 ± 0.7 mm), similar to that observed for CV at the end of the first 10 days (13.2 ± 0.8 mm) with control showing the shorter roots after 20 and 30 days of treatment (Figure 4b).

a



b

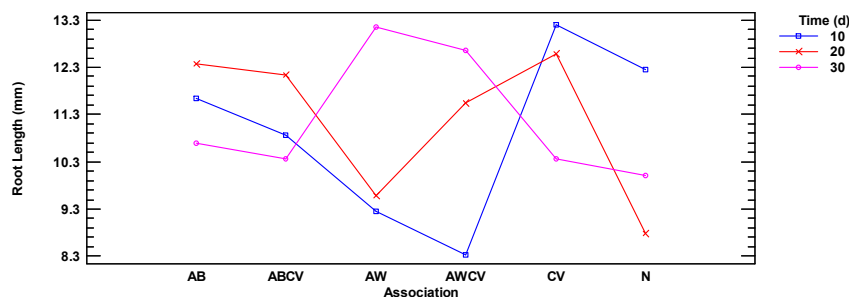


Figure 4. **a)** Root lengths for seedlings in relation to NaCl concentrations using different microbial associations for hydroponic media in the second set of experiments. **b)** Root lengths for seedlings growing in different microbial associations for three periods of time in hydroponic media in the second set of experiments.

4. Discussion

Hydroponic culture of plants with sea water or even salted water and the use of biofertilizers is a promising technology in order to mitigate the salinity effect on food crops. In the present work we planned to analyze the effects of *Azospirillum brasilense* Cd wild type, *A. brasilense* Cd-BIF able to over accumulate the osmoprotectant trehalose and *Chlorella vulgaris* in the

1
2
3 238 growth of tomato seedlings using two different culture media and two different microbial
4
5 239 association forms, free and alginate-immobilized cells.
6
7
8 240
9
10 241 According to the observed results, *Azospirillum brasilense* Cd-BIF followed by *Chlorella*
11
12 242 *vulgaris* showed the better influence in seedlings promoting longer stems, with good results
13
14 243 even at 250 mM of NaCl. Given that microbial associations showed in general better results for
15
16 244 stem and roots elongation in tomato seedlings, this could imply that these plants could be
17
18 245 irrigated with sea water at least partially when associated to any of this microorganisms.
19
20 246 Seemingly, if the concentration of NaCl is increased for those seedlings growing in hydroponic
21
22 247 medium, the effect of *A. brasilense* Cd-BIF will be better; meanwhile the triple association of
23
24 248 *A. brasilense* Cd, *C. vulgaris* plus seedlings appears to be sensitive to NaCl increments. These
25
26 249 results are in agreement with those works reported previously about *Azospirillum brasilense*
27
28 250 growing up to 200 mM of NaCl, where no drop in bacterial growth rate was observed, but
29
30 251 when 300 mM of NaCl was used, the growth rate diminished in 66% (22). In our results, *A.*
31
32 252 *brasilense* Cd showed almost the same growing behavior, however we assume that *A.*
33
34 253 *brasilense* Cd-BIF could grow with no problems even up to 300 mM.
35
36 254
37
38 255 In previous works with plants of *Zea mayz* under osmotic stress, Rodríguez-Salazar *et al.* (23)
39
40 256 observed an increased biomass, namely thicker roots, of those plants grown in association with
41
42 257 *A. brasilense* Cd-BIF. Other works with maize and wheat report an osmoadaptative phenomena
43
44 258 for those plant cells associated with *A. brasilense* (2, 16). Some other examples in wheat and
45
46 259 barley suggest that the association plant-microorganism are beneficial for plant's salt tolerance
47
48 260 due to an increase in its growing capacity (5, 29).
49
50 261
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

On the other hand, Hiremath and Mathad *et al.* (11) demonstrated that *Chlorella vulgaris* was positively stimulated by up to 200 mM of NaCl for chlorophyll and proline production, but when salinity concentration was increased up to 300 mM a reduction on chlorophyll was observed. Díaz *et al.* (8) reported that proline accumulates in plants in response to increased environmental salinity. These supports the evidence showed here regarding *C. vulgaris* and its effect on plant tolerance as mentioned above, where *C. vulgaris* had the second marked effect on salt tolerance over the seedlings of tomato.

In general, stems and roots lengths decreased with time, despite of the applied treatment and this could be a cause of the prolonged immersion time of the seedlings in the nutritive solutions, thus is advisable to add some kind of support for the plant. This is why for a future work we are planning to evaluate the effect of these microbial species in seedlings growing in alginate beads supports. As our results suggests, the use of *A. brasilense* Cd-BIF and *C. vulgaris* is a viable approach to increase the salt tolerance in plants and their biomass and the possible use of sea water to irrigate horticultural plants.

Acknowledgement

The main authors wish to thank the Doctoral fellowship 162578 by CONACYT to Daniel Cortés and Abril Gómez, respectively. We express our gratitude to Virginia Berenice Suarez for her English correction proof.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

References

1. Abd El Baky HH, Hussein MM, El-Baroty GS (2008) Algal extracts improve antioxidant defense abilities and salt tolerance of wheat plant irrigated with sea water. African J of Biochem Res 2(7): 151 –164.

2. Abd El-Samad Hamdia M, Shaddad MAK, Doaa MM (2004) Mechanisms of salt tolerance and interactive effects of *Azospirillum brasilense* inoculation on maize cultivars grown under salt stress conditions. Plant Growth Regulation 44: 165–174

3. Bacilio M, Rodriguez H, Moreno M, Hernandez JP, Bashan Y (2004) Mitigation of salt stress in wheat seedlings by a gfp-tagged *Azospirillum lipoferum*. Biol Fertil Soils 40: 188-193.

4. Bischoff HW, Bold HC (1963) IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. In: Elsevier Academic Press. Algal culturing techniques. Andersen, R.A., London, UK 1 – 95.

5. Caballero-Mellado J (2006) Microbiología agrícola e interacciones microbianas con plantas. Rev Latinoam Microb 48(2): 154 – 161.

6. Canto MJC, Medina PS, Morales AD (2004) Efecto de la inoculación con *Azospirillum* spp. en plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacquin). Tropical and subtropical Agroecosystems 4(01): 21-27.

7. De-Bashan LE, Hernandez JP, Morey T, Bashan Y (2004) Microalgae growth-promoting bacteria as “helpers” for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. Water Res 38: 466-474.

8. Díaz P, Borsani O, Monza J (1999) Acumulación de prolina en plantas en respuesta al estrés osmótico. Agrociencia 3(1):1-10.

- 1
2
3 309 9. Givaudan A, Bally R (1991) Similarities between large plasmids of *Azospirillum*
4
5 310 *lipoferum*. FEMS Microbiol Lett 78: 245-251.
6
7
8 311 10. Hartmann A, Mahavir S, Klingmüller W (1983) Isolation and characterization of
9
10 312 *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. Can J Microbiol 29:
11
12 313 916 – 923.
13
14
15 314 11. Hiremath S, Mathad P (2010) Impact of salinity on the physiological and biochemical
16
17 315 traits of *Chlorella vulgaris* Beijerinck. J Algal Biomass Utiln 1(2): 51-59.
18
19
20 316 12. Jensen MM, Malter A (1995) Protected agriculture: A global review. World bank
21
22 317 technical paper #253. The world bank Washington, DC EUA 157.
23
24 318 13. Mazur A, Konop A, Synak R (2001) Indole-3-acetic acid in the culture medium of two
25
26 319 axenic green microalgae. J Appl Phycol 13:35-42
27
28
29 320 14. Meloni D, Gulotta M, Martínez C (2008) Salinity tolerance in *Schinopsis quebracho*
30
31 321 colorado: Seed germination, growth, ion relations and metabolic responses. J Arid
32
33 322 Environm 72:1785-1792.
34
35
36 323 15. Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with
37
38 324 tobacco tissue culture. Physiol Plant 15: 473-479.
39
40
41 325 16. Nagarajan T, Vanderleyden J, Kumar TK (2007) Identification of salt stress inducible
42
43 326 genes that control cell envelope related functions in *Azospirillum brasilense* Sp7. Mol
44
45 327 Genet Genomics 278:43–51
46
47
48 328 17. Nasr, SMH, Parsakhoo A, Skandari S, Gojani HJ, Savad-Koohi SK (2012) Investigation
49
50 329 of salinity tolerance in *Dodonaea viscosa* L. J Appl Biol Sci 6(1): 31-36.
51
52
53 330 18. Perrig D, Boiero L, Masciarelli O, Penna C, Cassán F, Luna V (2007) Plant growth
54
55 331 promoting compounds produced by two agronomically important strains of
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

332 *Azospirillum brasilense* and their implications for inoculant formulation. Appl Microb
333 Biotech 75: 1143-1150.

334 19. Porta C, López-Acevedo M, Roquero C (1999) Edafología para la agricultura y el
335 medio ambiente. Mundi-Prensa, Madrid.

336 20. Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Palme JP, Jansen MAK (2008) Stress-induced
337 morphogenic responses: growing out of trouble?. Trends in Plant Sci 12(3):98-105.

338 21. Ríos-Gómez R, Salas-García CE, Monroy-Ata A, Solano E (2010) Salinity effect on
339 *Prosopis laevigata* seedlings. Terra Latinoamericana 28(2): 99-107.

340 22. Rivarola V, Castro S, Mori G, Jofré E, Fabra A, Garnica R, Balegno H (1998) Response
341 of *Azospirillum brasilense* Cd to sodium chloride stress. Antonie van Leeuwenhoek 73:
342 255–261.

343 23. Rodríguez-Salazar SJ, Suárez R, Caballero-Mellado J, Iturriaga G (2009) Trehalose
344 accumulation in *Azospirillum* improves drought tolerance and biomass in maize plants.
345 FEMS Microb Lett 296: 52-59.

346 24. Stirk WA, Ordog V, Van Staden J, Jager K (2002) Cytokinin-and auxin-like activity in
347 cyanophyta and microalgae. J Appl Phycol 14: 215-221.

348 25. Strzelczyk E, Kamper M, Li C (1994) Cytocinin-like-substances and ethylene
349 production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. Microbiol Res
350 149:55-60.

351 26. Tobe K, Li X, Omasa K (2000) Seed germination and radicle growth of a halophyte,
352 *Kalidium capsicum* (Chenopodiaceae). Ann of Bot 85: 391-396.

353 27. Umali-Garcia M, Hubbell DH, Gaskins MH, Dazzo FB (1980) Association of
354 *Azospirillum* with grass roots. Appl Environ Microbiol 39(1): 219-26.

- 1
2
3 355 28. Velarde M, Felker P, Degano C (2003) Evaluation of Argentine and
4
5 356 Peruvian *Prosopis* germplasm for growth at seawater salinities. *J Arid Environ* 55:515-
6
7 531.
8 357
9
10 358 29. Zawoznik MS, Ameneiros M, Benavides MP, Vázquez S, Groppa MD (2011) Response
11
12 359 to saline stress and aquaporin expression in *Azospirillum*-inoculated barley seedlings.
13
14 360 *Appl Microbiol Biotechnol* 90:1389–1397.
15
16 361 30. Zribi L, Fatma G, Fatma R, Salwa R, Hassan N, Nejib RM (2009) Application of
17
18 362 chlorophyll fluorescence for the diagnosis of salt stress in tomato (*Solanum*
19
20 363 *lycopersicum*, variety Rio Grande). *Sci Hort* 120:367–372.
21
22
23
24 364
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60