

Fitodesalinización asistida por microorganismos para la recuperación de suelos agrícolas

Tesis
Doctoral

José María
Barcia Piedras

Tesis Doctoral

José
María
Barcia
Piedras

2020

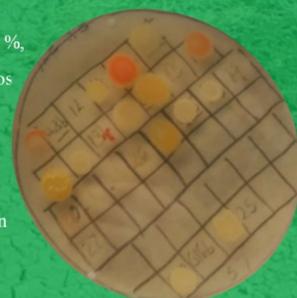
El planeta Tierra está sufriendo graves alteraciones debido a la actividad del ser humano, entre las que cabe destacar el crecimiento exponencial de la población mundial. Dicho aumento conlleva la necesidad de producir más alimentos básicos. Consecuentemente, se están sobreexplotando las zonas agrícolas, lo que aumenta la demanda tanto de abono como de agua, que en ocasiones, hace que se utilice para el riego agua de baja calidad. Esto produce una salinización del suelo agrícola que se empobrece y deja de ser útil. Se hace por tanto necesaria la recuperación de zonas de cultivo salinizadas, para atender la creciente demanda de alimentos.

Entre las soluciones que se plantean para recuperar dichos suelos está la fitodesalinización, es decir, el uso de plantas para corregir el exceso de sal. En concreto, existe un grupo de plantas denominadas halófitas (requieren sal para desarrollarse de forma óptima) que poseen un alto potencial para ser usadas en la desalinización. A su vez, diversos estudios han mostrado que el empleo de bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPB) mejora la capacidad remediadora de las especies vegetales. Con dichas ideas, el objetivo de esta Tesis Doctoral fue estudiar la capacidad de la halófito *Arthrocnemum macrostachyum* (Morric.) Moris para fitodesalinizar suelos contaminados por exceso de sal y determinar la influencia en este proceso de bacterias con propiedades PGP.

Tras estudiar la rizosfera (suelo alrededor de las raíces) de *A. macrostachyum*, se aislaron 182 cepas bacterianas que se caracterizaron por su tolerancia a la salinidad y a altas temperaturas, por la producción de auxinas (AIA) y acil-homoserina lactona (AHL), así como por la capacidad para solubilizar hierro y fósforo. Una vez analizadas todas las propiedades, se concluyó que las más comunes en la colección bacteriana, fueron la producción de auxinas y la solubilización de hierro. Respecto a la interacción que se establece entre *A. macrostachyum* y las bacterias seleccionadas hay diferentes aspectos a destacar. Por un lado, las cepas bacterianas Hv16, RTE9 y OR133 inhibieron el efecto negativo que la sal ejerce sobre la germinación de la halófito, mejorándola al menos un 20%. Además, se determinó que la sal es un factor que modula dicha interacción, de manera que se promueve más el crecimiento de la planta en ausencia de sal o en una concentración por debajo del óptimo de la halófito. Se observó que, gracias a los inoculantes Hv16 y C58, enraizaron mejor las estaquillas de *A. macrostachyum*, produciendo un 20% más de raíces. También se comprobó que la mayor interacción entre *A. macrostachyum*-bacteria, se produce cuando la planta es inoculada a nivel de semilla.

En un experimento de fitodesalinización de suelos agrícolas se consiguió disminuir la salinidad de los suelos entre un 31-80%, independientemente de la inoculación realizada en la halófito, permitiendo que se desarrollaran, a posteriori, diversos cultivos en el suelo remediado. Se observó que la coinoculación con las cepas bacterianas Hv16 y RTE9 permitió mejorar la gestión de los recursos hídricos de *A. macrostachyum*, sin mermar por ello su capacidad fitodesalinizadora.

En conclusión, la halófito *A. macrostachyum* inoculada con las cepas bacterianas Hv16 (*Kocuria polaris*) y RTE9 (*Rahnella aquatilis*) se propone como una bioherramienta para la recuperación de suelos agrícolas en desuso debido a la contaminación por sales.



IFAPA

Instituto de Investigación y
Formación Agraria y Pesquera

Agricultura y Medio Ambiente

Centro Las Torres



Departamento de Biología Vegetal y Ecología

Facultad de Biología

FITODESALINIZACIÓN ASISTIDA POR MICROORGANISMOS PARA LA RECUPERACIÓN DE SUELOS AGRÍCOLAS

TESIS DOCTORAL

José María Barcia Piedras

Sevilla, 2020



F. Agricultura y Medio Ambiente
Centro Las Torres



Departamento de Biología Vegetal y Ecología
Facultad de Biología

Memoria para optar al grado de Doctor en Biología:

**FITODESLINIZACIÓN ASISTIDA POR MICROORGANISMOS PARA LA
RECUPERACIÓN DE SUELOS AGRÍCOLAS**

DIRECTORAS DE ESTA TESIS DOCTORAL:

Fdo.: Dra. Susana Redondo Gómez

Catedrática

Departamento Biología Vegetal y Ecología

Universidad de Sevilla

Fdo. Dra. María Camacho Martínez-Vara de Rey

Investigador Titular

Centro Las Torres

IFAPA

PRESENTA:

Fdo.: José María Barcia Piedras

Doctorando

Sevilla, 2020

TESIS DOCTORAL

FITODESLINIZACIÓN ASISTIDA POR MICROORGANISMOS PARA LA RECUPERACIÓN DE SUELOS AGRÍCOLAS

JOSÉ MARÍA BARCIA PIEDRAS

SEVILLA, 2020

AGRADECE:

Esta Tesis ha podido ser realizada gracias al proyecto Fitodesalinización asistida por microorganismos para la recuperación de suelos agrícolas (**RTA2012-00006-C03**), principalmente a los subproyectos Aislamiento y caracterización de bacterias PGP de la rizosfera de *Arthrocnum macrostachyum* en su hábitat natural (**RTA2012-00006-C03-01**) y Evaluación de la capacidad desalinizadora de *Arthrocnum macrostachyum* (**RTA2012-00006-C03-02**). Financiados por el **Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)** y a los **Fondos Sociales Europeos (FSE)**.



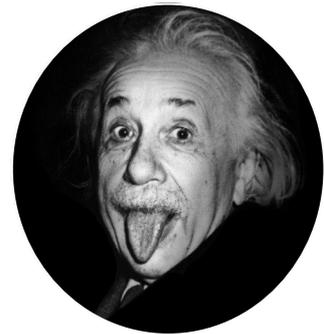
UNIÓN EUROPEA
Fondo Social Europeo

Dedicado a ti por prestarme
tu valioso tiempo.

"Wenn du es einem sechsjährigen nicht erklären kannst,
dann hast du es selbst nicht."

*["Si no puede explicárselo a un niño de seis años,
entonces usted mismo no lo entiende."]*

Albert Einstein



ÍNDICE

	Página
Abreviaturas y símbolos	23
Resumen	27
Introducción	
1. La salinización	31
1.1. Historia y enfoque actual de la salinización	31
1.2. La salinización de los suelos	33
1.3. Problemática con la agricultura	37
2. El Desarrollo Sostenible	41
3. La fitorremediación	42
3.1. Tipos de fitorremediación	43
3.2. Metodologías de la fitorremediación	45
3.3. La fitodesalinización	47
4. <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> (Morric.) Moris	48
4.1. El potencial fitodesalinizador de <i>Arthrocnemum macrostachyum</i>	49
5. Los microorganismos del suelo	50
5.1. Las funciones de los microorganismos del suelo	51
5.2. Las interacciones planta-microorganismo	53
5.3. Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal	54
5.3.1. Bacterias productoras de auxinas (AIA)	55
5.3.2. Bacterias productoras de acil homoserina lactonas (AHL)	57
5.3.3. Bacterias para combatir la clorosis férrica	57
5.3.4. Bacterias solubilizadoras de fosfato	58
5.3.5. Bacterias productoras de ACC	59
6. Inoculantes microbianos	59
6.1. Precedentes históricos	60
6.2. Selección de cepas	60
7. Bibliografía	61
Objetivos generales	81

	Página
Capítulo I	
Abstract	85
I.1. Introduction	85
I.2. Materials and methods	86
I.2.1. Soil and plant material	86
I.2.2. Experiment 1: phytodesalination with <i>A. macrostachyum</i>	87
I.2.2.1. Electrical conductivity	87
I.2.2.2. Growth of <i>A. macrostachyum</i>	88
I.2.2.3. Analysis of nutrients	88
I.2.2.4. Phytodesalination parameters	88
I.2.3. Experiment 2: phytodesalinated soil quality	89
I.2.4. Statistical analysis	90
I.3. Results and discussion	90
I.3.1. Experiment 1: phytodesalination with <i>A. macrostachyum</i>	90
I.3.1.1. <i>Growth of A. macrostachyum</i>	91
I.3.1.2. Phytodesalination parameters	93
I.3.2. Experiment 2: phytodesalinated soil quality	94
I.4. Conclusions	95
I.5. References	95
Capítulo II	
II.1. Objetivos	101
II.2. Materiales y Métodos	101
II.2.1. Microorganismos	101
II.2.2. Caracterización molecular de las bacterias: amplificación, secuenciación y análisis filogenético del ADNr 16S	103
II.2.3. Caracterización de la colección bacteriana	104
II.2.3.1. Caracterización de las bacterias mediante propiedades físicas	104
II.2.3.1.1. Tolerancia a la sal	104
II.2.3.1.2. Tolerancia a la temperatura	105

	Página
II.2.3.2. Caracterización de las bacterias mediante propiedades bioquímicas	105
II.2.3.2.1. Producción de ácido indol acético	105
II.2.3.2.2. Quorum sensing. Producción de AHL	106
II.2.3.2.3. Producción de sideróforos	106
II.2.3.2.4. Solubilización de fosfatos	107
II.2.4. Análisis estadístico	107
II.3. Resultados	107
II.4. Discusión	113
II.5. Bibliografía	116
Capítulo III	
III.1. Objetivos	123
III.2. Materiales y Métodos	123
III.2.1. Microorganismos	123
III.2.2. Material vegetal	123
III.2.3. Ensayo 1: influencia de la inoculación bacteriana y la sal en la fisiología de <i>A. macrostachyum</i>	124
III.2.3.1. Evaluación de las cepas bacterianas sobre la colza	124
III.2.3.2. Evaluación de las cepas bacterianas sobre <i>A. macrostachyum</i>	125
III.2.3.2.1. Crecimiento vegetal	125
III.2.3.2.2. Intercambio de gases	128
III.2.4. Ensayo 2: efectos de la inoculación bacteriana y la sal en la germinación de <i>A. macrostachyum</i>	129
III.2.5. Ensayo 3: influencia de la inoculación bacteriana en el estaquillado de <i>A. macrostachyum</i>	129
III.2.5.1. Material vegetal e inoculación	129
III.2.5.2. Crecimiento vegetal	130
III.2.5.3. Intercambio de gases	131
III.2.6. Estadística	131

	Página
III.3. Resultados	131
III.3.1. Propiedades promotoras del crecimiento vegetal de los microorganismos	131
III.3.2. Influencia de la inoculación bacteriana en la fisiología de <i>A. macrostachyum</i>	132
III.3.2.1. Evaluación de las cepas bacterianas sobre la colza	132
III.3.2.2. Crecimiento vegetal de <i>A. macrostachyum</i>	133
III.3.2.3. Intercambio de gases de <i>A. macrostachyum</i>	134
III.3.3. Efectos de la inoculación bacteriana y la sal en la germinación de <i>A. macrostachyum</i>	135
III.3.4. Influencia de la inoculación bacteriana en el estaquillado de <i>A. macrostachyum</i>	137
III.3.4.1. Crecimiento vegetal	138
III.3.4.2. Intercambio de gases	138
III.4. Discusión	139
III.5. Bibliografía	142
Capítulo IV	
IV.1. Objetivos	149
IV.2. Materiales y Métodos	149
IV.2.1. Microorganismos	149
IV.2.2. Material vegetal	149
IV.2.3. Ensayo 1: efectos en la germinación de <i>A. macrostachyum</i> de la cepa OR133 y la sal	150
IV.2.3.1. Material vegetal e inoculación	150
IV.2.4. Ensayo 2: influencia del momento de la inoculación, la cepa	150
IV.2.4.1. Crecimiento vegetal e inoculación	150
IV.2.4.2. Intercambio de gases	151
IV.2.4.3. Pigmentos	151
IV.2.5. Estadística	152
IV.3. Resultados	152

	Página
IV.3.1. Ensayo 1: efectos en la germinación de <i>A. macrostachyum</i> de la cepa OR133 y la sal	152
IV.3.2. Ensayo 2: influencia del momento de la inoculación, la cepa bacteriana OR133 y la sal sobre <i>A. macrostachyum</i>	154
IV.3.2.1. Crecimiento vegetal	154
IV.3.2.2. Intercambio de gases	157
IV.3.2.3. Pigmentos	157
IV.4. Discusión	159
IV.5. Bibliografía	161
Capítulo V	
V.1. Objetivos	167
V.2. Materiales y Métodos	167
V.2.1. Microorganismos	167
V.2.2. Material vegetal	168
V.2.3. Ensayo 1: Fitodesalinización	168
V.2.3.1. Suelo	168
V.2.3.2. Conductividad eléctrica	169
V.2.3.3. Velocidad de fitodesalinización	169
V.2.3.4. Crecimiento de <i>A. macrostachyum</i>	169
V.2.3.5. Intercambio de gases de <i>A. macrostachyum</i>	170
V.2.4. Ensayo 2: calidad del suelo fitodesalinizado	170
V.2.4.1. Germinación de las leguminosas	170
V.2.4.2. Crecimiento vegetal e intercambio de gases de las leguminosas	171
V.2.5. Análisis estadístico	171
V.3. Resultados	171
V.3.1. Ensayo 1: fitodesalinización con <i>A. macrostachyum</i>	171
V.3.1.1. Conductividad eléctrica	171
V.3.1.2. Velocidad de fitodesalinización	172
V.3.1.3. Crecimiento de <i>A. macrostachyum</i>	172

	Página
V.3.1.4. Intercambio de gases de <i>A. macrostachyum</i>	172
V.3.2. Experimento 2: calidad del suelo fitodesalinizado	173
V.3.2.1. Germinación de las leguminosas	173
V.3.2.2. Crecimiento vegetal e intercambio de gases de las leguminosas	174
V.4. Discusión	175
V.5. Bibliografía	178
Discusión final	185
Bibliografía	192
Conclusiones	201
Apéndices	
Apéndice 1: medios y reactivos	205
Apéndice 2: colección bacteriana	213
Agradecimientos	223

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

<u>Abreviatura</u>	<u>Significado</u>	<u>Abreviatura</u>	<u>Significado</u>
A	tasa fotosintética neta	M	molar
ACC	ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico	mg	miligramo
ADNr	ácido desoxiribonucleico ribisómico	ml	mililitro
ACP	análisis de componentes principales	mM	milimolar
AHL	acil-homoserina lacnota	MTE (-G)	tiempo medio de emergencia (o germinación)
AIA	ácido indol-3-acético	mS	milisiemen
AN	agar nutritivo	Na	sodio
CAS	chrome Azurol S	NaCl	cloruro sódico
CE	conductancia eléctrica	3-oxo-C6-HSL	3-oxo-hexanoil homoserina lactona
Chx	cicloheximida	PFD	densidad de flujo de fotones
CHR	contenido hídrico relativo	PGP	promoción del crecimiento vegetal
C _i	concentración intercelular de CO ₂	PGPB	bacteria promotora del crecimiento vegetal
CN	caldo nutritivo	PGPR	rizobacteria promotora del crecimiento vegetal
EE	error estándar	PIPES	piperazina-1,4-bis(ácido 2-etanosulfónico)
EDDHA	ácido etilendiamino-N,N'-bis(2-hydroxy-fenilacético)	ppm	parte por millón ($\mu\text{g g}^{-1}$)
EDTA	ácido etilendiamino-tetraacético	RGR	tasa de crecimiento relativo
iWUE	eficiencia en el uso del agua intrínseca	rpm	revoluciones por minuto
<i>et al.</i>	y colaboradores	TSA	tryptic soy agar
g	gramo	ufc	unidad formadora de colonias
GLM	modelo lineal general	X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
g _s	conductancia estomática		
ha	hectárea		
l	litro		
L-Trp	aminoácido L-triptófano		
L-Tyr	aminoácido L-tirosina		

<u>Símbolo</u>	<u>Significado</u>
€	euro
®	marca registrada
λ	longitud de onda
Ψ_0	potencial osmótico

RESUMEN

El planeta Tierra está sufriendo graves alteraciones debido a la actividad del ser humano, entre las que cabe destacar el crecimiento exponencial de la población mundial. Dicho aumento conlleva la necesidad de producir más alimentos básicos. Consecuentemente, se están sobreexplotando las zonas agrícolas, lo que aumenta la demanda tanto de abono como de agua, que en ocasiones, hace que se utilice para el riego agua de baja calidad. Esto produce una salinización del suelo agrícola que se empobrece y deja de ser útil. Se hace por tanto necesaria la recuperación de zonas de cultivo salinizadas, para atender la creciente demanda de alimentos.

Entre las soluciones que se plantean para recuperar dichos suelos está la fitodesalinización, es decir, el uso de plantas para corregir el exceso de sal. En concreto, existe un grupo de plantas denominadas halófitas (requieren sal para desarrollarse de forma óptima) que poseen un alto potencial para ser usadas en la desalinización. A su vez, diversos estudios han mostrado que el empleo de bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPB) mejora la capacidad remediadora de las especies vegetales. Con dichas ideas, el objetivo de esta Tesis Doctoral fue estudiar la capacidad de la halófito *Arthrocnemum macrostachyum* (Morric.) Moris para fitodesalinizar suelos contaminados por exceso de sal y determinar la influencia en este proceso de bacterias con propiedades PGP.

Tras estudiar la rizosfera (suelo alrededor de las raíces) de *A. macrostachyum*, se aislaron 182 cepas bacterianas que se caracterizaron por su tolerancia a la salinidad y a altas temperaturas, por la producción de auxinas (AIA) y acil-homoserina lactona (AHL), así como por la capacidad para solubilizar hierro y fosfato. Una vez analizadas todas las propiedades, se concluyó que las más comunes en la colección bacteriana, fueron la producción de auxinas y la solubilización de hierro.

Respecto a la interacción que se establece entre *A. macrostachyum* y las bacterias seleccionadas hay diferentes aspectos a destacar. Por un lado, las cepas bacterianas Hv16, RTE9 y OR133 inhibieron el efecto negativo que la sal ejerce sobre la germinación de la halófito, mejorándola al menos un 20 %. Además, se determinó que la sal es un factor que modula dicha interacción, de manera que se promueve más el crecimiento de la planta en ausencia de sal o en una concentración por debajo del óptimo de la halófito. Se observó que, gracias a los inoculantes Hv16 y C58, enraizaron mejor las estaquillas de *A. macrostachyum*, produciendo un 20 % más de raíces. También se comprobó que la mayor interacción entre *A. macrostachyum*-bacteria, se produce cuando la planta es inoculada a nivel de semilla.

En un experimento de fitodesalinización de suelos agrícolas se consiguió disminuir la salinidad de los suelos entre un 31-80 %, independientemente de la inoculación realizada en la halófito, permitiendo que se desarrollaran, a posteriori, diversos cultivos en el suelo remediado. Se observó que la coinoculación con las cepas bacterianas Hv16 y RTE9 permitió mejorar la gestión de los recursos hídricos de *A. macrostachyum*, sin mermar por ello su capacidad fitodesalinizadora.

En conclusión, la halófito *A. macrostachyum* inoculada con las cepas bacterianas Hv16 (*Kocuria polaris*) y RTE9 (*Rahnela aquatilis*) se propone como una bioherramienta para la recuperación de suelos agrícolas en desuso debido a la contaminación por sales.

INTRODUCCIÓN

1. La salinización

1.1. Historia y enfoque actual de la salinización

Ya desde el inicio del desarrollo agrícola en el Neolítico, hace aproximadamente 10000 años (Figura 1), y, sobre todo, con el posterior descubrimiento de los metales y la manera de transformarlos, comenzaron las causas fundamentales de la contaminación ancestral de los suelos (Lovgren, 2005). Las labores agrícolas han provocado la salinización del suelo, en especial en climas áridos. Actualmente, hay que añadir que el regadío intensivo con aguas de baja calidad (a veces, además, en áreas con suelos ricos en sales) provoca la rápida degradación del suelo. En resumen, la salinización ha originado pérdidas importantes de la capacidad productiva en todas las épocas y culturas (Diamond, 2005).

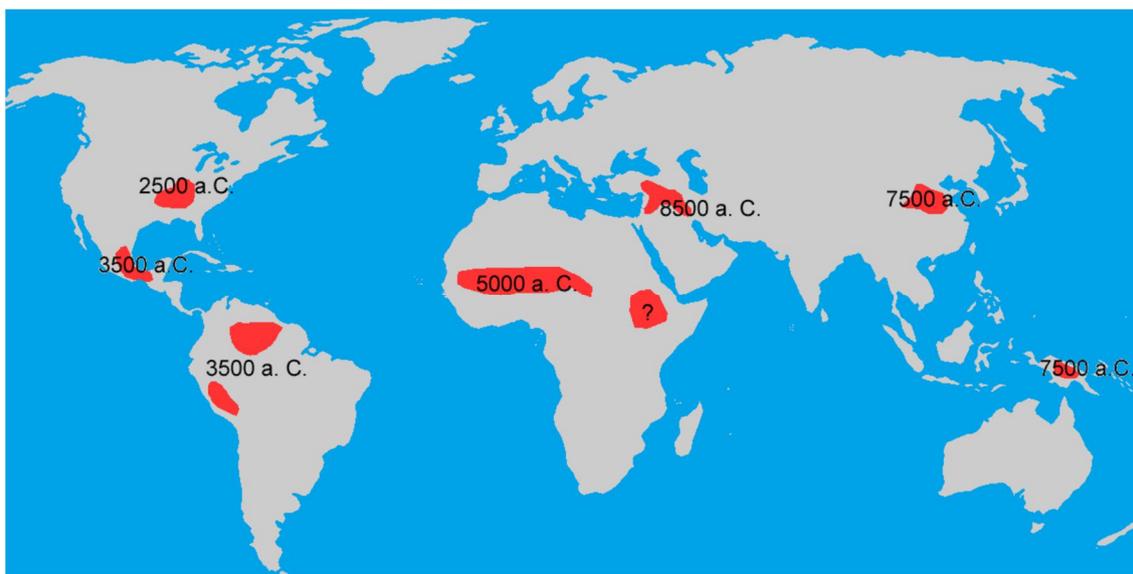


Figura 1. Posibles zonas del origen de la agricultura en el Neolítico, nótese que el más antiguo, situado en la península Mesopotámica, coincide con una zona árida potencialmente salinizable, como se verá más adelante, debido a la región climática en la que se localiza (Diamond, 2005).

En la actualidad vivimos en un mundo caracterizado por ser global y cambiante, en el cual los flujos de materia, energía e información no conocen límites. En este marco de trasiegos continuados entre los distintos ecosistemas (naturales, seminaturales y antrópicos) se observa la presencia de descompensaciones que producen alteraciones en todos ellos (Ateweberhan *et al.*, 2013). En concreto, en la naturaleza cada día se detectan muchas perturbaciones, en gran parte debido a los excesos de la actividad humana, que actúa como sinergia para los procesos naturales. Es decir, que los cambios que se dan de forma natural en el planeta están siendo influenciados por la forma de maniobrar que

presenta el humano para sacar provecho del medio que lo rodea (Bytnerowicz *et al.*, 2007). Dichas alteraciones se engloban en un conjunto de alteraciones de diferente origen, que afectan a todo el planeta y sin una respuesta lineal a sus efectores que, actualmente, se acuña con el nombre de Cambio Global. Dentro de dichas alteraciones cabe destacar el aumento progresivo de la temperatura (IPCC, 2008) y la falta de agua útil para la explotación humana (Schmitt, 2010). A su vez, estos trastornos conllevan consecuencias como la salinización del suelo o incluso la desertificación, que derivan en la degradación del medio en el que vivimos (Comisión Europea, 2003).

La Península Ibérica no queda apartada de esta influencia general, un claro ejemplo sería el proceso de desertificación que está afectando el suroeste peninsular (Álvarez-Rogel, 2009). Tanto el aumento en la amplitud térmica como el descenso en la pluviometría anual están poniendo en jaque dicha región, en el sentido de ser una zona de gran interés económico relacionado con la productividad agraria, pero que cada vez encuentra más obstáculos que conducen al deterioro de sus campos (Figura 2). Un ejemplo sería el uso de aguas de riego que contengan un exceso de sales, pues acentúa la salinización y la sodificación del suelo. En el primer caso se produce una acumulación de sales más solubles que el yeso, que interfieren en el crecimiento de la mayoría de los cultivos y plantas no especializadas. En el segundo acontecimiento se produce una acumulación de sodio intercambiable, que tiene una acción dispersante sobre las arcillas y de solubilización de la materia orgánica, afectando negativamente a las propiedades físicas del suelo (Juárez-Sanz *et al.*, 2006).

Como en todo sistema organizado, y el planeta Tierra lo es, existen movimientos de materia y energía que permiten la existencia de equilibrios dinámicos, pero, a su vez, estables. En este sentido, las sales al ser parte de este sistema natural no deberían suponer un problema. El problema es que debido a la actividad humana dichos ciclos, conservados durante miles de años, se están alterando con graves consecuencias. Así se explica cómo la sal, que es un producto natural, puede estar acumulándose en zonas de alto interés para el hombre como son las zonas de cultivo (Rengasamy, 2006).

En esta Tesis Doctoral se pretende poner de manifiesto el problema global que supone la salinización de los suelos y presentar una metodología para recuperarlos y poder sacarles provecho de nuevo, utilizando tanto las plantas como bacterias en un tándem de herramientas biológicas correctoras del mal comportamiento del hombre en el ámbito agrícola.

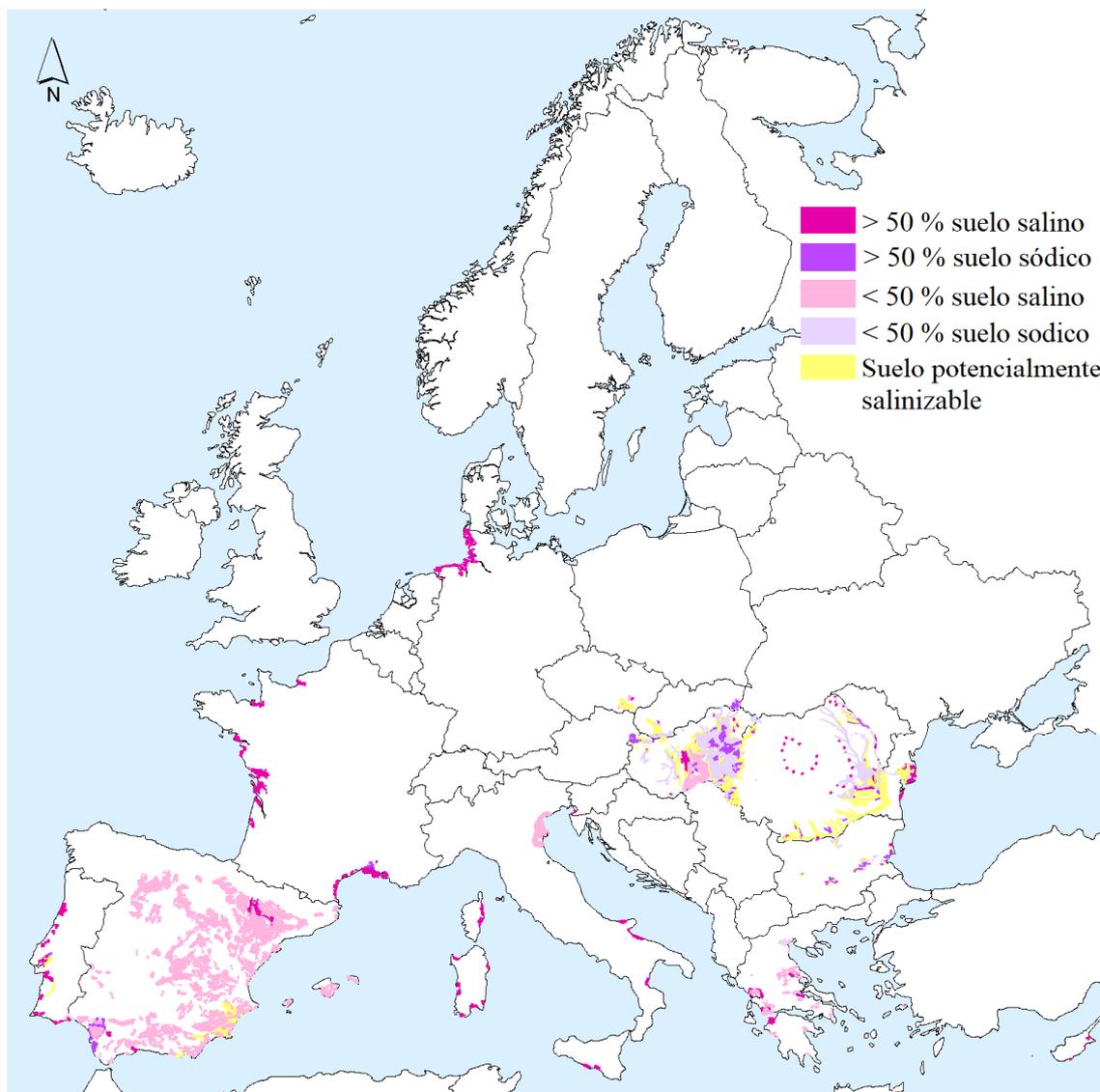


Figura 2. Mapa de la Unión Europea sobre la distribución de los suelos salinos y sódicos de origen tanto primario (suelos naturales) como secundario (degradación debida al hombre). Obsérvese como la costa suroeste, de un alto carácter agrícola, presenta problemas de salinización y algunas zonas presentan un alto riesgo de salinización si no se gestionan adecuadamente (Tóth *et al.*, 2008).

1.2. La salinización de los suelos

En un sentido amplio, se define salinización como un incremento de la concentración de sales y su eventual precipitación en la disolución del suelo (Juárez-Sanz *et al.*, 2006). Los suelos salinos tienen diferentes orígenes, así se pueden agrupar en (1) suelos salinos primarios, cuyo origen es natural; y en contraposición están (2) los suelos salinos secundarios, en los cuales la salinización no se debe a la historia geológica y climática de la zona, sino a una salinización ocurrida en un plazo de tiempo más corto y asociado a la actividad antrópica (Figura 3).



Figura 3. Mapa global en el que se representan los países con problemas de salinidad, tanto primario como secundario. En muchas de esas zonas el problema se acrecenta debido a una climatología desfavorable, asociada a altas temperaturas y una pluviometría escasa (Zaman *et al.*,2018).

Respecto a la salinización primaria, recordar que aproximadamente las tres cuartas partes de la superficie terrestre están cubiertas por agua. De todo ese volumen el 97 % es agua de mar y océanos, es decir, aguas que contienen un valor medio de 35 g de sales por litro de agua (Large *et al.*, 1994). Esto permite hacerse una idea de la gran cantidad de sal presente en nuestro planeta y por qué puede ejercer una gran influencia en la vida cotidiana de muchas personas que viven en zonas afectadas por un clima seco y suelos salados (FAO, 1993). La sal es un compuesto muy distribuido por la corteza terrestre. Con el término sal en general se conocen varios compuestos de origen natural (siendo el más común el cloruro sódico, NaCl). La sal aparece en el agua de los océanos y a partir de ese punto puede sufrir diferentes procesos físicos y químicos que permiten su presencia en todo el planeta. Así los agentes físicos presentes en las zonas costeras, tanto el agua como el viento, pueden provocar deposiciones en un paisaje (Bresler *et al.*, 1982). También puede tener un origen mucho más antiguo debido a la historia geológica del planeta Tierra; así, hay suelos formados por sedimentos marinos dejados por el mar al retirarse de dicha zona (Bresler *et al.*, 1982). La meteorización (degradación por diferentes agentes) de los minerales de la roca puede transportar la sal lejos de su origen inicial. En paisajes sin alterar la mayoría de la sal poco a poco va lixiviándose en el subsuelo más allá del alcance de las raíces de las plantas, que actúan como barrera para que la sal no se pierda, o al menos sea retenida (Brandy y Weil, 2002).

Respecto a la salinidad secundaria, a su vez hay dos formas principales: (1) una asociada a zonas áridas y semiáridas, conocida como salinización zonal; y (2) otra azonal, no relacionada tanto con una zona climática, sino más bien con la mala gestión en zonas de laboreo (Martín de Santa Olalla-Mañas, 2001).

La salinización zonal puede ser la más problemática en el sentido de que debido a las zonas climáticas en las que se localizan estos suelos, normalmente zonas subtropicales, la lluvia anual no es suficiente para cubrir las necesidades de evapotranspiración del suelo (movimiento ascendente del agua desde el suelo a la atmósfera, impulsado tanto por las temperaturas como por la actividad vegetal). Esto implica que son zonas supeditadas al agua de riego, lo que conlleva la adición de sales a la tierra ya que cualquier tipo de agua natural contiene las sales solubles más comunes (a destacar el cloruro de sodio, pero también hay sales, cloruros y sulfatos, de calcio, magnesio y potasio) y, por ende, la acumulación de dichos compuestos. Además, siempre que el agua que se aporte al campo esté asociada a su uso por las plantas, la salinización del suelo es inevitable, ya que la vegetación potencia la evapotranspiración. Por ello, se puede considerar que los suelos de estas zonas están siempre en un riesgo potencial de salinizarse (FAO, 1999).

Los suelos con problemas de sales se pueden clasificar en tres grupos, de mayor a menor problema para ser usados como cultivables, según la clasificación americana de suelos (Chhabra, 1996): (1) suelos salinos, (2) suelos sódicos y (3) suelos salino-sódicos.

Los suelos salinos son aquellos que presentan, en la zona donde están las raíces de las plantas, una cantidad de sales disueltas suficiente para restringir el desarrollo de los cultivos. Las sales más comunes son las de sodio, aunque también las de calcio y magnesio. Estos suelos se caracterizan por tener siempre una costra blanca en la superficie y una permeabilidad mayor o similar a la de suelos no salinos, con lo que se lavan con facilidad. Además, se suelen ver afectados los cultivos, pero no así la integridad del suelo (Figura 4) (López-Ritas y López-Melida, 1990).

En los suelos sódicos la cantidad de sodio adsorbida (retenida por las partículas del suelo) es suficiente para tener propiedades físicas y químicas perjudiciales para los cultivos en la zona radicular. Entre sus características más destacables hay que indicar que son suelos en los que las arcillas se dispersan y son desplazadas por el agua de drenaje hacia abajo, lo que puede ocasionar que a no muchos centímetros se acumulen, formando una capa pesada nada permeable y asfixiante, mientras que la capa superior tiene una textura gruesa y quebradiza. Suelen tener un color negruzco en su superficie, álcali negro,

ya que la materia orgánica se disuelve y dispersa. Son suelos que se ven afectados en su estructura, además de afectar al crecimiento de los cultivos (Chen *et al.*, 2014).



Figura 4. Suelo de cultivo afectado por la salinidad, nótese la costa blanca formada por la acumulación de sal en la superficie del suelo que imposibilita el desarrollo del vegetal (fotografía de Roberto Casas).

Por último, están los suelos salino-sódicos en los que la cantidad de sal disuelta es tal que sus propiedades fisicoquímicas hacen imposible el desarrollo de los cultivos. Mientras que no tengan un exceso de sales, su apariencia y propiedades son idénticas a la de los suelos salinos. Pero si las sales son lavadas, las propiedades del suelo pueden cambiar notablemente, llegando a equipararse a la de los suelos sódicos. Si estos suelos presentan yesos, al ser lavados intercambian el sodio que haya sido absorbido por el calcio del yeso, provocando un lavado de las sales que no afecta a la estructura edáfica (Brandy y Weil, 2002).

Una última cuestión a tratar en este apartado va a ser la desertificación. En Nairobi en 1977, durante la Conferencia de las Naciones Unidas sobre la desertificación, se definió dicho proceso como: el agravamiento o extensión de las condiciones características del desierto; proceso que acarrea una disminución de la productividad biológica y, con ello, una reducción de la biomasa vegetal, de la capacidad de las tierras para las actividades pecuarias, de la producción agrícola y una degradación de las condiciones de vida para el ser humano (FAO, 1993). Uno de los factores que interviene

en que las características de una zona seca sean aún más extremas o se amplíe la superficie de los desiertos es la salinización de una zona. Aunque se disciernen como dos procesos diferentes, ambos están muy vinculados, de manera que si una zona árida o subhúmeda afectada por la salinización no es tratada como es debido, o incluso se sigue trabajando en ella sin tomar unas medidas correctoras, tienen una alta probabilidad de transformarse en zona desértica, con todas las consecuencias sociales, culturales y económicas que ello acarrea (Martín de Santa Olalla-Mañas, 2001).

1.3. Problemática con la agricultura

La producción de alimentos es limitada por diversos factores. Uno de los hechos principales es la salinización edáfica pues disminuye la capacidad de producción de los campos agrícolas (Martín de Santa Olalla-Mañas, 2004). Diversos estudios han demostrado que casi la mitad de las zonas agrícolas bajo riego, principalmente de zonas áridas y semiáridas, son afectadas por la salinización del suelo (Munns, 2002; Flowers, 2004).

Así, de los 1500 millones de hectáreas (ha) que se cultivan, aproximadamente el 5 % (77 millones de ha) se ven afectadas por la sal (Munns *et al.*, 1999). En el caso de España se calcula que unas 800000 ha están afectadas por sales. Además, el problema de la salinización va en aumento, a menudo debido a una errónea praxis agrícola. En la Tabla 1 se puede consultar la extensión de la salinización inducida por el hombre.

Tabla 1. Estima de la superficie de suelos afectados por sales inducidas por la actividad humana (Oldeman *et al.*, 1991; Mashali, 1995).

Zona	Extensión de la salinización inducida por el hombre (Millones de ha)					Tierras cultivables total (Millones de ha)
	Salinización					
	Débil	Moderada	Fuerte	Extrema	Total	
África	4.7	7.7	2.4	-	14.8	185
Asia	26.8	8.5	17.0	0.4	52.7	451
Norteamérica	0.3	1.5	-	-	2.3	274
Sudamérica	1.8	0.3	-	-	2.1	142
Europa	1.0	2.3	-	-	3.8	140
Australia	-	0.5	-	0.4	0.9	282
Total	34.6	20.8	20.4	0.8	76.6	1474

Como se mencionó en el apartado anterior las tierras de regadío están particularmente en riesgo. Aproximadamente un tercio de ellas está afectado significativamente por la salinidad (Tabla 2). A pesar de su área relativamente pequeña, se estima que las tierras de regadío producen un tercio de los alimentos del mundo (Munns, 2002), por lo que la salinización de este recurso es particularmente crítica.

Tabla 2. Datos sobre la superficie terrestre cultivable (ha) (Epstein *et al.*, 1980).

Superficie de tierras	14 * 10 ⁹
Potencialmente cultivables	3,2 * 10 ⁹
Cultivadas	1,5 * 10 ⁹
Áridas y semiáridas	6 * 10 ⁹
Irrigadas	0,23 * 10 ⁹
Irrigadas y salinizadas	0,076 * 10 ⁹

El origen de estos problemas agrícolas se debe a que las plantas de interés agrario no suelen estar adaptadas a medios salinos (o sódicos), con lo cual presentan problemas en su fisiología que no les permite crecer adecuadamente. Así, un problema crítico se produce en la germinación, ya que la presencia de sal dificulta que la semilla se hidrate correctamente (El-Madidi *et al.*, 2004). Posteriormente, en el desarrollo de la radícula y cotiledones (aparte de problema de la mala hidratación, que a su vez interfiere en la toma de nutrientes) está el exceso de sodio en tejidos vegetales que suele ser tóxico, lo que hace que se retrase, e incluso, imposibilite el desarrollo vegetal (Gil-Martínez, 1995). Dicha situación puede llegar a ser un problema en países agrícolas en los que la mayoría de las especies que se utilizan son los cultivos de grano, como es el caso de España (MAPA, 2018)

Respecto a la germinación, hay cultivos más sensibles que otros, aunque todos se ven afectados. Hay que destacar que los productos hortofrutícolas (algodón, tomate, etc.) suelen ser más sensibles que los de grano (trigo, cebada, cebada, etc.) y, aunque pueden germinar en suelos con gran cantidad de sal, hay que tener en cuenta que muchas veces las plantas no se desarrollarán en esos suelos (Maas y Poss, 1989; El-Tayeb, 2005). En especial, habrá problemas en los suelos sódicos debido a las características edáficas, tales como capas compactas de arcillas que la raíz no puede atravesar, la mala aireación del suelo o imposibilidad de un correcto drenaje, que impide el buen crecimiento y/o la productividad de los vegetales (Juárez-Sanz *et al.*, 2006).

Por otro lado, es básico recordar que para la toma de agua por parte de las plantas la presencia de sales en la solución del suelo actúa como una barrera, impidiendo la

hidratación de la planta. Esto se explica por el proceso de ósmosis, ya que la planta presenta barreras semipermeables en el flujo que va desde el suelo a los tejidos vegetales (Taiz y Zeiger, 2015). Si la concentración total de sales es mayor en el suelo que en la planta se inhibe la toma de agua. Si esto ocurre de forma continuada puede incluso provocar la salida de agua desde las células hacia el medio, llegando la célula a colapsar (proceso de plasmólisis). Sin llegar al caso extremo citado anteriormente, si la toma de agua de la planta no es la apropiada puede desencadenar problemas en la fotosíntesis, que está directamente relacionada con la productividad de los vegetales de uso agronómicos (Gil-Martínez, 1995).

Las alteraciones que presentan las plantas en su nutrición pueden llevar o bien a la falta de la toma de algún nutriente esencial para su desarrollo, o a la presencia de un elemento presente en el suelo, y muy accesible a la planta, que le pueda provocar toxicidad. Cualquiera de los dos procesos anteriores (defecto o exceso de un elemento) está ligado a dos factores: (1) exceso de sodio en suelos salinos que interfiere en la toma de otros nutrientes. Y (2) el pH del suelo que permite que los elementos del suelo estén en una forma química u otra (Juárez-Sanz, *et al.*, 2006), así la mayoría de los macro y micronutrientes de las plantas están en mayor disponibilidad a pH ligeramente ácido (5.5-6.5). Pero si se hace algo más ácido el suelo (pH 5), elementos tan frecuentes como el aluminio se vuelven soluble y muy tóxico para las plantas (Horst *et al.*, 2010).

No obstante, la salinización es un proceso reversible. Se pueden recuperar suelos salinos con un riego abundante que disuelva las sales y las arrastre hasta los horizontes más profundos del perfil del suelo, lejos de la zona de enraizamiento (Ayers y Westcot, 1985). El coste del lavado del suelo depende del tipo de cultivo y de la salinidad que presente. En ocasiones los agricultores realizan lo que se denomina un riego a manta, que consiste en inundar una serie de campos con agua procedente de diversas canalizaciones. Además, suele ser frecuente tras el lavado realizar un drenaje artificial del agua añadida, con objeto de evitar un ascenso del nivel freático hacia la superficie (evitando así que retornen las sales lavadas), lo que incrementa los costes.

Qadir *et al.* (2014) identificaron países en los que se ha reportado los gastos económicos producidos por la salinización. Países como Australia, India, Estados Unidos, Irak, Pakistán, Kazajistán, Uzbekistán y España indican dichos costes respecto a una estima de pérdidas en la producción de cultivos, aunque no está claro si sus comparaciones se hacen con los valores de producción de cultivos tomados respecto a tierras no afectadas por la salinidad. Teniendo en cuenta los países anteriores, Qadir *et al.*

(2014) concluyeron que la extensión del área irrigada global es de 310 millones ha (FAO-AQUASTAT, 2013), que el 20 % de las misma está afectada por la sal (62 millones ha) y que los gastos que implican las áreas contaminadas por la sal son de 608 € ha⁻¹ en 2013. Así, las pérdidas globales podrían rondar los 37'7 millones €. En base a esta estimación, Qadir *et al.* (2014) recomendaron invertir en la remediación de las tierras afectadas por la sal y señalaron que los costes de remediación deben incluirse en una estrategia nacional por la seguridad alimentaria.

En una experiencia de desalinización edáfica llevada a cabo en México tuvieron que realizar una inversión de 1160 € ha⁻¹. Usando este coste como referencia, y teniendo en cuenta el número de hectáreas afectadas por la salinidad, indicadas en la Tabla 1, la recuperación de los suelos salinos de Europa podría costar unos 8236 millones € (<http://www.teorema.com.mx/agua/propicia-eu-la-salinidad-que-dana-suelos-de-cultivo-en-mexicali/>).

La superficie de España se corresponde con 50 millones ha y casi la mitad de la superficie se destina a actividades agrícolas (INE, 2018). Aproximadamente 3'5 millones ha se destinan al cultivo de regadío y de ese total el 3 % son suelos gravemente afectados por la salinidad y otro 15 % se encuentra seriamente amenazado (Amezketta, 2011). Con todos estos datos recabados, el coste de la recuperación de ese 18 % de suelos alterados por la sal utilizando el lavado de sales ascendería a unos 731 millones €.

En el caso de la sodificación el lavado es más complejo y se realiza con la adición de yeso agrícola (sulfato de calcio), que desplaza los iones sodio por calcio para recuperar la estructura del suelo, ya que la disminución de la infiltración provocada por la presencia de sodio agravaría el problema con un lavado normal. La aplicación de correctores como el yeso al suelo es más cara. Una tonelada de yeso agrícola cuesta unos 90 €, y se necesitan unas 8 toneladas por hectárea, lo que supone unos 720 €/ha (<http://www.gatfertilizados.com/>).

Por otro lado, se estima que en tres décadas a nivel mundial la agricultura debería producir un 60 % más, y en el caso concreto de los países en vía de desarrollo esa cifra sería muy cercana al 100 % (Alexandratos y Bruinsma, 2012). Sin embargo, las tasas actuales de crecimiento de las demandas agrícolas sobre los recursos de agua dulce del mundo son insostenibles. La mala gestión de los recursos, como el uso ineficiente del agua para la producción de cultivos, agota los acuíferos, reduce los caudales de los ríos, degrada los hábitats de la vida silvestre y causa la salinización de las tierras irrigadas a nivel mundial (FAO, 2011). Por ello, es necesario que tanto la producción de alimento

como las medidas correctoras para la recuperación de tierras para la explotación agrícola tengan un carácter sostenible.

2. Desarrollo Sostenible

Según la UNESCO (2008) la sobreexplotación y salinización de los recursos hídricos en proyectos de riego de gran escala son a menudo resultado de la falta de infraestructuras de drenaje, que no se incluyen en el diseño de ingeniería para que los proyectos resulten económicamente más atractivos. Pese a que se conocen las soluciones a estos problemas, su aplicación resulta costosa. Se estima que 950 millones ha de tierras salinizadas se producen en las regiones áridas y semiáridas, casi el 33 % de la superficie potencialmente cultivable del mundo. A nivel mundial, alrededor del 20 % de las tierras de regadío (45 millones ha) están afectadas por la salinización (Figura 5), con una pérdida de suelos productivos entre 0'25-0'5 millones ha año⁻¹ (FAO, 1995).

Es decir, es necesario poder abarcar la solución al problema de la salinización desde un punto de vista menos ambicioso económicamente, pero más accesible a toda la sociedad. Con esa idea aparece el concepto de desarrollo sostenible, definido como el manejo y la conservación de los recursos naturales; y la orientación de los cambios tecnológicos e institucionales de tal manera que se asegure la continua satisfacción de las necesidades humanas para las generaciones presentes y futuras (FAO, 1995). Este desarrollo sostenible debe conservar los recursos de la tierra (agua, plantas y animales) en todos sus sectores (agrícola, forestal y pesquero) y no afectar al medio ambiente. Debe ser técnicamente apropiado, económicamente viable y socialmente aceptable.

Además, la mayoría de la pobreza (70 %) se concentra en países en desarrollo. Coincide con poblaciones que socioculturalmente se caracterizan por vivir en zonas rurales en las que su subsistencia depende de la agricultura. Mientras que existan zonas deprimidas en las que haya problemas de hambruna no podrá hablarse de un planeta que tenga un desarrollo sostenible. La FAO estima que aún será necesario el aumento de la superficie agrícola, en especial en África y Sudamérica, para que toda la humanidad se encuentre abastecida (FAO, 2002).

Uno de los objetivos principales es que el citado aumento de tierras no sea a costa de invadir espacios naturales. No hay que olvidar que el desarrollo sostenible se sustenta en la búsqueda del bienestar de la población humana y la conservación de la biodiversidad en nuestro planeta. Para ello, hay que intentar mejorar el rendimiento de las cosechas que actualmente se cultivan cada año, así como las condiciones de los suelos que se vean

afectados por la salinización (con el riesgo de desertificarse); incluso recuperar suelos que han perdido su potencial y poder así responder a las necesidades nutricionales tanto de las poblaciones actuales como de las venideras (FAO, 2002).



Figura 5. Imagen de satélite procesada en la cual, en verde, están marcadas las zonas utilizadas actualmente en la explotación agrícola. Muchas de esas zonas coinciden con zonas deprimidas económicamente y, a su vez, con un clima de altas temperaturas y/o escasos recursos hídricos; factores que acrecenta el problema de la salinización (ejemplos: África subsahariana, el Medio Oeste o la zona del Indostán) (fuente: <https://web.croplands.org/app/map?lat=0&lng=0&zoom=2>).

3. La fitorremediación

En general, remediación hace referencia a técnicas utilizadas para recuperar suelos contaminados, por agentes orgánicos o inorgánicos, a su estado original (o al menos que dejen de ser potencialmente nocivos para la salud). Los primeros procesos de remediación para recuperar suelos contaminados fueron mediante métodos físicos y/o químicos; siendo una actividad que se lleva realizando, de manera habitual, algunas décadas. En especial, la remediación se ha focalizado mucho en la descontaminación de metales pesados.

Las técnicas más habituales empleadas para limpiar suelos de metales tóxicos han sido: (1) la extracción, que es la excavación, transporte y depósito del suelo contaminado a un vertedero de residuos peligrosos apropiado; (2) la fijación, mediante procesos

químicos que consiguen inmovilizar el contaminante en el suelo, seguida de la impermeabilización (impidiendo la lixiviación del material fijado); y, por último, (3) la lixiviación, en esta técnica se extraen los suelos, se limpian, usando soluciones ácidas u otros lixiviantes comerciales para desabsorber el contaminante y se retorna el suelo ya libre del agente nocivo.

Desde hacía siglos que se intuía que las plantas eran capaces de limpiar contaminantes, no obstante, al principio de la década de los 80 comienzan a describirse cómo hay plantas que acumulan y a la vez toleran la presencia de metales pesados en sus tejidos, es decir, se describe el potencial de las plantas como una bioherramienta para descontaminar (Chaney, 1983).

Cunningham y Berti (1993) hablan por primera vez fitorremediación, como: “el uso de plantas verdes para eliminar, contener o hacer inofensivo un contaminante ambiental, aplicándolo a todos los procesos biológicos, químicos y físicos influenciados por las plantas que ayudan en la remediación del sitio”. A partir de la década de los 90, la fitorremediación se estableció como una línea de investigación que crece de forma exponencial. Pero es una década posterior cuando se revolucionan los estudios en la fitorremediación de manera transversal, gracias al uso de microorganismos que se asocian a las plantas y potencian el proceso de fitorremediación. Es un nuevo camino para la recuperación de zonas contaminadas mediante un proceso rentable, no invasivo, alternativo y/o complementario a otros métodos para solucionar el problema de los suelos contaminados (Pilon-Smits, 2005).

3.1. Tipos de fitorremediación

La fisiología de las plantas es bastante amplia, lo cual permite que haya muchas vías que se pueden utilizar la remediación del medioambiente. Dependiendo del órgano de la planta que se utilice para fitorremediar y la forma de actuar sobre el contaminante, se clasifican varios tipos de fitorremediación (Figura 6):

(1) Fitoextracción: es el proceso por el cual una planta extrae al contaminante del medio y lo acumula en alguno de sus tejidos, bien acomplejándolo a otro compuesto para neutralizarlo o bien compartimentándolo en vacuolas (Blaylock y Huang, 2000). Como es el tipo de fitorremediación usado en esta Tesis Doctoral, va a desarrollarse un poco más:

Las plantas pueden realizar dos tipos de fitoextracción: (1a) fitoextracción inducida, fue la primera que comenzó a realizarse, se basa en añadir al medio agentes

quelantes que permiten o facilitan la toma del contaminante por parte de la planta; aunque no suelen representar más del 0'6 % de la biomasa seca de la planta (Blaylock, *et al.*, 1997). En contra posición está (1b) la fitoextracción continua, en este proceso la planta va absorbiendo el contaminante de forma natural durante todo su ciclo vital. En este caso la cantidad de contaminante respecto al peso seco total de la planta suele ser más del doble respecto a la fitoextracción inducida; por ello, las plantas que fitoextraen así se conocen como hiperacumuladoras (Baker y Brooks, 1989). Es el modelo es el utilizado en esta Tesis. Hay que resaltar que para que una planta sea óptima en este proceso no solo debe ser capaz de tolerar y acumular altos niveles del contaminante en su parte cosechable, sino que también debe tener el potencial de producir una gran cantidad de biomasa en el campo (Salt *et al.*, 1995).

Tras la limpieza del suelo hay que tomar ciertas precauciones para evitar que el agente que se desea eliminar no retorne al medioambiente. En ese sentido, en el caso concreto de la fitoextracción, se utilizan plantas que no pierdan la biomasa que generan o, si no es el caso, ésta se cosecha y se elimina en un vertedero o centro de reciclado (Salt *et al.*, 1998).

(2) Fitoestabilización: denota el uso de las raíces de las plantas para estabilizar contaminantes en el suelo, ya sea simplemente evitando la erosión, lixiviación o convirtiendo el contaminante en una forma menos disponible para los organismos, por ejemplo, a través de la precipitación en la rizosfera (Berti *et al.*, 2000).

(3) Fitoestimulación (o rizodegradación): es el proceso por el cual las raíces facilitan la biodegradación de contaminantes, normalmente orgánicos, mediante los microorganismos de su rizosfera (McCutcheon y Schnoor, 2003), siendo rizosfera la fracción de suelo que se localiza inmediata a las raíces vivas. La rizosfera se encuentra muy influenciada por la actividad radical (toma y excreción de compuestos), viéndose alterada la biodiversidad de microorganismos de dicho volumen de suelo, normalmente aumentando la densidad de estos (Hiltner, 1904; April y Keller, 1990; Burdman *et al.*, 2000).

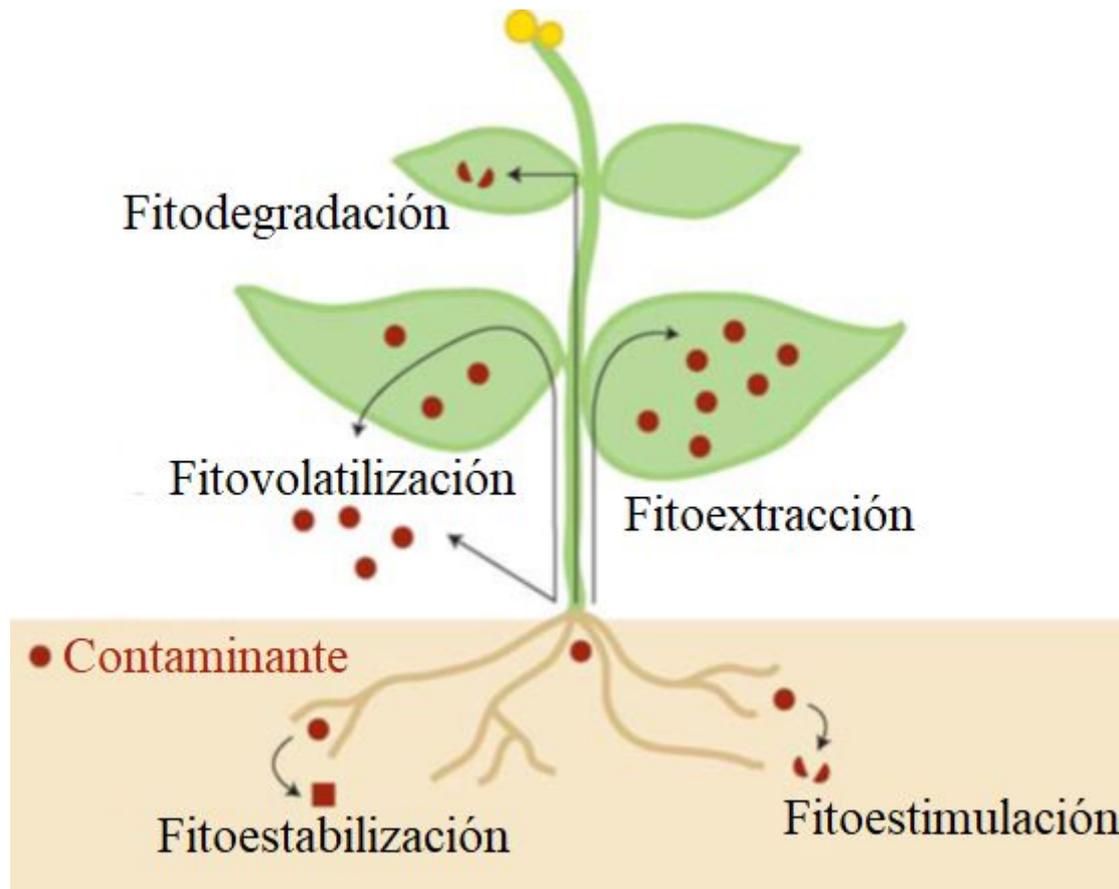


Figura 6. Mecanismos por los que una planta toma un contaminante durante la fitorremediación, el contaminante (representado por círculos rojos) se puede volatilizar tanto desde la raíz como en otros tejidos (fitovolatilización), secuestrar (fitoextracción) y/o degradar dentro del tejido de la planta (fitodegradación), y, por último, estabilizar o degradar en la rizosfera (fitoestabilización y fitoestimulación, respectivamente) (Pilon-Smits, 2005).

(4) Fitodegradación: proceso que se inicia con la captación del contaminante y su transporte hacia los tejidos para poder ser degradado directamente, a través de sus propias actividades enzimáticas (Pilon-Smit, 2005).

(5) Fitovolatilización: una vez tomado el contaminante por las raíces y transportado hacia las hojas, en ellas se realiza una transformación de dicho compuesto en un compuesto volátil, normalmente inocuo, que se emite a la atmósfera (Terry *et al.*, 1995).

3.2. Metodologías de la fitorremediación

Los procesos previamente citados ocurren de forma natural y espontánea. Es decir, en aquellos lugares contaminados que tienen vegetación hay una tendencia a limpiarse sin que intervenga el ser humano, es lo que se conoce como atenuación natural. Pero dependiendo del componente medioambiental (agua, tierra o aire) que se quiera

descontaminar se han desarrollado múltiples métodos para implementar y optimizar la fitorremediación (Figura 7):

(1) Rizofiltración (Figura 7a): con esta técnica lo que se hace es canalizar el agua contaminada a través de un medio hidropónico en el que están embebidas las raíces de la planta fitorremediadora, que actúan como un filtro que retiene al contaminante (Raskin *et al.*, 1997). Lo ideal es que la planta que se utilice tenga un crecimiento rápido de sus raíces. Suele ser el método más caro de la fitorremediación, pero es altamente eficaz para volúmenes de agua no demasiado grandes (Pilon-Smit, 2005).

(2) La creación de humedales o el control hidráulico: ambas técnicas tienen similitud pues tratan de usar la vegetación natural como barreras impermeables al contaminante. En el primer caso, en humedales, en los que se aprovechan las características que presentan las herbáceas y arbustos que se desarrollan en esos ecosistemas tan característicos (Horne, 2000) (Figura 7b). En el segundo, gracias a los árboles, en especial aquellos que tienen sistemas radicales amplios y profundos para retener contaminantes tanto a nivel del suelo como de fuentes de agua profundas (Newman *et al.*, 1997) (Figura 7 c).

(3) El cultivo del suelo contaminado: lo que se busca es crear una barrera en el suelo, combinando el potencial complementario de los árboles y las herbáceas. Los primeros actúan como bombas de succión desde el suelo a la atmósfera, impidiendo así la pérdida del contaminante por lixiviación; mientras que las herbáceas se desarrollan por el suelo fijando el sustrato e impidiendo movimientos horizontales del contaminante (Pilon-Smit, 2005) (Figura 7 d).

(4) La filtración del aire: las plantas presentan en sus hojas una estructura ultracelular, los estomas, a través de los cuales se realiza el intercambio gaseoso con la atmósfera necesario para la fotosíntesis. A través de ese flujo, nada selectivo, entran muchos componentes volátiles que la planta incorpora bien acumulándolos o transformándolos (Figura 7e).

Hay que destacar que todas estas técnicas de fitorremediación no se excluyen mutuamente; de manera que, en un humedal construido, la acumulación, la estabilización y la volatilización pueden estar sucediendo de manera simultánea (Hansen *et al.*, 1998).

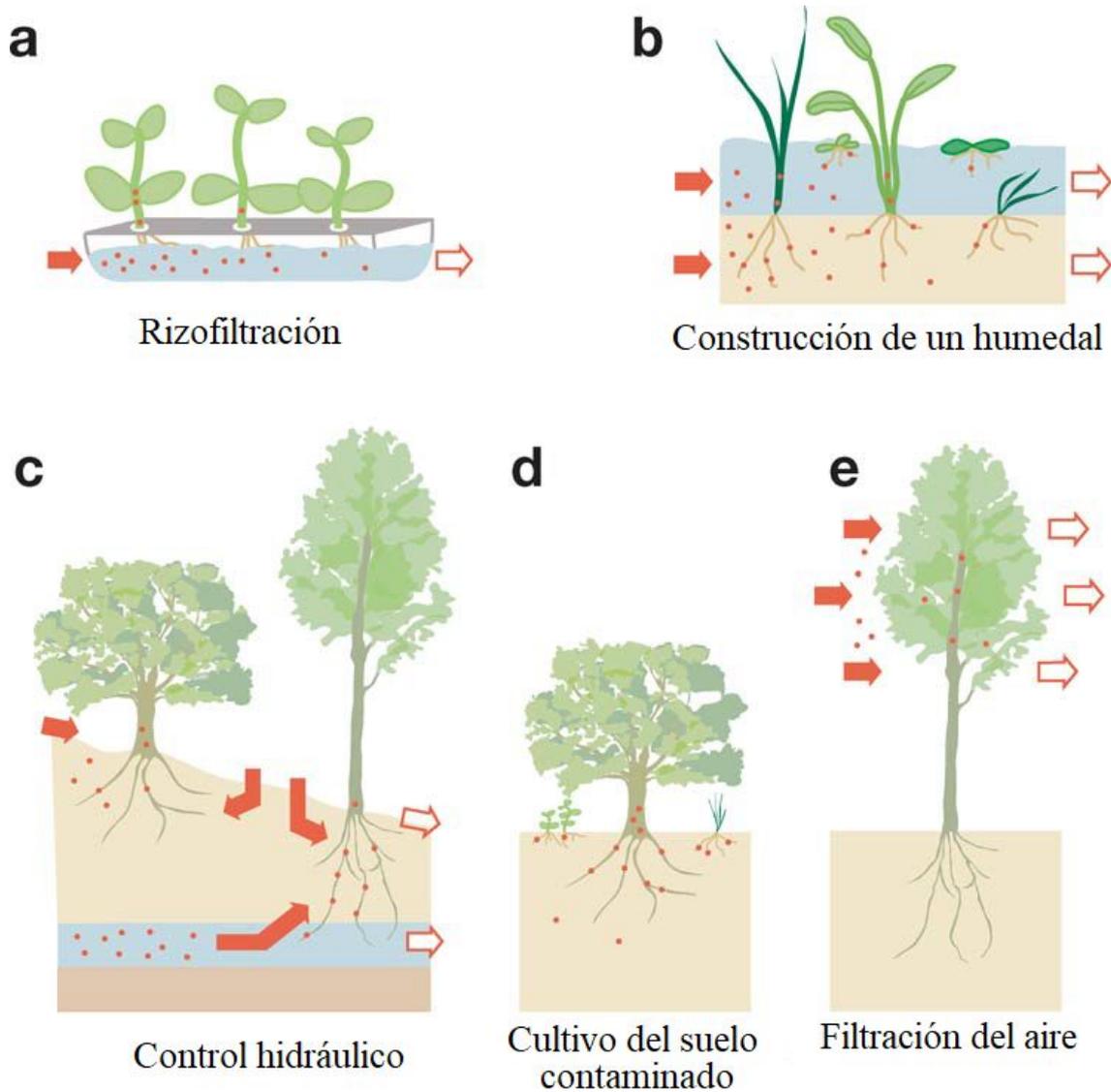


Figura 7. Las técnicas de fitorremediación utilizadas para la limpieza de los tres componentes del medioambiente (el agua, la tierra y la atmósfera). Las flechas indican el flujo del medio (agua o aire) y los puntos rojos el contaminante (Pilon-Smits, 2005).

3.3. La fitodesalinización

Como se ha explicado en el apartado 3.2., existen diferentes mecanismos por los cuales las plantas pueden ser útiles para recuperar suelos contaminados. En concreto, esta Tesis se centra en la fitodesalinización, que es una remediación del tipo fitoextracción mediante el cultivo de una planta en suelo contaminado. Es decir, la eliminación del exceso de sales edáficas, en especial NaCl, por medio de una planta capaz de extraerla del suelo y retenerla en su interior, permitiendo que la concentración de sal de dicho suelo disminuya, y de esta manera se recupere para el cultivo.

4. *Arthrocnemum macrostachyum* (Morric.) Moris

Con todo lo expuesto hasta ahora, es necesario generar un sistema de fitodesalinización, acorde con un enfoque sostenible, que cumpla unos requisitos mínimos, como son: (1) poder proporcionar servicio esencial al ecosistema, (2) generar los mínimos gastos económicos posibles, (3) ser ecológicamente inocuo y (4) duradero (Vargas *et al.*, 2018). Respecto a este último aspecto, es mejor emplear especies de árboles y arbustos perennes (Sapanov, 2003).

Teniendo en cuenta los requisitos anteriores, en las marismas hay una gran variedad de especies que potencialmente podrían utilizarse con el objetivo de remediar zonas degradadas por el exceso de sal. Las marismas y saladares se caracterizan por la abundancia de sales en el suelo y poseer un nivel freático próximo a la superficie, que provoca afloramientos de agua, al menos durante una parte del año (Rengasamy, 2006). Hasta hace relativamente poco tiempo, los estudios en dichos ecosistemas se cernían a la descripción de procesos físicos, químicos y biológicos. Pero en la actualidad se observan dichas zonas como laboratorios biológicos de los que poder sacar un mayor rendimiento. De ahí, surge la idea de utilizar plantas halófilas (tolerantes a la sal, muchas de ellas incluso necesitan la sal para desarrollarse) como sumideros orgánicos de sal (Pilon-Smits, 2005). Suponen una actuación más barata y sencilla para aquellas zonas rurales sin los recursos necesarios para acometer los complejos y costosos procesos de desalinización, pues básicamente lo que se necesitaría es plantar las especies deseadas (Pilon-Smits, 2005). De esta manera, se podrían limpiar zonas afectadas por salinidades no óptimas para el cultivo, complementando o incluso sustituyendo a las técnicas físicas o químicas, tan costosas, que se utilizan en la actualidad.

Para el desarrollo de esta Tesis Doctoral seleccionamos a la halófito *Arthrocnemum macrostachyum* (Morric.) Moris (Figura 8). Es una angiosperma hermafrodita, arbustiva, semileñosa, erecta o postrada radicante, que alcanza hasta 1'5 m de altura. Sus tallos son articulados, formados por segmentos carnosos originados por las hojas que se sueldan por la base y al tallo (Figura 8). Su color vira entre verde claro y verde ceniciento. Pertenece al orden *Caryophyllales* y a la familia de las antiguas *Chenopodiaceae*, pero según la clasificación APG (moderna clasificación filogenética basada en la historia evolutiva) actualmente se engloba dentro de la familia de las *Amaranthaceae*, subfamilia *Chenopodioideae* (Chase *et al.*, 2016). Su distribución es cosmopolita a lo largo de la cuenca mediterránea, Oriente Medio y Asia (Winter *et al.*,

1976), localizándose en saladares (tanto de interior como de costa) y marismas, aunque nunca influenciada directamente por la marea (Castroviejo, 1986).



Figura 8. Vista general de varios individuos de *Arthrocnemum macrostachyum* (A), de un solo individuo juvenil (B) y de las ramas estériles y ramas fértiles con flores (C).

4.1. El potencial fitodesalinizador de *Arthrocnemum macrostachyum*

La elección de *A. macrostachyum* se fundamenta en los siguientes aspectos: (1) es una halófita obligada (necesita la sal para su correcto desarrollo) en la que la producción de biomasa se estimula entre los 200 y 400 mM de NaCl (Khan *et al.* 2005; Redondo-Gómez *et al.*, 2010). De manera que (2) puede crecer en suelos afectados por un amplio rango de salinidad.

Es una especie perenne (no pierde las hojas), de porte medio, que acumula las sales en sus ramas (Winter *et al.* 1976), con lo cual la sal que extrae del suelo no retorna al medio. Es decir, tenemos una planta que presenta un crecimiento óptimo en suelos con salinidades medias-altas, capaz de extraer y acumular la sal en su parte aérea, sin que retorne al medio. Por ello, *A. macrostachyum* tiene un gran potencial para ser utilizada en fitodesalinización.

5. Los microorganismos del suelo

Cientos de miles de especies de microorganismos aparecen por gramo de suelo (Allison y Martiny, 2008). Solo con ese valor se puede considerar el suelo, por sí mismo, un ecosistema. Además de los macroorganismos existentes (raíces de plantas, invertebrados y vertebrados en menor medida), la microbiota de un suelo presenta una de las mayores biodiversidades del planeta y conforma un complejo entramado de interacciones, tanto entre sus propios componentes como con los animales y plantas con los que cohabitan. En cualquier suelo se pueden encontrar bacterias, arqueas, hongos, algas unicelulares, protozoos, nematodos e incluso virus (sin entrar en consideraciones de si es o no un organismo vivo, pero están presentes en muchos hospedadores del suelo).

No todos estos organismos están representados en igualdad de proporciones, ni siquiera todos tienen que presentarse, pero es cierto que cada uno de ellos cumple una función en el ecosistema. Así las arqueas, suelen ser un grupo de organismos extremófilos, lo que ha permitido, y casi restringido, su presencia a ecosistemas de ambiente extremo (Kimura *et al.*, 2008; Swanson *et al.*, 2009; Killham y Prosser, 2015). Más comunes son las algas unicelulares, localizadas en la fina capa de agua que cubre las partículas del suelo, las cuales ellas mismas ayudan a mantener cohesionadas, mejorando la estructura del mismo gracias a la secreción de ciertos compuestos agregantes (Maier *et al.*, 2009). También hay que citar el papel de los protozoos como depredadores que básicamente regulan las poblaciones de los organismos hasta ahora citados (Six *et al.*, 2006). Y estos a su vez son la base alimenticia para los nematodos (junto a los otros grupos de la microbiota) (Yeates *et al.*, 1993).

Sin duda alguna, los grupos más presentes, tanto por diversidad como por número entre los microorganismos del suelo, corresponden a las bacterias y hongos, ya que entre ambos constituyen más del 90 % de los componentes de éste (Six *et al.*, 2006). Con esta breve descripción se quiere mostrar la complejidad entre las comunidades de microorganismos y sus interacciones, que llegan a conformar una red trófica (Steffan *et al.*, 2015). Además de la importancia que tienen a nivel global, pues meros cambios en la biodiversidad de estos organismos afectan al buen funcionamiento del ecosistema; como ejemplo, Maron *et al.* (2018) demostraron recientemente que descensos en la biodiversidad bacteriana provocaban pérdidas de un 40 % de las fuentes de carbono disponibles para el ecosistema.

Estos cambios en la biodiversidad, al igual que las alteraciones a las cuales nos referimos respecto a la salinidad, pueden tener (1) un origen natural (tanto abiótico como biótico) o (2) ser alteraciones producidas por el ser humano (Nadal-Rocamora, 2015). Atendiendo a las disrupciones de origen natural, básicamente se refieren a oscilaciones en el clima y alteraciones del suelo. Así, un aumento de la temperatura, asociado o no, a cambios en la disponibilidad del agua, hace que disminuyan los microorganismos del suelo o, al menos, que haya cambios en las densidades poblacionales. Además, el clima mediterráneo se caracteriza por alternar estaciones bien definidas, en las cuales los cambios de luz, temperatura y precipitaciones moldean la comunidad de microorganismos edáficos (Buckeridge *et al.*, 2013; Bevivino *et al.*, 2014), normalmente tendiendo a favorecer a aquellas especies que mejor se aclimaten a dichas condiciones (Schimel *et al.*, 2007; Berard *et al.*, 2011; 2012). Respecto a las alteraciones antropogénicas, su principal impacto sobre los microorganismos procede de los focos de contaminación que producimos (Wong, 2003; Clarke y Smith, 2011; De Santiago-Martín *et al.*, 2013). Pero no es necesario realizar actividades tan agresivas con el medioambiente para perturbar a la microbiota del suelo. De hecho, muchas actividades agrícolas producen alteraciones en la biodiversidad del mismo. Por ejemplo, el aporte de fertilizantes o quema de restos de los cultivos altera la química del suelo (Mijangos *et al.*, 2006; Diacono y Montemurro, 2010), la roturación del suelo cambia la talla de los agregados (Villar *et al.*, 2004; Lagomarsino *et al.*, 2012) y la creación de canales de riego y desagüe modifican la pendiente del terreno (Rietz y Haynes, 2003).

5.1. Las funciones de los microorganismos del suelo

Como se ha descrito en el apartado anterior, la biodiversidad de microorganismos es fundamental en un suelo. Y no solo desde el punto de vista taxonómico, sino por las funciones que desempeñan en el ecosistema (Fierer *et al.*, 2007). Es decir, cada especie de microorganismo tienen un nicho ecológico determinado, con una función específica a realizar para que el ecosistema funcione bien.

Centrándonos en las bacterias, grupo de organismos que va a ser utilizado en esta Tesis Doctoral, sus funciones son varias:

(1) Ciclos biogeoquímicos: se considera su principal actividad en los suelos, gracias a la gran versatilidad metabólica que poseen las bacterias. Son componentes claves que actúan en el sentido de la mineralización de los nutrientes para que los productores primarios tengan las bases para su crecimiento. Pero también intervienen en

el sentido opuesto mediante las síntesis de compuestos orgánicos, ya sean moléculas sencillas (ejemplo, los nitratos), o metabolitos secundarios (tales como las fitohormonas). Las bacterias intervienen en los ciclos tanto de los macronutrientes (carbono, nitrógeno o fósforo) como de los micronutrientes (hierro). Así, tienen la capacidad de utilizar múltiples fuentes de carbono, incluso las más complejas, lo que les permite eliminar compuestos orgánicos muy variados del suelo (Garrido-Sanz *et al.*, 2018; 2019). Con respecto al nitrógeno, el grupo más conocido es el de las bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico, las cuales hacen independientes de la fertilización nitrogenada a las plantas leguminosas, permitiendo incluso la incorporación al suelo de este nutriente si las plantas son enterradas y usadas como “abono verde”, pudiendo beneficiarse así otros cultivos de este N₂ fijado. El fósforo es un elemento poco móvil y escaso dentro suelo, con lo cual las bacterias juegan un papel muy importante en la movilización del mismo, junto con los hongos micorrícicos (Darrah, 1993). De igual manera, aunque el hierro es un elemento muy presente en la corteza terrestre, muchas veces se presenta en una manera no accesible para la mayoría de los organismos y gracias a las bacterias se pone a disposición de los demás seres vivos (Barber, 1995).

(2) Interacciones con otros organismos: como en cualquier ecosistema los microorganismos se relacionan con otros organismos. Estas interacciones pueden ser tanto negativas como positivas. En las relaciones negativas, se considera que muchas de estas especies colonizan nichos similares, con lo que unas actúan como reguladoras de las poblaciones de otras. Así, se han descrito bacterias que regulan a determinadas especies de hongos (Chen *et al.*, 1995; Nowak *et al.*, 1995; Mukhopadhyay *et al.*, 1996), a otras bacterias (Liu *et al.*, 1995) e incluso a nemátodos (Hallmann *et al.*, 1995). Pero las bacterias no solo interaccionan con otros microorganismos, pues también se han descrito en el control de plagas de animales, por ejemplo, de insectos (Dimock *et al.*, 1988). En cuanto a las relaciones positivas, se han descrito numerosos casos de cómo una especie bacteriana facilita la colonización de la raíz (tanto de árboles como de cultivares) por parte de un hongo micorrícico (Frey-Klett *et al.*, 2007). Además, los microorganismos pueden interaccionar no solo en una relación entre dos organismos, sino que se han descrito interacciones aún más complejas, como por ejemplo la demostrada por Lee *et al.* (2000) en la cual restos de alimentos de rumiantes se degradan de forma más eficiente cuando están presentes tanto hongos como bacterias y protozoos.

5.2. Las interacciones planta-microorganismo

La relación entre microorganismos y plantas es muy antigua. Se sabe que ya en el Paleozoico (hace 400 millones de años) existía una interacción de este tipo entre los hongos micorrícicos, que aportan nutrientes y agua a las plantas, y éstas que, a su vez, sintetizan compuestos para alimentarse, tanto ellas como a la micorriza (Honrubia, 2009). Dentro de las bacterias, la relación más estudiada es la que establecen las leguminosas con sus bacterias simbióticas, los rizobios; se ha estipulado que esa interacción, y otras similares, proceden de la época de Cretácico (hace entre 165 y 44 millones de años) cuando, debido a los suelos pobres en nitrógeno, se potenciaron las interacciones entre plantas y microorganismos que podían fijar nitrógeno atmosférico (Doyle y Doyle, 1997). Posteriormente, en la época de la Roma Antigua, aparecen las primeras referencias escritas sobre las leguminosas, en las que el escritor Marco Terencio Varrón (40 a.C.), aun sin conocer el por qué, cita “las leguminosas deben ser plantadas en el suelo, no por su interés como alimento sino por los efectos positivos que provocan en la siguiente época de siembra” (Fred *et al.*, 1933).

Como se ha mencionado anteriormente, estas interacciones existen sobre todo en la rizosfera, que por sí misma conforma un ecosistema acotado entre los primeros milímetros alrededor de la raíz viva (la ectorizosfera) y la endodermis de la raíz (McNear, 2013). En ese volumen de suelo existen unas condiciones tanto físicas como químicas especiales, producidas por la sinergia de las actividades de la planta y de los microorganismos, con el suelo y entre ellas, donde se generan nichos muy específicos en los que habitan las bacterias (Barea *et al.*, 2005).

Las interacciones entre las plantas y los microorganismos se pueden catalogar en beneficiosas o perjudiciales, haciendo referencia al efecto que el microorganismo produce sobre la planta (Tinker, 1984) o, en infectivas y no infectivas, según el microorganismo colonice o no el interior de la planta (De Felipe-Antón, 2004).

Centrándonos en las primeras y, con respecto a los hongos, son muchos los que se han adaptado a sobrevivir a partir de la colonización de una planta, viéndose ésta debilitada. Un ejemplo podría ser la interacción perjudicial que se da entre el hongo *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* y cualquier tipo de gramínea que colonice, en la que produce daños devastadores (Henson *et al.*, 1999). Pero a la vez, hay especies de hongos que favorecen de diferentes maneras a las plantas. Así, la interacción beneficiosa mejor conocida es la ya citada, con las micorrizas, siendo una relación que se establece

en la mayoría de las plantas. Pero existen otros casos, como la que ocurre con muchas especies del género *Trichoderma*, en la que el hongo se convierte en simbiote oportunista de la planta y le otorga diferentes ventajas, tales como resistencia frente a patógenos y mejora en el crecimiento y/o la nutrición Harman *et al.* (2004). Dentro del otro gran grupo de microorganismos, las bacterias, uno de los resultados de las interacciones perjudiciales con plantas más común es la denominada agalla, producida por la bacteria fitopatógena *Agrobacterium tumefaciens*, que no es más que una estructura de tejido vegetal que ha crecido en exceso, generando así un ambiente idóneo para el desarrollo de la bacteria (Link y Eggers, 1941).

Las vías por las se establecen interacciones positivas entre las plantas y los microorganismos en general y las bacterias, en particular, son muy variadas (Figura 9). En el apartado siguiente se desarrollará con más detalle el tipo de acciones positivas llevado a cabo por estas bacterias, denominadas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR (del término anglosajón *plant growth promoting rhizobacteria*) en sus interacciones con las plantas.

5.3. Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Se denomina así a un grupo heterogéneo de bacterias que, de forma directa o indirecta, mejoran el desarrollo de las especies vegetales (Figura 9). Así, se incluyen en este grupo a las bacterias biofertilizantes, es decir, aquellas que gracias a su actividad en los ciclos de los nutrientes estimulan la nutrición de las plantas aumentando el suministro de los mismos (método directo) o aquellas que, mediante la producción de fitohormonas (ejemplo, auxinas) aumentan el volumen de raíces y, por ende, la captación de nutrientes por parte de la planta (método indirecto). Además, si una bacteria puede regular una molécula precursora, o en general, algún compuesto que regule a las fitohormonas, estaría a su vez favoreciendo el crecimiento de la planta por una vía indirecta. Un ejemplo de este tipo de control es el que realizan las bacterias que eliminan moléculas de ACC (precursor del etileno, señal de estrés en plantas) mediante la actividad enzimática de la ACC desaminasa.

Por último, pero no menos importante como actividad promotora del crecimiento vegetal, se encuentra el biocontrol. Como se mencionó en las funciones de las bacterias del suelo, éstas interactúan con otros organismos regulando sus poblaciones. Si esa regulación se realiza sobre organismos patógenos para la planta, se está mejorando la salud de la misma y su crecimiento (Barka *et al.*, 2002). En otros casos se ha descrito que

la bacteria PGP no influye al patógeno, sino que actúa estimulando la respuesta de defensa de la planta, protegiéndola así frente a organismos dañinos (Barka *et al.*, 2000).

En los siguientes subapartados describiremos brevemente los mecanismos de las bacterias PGP que se han utilizado para el desarrollo de esta Tesis.

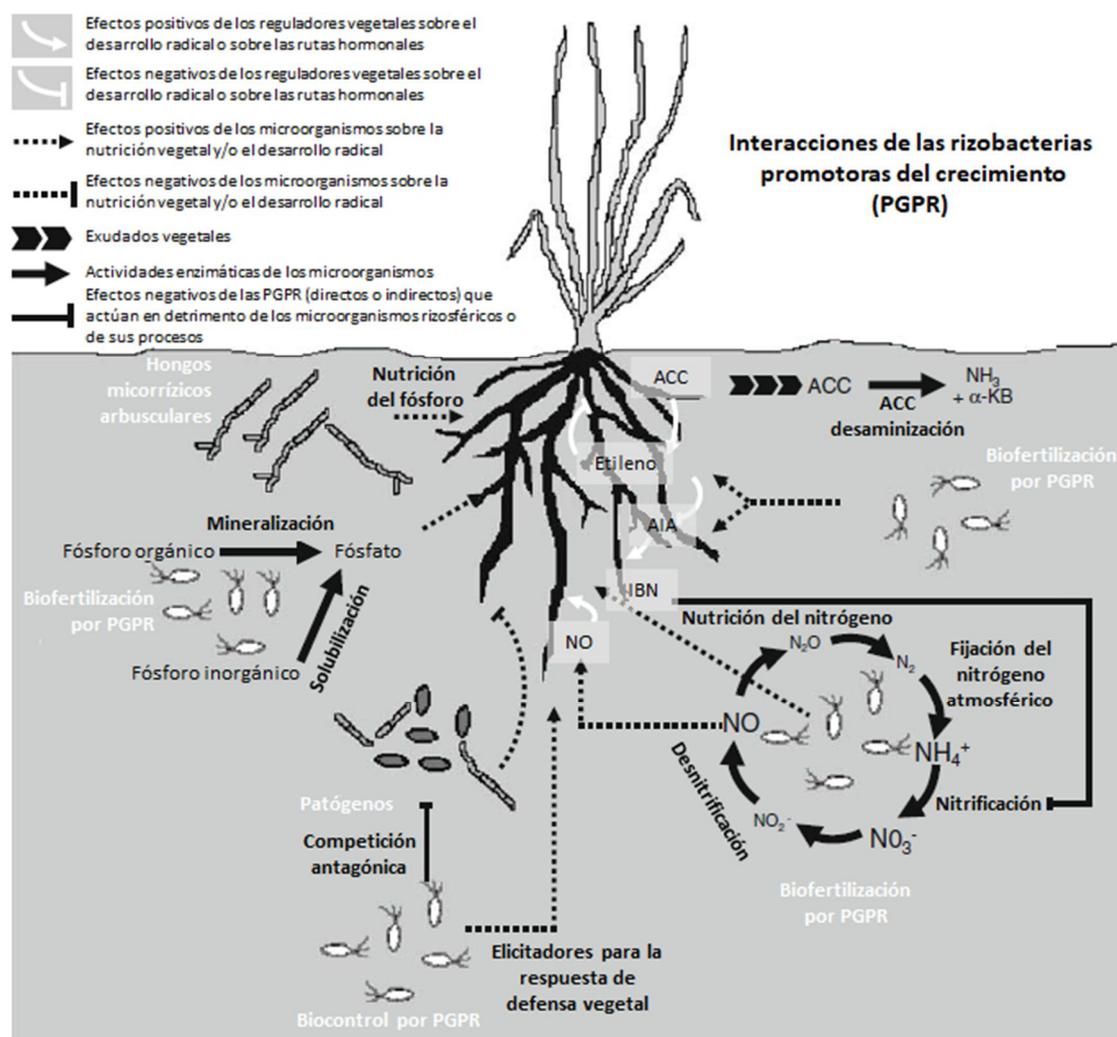


Figura 9. Esquema de los mecanismos que influyen de forma positiva y negativa sobre el crecimiento de las plantas asociados a los microorganismos del suelo y de la rizosfera (Richardson *et al.*, 2009).

5.3.1. Bacterias productoras de auxinas (AIA)

A lo largo del siglo XIX se comenzaron a realizar estudios basados en la intuición de que el desarrollo vegetal estaba controlado por sustancias que se sintetizaban en una zona de la planta, pero su efecto se reflejaba en otra diferente (Von Sachs, 1865; Darwin y Darwin, 1881). Más de cien años después, se sabe que aquellas sustancias a las que hacían referencia son las hormonas vegetales, compuestos de naturaleza muy variada, procedentes de las rutas metabólicas básicas de las plantas y que actúan a concentraciones

muy bajas, normalmente, en tejidos diferentes a los que se sintetizan (Vega-Celedón *et al.*, 2016). El término fitohormona engloba a diferentes familias tales como las auxinas, las giberelinas, las citoquininas, o los brasinoesteroides; y compuestos como el ácido abscísico o el etileno. De todas ellas, destacan las auxinas, pues son las que más influyen en el desarrollo de las plantas (Wiśniewska *et al.*, 2006). Dentro de esta familia, se ha determinado la presencia de cuatro hormonas diferentes (Simon y Petrášek, 2011): el ácido indol-3-acético (AIA); el ácido indol-3-butírico, el ácido 4-cloroindol-3-acético y el ácido fenilacético.

De todas ellas, es la hormona AIA la que juega un papel más importante en la interacción con las plantas (Bonner y Bandurski, 1952; Mashiguchi *et al.*, 2011). El AIA interviene en multitud de procesos esenciales como son la diferenciación de los tejidos o las respuestas fisiológicas a la luz y a la gravedad (Silverstone *et al.*, 1993). Además, estimula el alargamiento y la división celular (lo que implica que se produzca un crecimiento vegetal) y actúa sobre la morfología de la planta, controlando la altura de los tallos, el crecimiento del vástago principal (dominancia apical) y reduciendo el crecimiento de las ramas laterales (Koshiba y Matsuyama, 1993). No debemos olvidar que también actúa en la respuesta defensiva (Leveau y Lindow, 2005; Santner *et al.*, 2009), que se ha asociado al desarrollo del xilema (Davies, 1995) y a la proliferación de los pelos radicales (Verbon y Liberman, 2016).

De forma natural, las plantas sintetizan el AIA en los meristemos de los tejidos aéreos (Ljung *et al.*, 2001), utilizando como precursor el aminoácido L-triptófano, situado en estado libre en el citosol (Bialek *et al.*, 1992). De igual manera, muchas bacterias de la rizosfera son capaces de producir este compuesto y liberarlo al medio (Frankenberger y Arshad, 1995). De hecho, los exudados radicales son un aporte natural del L-Trp para la microbiota rizosférica, lo que potencia la biosíntesis de auxinas en la rizosfera (Krauchenko *et al.*, 1991). Así, se ha comprobado en condiciones *in vitro*, que la síntesis de AIA por parte de las bacterias, depende tanto de la bacteria utilizada como de la concentración de L-Trp presente en el medio (Oberhänsli *et al.*, 1991; Sridevi y Mallaiah, 2007). Más tarde, Glick *et al.* (1999) llegaron a la conclusión que bajas concentraciones las bacterias productoras de AIA promueven el desarrollo y crecimiento de plantas. De hecho, demostraron que si la bacteria secreta poco AIA (10^{-9} a 10^{-12} M) se estimula la elongación de raíces, mientras que si la bacteria produce concentraciones de auxinas mayores se promovía un mayor número en las raíces laterales y/o de pelos absorbentes. Pero hay que tener en cuenta que con concentraciones de AIA muy altas el crecimiento

se afecta, incluso pudiendo llegar a estresar a la planta hasta su muerte (Grossmann, 2003; 2007).

5.3.2. Bacterias productoras de acil-homoserina-lactona (AHL)

El *quorum sensing* es un mecanismo de determinación de la concentración celular que presentan diversas bacterias; con ello pueden regular diferentes funciones de modo que, éstas solo se produzcan cuando el número de individuos es suficiente, asegurándose así el éxito de dicha función (Fuqua *et al.*, 1994). La molécula más común en este proceso es la denominada AHL (Lixa *et al.*, 2015). Entre las funciones que regulan cabe destacar la formación de biopelículas y de exopolisacáridos, la transferencia de plásmidos o la motilidad, siendo todos ellos procesos esenciales para establecer una buena relación entre las bacterias y la planta (Rinaudi y Giordano, 2010). Un ejemplo práctico del beneficio de esta propiedad hacia las plantas es la producción de biofilms, una matriz en la que se desarrollan las bacterias que les facilita tanto el protegerse ellas mismas de la deshidratación como poder adherirse a la superficie radical. Se cree, además, que esa misma capa de bacterias podría proteger también a la planta frente al estrés hídrico (Pérez-Montaña *et al.*, 2013).

5.3.3. Bacterias para combatir la clorosis férrica

De todos los metales, el hierro es el cuarto metal más abundante en los suelos (Crichton y Charlotheaux–Wauters, 1987). Es un elemento fundamental en el metabolismo celular de cualquier organismo, pues actúa como cofactor de muchas enzimas (Wandersman y Delepelaire, 2004); además de cumplir diversas funciones en procesos biológicos esenciales, como el transporte del oxígeno, la síntesis de ADN, la fijación de nitrógeno, la respiración o la fotosíntesis (Greenshields *et al.*, 2007).

El problema radica en que su disponibilidad para los seres vivos depende de varios factores como son el pH, la textura, la cantidad de materia orgánica o la aireación del terreno. Todos estos factores hacen que, a pesar de su abundancia, en presencia de oxígeno y/o pH neutro o alcalino, este elemento se oxide rápidamente de Fe^{2+} (ion ferroso) a Fe^{3+} (ion férrico), que se transforma en hidróxidos insolubles, no disponibles para los seres vivos (Harrington y Crumbliss, 2009), suponiendo un factor de estrés para las plantas (Epstein, 1972).

Muchos organismos tienen la capacidad de producir moléculas que solubilizan el hierro (quelantes del ion ferroso) para después poder asimilarlo. Las plantas producen los

fitosideróforos, pero en condiciones limitantes de hierro, las bacterias también producen sideróforos (Clark, 2004), llegando a producir tal exceso que las plantas pueden nutrirse de ellos (Crowley *et al.*, 1987; 1991). En este sentido, Jin *et al.* (2010) demostraron que las plantas frente a un déficit de hierro excretan compuestos fenólicos que favorecen la aparición de bacterias PGP.

5.3.4. Bacterias solubilizadoras de fosfato

El fósforo es un macronutriente de las plantas y representa, aproximadamente, el 0,2 % de su biomasa, ya que forma parte de los fosfolípidos de membrana y de los nucleótidos; siendo el portador básico de la energía, tanto en la fotosíntesis como en el catabolismo. Por ello, es un elemento que está involucrado en procesos vitales como el crecimiento de la planta, la floración y la producción de semillas (Coyne y Rasskin, 2000).

Tras el déficit de nitrógeno, el de fósforo es el principal problema de la nutrición vegetal. Esto es debido a que, aun siendo la corteza terrestre el principal sumidero de este elemento, éste se caracteriza por ser muy poco móvil. Es decir, aunque haya o se añada fósforo al suelo, la gran mayoría se va a transformar en fosfatos de calcio en suelos alcalinos y en fosfatos de hierro o aluminio en suelos ácidos, siendo todos ellos formas inorgánica insolubles y no accesibles a las plantas (Goldstein, 1986; Sanyal y De Datta, 1991). Estos organismos básicamente captan el nitrógeno inorgánico en forma de aniones fosfatos (HPO_4^{2-} y H_2PO_4^-). Estos iones, en el equilibrio de una solución del suelo, están presentes a bajas concentraciones (1 y 10 μM), y rápidamente son agotados por los organismos del suelo, sin que el propio equilibrio químico tenga la velocidad necesaria para compensar ese consumo (Richardson, 1994; Richardson *et al.*, 2009). Además, el fósforo también se presenta en el suelo de forma orgánica, siendo la mayoría (entre 50-80 %) en forma de ácido fítico ($\text{C}_6\text{H}_{18}\text{O}_{24}\text{P}_6$) y sus derivados de polifosfatos de inositol (Richardson *et al.*, 2001); el resto corresponde a componentes de los seres vivos; aunque todas esas formas no son accesibles a las plantas.

Estas dificultades que presenta el fósforo para su asimilación por las plantas, junto a la concienciación de un uso sostenible de los fertilizantes, ha hecho que se busquen soluciones alternativas, entre las que, el uso de bacterias con capacidad para movilizarlo, independientemente de su forma, cobra una gran importancia. Así, respecto al fósforo inorgánico hay bacterias (normalmente gram-negativas) que aceleran su solubilización mediante la acidificación del medio, excretando ácidos orgánicos como el glucónico, el cítrico, el oxálico, el malónico o el succínico (Illmer y Schinner, 1995; Rodríguez y Fraga,

1999; Bobadilla-Henao y Rincón-Vanegas, 2008). Por otro lado, respecto a las formas orgánicas, las bacterias aportan fósforo a las plantas mediante la mineralización de los compuestos orgánicos. Sobre todo, mediante la actividad enzimática de las fosfatasas, que desfosforilan los grupos fosfoéster de la materia orgánica, y de las fitasas, catalizadoras de la hidrólisis del ácido fítico (Rodríguez, *et al.*, 2006); aunque también se han descrito bacterias con actividades como las fosfonatasas y cabonofosfoliasas que intervienen en la catalización de los compuestos organofosfonatos (Fernández y Rodríguez, 2005; Gálvez y Burbano, 2015).

5.3.5. Bacterias con la actividad enzimática ACC desaminasa

El papel del etileno como hormona vegetal está ampliamente estudiado. Así, se sabe que juega un papel decisivo en procesos importantes del desarrollo vegetal, incluyendo la maduración, abscisión, senescencia, crecimiento, floración y expresión sexual (Abeles, 1973). Además, en ciertos casos de estrés, puede terminar inhibiendo la producción de raíces adventicias (Geneve *et al.*, 1983).

Antes que nada, es necesario recordar que el precursor del etileno es la molécula de ACC. Existen bacterias, muchas de ellas presentes en la rizosfera, que presentan la actividad enzimática ACC desaminasa, que puede catalogarse como una pieza clave en relación con el etileno y la interacción planta-microorganismo, como se explicará a continuación. Por un lado, mediante esta enzima, las bacterias descomponen las moléculas de ACC que se excretan al medio junto con los exudados de la raíz, hecho que la planta intenta compensar exudando más ACC y, consecuentemente, disminuyendo la cantidad de ACC en el interior de la célula vegetal. Esta disminución de ACC intracelular conlleva una disminución en la producción de etileno que provoca la inhibición del crecimiento radical. Por otro lado, la bacteria al degradar la molécula de ACC origina α -cetobutirato y amonio, que son fuentes de carbono y nitrógeno para la propia planta.

6. Inoculantes microbianos

Los inoculantes microbianos son un producto comercial compuesto por uno o más microorganismos (bacterias u hongos) y un soporte inerte económico y fácil de usar, que puede ser de diferente naturaleza (sólido o líquido). El soporte sólido más usado ha sido la turba, que está siendo desplazado por formulaciones líquidas, cuya composición suele ser secreto profesional de la empresa que lo comercializa. El inoculante es el medio de

transporte del microorganismo desde donde se crea hasta el punto donde se aplica, ya sea semillas, plantas o suelo, con el fin de mejorar al vegetal. Son productos biotecnológicos que se pueden usar de forma simultánea o, sustituyendo a los fertilizantes químicos, consiguiendo así una agricultura más sostenible. Aunque hay que decir que algunos inoculantes pueden requerir procedimientos de registro largos y costosos en algunos países (Bashan, 2014).

6.1. Precedentes históricos

El uso de los inoculantes es bastante antiguo, incluso sin conocer las bacterias, en la Grecia clásica de forma práctica se sabía que para mejorar un cultivo había que mezclar el suelo donde se iba a sembrar con el suelo de un cultivo de legumbres, que ahora sabemos que es rico en rizobios simbiotes fijadores de nitrógeno atmosférico (Bashan, 1998). De hecho, a finales del siglo XIX en USA ya había establecido un protocolo para la inoculación de leguminosas mediante el mezclado de suelos “inoculados naturalmente” con las semillas a plantar (Smith, 1992). A lo largo de siglo XX se fue fomentando la inoculación de plantas con bacterias no simbióticas, en especial con bacterias del género *Azotobacter*, pero los pobres resultados obtenidos, y sobre todo la Segunda Guerra Mundial, hicieron abandonar los estudios en inoculación (Rubenchik, 1963). Ya es a finales de la década de los 70, cuando comienzan de nuevo a florecer estos estudios, debido al alto potencial de estos microorganismos para mejorar el crecimiento de las plantas y aumentar su resistencia frente a diversos factores de estrés y, por lo tanto, mejorar la salud de los vegetales (Compant *et al.*, 2019).

6.2. Selección de cepas

Los estudios de inoculantes comienzan con la realización de una colección de cepas bacterianas, procedente del lugar de interés, a las que se le realizan diferentes pruebas características de promoción del crecimiento vegetal. Estos ensayos de detección se basan principalmente en propiedades bacterianas específicas como la solubilización de fosfato, la fijación de nitrógeno o la producción de antibióticos, sideróforos, hormonas vegetales y ACC desaminasa (Compant, *et al.*, 2019). Posteriormente, las cepas más prometedoras se prueban en el invernadero donde se seleccionan aquellas con las que se realizaran los ensayos de campo. Pero hay que tener en cuenta que muchas cepas bacterianas muestran un gran éxito en las condiciones de laboratorio e invernadero, pero no lo logran a nivel de ensayos en campo (Backer *et al.*, 2018). Esto es debido a la

competencia con otros microorganismos presentes en el suelo. Sin embargo, hoy día muchos de los inoculantes son aplicados bajo condiciones controladas (invernaderos o viveros) permitiéndoles así ejercer la función por la que fueron seleccionados (por ejemplo, un mayor desarrollo radical) o permitiendo una colonización temprana del sistema radical que haga más difícil la posterior colonización por otros microorganismos.

7. Bibliografía

- Abeles, F. B.** 1973. Ethylene in Plant Biology. *Academic Press*, Nueva York, USA, 302 pp.
- Alexandratos, N. y Bruinsma, J.** 2012. World agriculture towards 2030/2050: The 2012 revision. *Food and Agriculture Organization of the United Nations, ESA Working Paper*, 12-03, Rome, Italia.
- Allison, S. D. y Martiny, J. B. H.** 2008. Resistance, resilience and redundancy in microbial communities. *Proc Natl Acad Sci*, USA, 105: 11512-11519.
- Álvarez-Rogel, J.** 2009. Salinización de suelos y salinidad: una moneda de dos caras que incluye degradación pero también preservación de los recursos naturales. *Libro de actas del IV simposio Control de la Degradación de los Suelos y Cambio Climático*: 111-118.
- Amezketta, E.** 2011. Problemática relacionada con la salinidad del suelo en Navarra. *Sección de Evaluación de Recursos Agrarios (SERA) - Departamento de Agricultura, Ganadería y Alimentación (DAGA)*, Navarra, España, 31 pp.
- April, R. y Keller, D.** 1990. Mineralogy of the rhizosphere in forest soils of the eastern United States. *Biogeochemistry*, 9 (1): 1-18.
- Ateweberhan, M., Feary, D., Keshavmurthy, S., Chen., A., Schleyer, M. y Sheppard, C.** 2013. Climate change impacts on coral reefs: synergies with local effects. possibilities for acclimation. and management implications. *Marine Pollution Bulletin*, 74: 526-539.
- Ayers, R. y Westcott, D.** 1985. Water quality for agriculture. *FAO Irrigation and Drainage Paper*, 29: 163-174.

- Baker, A. J. M. y Brooks, R. R.** 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements—a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*, 1:81-126.
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci E, Subramanian, S. y Smith, D. L.** 2018. Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 871: 1473.
- Barber, S. A.** 1995. Soil nutrient bioavailability: A mechanistic approach. *Wiley*, Nueva York, USA, 414 pp.
- Barea, J. M., Pozo, M. J., Azcon, R. y Azcon-Aguilar, C.** 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of experimental botany*, 56 (417): 1761-1778.
- Barka, E. A., Belarbi, A., Hachet, C., Nowak, J. y Audran, J. C.** 2000. Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 186 (1): 91-95.
- Barka, E. A., Gognies, S., Nowak, J., Audran, J. C. y Belarbi, A.** 2002. Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. *Biological Control*, 24 (2): 135-142.
- Bashan, Y.** 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, 16 (4): 729-770.
- Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R. y Hernandez, J. P.** 2014. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant Soil*, 378: 1-33.
- Berard, A., Bouchet, T., Sevenier, G., Pablo, A. L. y Gros, R.** 2011. Resilience of soil microbial communities impacted by severe drought and high temperature in the context of Mediterranean heat waves. *European Journal of Soil Biology*, 47 (6): 333-342.

- Berard, A., Ben, S. M., Renault, P. y Gros, R.** 2012. Severe drought-induced community tolerance to heat wave. An experimental study on soil microbial processes. *Journal of Soils and Sediments*, 12: 513-518.
- Berti, W. R. y Cunningham, S. D.** 2000. Phytostabilization of metals, en *Phytoremediation of Toxic Metals. Using Plants to Clean up the Environment. Wiley, New York USA*, 304 pp.
- Bevivino, A., Paganin, P., Bacci, G., Florio, A., Pellicer, M. S., Papaleo, M. C., Mengoni, A., Ledda, L., Fani, R., Benedetti, A. y Dalmastri, C.** 2014. Soil bacterial community response to differences in agricultural management along with seasonal changes in a Mediterranean region. *PloS One*, 9 (8): e105515.
- Bialek, K., Michalczuk, L. y Cohen, J.** 1992. Auxin biosynthesis during seed germination in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology*, 100 (1): 509-517.
- Blaylock, M. J., Salt, D. E., Dushenkov, S., Zakharova, O., Gussman, C., Kapulnik, Y., Ensley, B. D. y Raskin, I.** 1997. Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil-applied chelating agents. *Environmental Science and Technology*, 31: 860-65.
- Blaylock, M. J. y Huang, J. W.** 2000. Phytoextraction of metals, en *Phytoremediation of Toxic Metals. Using Plants to Clean up the Environment. Wiley, Nueva York, USA*, 304 pp.
- Bobadilla-Henao, C. y Rincón-Vanegas, S. C.** 2008. En la tesis de grado, Aislamiento y producción de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza. *Pontificia Universidad Javierana, Bogotá, Colombia*, 87 pp.
- Bonner, J. y Bandurski, R. S.** 1952. Studies of the Physiology, Pharmacology and Biochemistry of the Auxins. *Annual Review of Plant Physiology*, 3, (1): 59-86.
- Brandy, N. C. y Weil, R. R.** 2016. The nature and properties of soils. *Pearson Education Limited, Londres, Inglaterra*, 1104 pp.
- Bresler, E., Mcneal, B. L. y Carter, C. I.** 1982. Saline and sodic soils. Principles-Dynamics-Modeling. *Springer-Verlag, Berlin- Heidelberg-Nueva York*, 236 pp.

- Buckeridge, K. M., Banjeree, S., Siciliano, S. D. y Grogan P.** 2013. The seasonal pattern of soil microbial community structure in mesic low arctic tundra. *Soil Biology and Biochemistry*, 65: 338-347.
- Burdman, S., Jurkevitch, E. y Okon, Y.** 2000. Recent advances in the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture, en *Microbial Interactions in Agriculture and Forestry*. Science Publishers, Enfield, USA, 298 pp.
- Bytnerowicz, A., Omasa, K. y Paoletti, E.** 2007. Integrated effects of air pollution and climate change on forests: a northern hemisphere perspective. *Environmental Pollution*, 147: 438-445.
- Castroviejo, S.** 1986. Flora Ibérica Volumen II. CSIC, Madrid, España, 900 pp.
- Chaney R. L.** 1983. Plant uptake of inorganic waste constituents, en *Land Treatment of Hazardous Wastes*. Noyes Data Corporation, Illinois, USA, 422 pp.
- Chase, M. W., Christenhusz, M. J .M., Fay, M. F., Byng, J. W., Judd, W. S., Soltis, D. E., Mabberley, D. J., Sennikov, A. N., Soltis, P. S., Stevens, P. F., Briggs, B., Brockington, S., Chautems, A., Clark, J. C., Conran, J., Haston, E., Möller, M., Moore, M., Olmstead, R., Perret, M., Skog, L., Smith, J., Tank, D., Vorontsova, M. y Weber, A.** 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181 (1): 1-20.
- Chen, C., Bauske, E. M., Musson, G., Rodriguez-Kibana, R., y Kloepper, J. W.** 1995. Biological control of Fusarium wilt on cotton by use of endophytic bacteria. *Biological Control*, 5: 83-91.
- Chen, G., Weil, R. y Hill, R.** 2014. Effects of compaction and cover crops on soil least limiting water range and air permeability. *Soil & Tillage Research*, 136: 61-69.
- Cherlet, M., Hutchinson, C., Reynolds, J., Hill, J., Sommer, S. y von Maltitz, G.** 2018. World Atlas of Desertification: rethinking land degradation and sustainable land management. *Oficina de Publicaciones de la Unión Europea*, Luxemburgo, 247 pp.

- Chhabra, R.** 1996. Soil salinity and water quality. *Balkema Publishers*, Brookfield, USA, 300 pp.
- Clark, B. L.** 2004. Characterization of a catechol-type siderophore and the detection of a possible outer membrane receptor protein from *Rhizobium leguminosarum* strain IARI 312. *East Tennessee State University*, 43:154–244.
- Clarke, B. O. y Smith, S. R.** 2011. Review of "emerging" organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. *Environment International*, 37: 226-247.
- Comisión Europea.** 2003. Extent, causes, pressures, strategies and actions that should be adopted to prevent and to combat salinization and sodification in Europe. *Directorate General Environment. Directorate B. Erosion Working Group (Task 5; Topic: Salinization and Sodification). Draft Report*, 31, 10 pp.
- Compant, S., Samad, A., Faist, H. y Sessitsch, A.** 2019. A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of Advanced Research*, 19: 29-37.
- Coyne, M. y Rasskin, M.** 2000. Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio. *Paraninfo*, Madrid, España, 440 pp.
- Crowley, D. E., Reid, C. P. P. y Szaniszlo, P. J.** 1987. Microbial siderophores as iron sources for plants, en *Iron Transport in Microbes, Plants and Animals*. *VCH Verlagsgesellschaft*, Munich, Alemania, 533 pp.
- Crowley, D. E., Wang, Y. C., Reid, C. P. P. y Szaniszlo, P. J.** 1991. Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. *Plant and Soil*, 130: 179-198.
- Crichton, R. R. y Charlotheaux-Wauters, M.** 1987. Iron transport and storage. *European Journal of Biochemistry*, 164 (3): 485-506.
- Cunningham, S. D. y Berti, W. R.** 1993. Phytoremediation of contaminated soils: progress and promise. *American Chemical Society, Division of Petroleum Chemistry*, 38 (2): 265-268.

- Darrah, P. R.** 1993. The rhizosphere and plant nutrition: A quantitative approach. *Plant Soil*, 156:1-20.
- Darwin, C. y Darwin, F.** 1881. The power of movement in plants. *D. Appleton and Company*, Nueva York, USA.
- Davies, P. J.** 1995. Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology. *Springer*, Dordrecht, Holanda, 796 pp.
- De Felipe-Antón, M. R.** 2004. Interacciones microorganismos-suelo-planta en la preservación del Medio Ambiente y la Salud. *Anuario de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 70: 743-776.
- De Santiago-Martín, A., Valverde-Asenjo, I., Quintana, J. R., Vázquez, A., Lafuente, A. L. y González-Huecas, C.** 2013. Metal extractability patterns to evaluate (potentially) mobile fractions in periurban calcareous agricultural soils in the Mediterranean area-analytical and mineralogical approaches. *Environmental Science and Pollution Research*, 20: 6392-6405.
- Diacono, M. y Montemurro, F.** 2010. Long-term effects of organic amendments on soil fertility, a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 30: 401-422.
- Dimock, M. B., Beach, R. M., y Carlson, P. S.** 1988. Endophytic bacteria for the delivery of crop protection agents, en *Biotechnology, biological pesticides and novel plant-pest resistance for insect pest management*. *Boyce Thompson Institute for Plant Research*, Ithaca, Nueva York, 472 pp.
- Diamon, J.** 2005. *Guns, Germs and Steel: The Fates of Human Societies*. *W.W. Norton & Company*, Nueva York, USA, 425 pp.
- Doyle, J.J. y Doyle, J. L.** 1997. Phylogenetic perspectives on the origins and evolution of nodulation in the legumes and allies, en *Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture*. *Springer-Verlag*, Berlin-Heidelberg, Alemania, 330 pp.
- El-Madidi, S., El-Baroudi, B. y Aameur, F.** 2004. Effects of Salinity on Germination and Early Growth of Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Cultivars International Journal of Agriculture & Biology*, 6:1560–8530

- El-Tayeb, M.** 2005. Response of barley grains to the interactive effect of salinity and salicylic acid. *Plant Growth Regulation*, 45: 215-224.
- Epstein, E.** 1972. Mineral nutrition of plants: Principles and perspectives. *John Wiley & Sons*, Nueva York, USA, 412 pp.
- Epstein, E., Norlyn, J. D., Rush, D. W., Kingsbury, R. W., Kelley, D. B., Cunningham, G. A. y Wrona, A. F.** 1980. Saline culture of crops: a genetic approach. *Science*, 210: 399-404.
- FAO.** 1993. Sustainable development of drylands and combating desertification. *Food and Agriculture Organization of United Nations, Forestry Department*, Roma, Italia, XX pp.
- FAO.** 1995. Sustainability issues in agricultural and rural development policies. *Trainer's Manual*, 1.
- FAO.** 1999. Soil salinity assessment. Methods and interpretation of electrical conductivity measurements. *Food and Agriculture Organization of United Nations, Irrigation and Drainage Paper*, 57.
- FAO.** 2002. Contribución de la FAO a la cumbre sobre el Desarrollo Sostenible.
- FAO.** 2011. The State of the World's Land and Water Resources for Food and Agriculture: Managing systems at risk. *Earthscan/FAO*, Londres (Inglaterra) – Roma (Italia).
- FAO-AQUASTAT.** 2013. Area equipped for irrigation and percentage of cultivated land. <http://www.fao.org/nr/water/aquastat/data/query/index.html?lang=es> (último acceso: 22/06/2019).
- Fernández, M. T. y Rodríguez, H.** 2005. El papel de la solubilización de fosforo en los biofertilizantes microbianos. *ICIDCA, Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 39 (3): 27-34.
- Fierer, N., Bradford, M. A. y Jackson, R. B.** 2007. Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, 88 (6): 1354-1364.

- Flowers, T. J.** 2004. Improving crop salt tolerance. *Journal Experimental Botany*, 55: 307-319.
- Frankenberger, W. T. y Arshad, M.** 1995. Phytohormones in soil: Microbial roduction and function. *Marcel Dekker*, Nueva York, USA, 520 pp.
- Fred, E. B., Baldwin, I. L., McCoy, E., y Starkey, R. L.** 1933. Root nodule bacteria and leguminous plants. *Soil Science*, 35 (2): 167.
- Frey-Klett, P., Garbaye, J. y Tarkka, M.** 2007. The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist*, 176 (1):22–36.
- Fuqua, W. C., Winans, S. C. y Greenberg, E. P.** 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of bacteriology*, 176 (2): 269-275.
- Gálvez, Z. Y. A. y Burbano, V. E. M.** 2015. Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *NOVA Publicación en Ciencias Biomédicas*, 12 (21): 67-79.
- Garrido-Sanz, D., Manzano, J., Martín, M., Redondo-Nieto, M. y Rivilla, R.** 2018. Metagenomic analysis of a biphenyl-degrading soil bacterial consortium reveals the metabolic roles of specific populations. *Frontiers in Microbiology*, 9: 232.
- Garrido-Sanz, D., Redondo-Nieto, M., Guirado, M., Pindado Jiménez, O., Millán, R., Martin, M. y Rivilla, R.** 2019. Metagenomic Insights into the Bacterial Functions of a Diesel-Degrading Consortium for the Rhizoremediation of Diesel-Polluted Soil. *Genes*, 10 (6): 456.
- Geneve, R. L., y Heuser, C. W.** 1983. The relationship between ethephon and auxin on adventitious root initiation in cuttings of *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 108: 330–333.
- Gil-Martínez, F.** 1995. Elementos de fisiología vegetal. Relaciones hídricas. Nutrición mineral. Transporte. Metabolismo. Mundi-Prensa, Madrid, España, 1147 pp.
- Glick, B., Patten, C., Holguin, G. y Penrose, D.** 1999. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. *Imperial College press*, Londres, Inglaterra, 270 pp.

- Goldstein, A. H.** 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspectives and future prospects. *American Journal of Alternative Agriculture*, 1 (2): 57-65.
- Greenshields, D. L., Liu, G., Feng, J. I. E., Selvaraj, G. y Wei, Y.** 2007. The siderophore biosynthetic gene SID1, but not the ferroxidase gene FET3, is required for full *Fusarium graminearum* virulence. *Molecular plant pathology*, 8 (4): 411-421.
- Grossmann, K.** 2003. Mediation of herbicide effects by hormone interactions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 22 (1): 109-122.
- Grossmann, K.** 2007. Auxin herbicide action: lifting the veil step by step. *Plant Signaling & Behavior*, 2 (5): 421–423.
- Hallmann, J., Kloepper, J. W., Rodríguez-Kábana, R. y Sikora, R. A.** 1995. Endophytic rhizobacteria as antagonists of *Meloidogyne incognita* on cucumber. *Phytopathology*, 85: 1136.
- Hansen, D., Duda, P. J., Zayed, A. y Terry N.** 1998. Selenium removal by constructed wetlands: role of biological volatilization. *Environmental Science and Technology*, 32: 591–97.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I. y Lorito, M.** 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews microbiology*, 2 (1): 43-56.
- Harrington, J. M., y Crumbliss, A. L.** 2009. The redox hypothesis in siderophore-mediated iron uptake. *Biometals*, 22 (4): 679-689.
- Henson, J. M., Butler, M. J. y Day, A. W.** 1999. The dark side of the mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. *Annual review of phytopathology*, 37 (1): 447-471.
- Hiltner, L.** 1904. Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unterbesonderden berucksichtigung und Brache. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft*, 98: 59-78.

- Honrubia, M.** 2009. Las micorrizas: una relación planta-hongo que dura más de 400 millones de años. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 66S1: 133-144.
- Horne, A. J.** 2000. Phytoremediation by constructed wetlands, en *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water. Boca Raton: Lewis*, Ciudad, Pais, 408 pp.
- Horst, W. J., Wang, Y, y Eticha, D.** 2010. The role of the root apoplast in aluminium-induced inhibition of root elongation and aluminium resistance of plants: a review. *Annals of Botany*, 106(1), 185-197.
- Illmer, P. y Schinner, F.** 1995. Solubilization of inorganic calcium phosphates—solubilization mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 27 (3): 257-263.
- INE.** 2018. España en cifras 2018. *INE*, Madrid, España, 60 pp.
- IPCC. Intergovernmental Panel on Climate Change.** 2008. Fourth Assessment Report (AR4). Summary for Policymakers.
- Jin, C. W., Li, G. X., Yu, X. H. y Zheng, S. J.** 2010. Plant Fe status affects the composition of siderophore-secreting microbes in the rhizosphere. *Annals of Botany*, 105 (5): 835-841.
- Juárez-Sanz, M., Sánchez-Andreu, J. y Sánchez-Sánchez, A.** 2006. Química del suelo y medio ambiente. *Publicaciones Universidad de Alicante*, España, 743 pp.
- Khan, M. A., Ungar, I. A. y Showalter, A. M.** 2005. Salt stimulation and tolerance in an intertidal stem-succulent halophyte. *J. Plant Nutr*, 28: 1365-1374.
- Killham, K. y Prosser, J. I.** 2015. The Bacteria and Archaea en Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry. *Academic Press*, Boston, USA, 598 pp.
- Kimura, M., Jia, Z. J., Nakayama, N. y Asakawa, S.** 2008. Ecology of viruses in soils: Past, present and future perspectives. *Soil Science & Plant Nutrition*, 54: 1-32.
- Koshiba, M. y Matsuyama, H.** 1993. An in vitro system of indole-3-acetic acid formation from tryptophan in maize (*Zea mays*) coleoptile extracts. *Plant Physiology*, 102(4): 1319-1324.

- Krauchenko, L. V., Borovkov, A. V. y Pshikvil Z.** 1991. The possibility of auxin biosynthesis in wheat rhizosphere by associated nitrogen-fixing bacteria". *Mikrobiologiya*, 60: 927-931.
- Lagomarsino, A., Grego, S. y Kandeler, E.** 2012. Soil organic carbon distribution drives microbial activity and functional diversity in particle and aggregate-size fractions. *Pedobiologia*, 55: 101-110.
- Large, W., McWilliams, J. y Doney, S.** 1994. Oceanic vertical mixing - a review and a model with a nonlocal boundary-layer parametrization. *Review of Geophysics*, 32: 363-403.
- Lee, S. S., Ha, J. K. y Cheng, K.** 2000. Relative contributions of bacteria, protozoa, and fungi to in vitro degradation of orchard grass cell walls and their interactions. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (9): 3807–3813.
- Leveau, J. H. J. y Lindow, S. E.** 2005. Utilization of the plant hormone indole-3-acetic Acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (5): 52365-2371.
- Link, G. K. K., Eggers V.** 1941. Hyperauxiny in crown gall of tomato. *Botanical Gazette*, 103: 87-106.
- Liu, L., Kloepper, J. W., and Tuzun, S.** 1995. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, 85: 843-847.
- Lixa, C., Mujo, A., Anobom, C. D. y Pinheiro, A. S.** 2015. A structural perspective on the mechanisms of quorum sensing activation in bacteria. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 87 (4): 2189-2203.
- Ljung, K., Rishikesh, P., Bhalerao, D., Sandberg, G.** 2001. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *The plant journal*, 28: 465-474.
- López-Ritas, J. y López-Melida, J.** 1990. El diagnóstico de suelos y plantas, métodos de campo y laboratorio. *Mundi Prensa*, Madrid, España, 363 pp.

- Lovgren, S.** 2005. Guns, germs and steel: Jared Diamond on Geography as Power. *National Geographic News*. <https://www.nationalgeographic.com/science/2005/07/news-guns-germs-steel-jared-diamond-interview/>
- Maas, E. y Poss, J.** 1989. Salt sensitivity of wheat at various growth stages. *Irrigation Science*, 10: 29-40.
- Maier, R. M., Pepper, I. L. y Gerba, C. P.** 2009. Environmental microbiology. *Elsevier Academic Press*, Amsterdam (Holanda) – Boston (USA), 598 pp.
- MAPA.** 2018. Encuesta sobre superficies y rendimientos de cultivos de España, resultados nacionales y autonómicos. *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación*, Madrid, España, 45 pp.
- Maron, P. A., Sarr, A., Kaisermann, A., Lévêque, J., Mathieu, O., Guigue, J., Karimi, B., Bernard, L., Dequiedt, S., Terrat, S., Chabbi, A. y Ranjard, L.** 2018. High microbial diversity promotes soil ecosystem functioning. *Applied and Environmental Microbiology*, 84 (9): 13 pp.
- Martín de Santa Olalla-Mañas, F.** 2001. Agricultura y desertificación. *Mundi Prensa*, Madrid, España, 341 pp.
- Mashali, A. M.** 1995. Integrated soil management for sustainable use of salt-affected soils and network activities. *International workshop on integrated soil management for sustainable use of salt-affected soils*, 610: 55-75.
- Mashiguchi, K., Tanaka, K., Sakai, T., Sugawara, S., Kawaide, H., Natsume, M., Hanada, A., Yaeno, T., Shirasu, K. y Yao, H.** 2011. The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (45): 18512-18517.
- McCutcheon, S. C. y Schnoor, J. L.** 2003. Overview of phytotransformation and control of wastes, en *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*. *Wiley*, Nueva York, X 1024 pp.
- McNear, D. H.** 2013. The rhizosphere-roots, soil and everything in between. *Nature Education Knowledge*, 4 (3): 1.

- Mijangos, I., Pérez, R., Albizu, I. y Garbisu, C.** 2006. Effects of fertilization and tillage on soil biological parameters. *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 100-106.
- Mukhopadhyay, N. K., Garrison, N. K., Hinton, D. M., Bacon, C. W., Khush, G. S., Peck, H. D. y Datta, N.** 1996. Identification and characterization of bacterial endophytes of rice. *Mycopathologia*, 134: 151-159.
- Munns, R., Cramer, G. y Ball, M.** 1999. Interactions between rising CO₂, soil salinity and plant growth, en Carbon dioxide and environmental stress. *London Academic Press*, Londres, Inglaterra, 415 pp.
- Munns, R.** 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*, 25: 239–250.
- Nadal-Rocamora, I.** 2015. Alteraciones fisiológicas, metabólicas y de la composición de las poblaciones bacterianas de la microbiota de un suelo agrícola tras la aplicación de residuos orgánicos urbanos (tesis doctoral). *Universidad complutense de Madrid*, Madrid, España, 276 pp.
- Newman, L. A., Strand, S. E., Choe, N., Duffy, J. y Ekuan, G., Ruszaj, M., Shurtleff, B. B., Wilmoth, J., Heilman, P. y Gordon, M. P.** 1997. Uptake and biotransformation of trichloroethylene by hybrid poplars. *Environmental Science of Technology*, 31 (4): 1062-1067.
- Nowak, J., Asiedu, S. K., Lazarovits, G., Pillay, V., Stewart, A., Smith, C., y Liu, Z.** 1995. Enhancement of in vitro growth and transplant stress tolerance of potato and vegetable plantlets co-cultured with a plant growth promoting pseudomonad bacterium, en Ecophysiology and photosynthetic in vitro cultures. *Commissariat à l'énergie atomique*, France, 212 pp.
- Oberhänsli, T., Défago, G. y Haas, D.** 1991. Indole-3-acetic acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHAO of *Pseudomonas fluorescens*: role of tryptophan side chain oxidase. *Journal of General Microbiology*, 137 (10): 2273-2279.
- Oldeman, L. R., Hakkeling, R. T. A. y Sombroek, W. G.** 1991. World map of the status of human-induced soil degradation. An explanatory note. *UNEP/ISRIC*, Nairobi (Kenia) -Wageningen (Países Bajos), 35 pp.

- Pérez-Montaño, F., Jiménez-Guerrero, I., Contreras Sánchez-Matamoros, R., López-Baena, F. J., Ollero, F. J., Rodríguez-Carvajal, M. A., Bellogín, R. A. y Espuny, M. R.** 2013. Rice and bean AHL-mimic *quorum-sensing* signals specifically interfere with the capacity to form biofilms by plant-associated bacteria. *Research in Microbiology*, 164 (7):749-760.
- Pilon-Smits, E.** 2005. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, 56: 15-39.
- Qadir, M., Quillerou, E., Nangia, V., Murtaza, G., Singh, M., Thomas, R. J., Drechsel, P. y Noble, A. D.** 2014. Economics of salt-induced land degradation and restoration. *Natural Resources Forum*, 38 (4): 282-295.
- Raskin, I., Smith, R. D. y Salt D. E.** 1997. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology*, 8: 221-26.
- Redondo-Gómez S., Mateos-Naranjo, E., Figueroa, E., y Davy A.** 2010. Salt stimulation of growth and photosynthesis in an extreme halophyte, *Arthrocnemum macrostachyum*. *Plant Biology*, 12: 79-87.
- Rengasamy, P.** 2006. World salinization with emphasis on Australia. *Journal of Experimental Botany*, 57: 1017-1023.
- Richardson, A. E.** 1994. Soil microorganisms and phosphorous availability, en Soil biota: management in sustainable farming systems. *CSIRO*, Victoria, Australia, 626 pp.
- Richardson, A. E., Hadobas, P. A. y Hayes, J. E.** 2001. Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate. *The Plant Journal*, 25 (6): 641-649.
- Richardson, A. E., Barea, J. M., McNeill, A. M. y Prigent-Combaret, C.** 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil*, 321: 305-339.
- Rietz, D. N. y Haynes, R. J.** 2003. Effects of irrigation-induced salinity and sodicity on soil microbial activity. *Soil Biology & Biochemistry*, 35: 845-854.
- Rinaudi, L. V. y Giordano, W.** 2010. An integrated view of biofilm formation in rhizobia. *FEMS microbiology letters*, 304 (1): 1-11.

- Rodríguez, H. y Fraga, R.** 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances*, 17 (4-5): 319-339.
- Rodríguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T. y Bashan, Y.** 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and soil*, 287 (1-2): 15-21.
- Rubenchik, L. I.** 1963. *Azotobacter* and its use in agriculture, en Academy of sciences of the Ukrainian. *Israel programme for scientific translations*, Jerusalem, Israel, 65 pp.
- Salt, D. E., Blaylock, M., Kumar, N. P., Dushenkov, V., Ensley, B. D., Chet, I., y Raskin, I.** 1995. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology*, 13 (5): 468-474.
- Salt, D. E., Smith, R. D., y Raskin, I.** 1998. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, 49 (1): 643-668.
- Santner, A.; Calderon-Villalobos, L. I. A. y Estelle, M.** 2009. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature chemical biology*, 5 (5): 301–307.
- Sanyal, S. K. y De Datta, S. K.** 1991. Chemistry of phosphorus transformations in soil, en *Advances in soil science*. Springer, Nueva York, USA, 294 pp.
- Sapanov, M. K.** 2003. Ecology of forest plantations in arid regions. *Tula*, 248 pp. (in Russian).
- Schimmel, J., Balsler, T. C. y Wallenstein, M.** 2007. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology*, 88: 1386-1394.
- Smith, R. S.** 1992. Legume inoculant formulation and application. *Canadian Journal of Microbiology*, 38: 485-492.
- Schmitt, M.** 2010. Climate change and water resource management: adaptation strategies for protecting people and the environment. *Natural Resources Defense Council*.

- Silverstone, S. E., Gilchrist, D. G., Bostock, R. M. y Kosuge, T.** 1993. The 73-kb pIAA plasmid increases competitive fitness of *Pseudomonas syringae* subspecies savastanoi in oleander. *Canadian Journal of Microbiology*, 39 (7): 659-664.
- Simon, S. y Petrášek, J.** 2011. Why plants need more than one type of auxin. *Plant Science*, 180 (3): 454-460.
- Six, J., Frey, S. D., Thiet, R. K. y Batten, K. M.** 2006. Bacterial and fungal contributions to carbon sequestration in agroecosystems. *Soil Science Society of America Journal*, 70: 555-569.
- Steffan, S. A., Chikaraishi, Y., Currie, C. R., Horn, H., Gaines-Day, H. R., Pauli, J. N., Zapala, J. E. y Ohkouchi, N.** 2015. Microbes are trophic analogs of animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112 (49): 15119-15124.
- Sridevi, M. y Mallaiah, K.** 2007. Bioproduction of indole acetic acid by *Rhizobium* strains isolated from root nodules of green manure crop, *Sesbania sesban* (L.) Merr. *Iranian Journal of Biotechnology*, 5 (3): 178-182.
- Swanson, M. M. Fraser, G., Daniell, T. J., Torrance, L., Gregory, P.J. y Taliansky, M.** 2009. Viruses in soils: morphological diversity and abundance in the rhizosphere. *Annals of Applied Biology*, 155 (1): 51-60.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M. y Murphy, A.** 2015. Plant Physiology and Development. *Sinauer Associates*, Sunderland, USA, 761 pp.
- Terry, N., Zayed, A., Pilon-Smits, E. y Hansen, D.** 1995. Can plants solve the selenium problem? *Libro de actas del XIV Annual Symposium Current Top of Plant Biochemistry, Physiology, Molecular and Biological*, Missouri, USA: 63-64.
- Tinker, P. B.** 1984. The role of microorganisms in mediating and facilitating the uptake of plant nutrients from soil, en *Biological processes and soil fertility*. *Springer*, Dordrecht, Holanda, 403 pp.
- Tóth, G., Montanarella, L. y Rusco, E.** 2008. Updated map of salt affected soils in the European Union. En *Threats to Soil Quality in Europe. Scientific and Technical Research Series*, Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, pp. 151.

UNESCO. 2008. Salinización y desalinización. *e-Boletín del Agua de la UNESCO*.

Vargas, R., Pankova, E. I., Balyuk, S. A., Krasilnikov P. V. y Khasankhanova G. M.

2018. Handbook for saline soil management. *Food and Agriculture Organization of the United Nations y Lomonosov Moscow State University*, Rusia y Roma, 132 pp.

Vega-Celedón, P., Canchignia Martínez, H., González, M. y Seeger, M. 2016.

Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales*, 37: 33-39.

Verbon, E. H. y Liberman, L. M. 2016. Beneficial microbes affect endogenous

mechanisms controlling root development. *Trends in plant science*, 21 (3): 218-229.

Villar, M. C., Petrikova, V., Díaz-Raviña, M. y Carballas, T. 2004. Changes in soil

microbial biomass and aggregate stability following burning and soil rehabilitation. *Geoderma*, 122: 73-82.

Von Sachs, J. 1865. Handbuch der Experimental-physiologie der Pflanzen. *Verlag Von*

Wilhelm Engelmann, Leipzig, Alemania, 540 pp.

Wandersman, C. y Delepelaire, P. 2004. Bacterial iron sources: from siderophores to

hemophores. *Annual Review of Microbiology*, 58: 611-647.

Winter, K., Troughton, J. H., Evenari, M., Läuchli A. y Lüttge, U. 1976. Mineral ion

composition and occurrence of CAM-like diurnal malate fluctuations in plants of coastal and desert habitats of Israel and the Sinai. *Oecologia*, 25: 125-143.

Wiśniewska, J., Xu, J., Seifertová, D., Brewer, P. B., Růžička, K., Blilou, I., Rouquié,

D., Benková, E., Scheres, B. y Friml, J. 2006. Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science*, 312 (5775): 883-883.

Wong, M. H. 2003. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on

metal contaminated soils. *Chemosphere*, 50: 775-780.

Yeates, G. W., Bongers, T. D., De Goede, R. G. M., Freckman, D. W. y Georgieva,

S. S. 1993. Feeding habits in soil nematode families and genera-an outline for soil ecologists. *Journal of nematology*, 25 (3): 315-331.

Zaman, M., Shabbir, A. S. y Heng, L. 2018. Soil Salinity: Historical Perspectives and a World Overview of the Problem, en *Guideline for Salinity Assessment, Mitigation and Adaptation Using Nuclear and Related Techniques*. *Springer*, 164 pp.

<http://www.teorema.com.mx/agua/propicia-eu-la-salinidad-que-dana-suelos-de-cultivo-en-mexicali/> (último acceso: 05/11/2019)

https://www.ine.es/prodyser/espa_cifras/2018 (último acceso: 15/06/2019)

<http://www.gatfertilizados.com/> (último acceso: 05/11/2019)

<https://web.croplands.org/app/map?lat=0&lng=0&zoom=2> (último acceso: 04/11/2019)

OBJETIVOS GENERALES

El objetivo general de esta Tesis Doctoral fue estudiar el potencial de la halófito *A. macrostachyum* como herramienta biotecnológica para recuperar suelos agrícolas contaminados por un exceso de sal, así como el papel que desempeñan inoculantes bacterianos procedentes de su propia rizosfera en dicho potencial. Para la consecución de este objetivo se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Cuantificar la capacidad fitodesalinizadora de *A. macrostachyum*.
- Estudiar la biodiversidad microbiana presente en la rizosfera de *A. macrostachyum* en las marismas del río Guadalquivir: aislamiento, caracterización de las propiedades PGP (promotoras del crecimiento de las plantas) de las bacterias aisladas y determinación de la tolerancia a altas temperatura y concentración de NaCl.
- Determinar el efecto de diferentes cepas bacterianas con propiedades PGP en la germinación, el crecimiento y la capacidad desalinizadora de *A. macrostachyum*.
- Comprobar si el efecto de la inoculación depende del estadio de desarrollo de la halófito y de la presencia de sal en el medio.
- Estudiar la capacidad fitodesalinizadora de *A. macrostachyum* inoculada con un consorcio bacteriano.

CAPÍTULO I

Previous salt exposure of halophytes affects their phytodesalination capacity

(Publicado en: Barcia-Piedras, J. M., Pérez-Romero, J. A., Mateos-Naranjo, E., Camacho, M., y Redondo-Gómez, S. 2019.

Effect of prior salt experience on desalination capacity of the halophyte *Arthrocnemum macrostachyum*.

Desalination, 463, 50-54)

Abstract

We studied the capacity of extreme halophyte, *Arthrocnemum macrostachyum*, to desalinize an experimentally salinized soil under non-leaching conditions. Furthermore, we tested the effect of salt pre-exposure of this species on its phytodesalination capacity. The presence of the halophyte, independently salt pre-exposure, decreased salinity of the salinized soil by 31 % after 30 days; reducing the negative effects on emergence of both test cultures, barley and wheat. Plants of *A. macrostachyum* pre-treated without salt showed 4-fold higher relative desalination rate than those grown with optimum salinity (with higher initial biomass). Thus, previous salt exposure was as determinant as plant biomass for desalinating capacity. In conclusion, pre-exposure to salt of halophytes must be taken into account for desalination programs.

I.1. Introduction

Salinization of soil is one of the main factors that limit the capacity of agricultural fields for food production (Flowers, 2004). Several studies have shown that almost half of agricultural areas under irrigation, mainly in arid and semi-arid zones, are affected by soil salinization (Flowers, 2004; Munns, 2002). In fact, 5 % of the worldwide crop area is affected by salt (Munns *et al.*, 1999). However, salinization is a reversible process because saline soils can be recovered with chemical remediation (Jesus *et al.*, 2018) or abundant irrigation that dissolves the salts and leaches them to the deepest horizons far from the rooting zone (Ayers y Westcott, 1985). Chemical amendments also require leaching of the soil to wash away the sodium that was removed (Jesus *et al.*, 2018). The cost of washing the soil depends on the type of crop and its salinity. In Spain the cost of this recovery is estimated about 260 million euros (MAPAMA, 2015). In this way, phytoremediation, the use of plants for environmental decontamination, appears as a profitable, non-invasive, alternative or complementary process to other methods of solving the problem of contaminated soils (Pilon-Smits, 2005; Shukla *et al.*, 2011). Phytoremediation success being dependent on the ability of the selected plant species for accumulating high concentrations of pollutant in the shoots and to produce high biomass (Redondo-Gómez *et al.*, 2011; Sassi *et al.*, 2017).

Shoot-succulent halophytes, which are able to accumulate enormous Na quantities within their above-ground organs, are promising candidates for the study of desalination of salt-affected soils (Pilon-Smits, 2005; Nikalje *et al.*, 2018). Shukla *et al.*, (2011)

established that biomass density of halophytes is one of the main variables that governs the desalination process. According to this, several studies have tried to select suited species, as the first step for affordable soil desalination at a wider scale in arid and semi-arid regions (Sassi *et al.*, 2017; Rabhi *et al.*, 2009; Rabhi *et al.*, 2015). However, no study has previously evaluated the effect of the prior salt experience of the halophyte on its desalination capacity. In this way, we hypothesize that desalination capacity of the extreme halophyte *A. macrostachyum* could be affected by its prior salt experience. Therefore, the aims of our work were to: (i) study the desalination capacity of extreme halophyte *A. macrostachyum*; (ii) test the effect of pre-exposure to salt on *A. macrostachyum* phytodesalination capacity; and (iii) verify the effectiveness of soil restoration by means of glycophytic test cultures of *Hordeum vulgare* and *Triticum durum*.

I.2. Materials and methods

I.2.1. Soil and plant material

The substrate used in the experiments was a mixture of silica sand, perlite (fractions employed to maintain the correct aeration and humidity in the edaphic system) and clay loam soil coming from the experimental farm “La Hampa” (37°17'0.3"N-6°4'1.7"W, Puebla del Rio, Seville) at a ratio of 2:1:1. Before mixing, the soil fraction was dried in an oven for one week at 55 °C, crushed and sifting through a sieve of a pore size of 0.3 mm. The substrate was characterized by a pH of 8.2, an electrical conductivity (EC) of 0.19 dS m⁻¹ and Ca as the main nutrient at a rate of 3.25% followed by 0.28% K, 0.21% Mg and 0.09% Na. The experiments were conducted in unperforated trays filled with 10 L of substrate. Seeds of *A. macrostachyum* were collected from natural plants of the Odiel marshes, Huelva (37° 13' 22.2" N - 6° 57' 46.0"W). Seeds were disinfected (1' in sodium hypochlorite 1% and then 5' in distilled water) and 1% agar-water petri dishes with seeds were placed in a germinator (ASL devices scientist M-92004, Spain) and subjected to a diurnal regimen of 10 h of light (400–700 nm, 35 μmolm⁻² s⁻¹) at 20 °C/14 h darkness at 5 °C for 21 days (Redondo-Gómez *et al.*, 2007). Seedlings were planted into seedbed stuffed with perlite, which were placed in trays (5×39×53 cm) and watered with 3 L of 20% Hoagland's solution (Hoagland y Arnon, 1950). Half of the seedlings were watered with 20% Hoagland's solution plus NaCl (171 mM) and levels in the trays were monitored and were topped up to the marked level with 20% Hoagland's solution.

The entire solutions were replaced every two weeks for 90 days. Seeds of *Hordeum vulgare* (barley) and *Triticum durum* (wheat) were obtained from commercial distributors.

I.2.2. Experiment 1: phytodesalination with *A. macrostachyum*

Three different soil treatments were established, with 4 replicates per treatment: Saline soil (S) and two saline soils with *A. macrostachyum*, grown with (P1) or without (P0) NaCl, as previously described. Each replicate consisted of a tray (5×39×53 cm) filled with 12 kg of substrate, under non-leaching conditions (the trays were not perforated so there was no loss in the soil-plant system) (Figure 10). The saline soil treatment (S) was obtained by adding NaCl until reaching a final concentration of 171 mM. For P0 and P1 treatments, plants were planted 5 cm apart around (30 plants per replicate). The experiment was conducted in a glasshouse at the University of Seville with controlled temperature, ranging between 21 and 25 °C, 40–60% relative humidity and natural daylight for 30 days. During the experiment, the trays were watered weekly with 1.5 l of distilled water. At the end of the experiment the soils of the three treatments (S, P0 and P1) were preserved for experiment 2.



Figure 10. Two different saline soil treatments of phytodesalination under non-leaching conditions for 30 days. At left, saline soils with *A. macrostachyum* grown with salt (P1); and at right, saline soils with *A. macrostachyum* grown without salt (P0). Note the difference of biomass of *A. macrostachyum* in each treatment.

I.2.2.1. Electrical conductivity

To analyse the electrical conductivity (EC), soil samples of 50 mL were collected along the 5 cm depth of the trays (n=6, per treatment). Then, samples were saturated with

100 ml of distilled water for 30 min and EC was measured with an electrical conductivity meter (handylab LF11, SCHOTT Instruments, Germany).

I.2.2.2. Growth of *A. macrostachyum*

Ten plants of P0 and P1 treatments were harvested at the beginning and at the end of the experiment and separated into roots and shoots. Plant material was dried at 60 °C for 48 h to obtain the dry weight, after measuring the fresh weight of shoots. The Relative Growth Rate (RGR) of whole plants was calculated using the formula:

$$\text{RGR} = (\ln B_f - \ln B_i) * D^{-1} \text{ (g g}^{-1} \text{ day}^{-1}) \text{ (1)}$$

where B_f =final dry mass of ten plants, B_i =initial dry mass and D =duration of experiment in days.

The shoot water content (WC) was calculated as:

$$\text{WC} = (\text{FW} - \text{DW}) * \text{FW}^{-1} * 100 \text{ (2)}$$

where FW and DW are the fresh and dry weights of the shoots, respectively.

I.2.2.3. Analysis of nutrients

Dried biomass was ground and sieved for subsequent chemical analysis. Soil and plant samples ($n=3$) were digested with 4 ml HNO_3 at 69% (p/v) and 1 mL H_2O_2 at 33% (v/v). Analysis of the ionic composition for soils and Na concentration to tissue plants were carried out by mass spectrometry with an ICP- OES (Thermo ICAP 6500 DUO, USA).

Nutrient pool in shoots and roots of *A. macrostachyum* was calculated as:

$$\text{Nutrient pool} = \text{nutrient concentration in a tissue} \times \text{tissue biomass} \text{ (3)}$$

I.2.2.4. Phytodesalination parameters

The following phytodesalination parameters were calculated according with (Rabhi *et al.*, 2015):

Phytodesalination capacity (C_{PH}), the quantity of Na accumulated in shoots of *A. macrostachyum* per hectare:

$$C_{PH} = [\text{Na}^+]_{\text{shoots}} * \text{DW} * S^{-1} \text{ (kg Na ha}^{-1}) \text{ (4)}$$

where $[Na^+]_{shoots}$ =final shoot sodium concentration, DW=final shoot biomass, and S=desalinated surface.

Phytodesalination rate (R_{PH}), the quantity of Na^+ removed per unit of area and time:

$$R_{PH} = \Delta QNa * \Delta t^{-1} \text{ (kg Na ha}^{-1} \text{ day}^{-1}\text{)} \quad (5)$$

where ΔQNa =the difference between Na concentrations in the beginning and the end of the experiment and Δt the number of days of the experiment.

Relative phytodesalination rate (RPR), the aptitude of shoots to accumulate sodium ions per unit of biomass per unit of time, calculated as:

$$RPR = RGR * (Na_f - Na_i) * (B_f - B_i)^{-1} \text{ (kg Na t}^{-1} \text{ DW day}^{-1}\text{)} \quad (6)$$

where RGR=Relative Growth Rate, Na_f = final shoot Na concentration in terms of shoot biomass, Na_i = initial shoot Na concentration in terms of shoot biomass, B_f = final dry mass and B_i = initial dry mass.

I.2.3. Experiment 2: phytodesalinated soil quality

Seeds of barley and wheat were sown in unperforated pots of 65 ml, filled with the soils of previous experiment, S, P0 and P1 (n=50 per treatment and crop) (Figure 11). Pots were placed in trays filled with 3 l of water and covered with a transparent plastic wrap in order to maintain a constant humidity (Figure 11). Once seeds had surfaced, the plastics were drilled to allow the growth of seedlings. The emergence was recorded daily for 30 days.

Four characteristics of emergence were determined: final emergence percentage, number of days to first emergence and mean time to emergence (MTE), which was calculated using an equation modified of Redondo-Gómez *et al.* (2008):

$$MTE = \sum_i (n_i * d_i) * N_i \quad (7)$$

where n is the number of emerged seeds until day i; d is the incubation period in days, and N is the total number of emerged seeds. Lower values of MTE indicate a faster emergence.

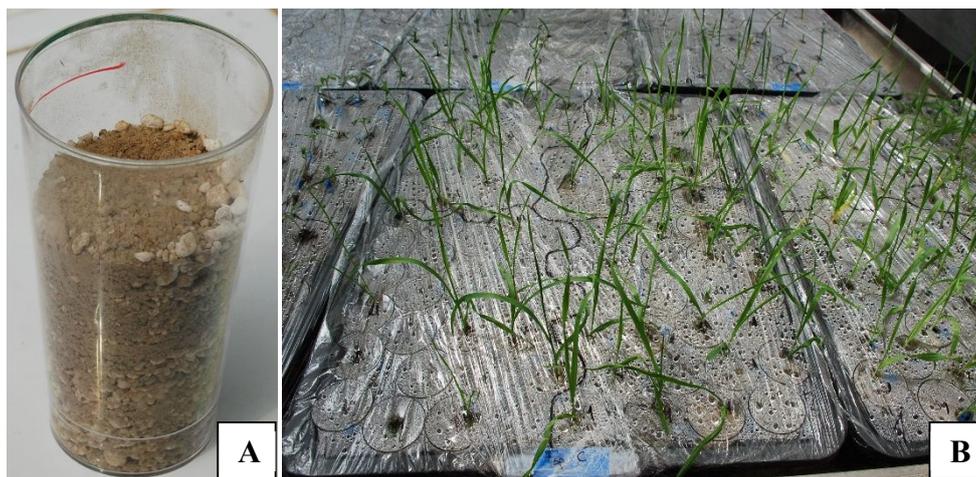


Figure 11. Unperforated pot for phytodesalinated soil quality (A). Method for humidity conservation (B).

I.2.4. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using PASW Statistics 18 program (IBM). Normality of data was checked by the Kolmogorov-Smirnov test and the homogeneity of variance with the Brown-Forsythe test. Data were analysed using one-way ANOVA, and significant test results were followed by Tukey test ($p < 0.05$). Differences between initial and final growth, nutrient content of *A. macrostachyum* and emergence of *T. durum* were compared by the t-Student test.

I.3. Results and discussion

I.3.1. Experiment 1: phytodesalination with *A. macrostachyum*

Extreme halophyte, *Arthrocnemum macrostachyum*, demonstrated a high capacity to desalinate an experimentally-salinized soil, under nonleaching conditions. The halophyte reduced by 31% soil salinity (from 10.94 to 7.5 dS m⁻¹) after 30 days of treatment, regardless of whether *A. macrostachyum* had been previously grown in the presence or absence of salt (P0 and P1 treatments). Muchate *et al.* (2016) and Rabhi *et al.* (2010) found similar electrical conductivity (EC) reductions (31% and 37 and 33% in the upper and lower 10 cm of non-perforated pots, respectively) for salinized soil treated during 90 and 189 days with seedlings of the halophyte *Sesuvium portulacastrum*, taken from motherplants grown under moderate saline conditions; and that reduction corresponded to a decline in the soluble sodium content. Additionally, Rabhi *et al.* (2010) recorded a decline in soil sodicity (estimated by SAR), which depends on Na, Ca and Mg salts (Oster y Sposito, 1980). In our experiment, the analysis of the ion sodium in the soil

ratified the EC data; the Na concentrations of the phytoremediated soils were 33 and 37% lower than in saline soil, for P0 and P1 respectively (Table 3). Otherwise, soil Fe, K, Mg and P contents were lower in P1 than in P0, although no significant differences were found with saline soil; thus nutrients of remediated soils remained available for the subsequent growth of crops (Table 3).

Table 3. Total calcium, iron, potassium, magnesium, manganese, sodium, phosphorus and sulphur concentrations for soils in response to three treatments for 30 days: saline soil (S); saline soil remediated with *A. macrostachyum* non-pre-treated with NaCl (P0); saline soil remediated with *A. macrostachyum* pre-treated with 171 mM NaCl (P1). Values are means \pm S.E. (n = 3). Letters indicate means within an analysed variable that are significantly different from each other (Tukey; p < 0.05).

Soil treatment	Concentration in soils							
	Ca (mgg ⁻¹)	Fe (mgg ⁻¹)	K (mgg ⁻¹)	Mg (mgg ⁻¹)	Mn (mgg ⁻¹)	Na (mgg ⁻¹)	P (μ gg ⁻¹)	S (μ gg ⁻¹)
S	22.1 \pm 0.5	4482 \pm 178 ^{ab}	1.8 \pm 0.1 ^{ab}	1.4 \pm 0.1 ^{ab}	86.8 \pm 13.8	2.7 \pm 0.0 ^a	130 \pm 2 ^{ab}	213 \pm 5
P0	21.0 \pm 0.6	4651 \pm 130 ^a	2.0 \pm 0.1 ^a	1.5 \pm 0.1 ^a	74.6 \pm 3.6	1.7 \pm 0.0 ^b	138 \pm 5 ^a	218 \pm 8
P1	23.8 \pm 0.9	3987 \pm 128 ^b	1.7 \pm 0.1 ^b	1.0 \pm 0.0 ^b	81.5 \pm 2.7	1.7 \pm 0.1 ^b	118 \pm 1 ^b	196 \pm 5

1.3.1.1. Growth of *A. macrostachyum*

At the beginning of experiment, an unequal plant growth was observed, depending on whether the plants have been pre-treated with salt or not (Table 4). Thus, the plants grown with 171 mM had higher shoot and root dry weights (5- and 6-fold, respectively) as well as 6% higher water content in the shoots; and at the end of the experiment *A. macrostachyum* of P1 treatment presented greater shoot and root dry weights (2- and 4-fold, respectively) and root/shoot ratio than plants of P0. This is in agreement with Redondo-Gómez *et al.* (2010) and Khan *et al.* (2005), who described a broad optimum of 171–510 mM and 200–400 mM NaCl, respectively, for growth of *A. macrostachyum*. They used plants without previous salt experience, which would explain why P0 plants showed similar RGR value (0.052 g g⁻¹ day⁻¹) to that recorded by Redondo-Gómez *et al.* (2010) at 171 mM NaCl; being higher than that of P1 (c. 2-fold; Table 4). It seems to be a saturation in the RGR response to salt, since P1 plants were in total (pre-treatment and experiment 1) one month more exposed to 171 mM NaCl than *A. macrostachyum* plants used by Redondo-Gómez *et al.* (2010). Final dry weight of P1 plants was consistent with that obtained by Khan *et al.* (2005) at 125 days after the salt concentration treatments were established (650 mg DW), although they did not show RGR data to be compared.

Table 4. Shoot and root dry weights, root/shoot ratio, shoot water content and relative growth rate (RGR) of *A. macrostachyum* at the beginning and the end (initial and final growths, respectively) of two phytoremediation treatments for 30 days: *A. macrostachyum* non pre-treated with NaCl (P0) and *A. macrostachyum* pre-treated with 171 mM NaCl (P1). Values are means \pm S.E. (n = 10 and 30 for initial and final growth, respectively). Letters indicate means within an analysed variable that are significantly different from each other (t-Student; $p < 0.05$).

	Initial growth		Final growth	
	P0	P1	P0	P1
Shoot dry weight (mg)	47 \pm 5 ^a	246 \pm 29 ^b	233 \pm 33 ^a	572 \pm 52 ^b
Root dry weight (mg)	9 \pm 1 ^a	55 \pm 7 ^b	23 \pm 3 ^a	89 \pm 9 ^b
Root/shoot ratio	0.20 \pm 0.010 ^a	0.21 \pm 0.015 ^a	0.10 \pm 0.009 ^a	0.16 \pm 0.008 ^b
Shoot water content (%)	86.7 \pm 0.6 ^a	91.8 \pm 0.2 ^b	89.6 \pm 0.9 ^a	88.6 \pm 0.6 ^a
RGR (g g ⁻¹ day ⁻¹)	-	-	0.048 \pm 0.004 ^a	0.020 \pm 0.004 ^b

In this way, at the end of the experiment shoot Na concentration of P0 was 31% greater than that of P1 (27.2 ± 4.7 and 18.7 ± 2.4 mg g⁻¹ for P0 and P1, respectively), although there were no significant differences; root Na concentrations were c. 27.5 mg g⁻¹ for both P0 and P1 plants. Redondo-Gómez *et al.* (2010) found 22.9 mg g⁻¹ Na in shoots of *A. macrostachyum* grown at 171 mM NaCl for three months. When nutrient pools and fluxes between tissues were considered (Figure 12), we observed that Na translocation from roots to shoots was c. 10 % lower in P1 than P0 plants; 81% Na content was in shoots while this percentage was 91 % for P0. In the same way, Ca, Mg, Fe and Mn pools were 6-7 % lower in P1 shoots. The lower Fe and Mg fluxes from roots to shoots could be explained by the lower soil Fe and Mg availability of P1 soils. Donovan *et al.* (1997) found that leaf Mg concentrations of the halophytic shrub *Sarcobatus vermiculatus* declined in parallel with soil Mg availability, along a soil salinity gradient. Moreover, Muchate *et al.* (2016) observed a reduction in K tissues of *Sesuvium portulacastrum* growth with salinity (4-20 dS m⁻¹), and K concentration was always lower than Na content. In contrast, K content of *A. macrostachyum* was higher than Na content (Figure 12).

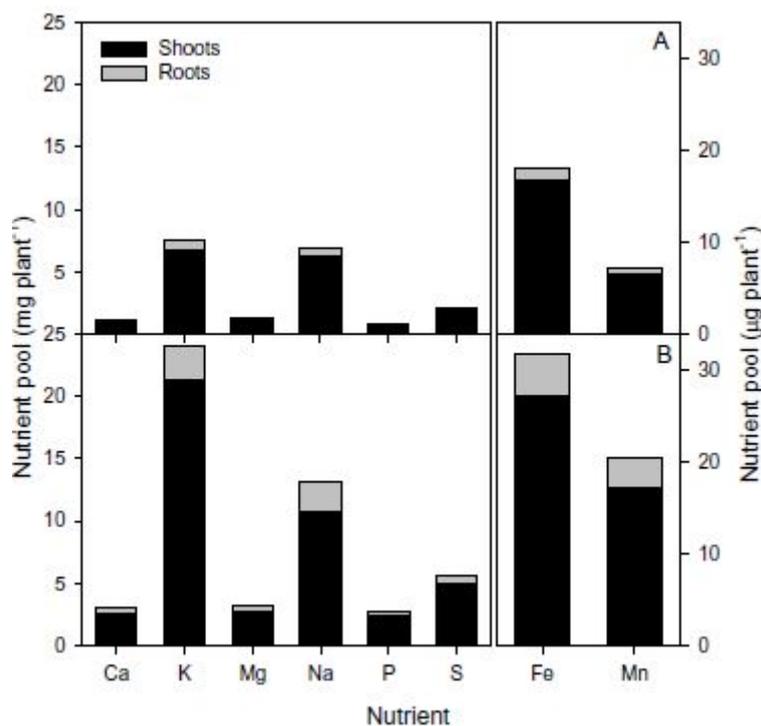


Figure 12. Calcium, potassium, magnesium, phosphorus, sulphur, iron and manganese pools (nutrient concentration x tissue biomass) in shoots and roots of *A. macrostachyum* in response to two phytoremediation treatments for 30 days: *A. macrostachyum* non pre-treated with NaCl (A) and *A. macrostachyum* pre-treated with 171 mM NaCl (B).

I.3.1.2. Phytodesalination parameters

Phytodesalination capacity (C_{PH}) was 47% higher in P1 than P0 treatment (11.9 and 6.3 kg Na ha⁻¹, respectively), due to the greater biomass of P1 plants. However, there were no differences between treatments for the phytodesalination rates (R_{PH} =19 kg Na ha⁻¹ day⁻¹ for both P0 and P1), which is consistent with the similar EC reductions recorded for P0 and P1 soils. (Rabhi *et al.*, 2009) found C_{PH} values of 800 kg Na ha⁻¹ for both *Suaeda fruticosa* and *Arthrocnemum indicum*, while R_{PH} values were 4.7 and 4.2 kg Na ha⁻¹ day⁻¹, respectively. They used *S. fruticosa* and *A. indicum* tufts of 0.2-0.7 and 0.5-3.0 g DW tuft⁻¹, respectively, which produced c. 2 mg DW plant⁻¹, for both species, during 170 days. Values of C_{PH} depends on the ability of each species to accumulate sodium in its tissues, but above all of the biomass, so initial biomass and the duration of the phytodesalination experiment are key to compare results. Therefore, relative phytodesalination rate (RPR) is more appropriate rate (Rabhi *et al.*, 2015) to compare the desalination ability of species and, in our case, to check the effect of pre-treatments; thus, RPR of P0 plants was c. four-fold than P1 (1.61 and 0.43 kg Na t⁻¹ DW day⁻¹, respectively).

I.3.2. Experiment 2: phytodesalinated soil quality

The results of the emergence of both glycophytes, barley and wheat, in the three different types of soil (saline, P0 and P1) are shown in Table 5. The final emergences of barley for both P0 and P1 treatments were about 90 % higher than S treatment; furthermore, barley emerged earlier and faster (lower MTE values) in soils treated with *A. macrostachyum*. There is an inverse correlation between the amount of salt present in the environment and the final emergence due to a decrease in survival of barley seeds (Goumi *et al.*, 2014) and/or a delay in the seed imbibition that slows the germination rate (Huang *et al.*, 2008). At the end of the experiment, the barley seedlings grown in S treatment did not survive.

Wheat was more sensitive to salinity than barley, wheat emergence in soils treated with the halophyte was 22 %, while no emergence was recorded in saline soil (Table 5). Munns *et al.* (2006) found a significant reduction in accumulation of potassium in germinating wheat seed with the increase in sodium concentration, which negatively affected the germination of wheat seed.

Table 5. Final emergence percentage, days to first emergence and mean time to emergence (MTE) of *H. vulgare* and *T. durum* grown in three soils for 30 days: saline soil (S), saline soil remediated with *A. macrostachyum* non pre-treated with NaCl (P0), saline soil remediated with *A. macrostachyum* pre-treated with 171 mM NaCl (P1). Values are means \pm S.E. (n = 50). Letters indicate means within an analysed variable that are significantly different from each other (Tukey test; $p < 0.05$ for *H. vulgare*; and t-Student; $p < 0.05$ for *T. durum*).

Soil treatment	Final emergence (%)	First emergence (d)	MTE
	<i>H. vulgare</i>		
S	4.0 \pm 2.3 ^a	12.0 \pm 0.0 ^a	6.0 \pm 0.0 ^a
P0	36.0 \pm 2.5 ^b	5.8 \pm 1.1 ^b	2.4 \pm 0.2 ^b
P1	35.5 \pm 1.4 ^b	6.0 \pm 0.9 ^b	2.9 \pm 0.2 ^b
<i>T. durum</i>			
S	-	-	-
P0	22.0 \pm 3.3 ^a	7.0 \pm 0.4 ^a	2.7 \pm 0.4 ^a
P1	21.8 \pm 5.4 ^a	6.5 \pm 0.6 ^a	2.7 \pm 0.7 ^a

Anyway, the soils phytodesalinated by *A. macrostachyum* (P0 and P1) provided significant better germination conditions for barley and wheat than the salinized one (S).

I.4. Conclusions

Halophyte *A. macrostachyum* is a species of great interest for desalination programs; it desalinated an experimentally-salinized soil in a percentage similar to that described for other halophytes previously (Rabhi *et al.*, 2010) but in much less time. This allowed the emergence of both barley and wheat seeds. In the case of *A. macrostachyum*, previous salt exposure was as determinant as plant biomass for desalinating capacity. Plants grown without salt showed similar phytodesalination rate to those grown with optimum salinity (with higher initial biomass), due to the higher relative phytodesalination rate of the former. Nevertheless, further field tests are required to determine the importance of prior salt experience of the halophytes in their phytodesalination capacity.

I.5. References

- Ayers, R. y Westcott, D. 1985. Water Quality for Agriculture. *FAO*, Roma, Italia.
- Donovan, L. A., Richards, J. H. y Schaber, E. J. 1997. Nutrient relations of the halophytic shrub, *Sarcobatus vermiculatus*, along a soil salinity gradient. *Plant Soil*, 190: 105-117.
- Flowers, T. 2004. Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 55: 307-319.
- Goumi, Y. E., Fakiri, M., Lamsaouri, O. y Benchekroun, M. 2014. Salt stress effect on seed germination and some physiological traits in three Moroccan barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. *J. Mater. Environ. Sci*, 5: 625-632.
- Hoagland, D. R. y Arnon, D. I. 1950. The water culture method for growing plants without soil. *Calif. Aes. Bull*, 347: 1-32.
- Huang, S., Spielmeyer, W., Lagudah, E. y Munns, R. 2008. Comparative mapping of HKT genes in wheat, barley, and rice, key determinants of Na⁺ transport, and salt tolerance. *J. Exp. Bot.*, 59: 927-937.
- Jesus, J. M., Danko, A. S., Fiuza, A. y Borges, M. T. 2018. Comparison of vegetative bioremediation and chemical amendments for non-calcareous highly saline-sodic soil remediation. *Water Air Soil Pollut*, 229: 274.

- Khan, M. A., Ungar, I. A. y Showalter, A. M.** 2005. Salt stimulation and tolerance in an intertidal stem-succulent halophyte. *J. Plant Nutr*, 28: 1365-1374.
- MAPAMA**, 2015. Available online
<http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/estadisticas/>, Accessed date: 8 February 2018.
- Muchate, N. S., Nikalje, G. C., Rajurkar, N. S., Suprasanna, P. y Nikam, T. D.** 2016. Physiological responses of the halophyte *Sesuvium portulacastrum* to salt stress and their relevance for saline soil bio-reclamation. *Flora*, 224: 96-105.
- Munns, R., Cramer, G. y Ball, M.** 1999. Interactions between rising CO₂, soil salinity and plant growth, en Carbon Dioxide and Environmental Stress. *Academic Press*, London, UK, 415 pp.
- Munns, R.** 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ*, 25: 23-250.
- Munns, R., James, R. y Lauchli, A.** 2006. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany*, 57: 1025-1043.
- Nikalje, G. C., Srivastava, A. K., Pandey, G. K. y Suprasanna, P.** 2018. Halophytes in biosaline agriculture: mechanism, utilization, and value addition. *Land Degrad. Dev*, 29: 1081-1095.
- Oster, J. D. y Sposito, G.** 1980. The Gapon coefficient and the exchangeable sodium percentage sodium adsorption ratio Relation1. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 44: 258-260.
- Pilon-Smits, E.** 2005. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Biol*, 56: 15-39.
- Rabhi, M., Hafsi, C., Lakhdar, A., Hajji, S., Barhoumi, Z., Hamrouni, M., Abdelly, C. y Smaoui, A.** 2009. Evaluation of the capacity of three halophytes to desalinate their rhizosphere as grown on saline soils under nonleaching conditions, *Afr. J. Ecol*, 47: 463-468.
- Rabhi, M., Ferchichi, S., Jouini, J., Hamrouni, M. H., Koyro, H. W., Ranieri, A., Abdelly, C. y Smaoui, A.** 2010. Phytodesalination of a salt-affected soil with the halophyte *Sesuvium portulacastrum* L. to arrange in advance the requirements for the successful growth of a glycophytic crop. *Bioresour. Technol.*, 101: 6822-6828.

- Rabhi, M., Atia, A., Abdelly, C. y Smaoui, A.** 2015. New parameters for a better evaluation of vegetative bioremediation, leaching, and phytodesalination. *J. Theor. Biol.*, 383: 7-11.
- Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Davy, A. J., Fernández-Muñoz, F., Castellanos, E. M., Luque, T. y Figueroa, M. E.** 2007. Growth and photosynthetic responses to salinity of the saltmarsh shrub *Atriplex portulacoides*. *Ann. Bot.*, 100: 555-563.
- Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Garzon, O., Castillo, J. M., Luque, T. y Figueroa, M. E.** 2008. Effects of salinity on germination and seedling establishment of endangered *Limonium emarginatum* (Willd.) O. Kuntze. *J. Coastal Res*, 24: 201-205.
- Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Figueroa, E. y Davy, A.** 2010. Salt stimulation of growth and photosynthesis in an extreme halophyte, *Arthrocnemum macrostachyum*. *Plant Biol*, 12: 79-87.
- Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Vecino-Bueno, I. y Feldman, S. R.** 2011. Accumulation and tolerance characteristics of chromium in a cordgrass Cr-hyperaccumulator, *Spartina argentinensis*. *J. Hazard. Mater*, 185: 862-869.
- Sassi, H., Farhat, N., Jendoubi, R., Elkhouni, A., Zorrig, W., Smaoui, A., Abdelly, C. y Rabhi, M.** 2017. Optimal soil salinity levels for the highest phytodesalination parameters in the obligate halophyte *Sesuvium portulacastrum* L. *Agrochimica*, 61: 329-339.
- Shukla, J. B., Sanghi, R., Goyal, A. y Misra, A. K.** 2011. Modeling the desalination of saline water by using bacteria and marsh plants. *Desalination*, 277: 113-120.

CAPÍTULO II

Caracterización de una colección bacteriana aislada de la rizosfera de *A. macrostachyum* en la marisma de Lebrija

II.1 Objetivos

El objetivo de este capítulo fue realizar una colección bacteriana mediante el aislamiento y caracterización de colonias bacterianas cultivables procedentes de la rizosfera de *A. macrostachyum*, en dos zonas diferenciadas, una zona de marisma alta del Río Guadalquivir y un canal de riego, en dos estaciones del año, verano y otoño.

II.2. Materiales y Métodos

II.2.1. Microorganismos

Para realizar los aislamientos bacterianos se recogieron muestras de suelo de la rizosfera (a 5 cm de profundidad) de plantas de *A. macrostachyum* (Moric.) C. Koch en dos ambientes diferenciados de las marismas de Lebrija (SO de la Península Ibérica), aunque geográficamente cercanos (Figura 11). Por un lado, se tomaron las muestras de rizosfera de plantas localizadas en mitad de la marisma alta (36° 54' 09.7" N - 6° 12' 36.6" O) y por otro, de plantas localizadas en un canal de riego (36° 54' 10.9" N - 6° 12' 45.2" O). Ambos suelos son de textura franco-arcillo-arenosa, con un pH neutro. En ambas zonas se realizaron dos muestreos, uno en la época seca de la región (julio de 2013) y otro tras las primeras lluvias (octubre de 2013).

Los aislamientos se obtuvieron tras homogenizar 1 g de suelo en 50 ml de sales minerales y realizar diluciones decimales seriadas hasta 10^{-5} - 10^{-6} , las cuales se sembraron en superficie, en placas conteniendo Plate Count Agar (PCA, Difco[®], España) al 50% suplementado con cicloheximida (100 mg l^{-1} , Sigma-Aldrich[®], USA) para evitar el crecimiento de hongos. El mismo procedimiento se realizó adicionando NaCl al medio a una concentración final de 350 mM. Las placas se incubaron a 28 °C durante 24 - 48h, hasta la aparición de colonias individuales. Tras aislar colonias en este tiempo, se dejaron incubar las placas durante 72 horas más y se procedió al aislamiento de aquellas colonias de crecimiento lento.

Con estos pasos, dividimos las cepas aisladas en 8 grupos arbitrarios según (1) la zona (2) la estación y (3) la concentración de sal. En la Tabla 6 se resumen los apelativos de las muestras.

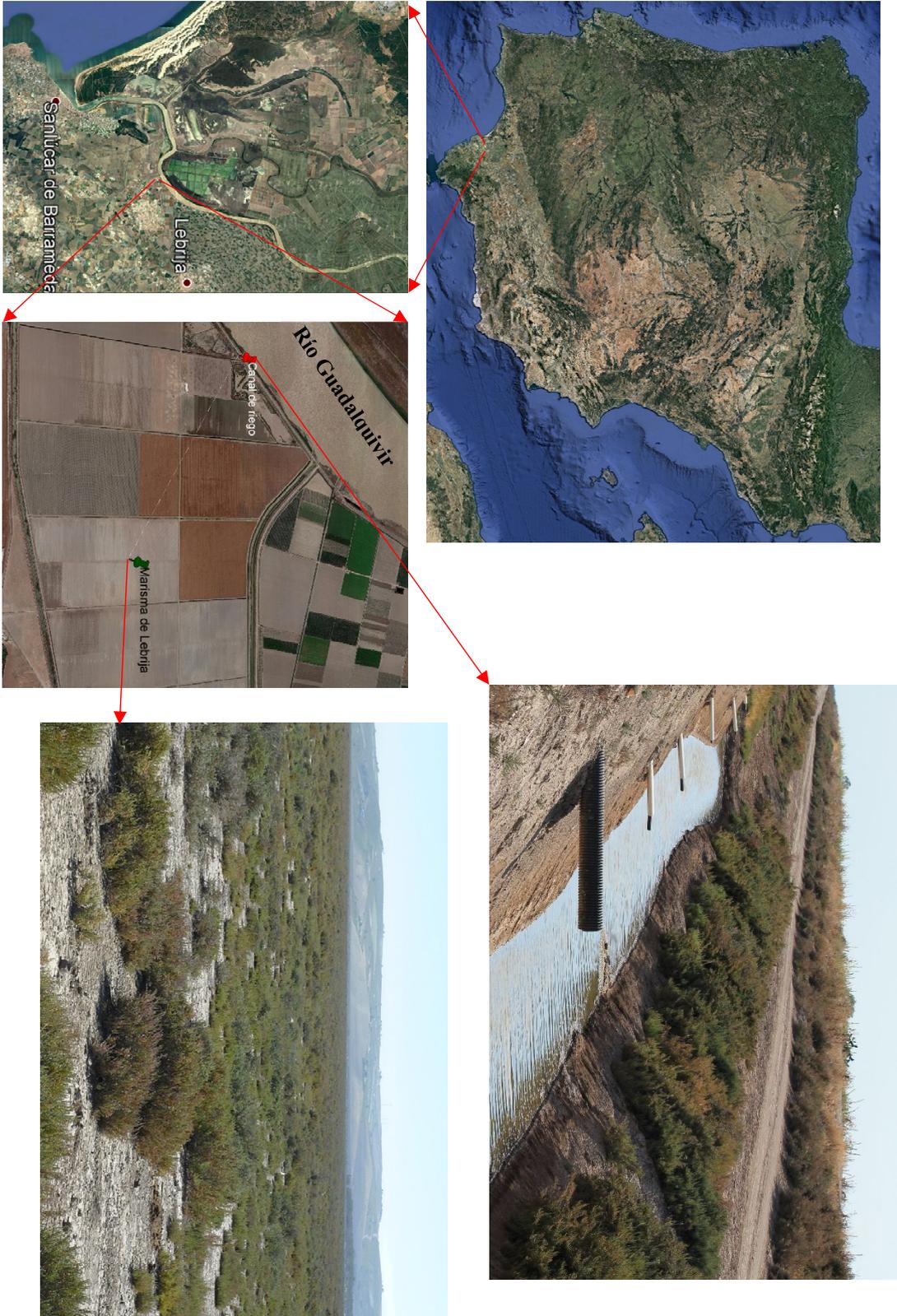


Figura 11. Localización de las zonas de muestreo en las cuales se tomaron las muestras de la rizosfera de *A. macrostachyum* utilizadas en este trabajo para realizar los aislamientos de bacterianos.

Una vez aisladas y purificadas, las cepas se conservan en tubos criogénicos con una mezcla de peptona (0.5 %) y glicerol (15 %) a -80 °C.

Para la inoculación en los distintos test, cada cepa se sembró, a partir de congelado, en placas de agar nutritivo (AN), compuesto por caldo nutritivo (CN) (Scharlau®, España) con 16 g l⁻¹ de agar bacteriológico (Difco®, España); y se dejó crecer a 28 °C durante 48 h. Para aquellas bacterias aisladas en sal, se le adicionó al medio de cultivo NaCl a una concentración final de 300 mM. A continuación, se tomó una colonia y se inoculó mediante asa en tubos con 5 ml de CN, que se incubaron durante 72 h, a 28 °C, en agitación continua (180 rpm), obteniéndose una concentración final de 10⁹ ufc ml⁻¹. Para la inoculación en material vegetal (semillas o plantas), los cultivos se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 minutos y las células se resuspendieron en tampón sulfato magnésico 0.03 M, hasta conseguir una concentración de 10⁸ ufc ml⁻¹.

Tabla 6. Nomenclatura y clasificación para las cepas aisladas en este trabajo según la zona, la estación y cantidad de sal.

Nombre		Descripción		
Sigla	Enumeración	Zona	Estación	Aislamiento
Hv	1 - 16	Marisma	Otoño	Sin sal
	51 - 80	Marisma	Verano	Sin sal
Hvs	1 - 18	Marisma	Otoño	Con sal
	51 - 81	Marisma	Verano	Con sal
C	1 - 27	Canal de riego	Otoño	Sin sal
	51 - 69	Canal de riego	Verano	Sin sal
Cs	1 - 27	Canal de riego	Otoño	Con sal
	51 - 62	Canal de riego	Verano	Con sal

II.2.2. Caracterización molecular de las bacterias: amplificación, secuenciación y análisis filogenético del ADNr 16S

Para la amplificación del ADNr 16S, las bacterias se sembraron en placas de Petri conteniendo los medios indicados en el apartado anterior. Se recogió el cultivo desde la placa, por medio de un palillo estéril, y se depositó en un tubo eppendorf de 1,5 ml. Se añadió 20 µl de solución de lisis y se resuspendió por agitación. Se incubó durante 15 min a 85 °C - 90 °C. Transcurrido este tiempo se añadieron 100 µl de agua estéril y se agitó suavemente. Se centrifugó 5 min a 13000 rpm (dos veces) y se cogió 1-2 µl del

sobrenadante para la PCR, en la que se utilizaron los cebadores 27F y 1492R (Lane, 1991). La amplificación del ADNr 16S se llevó a cabo en un termociclador MyiQ (Bio-rad®, USA) empleando una *Master Mix* de Qiagen® (USA) (*Master Mix Top Taq PCR*) en un volumen final de 50 µl, según las concentraciones indicadas por el fabricante, y añadiendo 0,5 µl de cada cebador (10 µM) y 1µl de ADN (aprox. 50 ng µl⁻¹). Las condiciones de amplificación fueron: 5 min a 95 °C, (30 s a 94 °C, 30 s a 50 °C, 1 min a 52 °C, 1 min a 72 °C) x 40 y 7 min a 72 °C. El producto de PCR se purificó con el kit Favorgen GEL/PCR Purification Kit (Biotech Corp®, USA) y se secuenció en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Alcalá de Henares. Para comparar similitudes con secuencias conocidas se usó la base de datos EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net>) (Yoon *et al.*, 2017).

II.2.3. Caracterización de la colección bacteriana

Cada una de las cepas aisladas se clasificaron en base a seis propiedades, dos de ellas físicas (tolerancia a la sal y a una temperatura de 40 °C) y otras cuatro bioquímicas (producción de auxinas, AHL y sideróforos; y solubilización de fosfatos). Todos los ensayos se realizaron por triplicado en cultivos independientes.

II.2.3.1. Caracterización de las bacterias mediante propiedades físicas

II.2.3.1.1. Tolerancia a la sal

Para conocer el rango de sal que toleran las bacterias se prepararon placas con AN con concentraciones crecientes de NaCl, entre 0-25 % (con incrementos del 1 %). Una vez sembrados los cultivos bacterianos en ellas, se incubaron durante una semana a 28 °C (Figura 12).

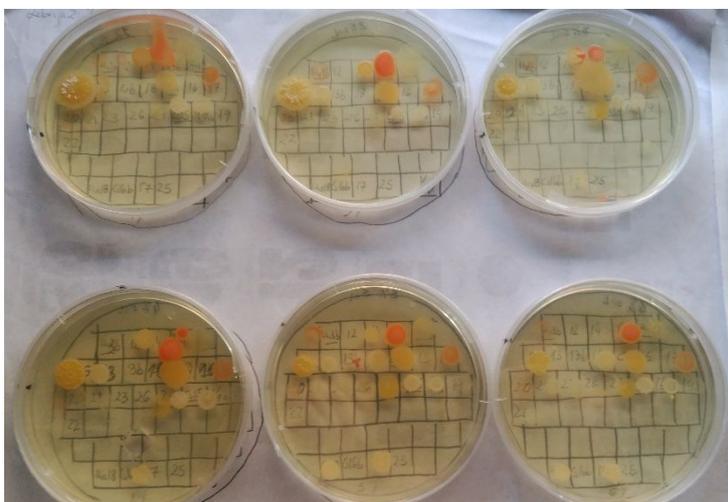


Figura 12. Caracterización de las cepas bacterianas respecto un gradiente de sal. Cada placa aumentaba en un 1 % la concentración de NaCl y cada cepa bacteriana se replicó en la misma posición en cada placa.

II.2.3.1.2. Tolerancia a la temperatura

Se colocaron 10 μl de cada cultivo bacteriano sobre placas con medio AN y se incubaron a 40 °C durante 2-7 días.

II.2.3.2. Caracterización de las bacterias mediante propiedades bioquímicas

II.2.3.2.1. Producción de ácido indol acético

Para conocer la concentración final de AIA producido por las bacterias se siguió el método colorimétrico descrito por Patten y Glick (2002). Para ello se realizó una recta patrón a partir de un stock de AIA (Panreac[®], España) de 200 $\mu\text{g g}^{-1}$ disuelto en etanol 10 %, del cual se realizaron diluciones seriadas entre 0 y 200 $\mu\text{g g}^{-1}$ con CN. Las bacterias se crecieron como se indica en el apartado anterior, con la salvedad que al CN se le adicionó 100 mg l^{-1} de L-Tyr (precursor necesario para la producción del AIA). Una vez crecidos, los cultivos se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 minutos y se utilizó el sobrenadante para cuantificar la concentración de AIA, agregándole reactivo de Salkowski en proporción 1:4 (v:v). Esta reacción se dejó 20 minutos a temperatura ambiente y, a continuación, se cuantificó la absorbancia en un espectrofotómetro (iMark Microplate Absorbance Reader, Bio-rad[®], USA) a 535 nm (Figura 13). Las mediciones se realizaron para una recta patrón de auxinas entre 0 y 200 ppm de AIA. Los resultados de cada cepa se extrapolaron a una clasificación categórica entre 0 (sin producción de AIA) y 4 (más de 200 ppm de AIA).



Figura 13. Caracterización de las cepas bacterianas respecto la producción de AIA. El viraje de color es del amarillo (sin producción de auxinas) al rosa (con producción de auxinas), siendo el color más oscuro cuanto mayor producción haya.

II.2.3.2.2. Quorum sensing. Producción de AHL

Los aislados bacterianos usados en este trabajo se crecieron como se indica en el apartado 1. *Agrobacterium tumefaciens* NT1 pLRZ4 (bacteria indicadora usada en este protocolo) se creció en medio de Vincent (Vincent, 1970) suplementado con X-gal a 28 °C y 180 rpm durante 24-48 h (Pérez-Montaña *et al.*, 2013).

Una vez la cepa estaba bien crecida, la prueba se llevó a cabo en una placa multipocillos. A cada pocillo se añadieron, en este orden, 100 µl del cultivo de *A. tumefaciens* y 100 µl del sobrenadante de las bacterias a analizar. Una vez bien mezclado todo, la placa se incubó durante 24-48 h a 28 °C. Se realizó un patrón de 3-oxo-C6-HSL, entre 0 y 100 mg ml⁻¹, al cual se le midió la absorbancia a 615 nm, con un lector automático de microtitulación iMark (Bio-rad®, USA). La placa de microtitulación se incubó durante 24 horas a 28 °C y se midió de nuevo la absorbancia (Figura 14). La prueba se consideró positiva si tras la incubación se cuantificó un aumento en la absorbancia. Los datos se presentan como presencia / ausencia de dicha actividad.

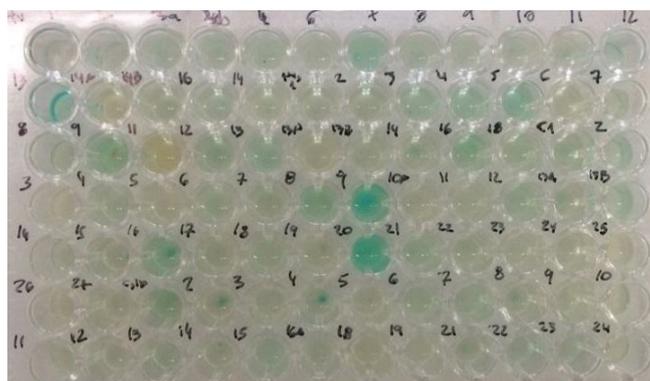


Figura 14. Caracterización de las cepas bacterianas respecto a la producción de AHL. La presencia de esta actividad se produce con la aparición del color turquesa en la reacción.

II.2.3.2.3. Producción de sideróforos

Se añadieron 10 µl del cultivo bacteriano sobre una placa de medio CAS (Alexander y Zureber 1991), que se incubó durante 78 h a 28 °C. Transcurrido este tiempo, se cuantificó la producción de sideróforos según el diámetro del halo hidrolítico producido por la cepa (Figura 15A).

II.2.3.2.4. Solubilización de fosfatos

Para la realización de este test se colocaron gotas de 10 μ l de los cultivos bacterianos sobre una placa de medio PVK (Pikovskaya, 1948) y se mantuvo a 28 °C durante 5 días. A continuación, se valoró la actividad según el halo hidrolítico generado por cada cepa (Figura 15B).

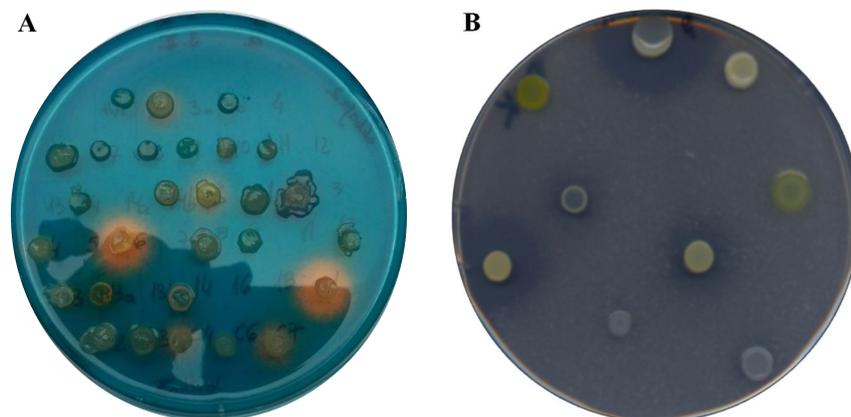


Figura 15. (A) Caracterización de las cepas bacterianas respecto la producción de sideróforos. La presencia se detectó mediante el halo amarillo que se forma alrededor de la colonia bacteriana al solubilizar el hierro. (B) Caracterización de las cepas bacterianas solubilizadoras de fosfato. La presencia se detectó mediante el halo transparente que se generó alrededor de la colonia bacteriana al solubilizar el fosfato. En ambos casos la intensidad de esta actividad se cuantificó midiendo el diámetro del halo.

II.2.4. Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico multivariable para verificar si las características analizadas en las bacterias caracterizan cada una de las zonas estudiadas. Para ello, se utilizó el software IBM SPSS Statistics 21[®] (USA) realizándose un análisis de componentes principales (ACP).

II.3. Resultados

Se aislaron un total de 182 cepas bacterianas, 25 de las cuales se identificaron a nivel de especie, por medio de la amplificación del ADNr 16S (Tabla 7), debido al alto interés que presentaban por sus diferentes propiedades promotoras del crecimiento vegetal. Del total de las cepas aisladas (Apéndice 2), la mitad se obtuvieron en verano y la otra mitad en otoño. La distribución, según la zona de aislamiento y la estación, se indica en la Tabla 8.

Tabla 7. Clasificación taxonómica de las cepas secuenciadas procedentes de la Marisma de Lebrija y de un canal de riego de la misma zona.

Cepa	Especie	Similitud (%)
Hv12	<i>Microvirga soli</i>	99.8
Hv14b	<i>Kocuria salina</i>	100
Hv16	<i>Kocuria polaris</i>	98.8
Hv52	<i>Bacillus altitudinis</i>	99.8
Hv63	<i>Gordonia branchialis</i>	99.9
Hv64	<i>Paracoccus carotinifaciens</i>	98.3
Hv67	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	99.5
Hv68	<i>Roseomonas vinacea</i>	99.9
Hvs2	<i>Bacillus licheniformis</i>	98.0
Hvs6	<i>Streptomyces fradiae</i>	100
Hvs8	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	99.9
Hvs11	<i>Halomonas zhanjiangensis</i>	99.4
Hvs13	<i>Brevibacterium frigotolerans</i>	100
Hvs18	<i>Thalassobacillus devorans</i>	99.7
Hvs53	<i>Pseudomonas zhaodongensis</i>	98.9
Hvs76	<i>Arthrobacter siccitolerans</i>	99.4
C13b	<i>Rhodococcus corynebacteroides</i>	99.3
C14	<i>Bacillus aquimaris</i>	99.3
C21	<i>Bacillus aryabhatai</i>	99.8
C25	<i>Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus</i>	99.7
C58	<i>Arthrobacter siccitolerans</i>	99.3
C59	<i>Ensifer meliloti</i>	99.9
Cs1b	<i>Microbulbifer celer</i>	99.9
Cs16b	<i>Microbulbifer rhizosphaerae</i>	100
Cs25	<i>Labrenzia salina</i>	100

Tabla 8. Número de cepas aisladas de la rizosfera de *A. macrostachyum* procedentes de la marisma de Lebrija en dos zonas contrastadas según su edafología y en dos estaciones climatológicamente bien diferenciadas.

Zona	Estación	
	Verano	Otoño
Marisma	61	35
Canal de riego	30	56

En el estudio de la tolerancia a la sal (Figura 16), cabe destacar que la mayoría de las cepas se reparten de forma similar entre los dos primeros intervalos (1-5 y 6-10 % de NaCl), con la excepción de las cepas aisladas de la rizosfera de plantas situadas en el canal de riego en verano, que son las que menos sal toleran (90 % menos del 6 %). Por el contrario, en la rizosfera de *A. macrostachyum* de la marisma se localizaron las cepas que soportan una mayor concentración salina.

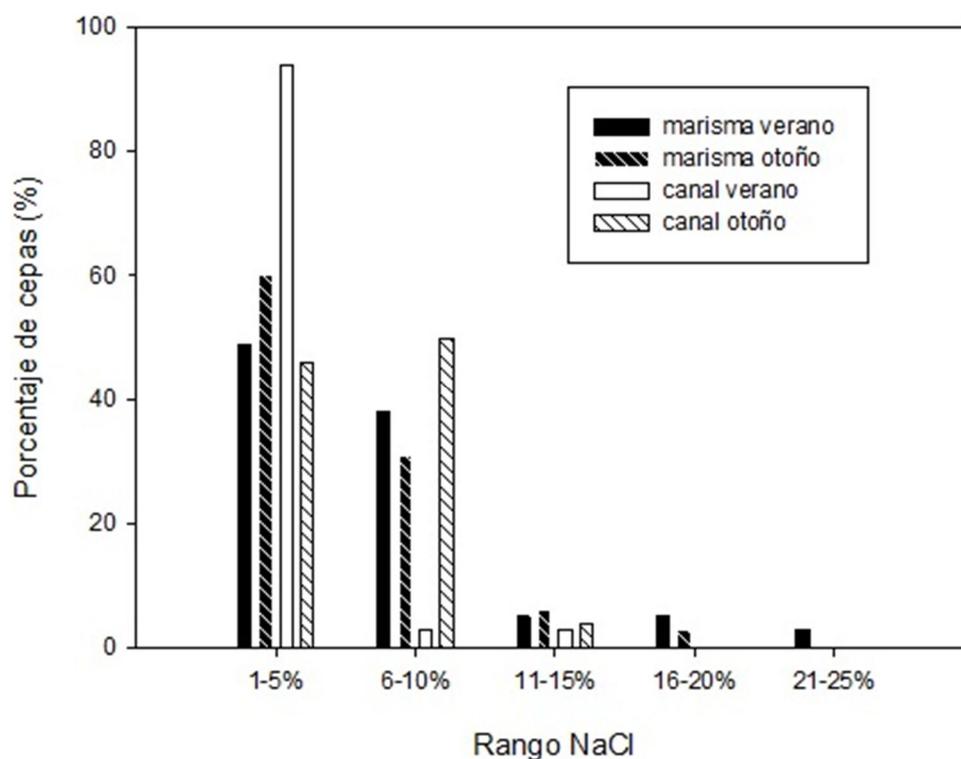


Figura 16. Porcentaje de las cepas bacterianas, agrupadas por zona y estación, que son tolerantes a un rango de concentración salina comprendido entre 1-25% de NaCl.

Respecto a la tolerancia a altas temperaturas, se observó que el verano es la estación en la que hay más cantidad de cepas que soportan mejor las altas temperaturas, siendo el porcentaje algo mayor en la marisma que en el canal (Tabla 9).

Tabla 9. Porcentaje de cepas aisladas a baja (28 °C) y alta temperaturas (40 °C) en la marisma de Lebrija y en un canal de riego de la misma zona en las estaciones de verano y otoño.

Zona	Estación	Baja temperatura	Alta temperatura
Marisma	Verano	51,4	48,6
	Otoño	64,7	35,3
Canal	Verano	56,7	43,3
	Otoño	67,9	32,1

Si nos centramos en el número de propiedades PGP que presentan las cepas vemos que, el 50% de las bacterias aisladas en otoño no expresaron ninguna propiedad PGP, mientras que, en las aisladas en verano, esa proporción disminuye a la mitad. Así, un tercio de las cepas posee, al menos, una propiedad favorecedora del crecimiento vegetal, sea cual sea la estación en la que se aisló, pero en verano es muy común (40 %) que presenten más de una. También es reseñable que ninguna cepa presentó todas las actividades estudiadas (Tabla 10A). Además, se observó que había patrones respecto a la asociación de propiedades PGP que presentaban las cepas. Así, las actividades que más se asociaron fueron la producción de sideróforos y la de auxinas, que se asociaron entre ellas. Por el contrario, la solubilización de fosfatos no se relacionó con ninguna otra propiedad. Atendiendo a la zona muestreada, en la rizosfera de plantas de la marisma hubo el doble de interacciones que en las del canal; y respecto a la estación del año, en verano fue más frecuente encontrar cepas con más de una propiedad. En resumen, en la rizosfera de *A. machrostachyum* en verano es cuando aparecieron un mayor número de interacciones entre las propiedades PGP, siendo la más frecuente la asociación entre la producción de auxinas y de sideróforos (Figura 10B).

Tabla 10. Porcentaje del número de propiedades promotoras del crecimiento presentes en las cepas aisladas en la Marisma de Lebrija y en un canal de riego de la misma zona en verano y otoño (A). Número de interacciones entre las propiedades PGP presentes en las cepas aisladas (AHL, *quorum sensing*; AIA, producción de auxinas; SID, producción de sideróforos; y PVK, solubilización de fosfatos) (B).

10A		Porcentaje propiedades PGP			
Zona	Estación	Ninguna	Una	Dos	Tres
Marisma	Verano	27.9	32.8	36.1	3.3
	Otoño	51.4	37.1	11.4	0
Canal	Verano	20.0	36.7	30.0	13.3
	Otoño	53.6	39.3	7.1	0

10B		Interacciones entre propiedades PGP					
Zona	Estación	SID-PVK	SID-AIA	SID-AHL	PVK-AIA	PVK-AHL	AIA-AHL
Marisma	Verano	4	18	3	1	0	4
	Otoño	1	1	0	0	0	5
Canal	Verano	1	10	4	0	0	3
	Otoño	3	0	0	0	0	1

Además, se observó una tendencia común por la cual hay más cepas que presentan cada actividad en verano que en otoño (Figura 17), siendo la excepción la propiedad de solubilizar fosfatos que presentan las bacterias del canal. A continuación, se describe de forma más concreta cada una de las propiedades PGP:

- Auxinas: es llamativo el ascenso de cepas que presenta esta propiedad en el canal de riego en el verano (40 % más frecuente que en otoño); dicho aumento también se observó en la marisma, pero más leve.
- *Quorum sensing*: en la rizosfera de las plantas de marisma no hubo diferencias estacionales entre las cepas que presentaron esta actividad, mientras que en el canal se presentó el doble de bacterias que sintetizan AHL en la estación seca que en la lluviosa.
- Sideróforos: fue la propiedad PGP estudiada más abundante, siendo en el canal donde se dieron un mayor número de cepas que los producen (casi un 65 % en verano y un 40 % en otoño). Por zonas, la disminución de verano a otoño fue idéntica (40 % aprox.).
- Solubilización de fosfatos: fue la propiedad menos frecuente de las propiedades PGP que se analizó. Presentó un patrón inverso según la zona, mientras que en la marisma sigue la misma tendencia descrita hasta ahora, en el canal las cepas que solubilizan fosfatos fueron más comunes tras las lluvias (11 % aproximadamente).

Una vez obtenidos todos estos datos, se realizó un análisis de componentes principales para comprobar si las rizosferas se diferenciaban según las propiedades estudiadas, entre ambas zonas y/o en las dos estaciones. El ACP aglutinó el 45 % de la varianza en las dos primeras componentes y apoyó los resultados obtenidos hasta ahora (Figura 18A). Así, la primera componente, estuvo dominada por tres factores, tolerancia a alta temperatura, producción de sideróforos y solubilización de fosfatos (Figura 18B), explicando el 25 % de las diferencias entre las rizosferas de *A. macrostachyum*. Mediante la segunda componente se explicó aprox. un 20 % de la varianza, siendo el factor de mayor peso la tolerancia a una alta salinidad (las más resistentes en la parte inferior), junto la producción de AIA y la capacidad de *quorum sensing* en menor grado (Figura 18B). Por todo ello, lo más destacable es que la rizosfera de *A. macrostachyum* en verano presenta unas cepas con unas características muy determinadas y extremas.

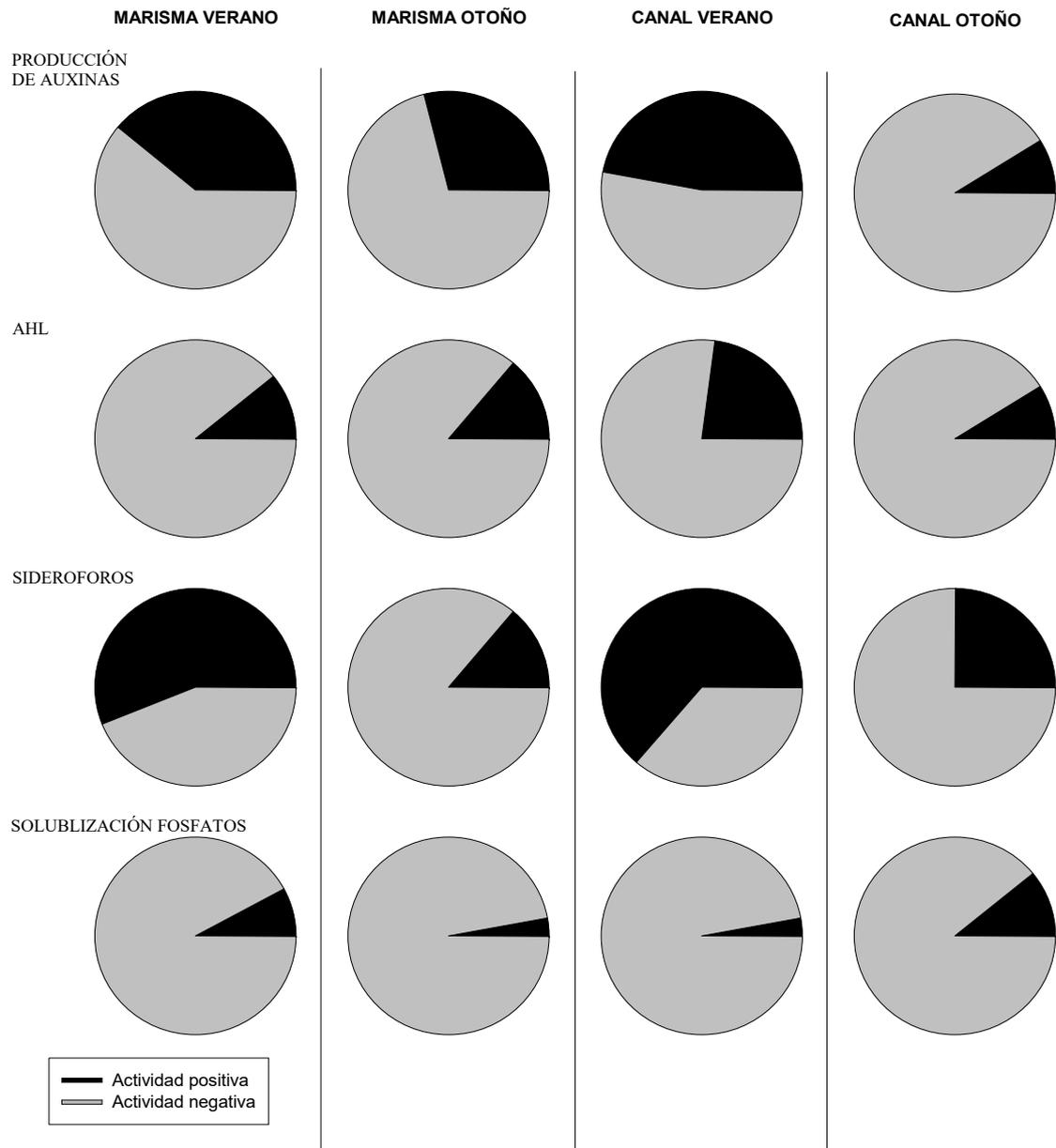


Figura 17. Porcentaje de cepas que presentan cada una de las propiedades promotoras del crecimiento vegetal que se han estudiado en dos zonas diferenciadas de la marisma de Lebrija (marisma y canal de riego), en verano y en otoño.

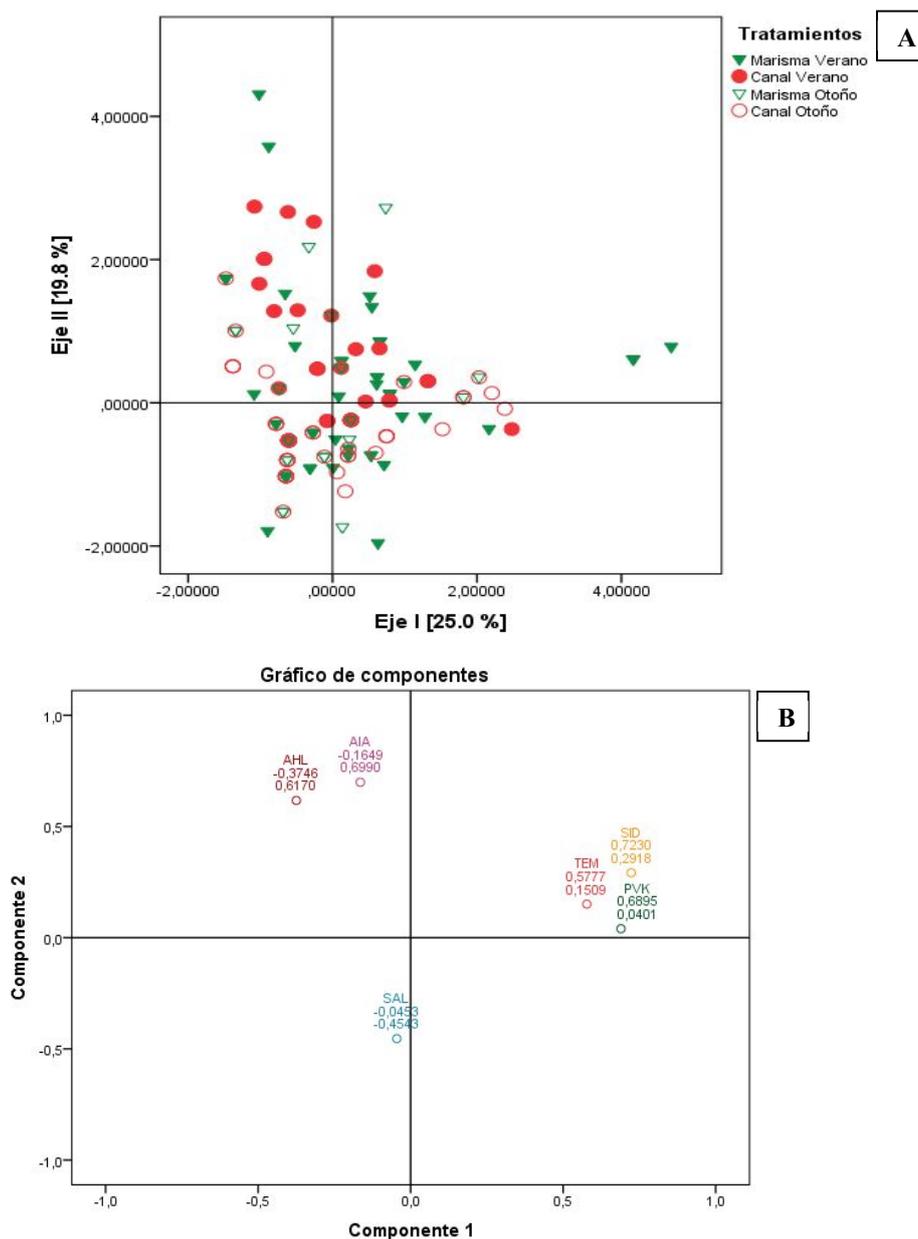


Figura 18. (A) Representación de las 182 cepas aisladas de la rizosfera de *A. macrostachyum* en las dos zonas de muestreo (marisma y canal de riego en Lebrija) en dos estaciones diferentes del año (verano y otoño) según las variables propiedades PGP, resistencias al exceso de temperatura y sal. (B) Autovalores del análisis de componentes principales (ACP) basado en las distancias ponderadas. AHL (*quorum sensing*); AIA (producción de auxinas); SID (producción de sideróforos); PVK (solubilización de fosfatos); TEM (crecimiento a 40 °C) y SAL (tolerancia a la alta concentración de NaCl).

II.4. Discusión

Las bacterias cultivables del suelo representan una fracción muy reducida (1-5%) del total de bacterias que viven en él (Rondon *et al.*, 1999; Torsvik y Ovreas 2002; Torsvik *et al.*, 2002; Curtis y Sloan, 2004). Sin embargo, la técnica del aislamiento de colonias puede proporcionar información sobre el papel que ejercen las bacterias en la

zona (Zacone *et al.*, 2002). En este sentido, aun habiendo obtenido un número total de cepas aisladas similar en ambas estaciones, es reseñable que, respecto a cada zona, la cantidad de aislados es inverso, siendo en verano mayor el número de bacterias aisladas en la marisma que en el canal y viceversa en otoño; datos corroborados por posteriores estudios de metagenómica (Camacho-Sánchez *et al.*, en revisión). Este hecho se debe a que las bacterias, como el resto de los organismos, no se distribuyen de forma homogénea alrededor del planeta, sino que su distribución está condicionada por factores bióticos y abióticos (Schmidt y Schaechter, 2001). Incluso a nivel local, las variaciones en las comunidades bacterianas pueden darse de manera estacional (González-Acosta *et al.*, 2006; Lacap *et al.*, 2007), variar según las especies vegetales existentes en la zona (Berg *et al.*, 2002) o variar en zonas muy próximas (1 m de distancia) debido a cambios en las condiciones fisicoquímicas del suelo (González-Acosta *et al.*, 2006).

Centrándonos en la cantidad de sal en el suelo, en la marisma puede llegar a formarse una costra blanquecina producida por acumulación de ésta en la superficie (López-Ritas y López-Melida, 1990). En este ambiente extremo se favorece el desarrollo de bacterias halófilas (organismos que crecen en una concentración mínima de 1 % de NaCl). De hecho, en este capítulo se ha observado que la mayor tolerancia a la sal aparece en organismos aislados en verano, cuando no hay precipitaciones y la evaporación es elevada, factores que favorecerían la presencia de bacterias halófilas extremas, las cuales crecen en concentraciones superiores al 10 % de NaCl (Bowers *et al.*, 2009). Por el contrario, la falta de organismos que soporten altas concentraciones de sal en el canal de riego podría deberse a que en verano esa zona recibe todo el excedente del agua de riego, con lo cual se produce una alta lixiviación y, por tanto, presentaría menos cantidad de sal. Es cierto que la temperatura es un factor decisivo en el crecimiento de las bacterias (González-Acosta *et al.*, 2006; Stabili *et al.*, 2006), incluso está descrito que microorganismos extremófilos para la sal también sean termófilos (Bowers *et al.*, 2009). A pesar de lo descrito por estos autores, en este trabajo no se ha encontrado dicha relación, incluso hay una total independencia entre dichos factores. Así, al realizar una correlación de Spearman entre la resistencia a la sal y el crecimiento a 40 °C se obtuvo un coeficiente de correlación cercano a cero (0.043). Hecho que también se recoge al analizar la gráfica de los autovalores del ACP (Figura 18B), en el que se observa como ambos factores están considerablemente distanciados, indicando que no hay dependencia entre la capacidad de las bacterias para vivir a alta temperatura y su resistencia a mayor concentración de sal.

Por otro lado, la presencia de propiedades promotoras del crecimiento es más común en la temporada de verano que en la otoñal, hecho que puede deberse a diversos factores, bien de forma independiente o en interacción. El crecimiento bacteriano está condicionado a la existencia de temperaturas óptimas. Stabili *et al.* (2006) establecen dicha idea siendo la media de la temperatura máxima de verano (27 °C) mejor que las del otoño (en torno a 15 °C). Esto concuerda con los registros de temperaturas de la zona en la que se ha trabajado, en la que se registraron temperaturas medias máximas de 26 y 17 °C en verano y otoño, respectivamente (datos obtenidos de la Red de Información Agroclimática de Andalucía). Otro factor que podría fomentar la presencia de bacterias con actividades PGP podría ser la propia planta, pues *A. macrostachyum* presenta el periodo tanto de crecimiento vegetal como de floración entre marzo y junio (Fernández-Illescas *et al.*, 2010), época en la que la planta presenta una mayor actividad metabólica (Iglesias *et al.*, 2002). Este aumento en dicha actividad también se refleja en las raíces, que exudan una mayor cantidad de metabolitos secundarios, lo cual favorece la presencia de microorganismos en la rizosfera (Dakora y Phillips, 2002).

Respecto al hierro, este elemento es un micronutriente para las plantas (Welch, 1995), y en ambas zonas estudiadas la concentración de este elemento es baja si las comparamos con otras marismas de zonas cercanas; así, respecto a la marisma del río Piedras, hay un descenso del orden de 10^3 en la cantidad de hierro presente en el suelo (Mesa *et al.*, 2015). Debido a este estado de deficiencia, se podría explicar que sean tan abundantes las cepas secretoras de sideróforos. Además, en ambas zonas siempre hay un mayor porcentaje de bacterias que presentan esta actividad en verano, suceso que podría explicarse por ser más necesaria la presencia de sideróforos para absorber el hierro en esta época, que es cuando factores como la escasez de humedad o un pH que vire hacia más básico dificultan la absorción de este metal (Lindsay, 1979).

Relacionado con otro nutriente, se observa que el porcentaje de cepas que presenta la capacidad de solubilizar fósforo es muy bajo. Esto podría deberse a que no es una propiedad PGP muy útil en estos suelos, ya que una concentración de fosfatos entre 0.2-0.3 ppm en la solución del suelo es suficiente para un buen desarrollo vegetal (Asher y Loneragen, 1967; Fox y Kamprath, 1970); y los suelos estudiados presentan concentraciones de 500 ppm, que además, al ser arcillosos y con un pH neutro, hacen que el fósforo sea fácilmente adquirible por las plantas.

A continuación, mediante el ACP se pudo comprobar cómo la distribución de algunos organismos está condicionada por su ambiente y sus propiedades PGP. Así,

mientras que se observó gran una uniformidad en otoño, en verano se detectaron diferencias. En concreto, en el canal aparecieron un gran número de cepas que no crecen a alta salinidad; esto podría deberse, como ya se ha comentado, a que dicha zona en verano recibe el agua de riego sobrante, lo que mantiene la concentración salina en niveles bajos. A su vez, en la marisma hubo cepas que se caracterizan por solo aparecer en verano, lo que podría explicarse por las duras condiciones que se dan en la región muestreada en esa estación (altas temperaturas, estrés hídrico o aumento de la salinidad). Frente a dichas condiciones extremas, el poseer, por ejemplo, la capacidad de sintetizar AHL podría otorgar a las bacterias ser más competitivas y aparecer en esa estación. De hecho, en ambientes marinos extremos se han descrito bacterias que producen AHL, siendo este uno de los factores que les permite resistir en dichas zonas (Edwards et al., 2000; Reysenbach y Cady, 2001; Hall-Stoodley et al., 2004).

Para concluir, se puede decir que la rizosfera de la halófito *A. macrostachyum* ha sido una fuente muy rica de biodiversidad bacteriana, y más aún, una fuente de cepas potencialmente útiles gracias a las propiedades promotoras del crecimiento vegetal que presentaron, siendo el verano la estación más adecuada de muestreo con este propósito.

II.5. Bibliografía

- Alexander, D. B. y Zuberer, D. A.** 1991. Use of Chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 12 (1): 39-45.
- Ali, B.** 2009. Plant associated auxin producing bacteria: Their genetical studies and impact on plant growth. Tesis doctoral. Department of Microbiology and Molecular genetics. University of the Punjab. Lahore. Pakistan.
- Asher, C. J. y Loneragen, J. F.** 1967. Response of plants to phosphate concentration in solution cultures. I. Growth and Phosphorus content. *Soil Science*, 103: 225–233.
- Berg, G., Roskot, N., Steidle, A., Eberl, L., Zock, A. y Smalla, K.** 2002. Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. *Applied Environ Microbiology*, 68: 3328-3338.

- Bowers, K. J., Mesbah, N. M. y Wiegel, J.** 2009. Biodiversity of poly-extremophilic Bacteria: Does combining the extremes of high salt, alkaline pH and elevated temperature approach a physico-chemical boundary for life? *Saline Systems*, 5: 9.
- Camacho-Sánchez, M., Barcia-Piedras, J. M., Redondo-Gómez, S. y Camacho, M.** Mediterranean seasonality and the halophyte *Arthrocnemum macrostachyum* determine the bacterial community in salt marsh soils in Southwest Spain. *Applied Soil Ecology*, en revisión.
- Castroviejo, S.** 1993. Flora Ibérica 3. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid, España.
- Crowley, D. E., Wang, Y. C., Reid, C. P. P. y Szaniszlo, P. J.** 1991. Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. *Plant and Soil*, 130: 179-198.
- Cuadrat, J. M. y Pita, M. F.** 2004. Climatología. Ed. Cátedra, Madrid, España, 496 pp.
- Curtis, T. P. y Sloan, W. T.** 2004. Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. *Current Opinion in Microbiology*, 7 (3): 221-226.
- Dakora, F. D. y Phillips, D. A.** 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil*, 245: 35-47.
- Döbereiner, J.** 1980. Forage grasses and grain crops, en Methods for evaluating biological nitrogen. *John Wiley and Sons Ltd*, Nueva York, USA, 702 pp.
- Edwards, K. J., Bond, P. L., Gihring, T. M. y Banfield, J. F.** 2000. An archaeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acid mine drainage. *Science*, 287: 1731-1732.
- Fernández-Illescas, F., Nieva, F. J., Silva, I., Tormo, R. y Muñoz, A.F.** 2010. Pollen production of *Chenopodiaceae* species at habitat and landscape scale in Mediterranean salt marshes: An ecological and phenological study. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 161, (3-4): 127-136.
- Fox, R. L. y Kamprath, E. J.** 1970. Phosphate sorption isotherms for evaluating the phosphate requirements of soils. *Soil Science Society of America Proceedings*, 34: 902-907.

- González-Acosta, B., Bashan, Y., Hernández-Saavedra, N. Y., Ascencio, F. y de la Cruz-Agüero, G.** 2006. Seasonal seawater temperature as the major determinant for populations of culturable bacteria in the sediments of an intact mangrove in an arid region. *FEMS Microbiology Ecology*, 55 (2): 311–321.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. y Stoodley, P.** 2004. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2 (2): 95-108.
- Iglesias, D. J., Lliso, I., Tadeo, F. R. y Talon, M.** 2002. Regulation of photosynthesis through source: sink imbalance in citrus is mediated by carbohydrate content in leaves. *Physiologia Plantarum*, 116: 563–572.
- Janssen, S., Kopylova, E., Vázquez-Baeza, Y., González, A., Morton, J. T., Mirarab, S., Xu, Z. Z., Jiang, L., Haroon, M. F., Kanbar, J., Zhu, Q., Song, S. J., Kosciolk, T., Bokulich, N. A., Lefler, J., Brislawn, C. J., Humphrey, G., Owens, S. M., Hampton-Marcell, J., Berg-Lyons, D., McKenzie, V., Fierer, N., Fuhrman, J. A., Clauset, A., Stevens, R. L., Shade, A., Pollard, K. S., Goodwin, K. D., Jansson, J. K., Gilbert, J. A., Knight, R. y The Earth Microbiome Project Consortium.** 2017. A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity. *Nature*, 551: 457-463.
- Lane, D. J.** 1991. 16S/23S rRNA sequencing, en *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons, New York, USA, 329 pp.
- Lacap, D. C., Barraquio, W. y Pointing, S. B.** 2007. Thermophilic microbial mats in a tropical geothermal location display pronounced seasonal changes but appear resilient to stochastic disturbance. *Environmental Microbiology*, 9 (12): 3065-3076.
- Lindsay, W. L.** 1979. *Chemical Equilibria in Soils*. Ed. Wiley-Interscience, Nueva York, USA, 449 pp.
- López-Ritas, J. y López-Melida, J.** 1990. *El diagnóstico de suelos y plantas, métodos de campo y laboratorio*. Mundi Prensa, Madrid, España, 363 pp.
- Mesa, J., Rodríguez-Llorente, I. D., Pajuelo, E., Barcia-Piedras, J. M., Caviedes, M.A., Redondo-Gómez, S. y Mateos-Naranjo, E.** 2015. Moving closer towards

restoration of contaminated estuaries: Bioaugmentation with autochthonous rhizobacteria improves metal rhizoaccumulation in native *Spartina maritima*. *Journal of Hazardous Materials*, 300: 263-271.

Montero-Calasanz, M.C., Santamaría, C., Albareda, M., Daza, A., Duan, J., Glick, B.R. y Camacho M. 2013. Alternative rooting induction of semi-hardwood olive cuttings by several auxin-producing bacteria for organic agriculture systems. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 11 (1): 146-154.

Patten, C. L. y Glick B. R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. *Applied Environmental and Microbiology*. 68 (8): 3795-3801.

Pérez-Montaño, F., Jiménez-Guerrero, I., Contreras Sánchez-Matamoros, R., López-Baena, F. J., Ollero, F. J., Rodríguez-Carvajal, M. A., Bellogín, R. A. y Espuny, M. R. 2013. Rice and bean AHL-mimic quorum-sensing signals specifically interfere with the capacity to form biofilms by plant-associated bacteria. *Research in Microbiology*, 164: 749-760.

Pikovskaya, R.I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiology*, 17: 362-370.

Ramos-Solano, B., Lucas, J.A., García-Villaraco, E.A., García-Cristobal, J. y Gutiérrez-Mañero, F.J. 2010. Siderophore and chitinase producing isolates from the rhizosphere of *Nicotiana glauca* Graham enhance growth and induce systemic resistance in *Solanum lycopersicum* L. *Plant and Soil*, 334: 189-197.

Red de Información Agroclimática de Andalucía: <https://ifapa.junta-andalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/web/red-de-informacion-agroclimatica-de-andalucia>

Reysenbach, A. L. y Cady, S. L. 2001. Microbiology of ancient and modern hydrothermal systems. *Trends in Microbiology*, 9 (2): 79–86.

Rodríguez, H. y Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17: 319-339.

- Rondon, M., Goodman, M. y Handelsman, J.** 1999. The earth's bounty: assessing and accessing the soil microbial diversity. *Trends in Biotechnology*, 17 (10): 403-409.
- Rosier, A., Medeiros, F. H. V. y Bais, H. P.** 2018. Defining plant growth promoting rhizobacteria molecular and biochemical networks in beneficial plant-microbe interactions. *Plant and Soil*, 428 (1-2): 35-55.
- Schmidt, T. y Schaechter, M.** 2001. Topics in Ecological and Environmental Microbiology. *Academic Press*, pp. 774.
- Stabili, L., Caroppo, C. y Cavallo, R. A.** 2006. Monitoring of a coastal mediterranean area: Culturable bacteria, phytoplankton, environmental factors and their relationships in the Southern Adriatic Sea. *Environmental Monitoring and Assessment*, 121 (1-3): 301-323.
- Torsvik, V. y Ovreas, L.** 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5 (3): 240-245.
- Torsvik, V., Ovreas, L. y Thingstad, T. F.** 2002. Prokaryotic diversity-magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science*, 296 (5570): 1064-1066.
- Ventosa, A.** 2004. Halophilic Microorganisms. *Springer-Verlag*, Berlin, Alemania, 350 pp.
- Vincent, J. M.** 1970. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. *Blackwell Scientific Publications*, Oxford-Edinburgh, 164 pp.
- Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H. y Chun, J.** 2017. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67: 1613-1617.
- Zaccone, R., Caruso, G. y Cali, C.** 2002. Heterotrophic bacteria in the Northern Adriatic Sea: Seasonal Changes and ectoenzyme profile. *Marine Environmental Research*, 54: 1-19.
- Welch, R. M.** 1995. Micronutrient Nutrition of Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 14 (1): 49-82.

CAPÍTULO III

Influencia de los aislamientos bacterianos en la germinación, crecimiento y estaquillado de *A. macrostachyum*

III.1. Objetivos

En este capítulo los objetivos que se propusieron fueron tres. Por un lado, se quiso dilucidar el efecto que tienen diferentes bacterias con propiedades PGP (en especial las productoras de auxinas) sobre (1) el crecimiento vegetal y la fisiología de *A. macrostachyum* crecida tanto a 0 mM como a 171 mM de NaCl. Las mejores cepas se seleccionaron para comprobar sus efectos sobre (2) la germinación de *A. macrostachyum* en condiciones salinas y (3) en el enraizamiento de estaquillas de *A. macrostachyum*.

III.2. Materiales y Métodos

III.2.1. Microorganismos

A continuación, se describen las bacterias utilizadas en este capítulo (Tabla 11):

Tabla 11. Denominación de las cepas, nombre de la especie y ambiente de las que se han aislado las bacterias.

Cepa	Especie	Procedencia
Hv16	<i>Kocuria polaris</i>	Rizosfera de <i>A. macrostachyum</i> de la marisma de Lebrija
Hvs13	<i>Brevibacterium frigitolerans</i>	Rizosfera de <i>A. macrostachyum</i> de la marisma de Lebrija (aislada con 350 mM de NaCl)
Hvs76	<i>Arthrobacter siccitolerans</i>	Rizosfera de <i>A. macrostachyum</i> de la marisma de Lebrija (aislada con 350 mM de NaCl)
C58	<i>Arthrobacter siccitolerans</i>	Rizosfera de <i>A. macrostachyum</i> en un canal de riego de la marisma de Lebrija.
C59	<i>Ensifer meliloti</i>	Rizosfera de <i>A. macrostachyum</i> en un canal de riego de la marisma de Lebrija.
RTE9*	<i>Rahnella aquatilis</i>	Interior de una planta sin determinar de la marisma del Río Tinto.

Todas las cepas proceden de la colección realizada en el Capítulo II de esta Tesis, salvo la cepa RTE9 que fue cedida por la Dra. Rosario Espuny (Universidad de Sevilla). A todas las cepas se le realizó la caracterización bioquímica y física de acuerdo con lo descrito en el Capítulo II (apartados II.2.3.1. y II.2.3.2.).

III.2.2. Material vegetal

En este trabajo se utilizaron semillas comerciales de Colza (*Brassica napus* L.) y semillas de *A. macrostachyum* (Mor.) C. Koch recolectadas en las marismas del río Odiel, SO de la Península Ibérica (37° 13' 4.4" N - 6° 57' 35.3" O) en dos campañas

diferentes (2014 para el ensayo 1 y 2015 para el ensayo 2). Una vez recolectadas las semillas fueron conservadas a 5 °C hasta su uso. En el ensayo 3 se utilizaron esquejes procedentes de plantas adultas de la campaña del 2014.

Para la desinfección de las semillas de colza se siguió el protocolo descrito por Montero-Calasanz (2011). Las semillas de *A. macrostachyum* se desinfectaron sumergiéndolas 30" en H₂SO₄ 96 %, seguido de 7 lavados con H₂O_d estéril, lejía al 5 % durante 3' y finalmente otros 7 lavados con H₂O_d estéril.

III.2.3. Ensayo 1: influencia de la inoculación bacteriana y la sal en la fisiología de *A. macrostachyum*

III.2.3.1. Evaluación de las cepas bacterianas sobre la colza

La colza es una especie sensible a los cambios hormonales, que se reflejan en la elongación de su raíz (Penrose y Glick, 2003). Por ello, cincuenta semillas de colza se colocaron en un tubo eppendorf con 1 ml de la suspensión bacteriana correspondiente (10^8 cel ml⁻¹) y se mantuvo en agitación durante 1 h (cepas crecidas como se describió en el II.2.3.2.1.) (Figura 19A). Como control se utilizaron semillas embebidas en MgSO₄ (0.03 M). A continuación, las semillas se colocaron en un número de diez por bolsa de crecimiento estéril (DIK-710A, Daiki[®], Japón) (Figura 19B) que contenía 12 ml de solución Hewitt 0'5x (Hewitt, 1952). Se realizaron cuatro réplicas por tratamiento (40 semillas).

Las bolsas se colocaron en una cámara de crecimiento (Sanyo Electric[®], Japón) con un ciclo de 12 h luz y 12 de oscuridad, iluminada por una fuente, ($\lambda = 400-700$ nm) con una densidad de flujo de 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; con la humedad relativa al 80 % durante siete días, tras los cuales se midió la longitud radical de cada plántula (Figura 19C).

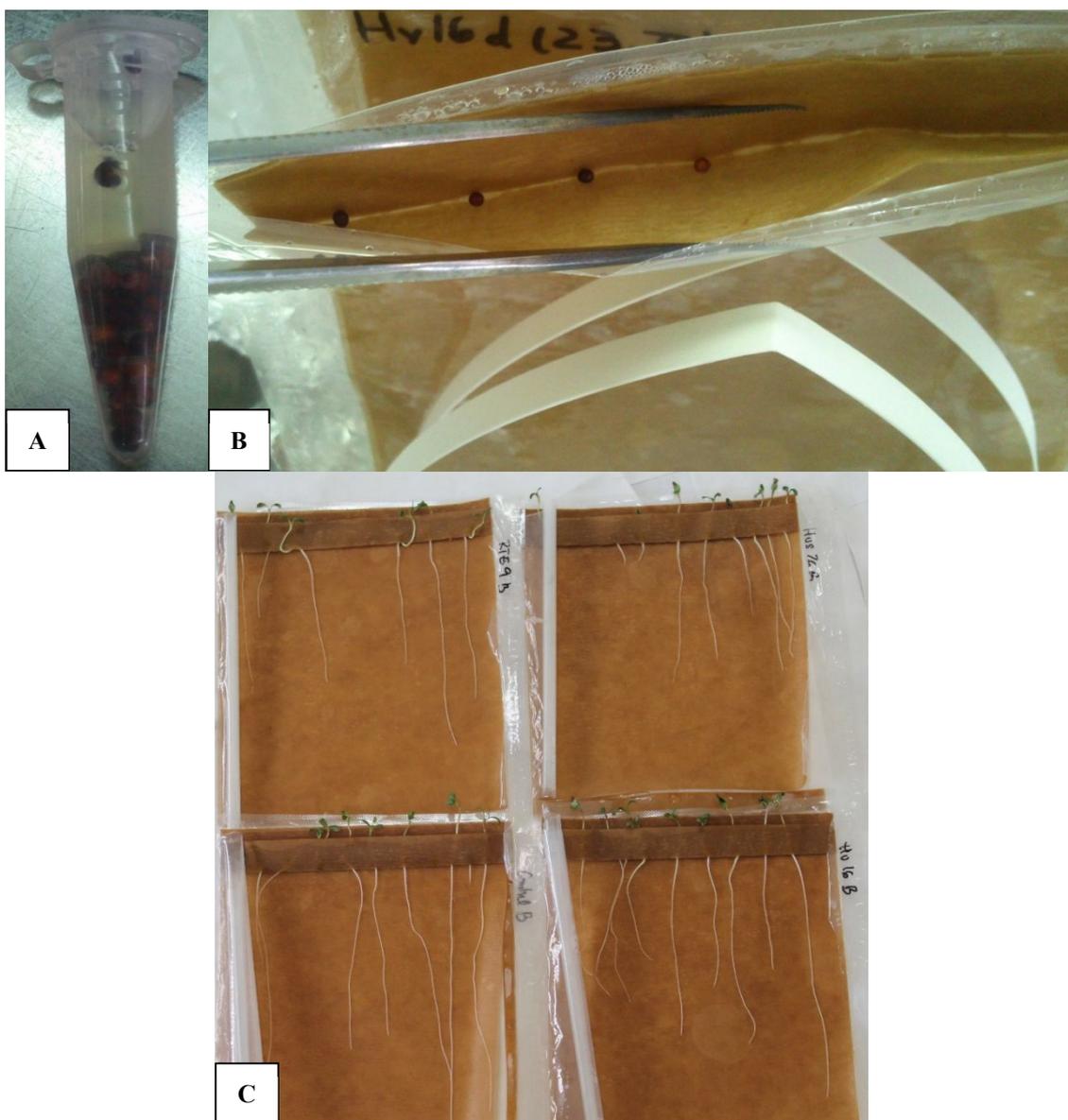


Figura 19. Inoculación de las semillas de colza mediante imbibición en una suspensión bacteriana (10^8 cel ml^{-1}) (A). Colocación de las semillas inoculadas en las bolsas de germinación (B). Cuantificación de la elongación de la raíz de colza una semana después de inocularlas (C).

III.2.3.2. Evaluación de las cepas bacterianas sobre *A. macrostachyum*

III.2.3.2.1. Crecimiento vegetal

Las cepas seleccionadas en el ensayo de elongación radical de la colza se utilizaron para inocular semillas de *A. macrostachyum*. Se utilizaron 100 semillas por tratamiento, cada tratamiento se inoculó de la misma manera que en el apartado anterior y se repartieron equitativamente en 4 placas de Petri con agar-agua al 1 % (Figura 20).

Tras esto, las placas se mantuvieron durante un mes en una cámara de crecimiento (Sanyo Electric[®], Japón) con un ciclo de 10 h luz a 20 °C y 14 h oscuridad a 5 °C.

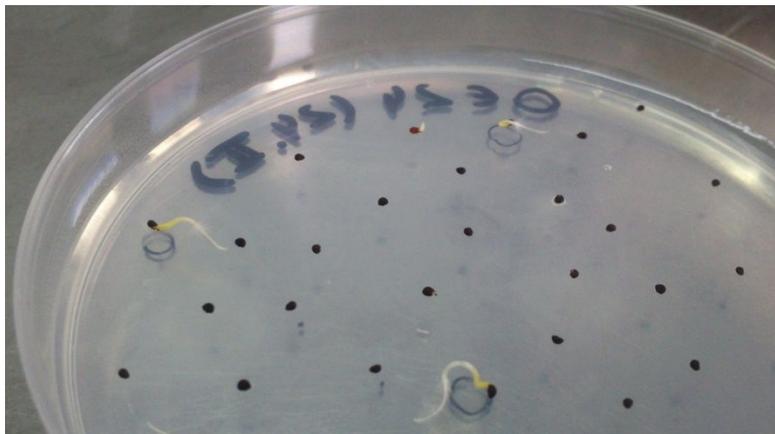


Figura 20. Semillas de *A. macrostachyum* germinando en una placa de Petri. Las semillas previamente habían sido embebidas en la suspensión bacteriana correspondiente (10^8 cel ml^{-1}) o en sulfato magnésico (control).

A continuación, las semillas germinadas se trasplantaron a semilleros perforados, con un sustrato compuesto por perlita-vermiculita 2:1 (v/v) (Figura 21). Una vez preparados, los semilleros se introdujeron en bandejas que se llenaron con solución Hewitt 0'5x hasta 1 cm de profundidad. Todo el material utilizado se esterilizó previamente, los semilleros y la solución nutritiva mediante calor húmedo 60 minutos a 121 °C, mientras que las bandejas fueron bases de placas de Petri estériles. Las bandejas se colocaron en el invernadero del centro IFAPA Las Torres en Sevilla (37° 30' 42.4" N - 5° 57' 47.4" O) con un ciclo de 16 h de luz a 30 °C, 8 h de oscuridad a 20 °C y se regaron 3 veces por semana (se mantuvo constante el mismo volumen de solución nutritiva). En estas condiciones permanecieron creciendo las plántulas de *A. macrostachyum* durante 3 meses. Al día siguiente de trasplantarse y, posteriormente una vez al mes, se realizó un recordatorio de la inoculación, añadiendo a cada plántula 200 μl de una suspensión bacteriana (10^8 cel ml^{-1}) de la cepa correspondiente.



Figura 21. Las semillas germinadas de *A. macrostachyum* se trasplantaron a semilleros estériles de perlita vermiculita (2:1; v/v) en las que estuvieron creciendo durante los siguientes tres meses. Un día después del trasplante se inocularon con la cepa correspondiente (o sulfato de magnesio para los controles), y se repitió una vez al mes.

Transcurrido este tiempo, en 20 plantas por tratamiento se cuantificó la longitud y el diámetro de la rama principal, además del número de ramas. Luego, dichas plantas se colocaron en jarros de Leonard estériles como soporte hidropónico (Figura 22). En este sistema la fase sólida estaba compuesta por perlita-vermiculita 2:1 (v/v) y la fase líquida por 200 ml de solución nutritiva Hewitt 0'5x. Con la intención de ver el efecto de la presencia de la sal en *A. macrostachyum* respecto a las cepas inoculadas, la mitad de las plantas se regaron con la solución Hewitt *per se*; y la otra mitad contenía la misma solución nutritiva adicionada con NaCl 171 mM (manteniéndose el volumen y concentración de la solución nutritiva de forma constante). En estos jarros se dejaron crecer las plantas durante tres meses más, siendo idénticas las condiciones ambientales del invernadero a las descritas anteriormente. Respecto a la inoculación de los tratamientos, se realizó un recordatorio una vez al mes durante todo el ensayo con 1 ml de la cepa correspondiente (10^8 cel ml^{-1}).

Al final del ensayo se cosecharon las plantas, se pesó la parte aérea y la raíz. Posteriormente, se secaron en una estufa, a 60 °C, durante 48 h volviéndose a pesar de nuevo, para calcular el contenido hídrico (CH) de la siguiente manera:

$$(1) \text{CH} = (\text{PF} - \text{PS}) * \text{PF}^{-1} * 100 [\%]$$

donde PF es el peso fresco de la biomasa aérea; y PS es el peso seco de la biomasa aérea.



Figura 22. El jarro de Leonard es un sistema hidropónico que permite su esterilización al completo, la parte superior es un sistema sólido compuesto por perlita vermiculita (2:1, v/v) comunicado mediante una gasa a la parte inferior que contiene la solución nutritiva (Hewitt 0'5x). Una vez esterilizado, se colocaron en ellos las plántulas de *A. macrostachyum* de tres meses. Un día después del trasplante se inocularon con la cepa correspondiente (o sulfato de magnesio para los controles) y se realizó un recordatorio de la inoculación una vez al mes.

III.2.3.2.2. Intercambio de gases

Antes de cosechar las plantas, en el ápice de la rama principal de 5 plantas de cada tratamiento, se midió el intercambio de gases fotosintético mediante un analizador de gases por infrarrojo (LCi-portable photosynthesis, ADC[®], UK). Se cuantificó la tasa fotosintética neta (A), la conductancia estomática (g_s) y la concentración intercelular de CO_2 (C_i). Las condiciones en las que se midieron estos parámetros fueron las ambientales (30-35 °C, humedad relativa del 45%, concentración atmosférica de $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 y densidad de flujo de fotones de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Los valores de A , g_s y C_i fueron calculados según las fórmulas de Von Caemmerer y Farquhar (1981). Nótese que al ser una planta de sección cilíndrica solo la mitad de la rama, el lado expuesto hacia la luz, se consideró como superficie fotosintética. También se calculó la eficiencia intrínseca en el uso del agua ($iWUE$) como:

$$(2) iWUE = A * g_s^{-1} [\mu\text{mol mol}^{-1}]$$

III.2.4. Ensayo 2: efectos de la inoculación bacteriana y la sal en la germinación de *A. macrostachyum*

Con los tratamientos bacterianos que más promovieron el crecimiento de *A. macrostachyum*, se realizó este nuevo ensayo de la misma manera que se indica en el III.2.3.2.1., salvo que se duplicó el número de semillas. La mitad de las semillas se germinaron sin sal y la otra mitad con una concentración salina de 171 mM. Diariamente se anotaron las semillas que germinaban en cada tratamiento. A lo largo del ensayo se determinaron cuatro características de la germinación: porcentaje de germinación final, número de días hasta la primera germinación, número de días hasta la última germinación y tiempo medio de germinación (MTG), que se calculó utilizando la ecuación de Ellis y Roberts, 1978:

$$(3) \text{ MTG} = \sum_i (n_i * d_i) * N_i^{-1} \text{ [días]}$$

donde n es el número de semillas germinadas hasta el día i; d es el período de incubación en días, y N es la cantidad total de semillas germinadas. Los valores más bajos de MTE indican una emergencia más rápida.

Para determinar si las bacterias tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de los hongos asociados a las semillas de *A. macrostachyum*, al final del ensayo se hizo un recuento de las colonias fúngicas aparecidas en las placas.

III.2.5. Ensayo 3: influencia de la inoculación bacteriana en el estaquillado de *A. macrostachyum*

III.2.5.1. Material vegetal e inoculación

Los esquejes de *A. macrostachyum* utilizados en este ensayo proceden de individuos adultos de la campaña del 2014, que habían sido regados semanalmente con solución nutritiva Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950). El ensayo se llevó a cabo en el Servicio de Invernadero del CITIUS (Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla, 37° 21' 32.6" N - 5° 59' 13.4" O). Las estaquillas se obtuvieron cortando los primeros 5 cm de las ramas nuevas. Tras inocularlas (sumergiéndolas en 100 ml de suspensión bacteriana durante una hora, Figura 23A), se introdujeron 2 cm de cada estaquilla en una mezcla de fibra de coco:perlita 5:1 (v/v), en un semillero perforado de 96 ml, que a su vez se colocó en bandejas que se mantuvieron con un volumen constante de solución Hoagland (Figura 23B). En total se cortaron 200

estaquillas (40 por tratamiento, separadas en 4 réplicas), además de 40 esquejes para las medidas iniciales. Las condiciones en las que se desarrolló este ensayo son: temperatura de 21- 25 °C, humedad relativa de 40-60 % y 16 h luz natural ($250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ como mínimo y $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ como máximo), durante 60 días.



Figura 23. Esquejes de *A. machrostachyum* embebidos en una solución bacteriana (10^8 cel ml^{-1}) durante una hora (A). A continuación se trasplantaron a semilleros de perlita vermiculita (2:1; v/v) en las que estuvieron creciendo durante los siguientes dos meses (B).

III.2.5.2. Crecimiento vegetal

Al inicio del ensayo se tomaron medidas de longitud y diámetro de todos los esquejes. Cuarenta de ellos se secaron y pesaron para obtener el peso seco inicial (apartado III.2.3.2.1.).

Tras dos meses, se midió la longitud, el diámetro, número de esquejes vivos y su peso fresco. Posteriormente, se metieron los esquejes en bolsas de autocierre con agua destilada a 5 °C en oscuridad y, tras 24 h se pesaron para conocer el peso turgente. Por último, se secaron (apartado III.2.3.2.1.) para conocer el peso seco tanto de las ramas como de las raíces.

Con todos estos datos de peso se calculó el contenido hídrico relativo de la siguiente manera:

$$(4) \text{ CHR} = (\text{PF} - \text{PS}) * (\text{PT} - \text{PS})^{-1} * 100 [\%]$$

donde PF es el peso fresco de la biomasa aérea; PS es el peso seco de la biomasa aérea; y PT es el peso turgente de la biomasa aérea.

También se calculó la tasa de crecimiento relativo (RGR):

$$(5) \text{ RGR} = \ln (B_f * B_i^{-1}) d^{-1} [\text{g g}^{-1} \text{ día}^{-1}]$$

donde B_f es la biomasa final de las ramas; B_i es la biomasa inicial de las ramas; y d es el número de días de duración del ensayo.

III.2.5.3. Intercambio de gases

Antes de cosechar las plantas, se realizaron medidas puntuales de intercambio de gases fotosintéticos mediante un analizador de gases por infrarrojo en un sistema abierto (LI-6400XT, LI-COR®, USA). Para cada tratamiento se midieron 7 estaquillas al azar, y se determinaron los mismos parámetros que en el apartado III.2.3.2.2.

III.2.6. Estadística

Los valores corresponden a la media \pm error estándar (E.E.). Para las variables continuas se testó la normalidad con la prueba de Kolmogorov-Smirnov, y el test de Brown-Forsythe para comprobar la homocedasticidad. Con el objetivo de testar si había diferencias se usó el test de Kruskal-Wallis en las variables discretas, y una ANOVA en las continuas; para los post-hoc se utilizó la prueba de la U de Mann-Whitney y el test LSD de Fisher respectivamente, en ambos casos con un valor de significancia de 0.05.

III.3. Resultados

III.3.1. Propiedades promotoras del crecimiento vegetal de los microorganismos

Todas las cepas utilizadas en este trabajo presentan al menos una de las cuatro propiedades estudiadas. La cepa que más propiedades presenta, y en mayor cantidad, es la cepa Hv16, seguida por la Hvs76 que tiene las mismas propiedades, pero en menor medida. Las cepas Hvs76 y C58 se describieron como la misma especie, sin embargo, la segunda no expresa la capacidad de formar biofilm (Tabla 12).

Tabla 12. Cuantificación de las propiedades promotoras del crecimiento vegetal de las cepas utilizadas en este trabajo. AIA, producción de auxinas; AHL, capacidad de *quorum sensing*; SID, producción de sideróforos; y FOS, solubilización de fosfato.

Cepa	AIA	AHL	SID	FOS
Hv16	+++++	++	++	-
Hvs13	+	-	+	-
Hvs76	++++	+	+	-
C58	++++	-	+	-
C59	+++	-	-	-
RTE9	++++	-	-	+++

III.3.2. Influencia de la inoculación bacteriana en la fisiología de *A. macrostachyum*

III.3.2.1. Evaluación de las cepas bacterianas sobre la colza

Como se dijo anteriormente, la colza es un buen modelo para los estudios hormonales, respecto a la elongación radical. Para seleccionar las bacterias que se usaron con *A. macrostachyum*, se realizó una prueba previa con semillas de colza. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 24. En ella podemos observar que las cepas C58 y Hv16 fueron las que indujeron un mayor crecimiento radical, respecto del tratamiento control, un 54 % y 42%, respectivamente. Los tratamientos C59 y RTE9 también lo mostraron, pero de forma más ligera que las cepas anteriores, y sin llegar a ser significativamente diferentes. Por el contrario, las cepas Hvs13 y Hvs76 afectaron de forma negativa al desarrollo de la raíz.

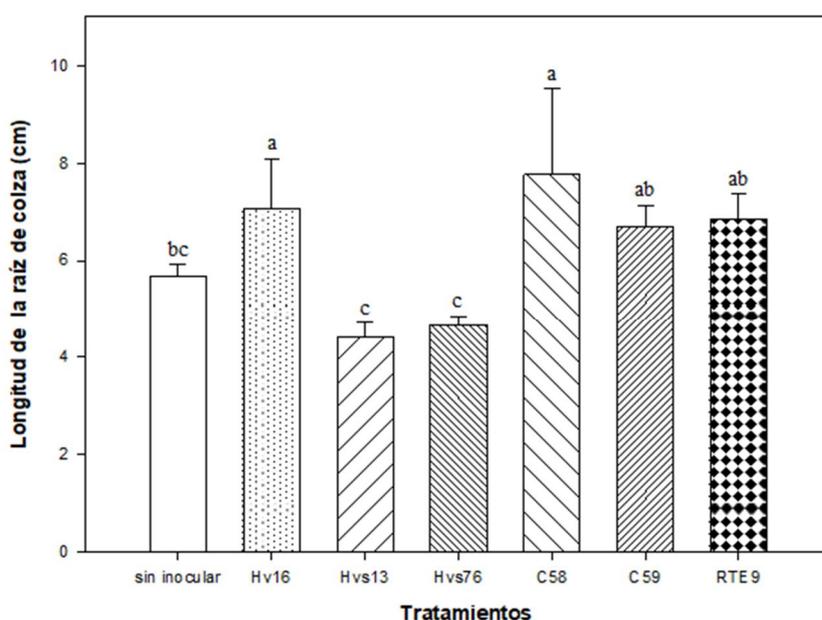


Figura 24. Longitud de la raíz de plántulas de colza inoculadas con diferentes cepas bacterianas tras 7 días. Los valores corresponden a la media \pm E.E. (n = 4). Las letras indican que los valores medios son significativamente diferentes entre ellos (test LSD de Fisher; $p < 0.05$).

III.3.2.2. Crecimiento vegetal de *A. macrostachyum*

Tras descartar las cepas menos influyentes en la elongación radical de la colza, el resto de los inóculos (Hv16, C58, C59 y RTE9) se utilizaron para inocular semillas de *A. macrostachyum*. Antes de trasplantarlas a los jarros de Leonard, las plántulas crecieron durante 3 meses en semilleros. Durante ese periodo, algunos de los tratamientos inoculados con bacterias desarrollaron un mayor tamaño que el tratamiento sin inocular (Tabla 13). Si nos fijamos en la longitud de la rama se observó que, las cepas Hv16 y RTE9 son un 31-22 % respectivamente superiores al control. Sin embargo, respecto al diámetro no se apreció ninguna diferencia significativa. Relacionando longitud y diámetro obtenemos la superficie de la rama, parámetro en el que se observó la misma tendencia que en la longitud. Por otro lado, en cuanto al número de ramas, solo el tratamiento Hv16 aceleró la ramificación de las plántulas.

Tabla 13. Longitud, diámetro, superficie y número de ramas de las plántulas de *A. macrostachyum* inoculadas con las diferentes bacterias, después de 3 meses. Los valores corresponden a la media \pm E.E. (n = 20). Las letras indican que los valores medios son significativamente diferentes entre sí (LSD de Fisher para todas las variables, excepto el número de ramas, U de Mann-Whitney; para ambos $p < 0.05$).

Características morfométricas de las plántulas <i>A. macrostachyum</i>				
Tratamiento	Longitud de la rama (cm)	Diámetro de la rama (mm)	Superficie rama (cm ²)	Número de ramas
No inoculada	2.2 \pm 0.2 ^b	1.7 \pm 0.1 ^{ab}	1.2 \pm 0.1 ^c	0 \pm 0 ^c
Hv16	2.9 \pm 0.2 ^a	1.9 \pm 0.1 ^a	1.7 \pm 0.1 ^a	2 \pm 0 ^a
C58	2.1 \pm 0.2 ^{bc}	1.9 \pm 0.1 ^a	1.4 \pm 0.1 ^{ab}	1 \pm 0 ^{bc}
C59	2.0 \pm 0.2 ^c	1.6 \pm 0.1 ^{bc}	1,1 \pm 0.1 ^c	1 \pm 0 ^{bc}
RTE9	2.7 \pm 0.2 ^a	1.8 \pm 0.1 ^a	1,7 \pm 0.2 ^a	1 \pm 0 ^{bc}

A continuación, las plantas de *A. macrostachyum* se pasaron a jarros de Leonard, en los cuales estuvieron otros 3 meses. Al final del experimento, las plantas volvieron a ser medidas, observándose que algunas de las cepas estimularon el crecimiento de *A. macrostachyum* cuando no hubo presencia de sal (Tabla 14). Así, se registró que la parte aérea de las plantas inoculadas con las cepas Hv16 y RTE9 duplicaron a la del tratamiento control, mientras que la cepa C58 la incrementó en un 60%, también respecto al tratamiento no inoculado. De la misma manera, todos los tratamientos inoculados, excepto C59, obtuvieron diferencias significativas en la biomasa radical respecto al de las plantas sin inocular. Sin embargo, sólo la cepa C58 mostró diferencias en el contenido hídrico relativo.

Por otro lado, en las plantas crecidas en presencia de sal, si bien no se apreciaron diferencias ni en la biomasa aérea ni en su contenido hídrico (Tabla 14), si observamos que todas las bacterias, a excepción de C58, estimularon la producción de raíces.

Tabla 14. Peso seco de la rama y de la raíz, y contenido hídrico de la rama de *A. macrostachyum* crecidas a 0 y 171 mM NaCl, con y sin inocular con cuatro cepas bacterianas diferentes, después de 90 días. Los valores corresponden a la media \pm E.E. (n = 10). Las letras indican que los valores medios son significativamente diferentes entre sí (LSD de Fisher; $p < 0.05$). Los tratamientos 0 y 171 mM están analizados de forma independiente.

Biomasa final de <i>A. macrostachyum</i> 0 mM			
Tratamiento	Peso seco de la rama (g)	Peso seco de la raíz (g)	Contenido hídrico (%)
No inoculada	0,27 \pm 0.10 ^c	0,19 \pm 0.06 ^c	84.1 \pm 1.8 ^{ab}
Hv16	0,59 \pm 0.12 ^a	0,73 \pm 0.18 ^a	85.3 \pm 0.8 ^a
C58	0,45 \pm 0.09 ^{ab}	0,81 \pm 0.23 ^a	78.9 \pm 1.2 ^c
C59	0,34 \pm 0.07 ^{abc}	0,40 \pm 0.11 ^{bc}	80.4 \pm 0.7 ^{bc}
RTE9	0,57 \pm 0.13 ^{ab}	0,67 \pm 0.19 ^{ab}	81.4 \pm 0.5 ^{abc}
Biomasa final de <i>A. macrostachyum</i> 171 mM			
No inoculada	1,25 \pm 0.27 ^{ab}	0,75 \pm 0.18 ^c	87.6 \pm 0.4 ^{ab}
Hv16	1,66 \pm 0.30 ^a	1,14 \pm 0.15 ^{ab}	88.0 \pm 0.2 ^{ab}
C58	0,89 \pm 0.15 ^b	0,77 \pm 0.13 ^{bc}	88.6 \pm 0.9 ^{ab}
C59	1,84 \pm 0.32 ^a	1,21 \pm 0.19 ^{ab}	87.4 \pm 0.6 ^b
RTE9	1,93 \pm 0.23 ^a	1,28 \pm 0.13 ^a	87.7 \pm 0.5 ^{ab}

III.3.2.3. Intercambio de gases

Al analizar la fotosíntesis de las plantas de *A. macrostachyum* crecidas sin sal, se observa un grupo conformado por los tratamientos Hv16 y RTE9, que presenta valores superiores de tasa de fotosíntesis neta (A), conductancia estomática (g_s) y concentración intercelular de CO₂ (C_i), y otro que incluye los tratamientos C58 y C59, que muestra valores muy similares al control (Tabla 15). Respecto a la eficiencia del uso del agua ($iWUE$), no observamos diferencias entre los distintos tratamientos, situándose todos ellos en valores cercanos a 80 mmol mol⁻¹. En las plantas que sí estuvieron expuestas a la sal, la fotosíntesis fue más homogénea pues no hubo diferencias en ninguno de los parámetros estudiados, salvo en la eficiencia en el uso del agua (Tabla 15).

Tabla 15. Tasas de fotosíntesis neta (A) y conductancia estomática (g_s), concentración intercelular de CO_2 (C_i) y eficiencia intrínseca en el uso del agua ($iWUE$) de *A. macrostachyum* crecidas a 0 y 171 mM NaCl, con y sin inocular con cuatro cepas bacterianas diferentes, después de 90 días. Los valores corresponden a la media \pm E.E. ($n = 5$). Las letras indican que los valores medios son significativamente diferentes entre sí (LSD de Fisher; $p < 0.05$). Los tratamientos 0 y 171 mM están analizados de forma independiente.

Fotosíntesis de <i>A. macrostachyum</i> 0 mM				
Tratamiento	A ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	g_s ($\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	C_i ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)	$iWUE$ ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)
No inoculada	7.5 ± 1.4^c	90 ± 20^c	215 ± 20^{bc}	85 ± 12
Hv16	14.1 ± 1.0^a	240 ± 30^a	250 ± 6^a	70 ± 14
C58	8.6 ± 1.7^{bc}	120 ± 40^b	215 ± 17^{bc}	82 ± 12
C59	5.8 ± 1.7^c	90 ± 20^c	224 ± 19^{ab}	78 ± 12
RTE9	10.9 ± 1.6^{ab}	150 ± 30^b	250 ± 10^a	76 ± 16
Fotosíntesis de <i>A. macrostachyum</i> con 171 mM				
No inoculada	7.3 ± 0.7	140 ± 20	275 ± 7^a	53 ± 4^b
Hv16	5.8 ± 1.1	100 ± 30	252 ± 9^{ab}	61 ± 7^{ab}
C58	6.8 ± 1.2	90 ± 20	232 ± 19^{ab}	86 ± 15^{ab}
C59	5.5 ± 0.6	90 ± 10	246 ± 19^{ab}	69 ± 13^{ab}
RTE9	5.6 ± 0.9	90 ± 40	215 ± 13^b	86 ± 1^a

III.3.3. Efectos de la inoculación bacteriana y la sal en la germinación de *A. macrostachyum*

Para comprobar si la inoculación con las bacterias tenía algún efecto positivo en la germinación de semillas de *A. macrostachyum*, se realizó un ensayo de germinación con tres de los cuatro tratamientos bacterianos utilizados en el ensayo anterior y, en presencia y ausencia de sal en el medio. En este ensayo observamos que en los tratamientos sin sal la inoculación no tiene un efecto beneficioso sobre la germinación (Figura 25A; LSD de Fisher; $p < 0.05$). Por el contrario, en presencia de NaCl el tratamiento sin inocular sufre una desaceleración en el reclutamiento de semillas germinadas a partir del quinto día, pero gracias a la inoculación, los tratamientos RTE9 y Hv16 no sufren ese retraso en la cinética de germinación, de manera que ésta mantiene valores finales similares a los obtenidos en los tratamientos germinados sin sal (Figura 25B; LSD de Fisher; $p < 0.05$).

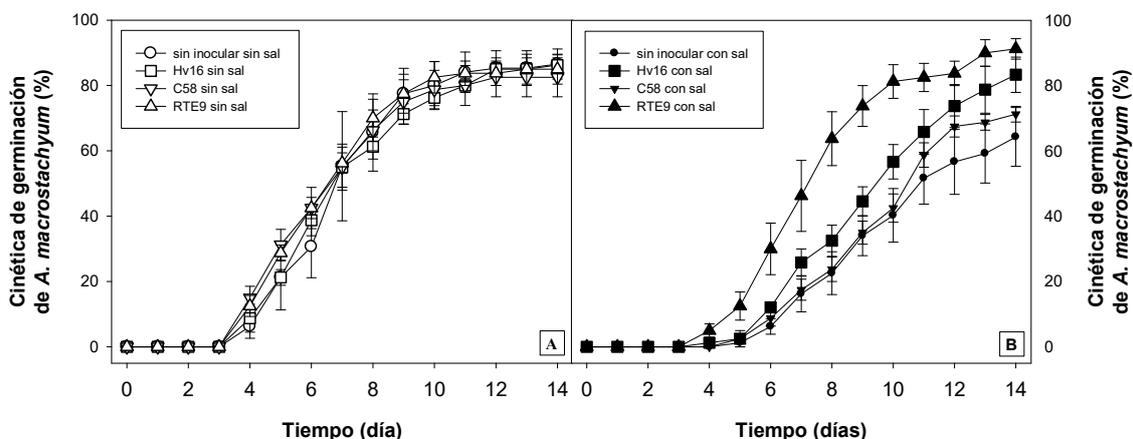


Figura 25. Porcentaje acumulado de germinación de *A. macrostachyum* crecidas a 0 (A) y 171 (B) mM NaCl, con y sin inocular con tres bacterias, lo largo de 14 días. Los valores corresponden a la media \pm E.E. (n = 4).

Igualmente, el porcentaje final de germinación en las cepas Hv16 y RTE9 mantiene los mismos valores que los obtenidos en ausencia de sal (Tabla 16). En el resto de los parámetros de germinación estudiados (día de inicio y fin de la germinación, y MTG) no se observan diferencias por la presencia/ausencia de sal.

Tabla 16. Parámetros de la germinación de *A. macrostachyum* a 0 y 171 mM NaCl, con y sin inocular con tres bacterias, después de 30 días. Los valores corresponden a la media \pm E.E. (n = 4). Las letras indican que los valores medios son significativamente diferentes entre sí (LSD de Fisher; $p < 0.05$). Los tratamientos 0 y 171 mM están analizados de forma independiente.

Características de la germinación de <i>A. macrostachyum</i> 0 mM NaCl				
Tratamiento	Porcentaje final (%)	Primera germinación (d)	Última germinación (d)	MTG (d)
No inculada	86 \pm 5	5 \pm 1	11 \pm 1	7.2 \pm 0.6
Hv16	86 \pm 3	4 \pm 1	12 \pm 1	7.2 \pm 0.3
C58	83 \pm 6	4 \pm 0	11 \pm 2	6.6 \pm 0.3
RTE9	88 \pm 3	4 \pm 0	12 \pm 3	6.9 \pm 0.2
Características de la germinación de <i>A. macrostachyum</i> 171 mM NaCl				
No inculada	64 \pm 5 ^a	6 \pm 1	14 \pm 0	9.6 \pm 0.4
Hv16	85 \pm 6 ^b	6 \pm 1	14 \pm 1	9.3 \pm 0.2
C58	71 \pm 2 ^{ab}	6 \pm 1	13 \pm 1	9.4 \pm 0.2
RTE9	91 \pm 3 ^b	5 \pm 1	14 \pm 2	8.8 \pm 0.4

Respecto al control biológico de hongos en la germinación, de forma general, aparecieron más colonias fúngicas en los tratamientos salinos (Figura 26). En este sentido, cabe destacar la capacidad de biocontrol que ejerce la cepa Hv16 cuando las semillas germinan en presencia de sal, pues redujo la aparición de colonias en un 50% respecto al tratamiento no inoculado (Figura 26).

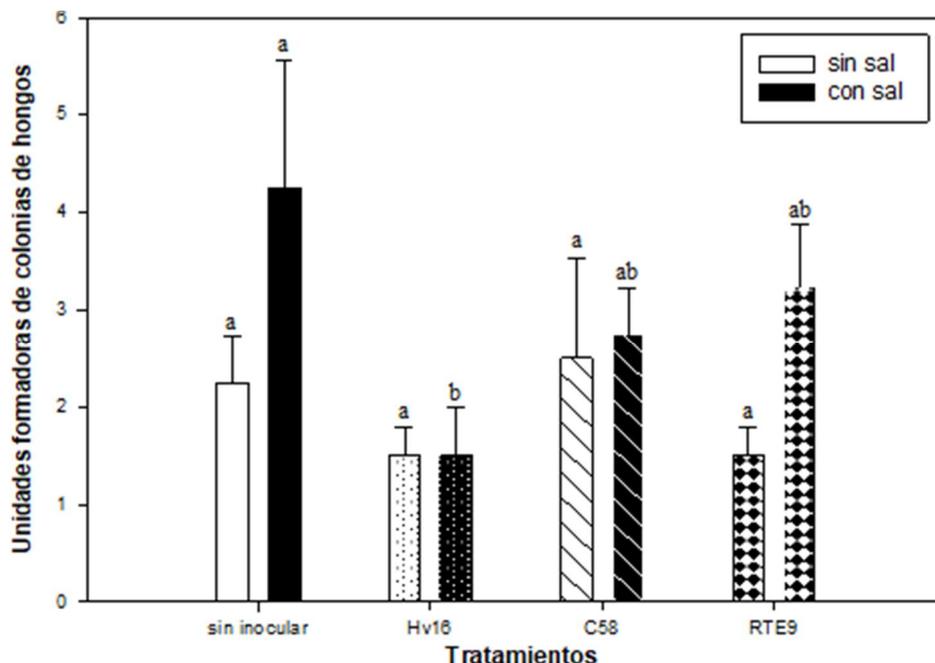


Figura 26. Aparición de unidades formadoras de colonias de hongos en la germinación de *A. macrostachyum* a 0 y 171 mM NaCl, con y sin inocular con tres bacterias, después de 30 días. Los valores corresponden a la media \pm E.E. ($n = 4$). Las letras indican que los valores de las medias son significativamente diferentes tras analizar la varianza (U de Mann-Whitney; $p < 0.05$). Los tratamientos con y sin sal están analizados de forma independiente.

III.3.4. Influencia de la inoculación bacteriana en el estaquillado de *A. macrostachyum*

Tras comprobar el efecto beneficioso de las bacterias, tanto en el crecimiento como en la germinación de *A. macrostachyum*, se nos planteó la duda de cómo afectarían al posible estaquillado de esta planta. Por ello, y basándonos en la experiencia previa en el estaquillado de plantas semileñosas de Montero-Calasanz *et al.* (2013), nos propusimos realizar un ensayo para averiguarlo. De esta manera, inoculamos estaquillas de *A. macrostachyum* con las mismas bacterias utilizadas en el ensayo de germinación y, trascurridos 60 días se determinaron parámetros relativos tanto al crecimiento como al estado fisiológico de las plantas.

III.3.4.1. Crecimiento vegetal

Transcurridos dos meses desde la inoculación, no se observaron diferencias significativas en las ramas (Tabla 17) aunque sí se aprecia una tendencia, en la cual la longitud de los esquejes inoculados es ligeramente superior a los no inoculados. Por otro lado, centrándonos en el crecimiento radical, se observa que si está bajo la influencia de los inóculos. En especial la cepa Hv16, que promueve la elongación radical aproximadamente un 20% más que el tratamiento control. Además de favorecer la elongación radical, esta cepa junto a la C58, estimularon la producción de raíces, de manera que el peso seco de ambas fue casi un 20 % superior respecto al del tratamiento sin inocular (Tabla 17).

Tabla 17. Biomasa y biometría de la rama y la raíz de estaquillas de *A. macrostachyum* inoculado con tres cepas bacterianas diferentes, después de 60 días. Los valores corresponden a la media \pm E.E. (n = 4). Las letras indican que los valores medios son significativamente diferentes entre sí (LSD de Fisher; $p < 0.05$).

Tratamiento	Características esquejes de <i>A. macrostachyum</i>					
	Rama				Raíz	
	Longitud (cm)	Peso seco (mg)	CHR (%)	RGR (mg g ⁻¹ día ⁻¹)	Longitud (cm)	Peso seco (mg)
No inoculada	82 \pm 6	43 \pm 3	89 \pm 2 ^a	25 \pm 3	44 \pm 4 ^b	8.6 \pm 0.6 ^b
Hv16	88 \pm 5	45 \pm 3	79 \pm 2 ^b	25 \pm 3	52 \pm 4 ^a	10.4 \pm 0.6 ^a
C58	84 \pm 6	38 \pm 3	87 \pm 2 ^a	21 \pm 3	48 \pm 5 ^{ab}	10.4 \pm 0.6 ^a
RTE9	80 \pm 5	39 \pm 3	72 \pm 2 ^c	27 \pm 2	47 \pm 5 ^{ab}	8.8 \pm 0.7 ^{ab}

III.3.4.2. Intercambio de gases

Respecto a los parámetros fotosintéticos, de los cuatro parámetros medidos, solo la tasa de fotosíntesis neta y la eficiencia intrínseca en el uso del agua presentaron diferencias significativas. Así para el parámetro A, los tratamientos con mayor tasa (y significativamente diferentes) fueron RTE9 y C58, alcanzando valores que fueron un 28 y un 14 % superiores al tratamiento control, respectivamente (Tabla 18). En cuanto al parámetro iWUE, fueron las cepas RTE9 y Hv16 las que presentaron los valores más altos, estando la cepa RTE9 cercana a duplicar el valor de la eficiencia respecto a los esquejes no inoculados, y mostrando la cepa Hv16 un valor 36 % superior al tratamiento control (Tabla 18).

Tabla 18. Tasas de fotosíntesis neta (A) y de conductancia estomática (g_s), concentración intercelular de CO_2 (C_i) y eficiencia en el uso del agua ($iWUE$) de estaquillas de *A. macrostachyum* inoculado con tres cepas bacterianas diferentes, después de 60 días. Los valores corresponden a la media \pm E.E. ($n = 4$). Las letras indican que los valores medios son significativamente diferentes entre sí (LSD de Fisher; $p < 0.05$).

Tratamiento	Parámetros fotosintéticos de los esquejes de <i>A. macrostachyum</i>			
	A ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	g_s ($\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	C_i ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)	$iWUE$ ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)
No inoculada	6.9 ± 0.2^c	150 ± 20	306 ± 5	45 ± 4^c
Hv16	7.3 ± 0.1^{bc}	130 ± 20	289 ± 12	61 ± 5^{ab}
C58	7.9 ± 0.4^{ab}	150 ± 10	296 ± 6	53 ± 3^{bc}
RTE9	8.8 ± 0.4^a	123 ± 17	281 ± 11	70 ± 10^a

III.4. Discusión

La influencia de la salinidad en la interacción planta-bacteria es un campo de estudio que actualmente está en auge. Sin embargo, en lo que concierne a la antigua familia *Chenopodiaceae* no existen muchos estudios que aborden este campo. Además, la mayoría de ellos se centran en plantas de interés comercial, como los realizados por Yang *et al.* (2016) con la quinoa (*Chenopodium quinoa*) o los realizados por Piernik (2017) al aplicar cepas bacterianas aisladas de *Salicornia europea* a la remolacha (*Beta vulgaris*) crecida bajo estrés salino. Respecto a las especies naturales, cabe destacar los trabajos de Asghari *et al.* (2005) quienes estudiaron cómo afectaba la inoculación con otro tipo de microorganismos (micorrizas arbusculares) al crecimiento de *Atriplex nummularia* frente al NaCl y, los de Ozawa *et al.* (2007) y Navarro-Torre *et al.* (2017), quienes aislaron diferentes cepas endófitas bacterianas (de la endorizosfera de *Salicornia europea* y la filosfera de *A. macrostachyum*, respectivamente) para aplicarlas sobre esas mismas especies en un gradiente salino. Por otra parte, Bashan *et al.* (2000) aplicaron bacterias rizosféricas aisladas en zonas salinas, a *Salicornia bigelovii* bajo una sola concentración de sal.

En esta Tesis Doctoral se pone de manifiesto cómo bacterias aisladas de la rizosfera de *A. macrostachyum*, con propiedades PGP, favorecen el crecimiento de esta misma planta en condiciones que no le son favorables, mejoran la germinación de las semillas e incluso ayudan al estaquillado de la planta. Redondo-Gómez *et al.* (2010) describieron que *A. macrostachyum* está muy adaptada a la salinidad, lo que corrobora que su óptimo de crecimiento se sitúe entre 200 - 400 mM (Khan *et al.*, 2005). En este trabajo se ha conseguido aumentar, mediante la inoculación con bacterias rizosféricas, la

superficie fotosintética de las ramas de *A. macrostachyum* de plantas crecidas durante tres meses en ausencia de sal (ambiente estresante para una halófita estricta), hecho que se refleja gracias al aumento de la longitud de la rama principal y la presencia de más ramas secundarias. Este último efecto, que se observó con la cepa Hv16, coincide con los datos obtenidos por Bashan *et al.* (2000) en la halófita *Salicornia bigelovii* al ser inoculada con cepas, de forma individual o en consorcio, aisladas de rizosferas de plantas del mismo ecosistema.

Igualmente, en la siguiente fase del ensayo, en la cual la mitad de las plantas crecieron en condiciones de salinidad, se observaron diferencias en el efecto que las bacterias tienen sobre el crecimiento vegetal de *A. macrostachyum*. Así, cuando *A. macrostachyum* crece sin sal, la inoculación con bacterias PGP propició una mayor biomasa, tanto en ramas como en raíces. Esto contrasta con los resultados obtenidos por Navarro-Torre *et al.* (2017), quienes no detectaron cambios en estos mismos parámetros en plantas de *A. macrostachyum* inoculadas con endófitos en las mismas condiciones. Además, en el tratamiento con sal se constató un beneficio de casi todos los inoculantes sobre las raíces. Esto supone una mejora respecto a otros trabajos similares realizados con *Chenopodiaceas* halófitas y bacterias. Así, mientras que en esta Tesis se cuantificó un aumento entre un 50-70 % en la cantidad de raíces, trabajos anteriores como el de Ozawa *et al.* (2007), utilizando *Salicornia europea* inoculada con una bacteria PGP fijadora de nitrógeno o el de Navarro-Torre *et al.* (2017), inoculando *A. macrostachyum* con endófitos PGP, no detectaron dicha mejora en las raíces. La explicación a que un inóculo en plantas halófitas tenga menos efecto en un medio con sal puede tener dos vertientes (o un punto intermedio entre ambas). Por un lado, Egamberdieva *et al.* (2017) describieron que la efectividad de las bacterias PGP depende del ambiente en el que se encuentran, es decir, que el medio salino pudiese afectar a la bacteria, pero debido a que todas las cepas utilizadas en este trabajo soportan concentraciones salinas mucho más elevadas que la planta (capítulo II y apéndice II), es poco probable que se deba a ello. Más bien podría ser que la presencia de NaCl sea un factor de mayor importancia que el inoculante en la producción de biomasa vegetal. De manera que la presencia de una concentración idónea de sal estimula más el crecimiento de *A. macrostachyum* que el propio inóculo, enmascarando así el efecto que se produce cuando la planta está creciendo en condiciones estresantes (sin sal), en las que las auxinas bacterianas pueden actuar como antagonistas de las señales de estrés que bloquean el crecimiento de la planta (Glick *et al.*, 1998).

Respecto al intercambio gaseoso, se observó el mismo efecto descrito para la biomasa. En un medio sin sal, la tasa fotosintética se correlaciona con un aumento en la biomasa producida. Aquí de nuevo se manifiesta como, en condiciones no favorables para *A. macrostachyum*, las cepas Hv16, C58 y RTE9 permiten que se potencie el intercambio gaseoso de la planta. Hecho que no se había puesto de manifiesto con anterioridad aun con condiciones similares, pero con otras cepas bacterianas (Navarro-Torre *et al.*, 2017). Por el contrario, los tratamientos que contenían sal no presentaron diferencias en la fotosíntesis. Esto podría relacionarse con el efecto que tiene la sal sobre la superficie fotosintética de *A. macrostachyum*, pues como describe Redondo-Gómez *et al.* (2010), esta planta respecto a la salinidad tiene un óptimo (entre los 171-510 mM) en el cual aumenta la superficie fotosintética gracias a un aumento en el diámetro de sus ramas. Por ello, para idéntica tasa de fijación de CO₂, los tratamientos con sal presentaron más superficie fotosintética.

Atendiendo a la germinación, se considera que es un proceso clave para que se establezca bien una planta. En las halófitas puede considerarse todavía una fase más sensible, pues aun necesitando o siendo tolerantes a la sal de adultas, en la germinación la gran mayoría de especies suelen ser sensibles a dicho factor (Mohammad y Sen, 1990). En este sentido, las bacterias utilizadas vuelven a jugar un papel fundamental cuando la planta está expuesta a un factor estresante como es el NaCl en el momento de la germinación. Son varios los aspectos a destacar de las bacterias en esta fase, siendo el más importante que la presencia de las cepas Hv16 y RTE9 permitiera obtener porcentajes de germinación similares a los obtenidos cuando no hay estrés salino. Además, en presencia de sal la cepa RTE9 destaca en otro aspecto y es que en la cinética de germinación (Figura 25B) se dio una aceleración (la pendiente de su curva es más pronunciada). Dicho proceso indica que, a un momento determinado de tiempo, siempre hubo más semillas germinadas si estaban inoculadas con RTE9. Desde un punto de vista ecológico se reclutan más individuos en menos tiempo, lo cual es una ventaja frente a posibles factores que pongan en compromiso la aparición de nuevos individuos de *A. macrostachyum* (oscilaciones en la inundación, la temperatura, la salinidad, etc.). Con respecto al porcentaje final de germinación, en este trabajo se han obtenido valores similares a los de Navarro-Torre *et al.* (2017), quienes inocularon semillas de *A. macrostachyum* con bacterias endófitas de la misma planta y las germinaron a 0'9 % de NaCl, aunque en su caso no obtuvieron la aceleración en el reclutamiento que se ha descrito en este trabajo. La explicación a esta mejora en la germinación puede atribuirse

a la presencia de AIA producido por las bacterias. Esta hormona influye sobre algunas enzimas como la α -amilasa que facilitan la asimilación del almidón, y esto a su vez induce una germinación temprana incluso en situaciones de estrés (Din *et al.*, 2019).

Otro aspecto a destacar en el ensayo de germinación es el biocontrol de los hongos, ya que, aun desinfectando la semilla superficialmente, hay hongos asociados a la zona más profunda de la testa difíciles de erradicar. En este sentido, la cepa Hv16 ha demostrado controlar la proliferación de los hongos *in vitro* y en presencia de sal. Esta especie no se había descrito como biocontroladora, aunque otras especies de su género (*Kocuria rosea*) se han descrito como tales en tubérculos de patata (Michaud *et al.*, 2002).

Por último, se determinó que los esquejes de *A. macrostachyum* tienen la capacidad de enraizar, proceso que no se había descrito hasta ahora. El enraizamiento de estaquillas es un proceso a tener en cuenta, pues permitiría su multiplicación asexual, acelerándose la producción de la planta, ya que la obtención de las mismas a partir de semillas es un proceso bastante más lento. Además, se ha podido constatar cómo el uso de las bacterias mejora el enraizamiento de estas estaquillas, reflejándose tanto en la mayor cantidad de raíces producidas, como en la mayor longitud alcanzada. De hecho, otros autores han descrito resultados positivos que concuerdan con lo obtenido en este trabajo respecto al estaquillado auxiliado mediante cepas bacterianas productoras de AIA a nivel de invernadero. Así, Montero-Calasanz *et al.* (2013) lo describieron para *Olea europaea* o Zenginbal y Demir (2018) para dos especies del género *Morus*. Además, gracias a que se ha realizado un análisis del intercambio gaseoso, se podría relacionar la inoculación de bacterias productoras de auxinas con que una gran parte del flujo de CO₂ fijado por *A. macrostachyum* (mayor valor de A en todos los tratamientos inoculados) se orientase a la producción de raíces y no a la producción de parte aérea.

III.5. Bibliografía

Asghari, H. R., Marschner, P., Smith, S. E. y Smith, F. A. 2005. Growth response of *Atriplex nummularia* to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi at different salinity levels. *Plant and Soil*, 273 (1-2): 245-256.

Bashan, Y., Moreno, M. y Troyo, E. 2000. Growth promotion of the seawater-irrigated oilseed halophyte *Salicornia bigelovii* inoculated with mangrove rhizosphere

bacteria and halotolerant *Azospirillum spp.* *Biology and Fertility of Soils*, 32 (4): 265-272.

Din, B. U., Sarfraz, S., Xia, Y., Kamran, M. A., Javed, M. T., Sultan, T., Munis, M. F. H. y Chaudhary, H. J. 2019. Mechanistic elucidation of germination potential and growth of wheat inoculated with exopolysaccharide and ACC-deaminase producing *Bacillus* strains under induced salinity stress. *Ecotoxicology and environmental safety*, 183: 109466.

Egamberdieva, D., Davranov, K., Wirth, S., Hashem, A., Fathi, y Abdallah E. 2017. Impact of soil salinity on the plant-growth – promoting and biological control abilities of root associated bacteria. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24 (7): 1601-1608.

Ellis, R. H. y Roberts, E. H. 1978. Towards a rational basis for testing seed quality, en Seed Production. *Butterworths*, Londres, Inglaterra, 694 pp.

Glick, B. R., Penrose, D. M., y Li, J. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of theoretical biology*, 190 (1): 63-68.

Hoagland, D. R. y Arnon, D. I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station*, 347: 1-32.

Hewitt, E. J. 1952. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. *Commonwealth Agricultural Bureaux*, Farnham Royal, Inglaterra: 547 pp.

Khan M. A., Ungar I. A. y Showalter A. M. 2005. Salt stimulation and tolerance in an intertidal stem-succulent halophyte. *Journal of Plant Nutrition*, 28: 1365-1374.

- Khalid, A., Arshad M. y Zahir, Z.A.** 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*, 96 (3): 473-80.
- Maxwell, K. y Johnson, G. N.** 2000. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51 (345): 659-668.
- Michaud, M., Martinez, C., Simao-Beunoir, A. M., Bélanger, R. R. y Tweddell, R. J.** 2002. Selection of antagonist microorganisms against *Helminthosporium solani*, causal agent of potato silver scurf. *Plant Disease*, 86 (7): 717-720.
- Montero-Calasanz, M. C.** 2011. Inducción del enraizamiento en estaquillas de olivo mediante el empleo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR). *Tesis doctoral Universidad de Sevilla*, Sevilla, España, 263 pp.
- Montero-Calasanz, M. C., Santamaría, C., Albareda, M., Daza, A., Duan, J., Glick, B. R. y Camacho, M.** 2013. Alternative rooting induction of semi-hardwood olive cuttings by several auxin-producing bacteria for organic agriculture systems. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 11 (1): 146-154.
- Mohammad, S. y Sen, D. N.** 1990. Germination behaviour of some halophytes in Indian desert. *Indian Journal of Experimental Biology*, 28: 545-549.
- Navarro-Torre, S., Barcia-Piedras, J. M., Mateos-Naranjo, E., Redondo-Gómez, S., Camacho, M., Caviedes, M. A., Pajuelo, E. y Rodríguez-Llorente, I. D.** 2017. Assessing the role of endophytic bacteria in the halophyte *Arthrocnemum macrostachyum* salt tolerance. *Plant Biology*, 19: 249-256.
- Ozawa, T., Wu, J. y Fujii, S.** 2007. Effect of inoculation with a strain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* isolated from the endorhizosphere of *Salicornia europaea* on salt tolerance of the glasswort. *Soil Science and Plant Nutrition*, 53 (1): 12-16.

- Patten C. L. y Glick B. R.** 2002. Role of *Pseudomonas putida* indolacetic acid in development of the host plant root system. *Applied Environmental Microbiology*, 68: 3795-3801.
- Penrose, D. M. y Glick, B. R.** 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum*, 118 (1):10-15.
- Piernik, A., Hryniewicz, K., Wojciechowska, A., Szymanska, S., Lis, M.I. y Muscolo, A.** 2017. Effect of halotolerant endophytic bacteria isolated from *Salicornia europaea* L. on the growth of fodder beet (*Beta vulgaris* L.) under salt stress. *Archives of Agronomy and oil Science*, 63 (10): 1404-1418.
- Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Figueroa, E. y Davy, A.** 2010. Salt stimulation of growth and photosynthesis in an extreme halophyte, *Arthrocnemum macrostachyum*. *Plant Biology*, 12: 79-87.
- Schreiber, U., Schliwa, W. y Bilger, U.** 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research*, 10: 51-62.
- Von Caemmerer S. y Farquhar G. D.** 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta*, 153: 377-387.
- Yang, A., Akhtar, S. S., Iqbal, S., Amjad, M., Naveed, M., Zahir, Z. A. y Jacobsen, S.** 2016. Enhancing salt tolerance in quinoa by halotolerant bacterial inoculation. *Functional Plant Biology*, 43 (7): 632-642.
- Zenginbal, H. y Demir, T.** 2018. Effects of some rhizobacteria and indole-3-butyric acid on rooting of black and white mulberry hardwood cuttings. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 28 (5): 1426-1431.

CAPÍTULO IV

Efectos de la inoculación y la sal sobre diferentes estadios del desarrollo de *A. macrostachyum*

IV.1. Objetivos

Los objetivos de este capítulo fueron: (1) conocer si la interacción entre *A. macrostachyum* y la bacteria depende de la fase del ciclo biológico en el que se encuentra la planta cuando se produce la inoculación (semilla o plántula); y (2) determinar si la presencia de una concentración subóptima de sal influye en dicha interacción, puesto que en el capítulo anterior no se observó efecto de los inoculantes cuando en el medio había una concentración de sal de 171 mM. Para ello, se utilizó la cepa bacteriana OR133 (*Pseudomonas lurida*) en interacción con *A. macrostachyum* en concentraciones de 0 y 86 mM de cloruro sódico.

IV.2. Materiales y Métodos

IV.2.1. Microorganismos

La cepa bacteriana OR133 que se utilizó en este trabajo se aisló de la rizosfera de una planta no determinada de la marisma del río Odiel (37° 9' 3.6" N - 6° 53' 56.2" O). La secuenciación del ARN 16S permitió clasificarla como *Pseudomonas lurida*. Esta cepa se ha caracterizado como PGPR, determinándose que produce una pequeña cantidad de auxinas, solubiliza fosfatos, produce sideróforos y en especial presenta la actividad ACC desaminasa. En cuanto a actividades relacionadas con biocontrol, posee actividades lipasa y proteasa e inhibe el crecimiento de algunos hongos y bacterias patógenos. La multiplicación de la bacteria OR133 y su resuspensión para la inoculación se realizó como se describe en el apartado II.2.1. del Capítulo II.

IV.2.2. Material vegetal

En este trabajo se utilizaron semillas de *A. macrostachyum* (Moris.) C. Koch recolectadas en la marisma del río Piedras, SO de la Península Ibérica (37° 13.7' 7" N - 7° 11' 7.2" O) en septiembre de 2016. Una vez recolectadas las semillas fueron conservadas a 5 °C hasta su uso.

IV.2.3. Ensayo 1: efectos en la germinación de *A. macrostachyum* de la cepa OR133 y la sal

IV.2.3.1. Material vegetal e inoculación

La desinfección, inoculación y germinación de las semillas de *A. macrostachyum* se describen en el Capítulo III (apartados III.2.2. y III.2.3.1.). Se realizaron cinco réplicas por tratamiento (50 semillas) y, al igual que en el Capítulo III, se anotó el número de colonias de hongos que aparecieron en cada placa ($n = 5$).

IV.2.4. Ensayo 2: influencia del momento de la inoculación, la cepa bacteriana OR133 y la sal sobre *A. macrostachyum*

IV.2.4.1. Crecimiento vegetal e inoculación

Los tratamientos utilizados en este ensayo son ocho. Cuatro de ellos son plantas procedentes del ensayo 1, a los que a partir de ahora se les denominará “tratamientos semillas” (Tabla 19). Para los otros cuatro tratamientos, se utilizaron semillas germinadas en las mismas condiciones, pero sin inocular. Éstos se conocerán como “tratamientos plántulas” (Tabla 19).

Todas las plantas (inoculadas y no inoculadas) se pasaron a macetas con un sustrato inerte de perlita-vermiculita 2:1 (v/v) que se colocaron en el invernadero del CITIUS de la Universidad de Sevilla (37° 21' 32.6" N - 5° 59' 13.4" O) en las condiciones ya descritas en el Capítulo III (apartado III.2.5.1.). Las macetas se repartieron en bandejas que contenían solución Hoagland al 20 % (Hoagland y Arnon, 1950); solución que se renovó cada quince días durante todo el ensayo.

Transcurrido un mes desde el trasplante, a los tratamientos con sal se les adicionó ésta hasta alcanzar una concentración de 86 mM y los “tratamientos plántulas” se inocularon como se describe en el Capítulo III, (apartado III.2.3.1.). El ensayo se mantuvo en estas condiciones tres meses. Durante el primer mes se realizó un recuerdo semanal de la inoculación, mientras que en los dos siguientes meses el recordatorio fue mensual. En la Tabla 19 se resumen los ocho tratamientos configurados en este ensayo:

Tabla 19. Configuración de los tratamientos utilizados en el ensayo para conocer la influencia del inicio de la inoculación, la cepa bacteriana OR133 y la sal sobre plantas de *A. macrostachyum*.

	Tratamiento	Inicio inoculación	[NaCl] (mM)	Inoculación	
Semilla	0 mM	No-inoculada	Semilla	0	No
		OR133	Semilla	0	Sí
	86 mM	No-inoculada	Semilla	86	No
		OR133	Semilla	86	Sí
Plántula	0 mM	No-inoculada	Plántula	0	No
		OR133	Plántula	0	Sí
	86 mM	No-inoculada	Plántula	86	No
		OR133	Plántula	86	Sí

Al final del experimento, además de las medidas descritas en el Capítulo III (apartado III.2.3.2.1.), se determinó el potencial osmótico (Ψ_o) de las ramas primarias ($n = 10$), utilizando una técnica psicrométrica mediante un osmómetro de presión de vapor 5600 Vapro (Wescor[®], USA).

IV.2.4.2. Intercambio de gases

Antes de cosechar las plantas, en el ápice de la rama principal de 6 plantas de cada uno de los tratamientos se midió el intercambio de gases mediante un analizador de gases por infrarrojo (LI-6400XT, LI-COR[®], USA) (Capítulo III, apartado III.2.5.3.).

IV.2.4.3. Pigmentos

Antes del cosechado de las plantas, se tomaron muestras de ramas al azar ($n = 6$) y se congelaron en nitrógeno líquido para más tarde liofilizarlas durante 72 h en oscuridad, para evitar la fotodegradación de los pigmentos (Duarte *et al.*, 2015). Luego, las muestras se homogeneizaron en 5 ml de acetona pura. La extracción de los pigmentos se produce durante las siguientes 24 h en oscuridad a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A continuación, las muestras se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 minutos. Se realizaron lecturas del sobrenadante en un espectrofotómetro de doble haz (Hitachi[®], Japón) de 1 nm en 1 nm entre los 350 a 750 nm de longitud de onda. La curva de absorbancia obtenida se usó para la cuantificación de pigmentos gracias a una biblioteca de adaptación de espectros de la curva de Gauss utilizando el programa informático SigmaPlot[®] (Küpper *et al.*, 2007).

IV.2.5. Estadística

Los valores corresponden a la media \pm error estándar (E. E.). Debido a que el factor “momento de la inoculación” tuvo un efecto muy potente sobre *A. macrostachyum*, enmascaró los efectos de los otros dos factores (sal e inoculación) sobre las variables analizadas, por ello se analizaron de forma independiente las muestras del tratamiento “semilla” y “plántula”. Se testó la normalidad con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y para comprobar la homocedasticidad el test de Brown-Forsythe. Para detectar si existió interacción entre los factores sal e inoculación sobre las diferentes variables medidas se utilizó el modelo lineal general (LGM; $p < 0.05$). Por último, con el fin de concretar las diferencias significativas se realizó el análisis post-hoc del Chi Cuadrado de Wald ($p < 0.05$).

IV.3. Resultados

IV.3.1. Ensayo 1: efectos en la germinación de *A. macrostachyum* de la cepa OR133 y la sal

La cinética de germinación de las semillas de *A. macrostachyum* sin inocular e inoculadas con la cepa OR133, en presencia y ausencia de sal se muestra en la Figura 27. Cabe destacar que el tratamiento con sal e inoculado, aceleró el reclutamiento de plántulas a partir del noveno día. Esto permitió que, el número de germinaciones totales en dicho tratamiento fuese casi un 20 % superior al mismo tratamiento sin inocular, alcanzando valores idénticos a los obtenidos en los tratamientos sin sal (Figura 27 y Tabla 20). Respecto al resto de parámetros, podemos observar que la sal produce un retraso en la germinación.

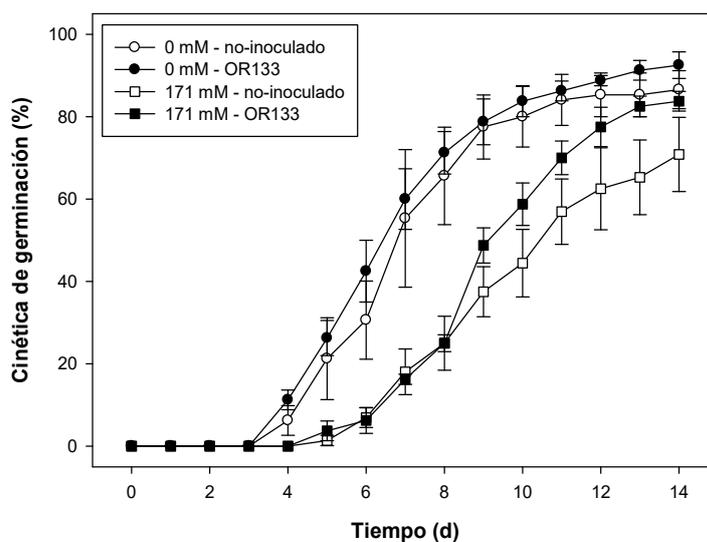


Figura 27. Porcentaje acumulado de germinación de *A. macrostachyum* crecidas a 0 y 171 mM NaCl, con y sin inocular con la cepa bacteriana OR133, a lo largo de 14 días. Los valores corresponden a la media \pm E.E. (n = 4).

Tabla 20. Parámetros de la germinación de *A. macrostachyum* crecidas a 0 y 171 mM NaCl, con y sin inocular con la cepa bacteriana OR133, después de 30 días. Los valores corresponden a la media \pm E.E. (n = 4). Las letras indican que los valores medios son significativamente diferentes entre sí (prueba de Wald; $p < 0.05$).

Características de la germinación de <i>A. macrostachyum</i> 0 mM NaCl				
Tratamiento	Porcentaje final (%)	Primera germinación (d)	Última germinación (d)	MTG (d)
No inoculada	86.6 \pm 4.9 ^a	5 \pm 1 ^{ab}	11 \pm 1 ^a	7.2 \pm 0.6 ^a
OR133	92.5 \pm 3.2 ^a	4 \pm 0 ^a	13 \pm 1 ^{ab}	7.1 \pm 0.2 ^a
Características de la germinación de <i>A. macrostachyum</i> 171 mM				
No inoculada	64.3 \pm 9.0 ^b	6 \pm 1 ^c	14 \pm 0 ^b	9.6 \pm 0.4 ^b
OR133	83.8 \pm 2.4 ^a	6 \pm 1 ^{bc}	13 \pm 1 ^{ab}	9.4 \pm 0.2 ^b

Además, al observar las colonias de hongos que se formaban en las placas, se detectó que éstos parecen crecer mejor con la sal. Pero que, en ambos casos (con y sin sal), la bacteria tenía la capacidad de controlar el número de colonias que se generaban (Figura 28).

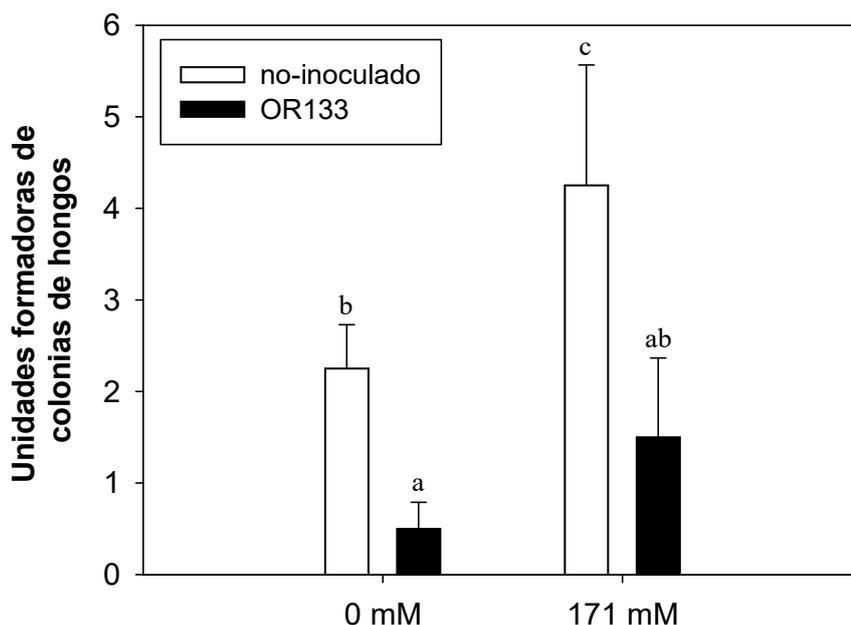


Figura 28. Cuantificación de unidades formadoras de colonias en la germinación plántulas de *A. macrostachyum* crecidas a 0 y 171 mM NaCl, con y sin inocular con la cepa bacteriana OR133, después de 30 días. Los valores corresponden a la media \pm E.E. ($n = 4$). Las letras indican que los valores de las medias son significativamente diferentes tras analizar la varianza (prueba de Wald; $p < 0.05$).

IV.3.2. Ensayo 2: influencia del momento de la inoculación, la cepa bacteriana OR133 y la sal sobre *A. macrostachyum*

IV.3.2.1. Crecimiento vegetal

Centrándonos en los datos de biomasa, hubo patrones diferentes según el momento de la inoculación. Así, cuando *A. macrostachyum* se inoculó a nivel de semilla existió una interacción entre los factores sal e inóculo, de manera que llegó a ser el tratamiento de mayor peso de ramas y raíces (Wald; $p < 0.05$) (Tabla 21). Sin embargo, cuando se inoculó a nivel de plántula, sólo el factor sal produjo un aumento en la biomasa. Respecto al resto de variables no se dio una interacción entre ambos factores.

En el contenido hídrico tanto en los tratamientos “semillas” como en los “plántulas” se dio la misma tendencia. De manera que en presencia 86 mM NaCl no hay diferencias, pero sin sal el inóculo tiende a mejorar el CHR de *A. macrostachyum* (Tabla 21).

Para la biometría, en los tratamientos “semillas” la bacteria tuvo diferentes efectos positivos. Así, en la longitud de la rama principal al haber sal, el tratamiento inoculado

con OR133 fue el más largo de todos. Fijándonos en el diámetro de la rama principal, en ausencia de sal el tratamiento inoculado ganó en grosor respecto al no inoculado. Por último, la raíz alcanzó una longitud mayor cuando se inoculó *A. macrostachyum*, independientemente de la sal. Sin embargo, en los tratamientos “plántula” o no hay diferencias, como pasa con la longitud de la rama principal; o es la sal el factor que hace que aumenten de diámetro la rama principal y la longitud de las raíces de *A. macrostachyum* (Tabla 21).

Atendiendo al potencial osmótico, sin sal en el medio no hubo ningún efecto de la bacteria. Pero a 86 mM NaCl, de nuevo en los tratamientos “semilla” se dio una interacción entre los factores sal e inoculación (Wald; $p < 0.05$). En esta interacción, el tratamiento inoculado con sal presentó un potencial osmótico mayor que el tratamiento no inoculado, A su vez, en los tratamientos “plántula”, solo el factor sal fue significativo (Wald; $p < 0.05$) con un efecto inverso al descrito para los tratamientos “semilla” (Figura 29).

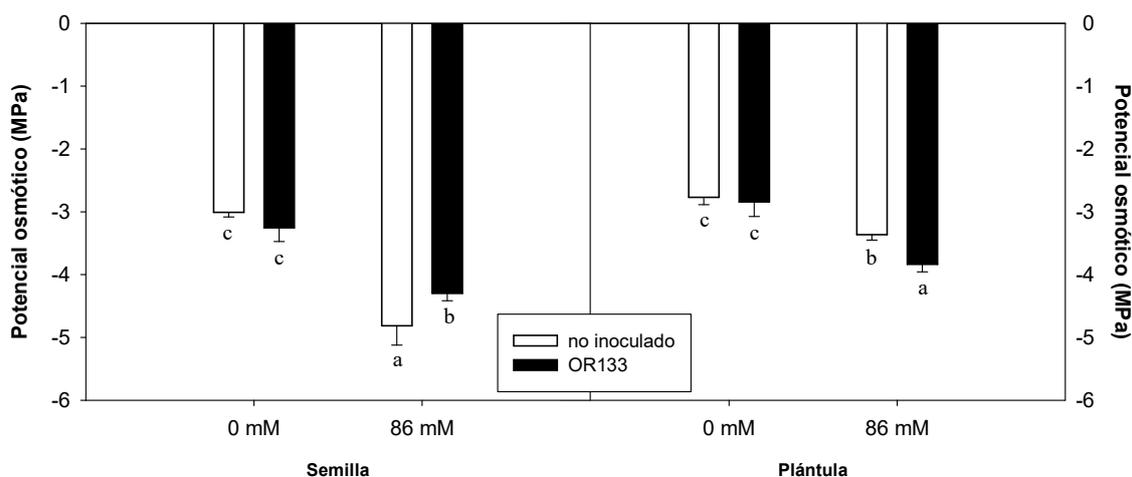


Figura 29. Potencial osmótico (Ψ_0) de semillas y plántulas de *A. macrostachyum* crecidas a 0 y 86 mM NaCl, con y sin inocular con la cepa bacteriana OR133, después de 90 días. Los valores corresponden a la media \pm E.E. ($n = 6$). Las letras indican que los valores medios son significativamente diferentes entre sí (prueba de Wald; $p < 0.05$). Los tratamientos semilla y plántula están analizados de forma independiente.

Tabla 21. Biomasa y biometría, de las ramas y la raíz, de *A. macrostachyum* crecidas a 0 y 86 mM NaCl, con y sin inocular con la cepa bacteriana OR133, después de 90 días. Los valores corresponden a la media \pm E.E. (n = 10). Los valores corresponden a la media \pm E.E. (n = 6). Las letras indican que los valores medios son significativamente diferentes entre sí (prueba de Wald; p < 0.05).

Tratamiento	Peso seco rama	CHR	Peso seco raíz	Longitud rama principal	Díámetro rama principal	Longitud raíz	
	(g)	(%)	(g)	(mm)	(mm)	(cm)	
Inoculación: semilla							
0 mM	No-inoculada	0.479 \pm 0.080 ^c	75.3 \pm 4.7 ^{bc}	0.084 \pm 0.014 ^c	20.9 \pm 1.8 ^c	1.68 \pm 0.07 ^c	17.3 \pm 1.5 ^b
	OR133	0.538 \pm 0.064 ^c	81.9 \pm 1.5 ^{ab}	0.105 \pm 0.010 ^c	22.5 \pm 1.9 ^{bc}	1.91 \pm 0.08 ^b	26.2 \pm 1.7 ^a
86 mM	No-inoculada	1.597 \pm 0.220 ^b	80.4 \pm 2.4 ^{ab}	0.255 \pm 0.033 ^b	25.9 \pm 1.4 ^b	2.51 \pm 0.05 ^a	19.6 \pm 1.7 ^b
	OR133	2.739 \pm 0.204 ^a	87.4 \pm 2.8 ^a	0.438 \pm 0.038 ^a	31.6 \pm 1.6 ^a	2.65 \pm 0.09 ^a	26.1 \pm 1.6 ^a
Inoculación: plántula							
0 mM	No-inoculada	0.505 \pm 0.059 ^b	58.6 \pm 6.8 ^c	0.113 \pm 0.012 ^b	27.0 \pm 1.7	1.66 \pm 0.09 ^b	19.4 \pm 1.2 ^b
	OR133	0.562 \pm 0.057 ^b	70.1 \pm 2.0 ^b	0.129 \pm 0.014 ^b	26.9 \pm 1.9	1.94 \pm 0.09 ^b	19.6 \pm 1.5 ^b
86 mM	No-inoculada	1.536 \pm 0.149 ^a	82.2 \pm 3.7 ^a	0.397 \pm 0.050 ^a	28.0 \pm 1.3	2.44 \pm 0.12 ^a	25.2 \pm 1.7 ^a
	OR133	1.971 \pm 0.246 ^a	81.3 \pm 1.8 ^a	0.462 \pm 0.084 ^a	31.1 \pm 1.6	2.41 \pm 0.13 ^a	23.9 \pm 1.1 ^a

IV.3.2.2. Intercambio de gases

Respecto al intercambio de gases, no se detectó interacción entre los factores sal e inóculo (LGM; $p < 0.05$). Lo más destacable fue que en ausencia de sal no hubo diferencias significativas para ninguna variable, independientemente del momento de la inoculación. Sin embargo, sí hubo diferencias en la tasa de fijación de CO_2 en los tratamientos inoculados; pero en este caso la respuesta fue inversa según cuando se realizó la primera inoculación (Tabla 22).

Tabla 22. Tasas fotosintética neta (A) y de conductancia estomática (g_s), concentración intercelular de CO_2 (C_i) y eficiencia intrínseca en el uso del agua ($iWUE$) de *A. macrostachyum* crecidas a 0 y 86 mM NaCl, con y sin inocular con la cepa bacteriana OR133, después de 90 días. Los valores corresponden a la media \pm E.E. ($n = 6$). Las letras indican que los valores medios son significativamente diferentes entre sí (prueba de Wald; $p < 0.05$). Los tratamientos semilla y plántula están analizados de forma independiente.

Tratamiento		A	g_s	C_i	$iWUE$
		($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	($\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	($\mu\text{mol mol}^{-1}$)	($\mu\text{mol mol}^{-1}$)
Inoculación: semilla					
0 mM	No-inoculada	6.3 ± 0.5^a	115 ± 9^a	296 ± 7^a	55 ± 9^b
	OR133	6.8 ± 0.5^a	106 ± 10^a	276 ± 7^a	67 ± 10^b
86 mM	No-inoculada	4.2 ± 0.6^b	39 ± 7^b	207 ± 8^b	112 ± 11^a
	OR133	5.6 ± 0.5^a	58 ± 10^b	218 ± 7^b	103 ± 10^a
Inoculación: plántula					
0 mM	No-inoculada	7.4 ± 0.6^b	71 ± 11^b	234 ± 9^{bc}	126 ± 10^a
	OR133	6.9 ± 0.6^b	67 ± 11^b	218 ± 8^c	105 ± 11^{ab}
86 mM	No-inoculada	10.2 ± 0.5^a	151 ± 10^a	273 ± 7^a	69 ± 10^b
	OR133	7.1 ± 0.5^b	77 ± 10^b	237 ± 7^b	92 ± 10^{ab}

IV.3.2.3. Pigmentos

En los pigmentos fotosintéticos no se detectaron patrones destacables, salvo en las clorofilas a y b donde encontramos un patrón similar a lo que ocurría en los parámetros fotosintéticos en los tratamientos “semillas”. Así, observamos que la presencia de sal hizo disminuir los valores, aunque este descenso se atenuó en los tratamientos inoculados con OR133. Sin embargo, en los “tratamientos plántulas” el patrón fue inverso. Esto es, el valor más alto lo alcanza el tratamiento sin sal y no inoculado, no existiendo diferencias significativas entre el resto de los tratamientos. Por otra parte, para el resto de los pigmentos no se observaron tendencias destacables (Tabla 23).

Tabla 23. Concentraciones de pigmentos fotosintéticos ($\mu\text{g} / \text{g}$) de *A. macrostachyum* crecidas a 0 y 86 mM NaCl, con y sin inocular con la cepa bacteriana OR133, después de 90 días. Los valores corresponden a la media \pm E.F. (n = 6). Las letras indican que los valores medios son significativamente diferentes entre sí (prueba de Wald; $p < 0.05$). Los tratamientos semilla y plántula están analizados de forma independiente.

Tratamiento	Inoculación: semilla									
	Clorofila a	Clorofila b	Feofitina a	Feofitina b	Anteraxantina	β -carotenos	Luteína	Zeaxantina		
0 mM	No inoculada	227 \pm 37 ^a	161 \pm 26 ^a	200 \pm 33 ^a	1.5 \pm 0.4	29.4 \pm 4.5	11.7 \pm 1.5 ^a	26.5 \pm 4.0	12.4 \pm 1.6 ^a	
	OR133	221 \pm 40 ^a	138 \pm 19 ^a	161 \pm 16 ^{ab}	3.8 \pm 0.9	20.4 \pm 6.2	11.1 \pm 1.5 ^a	21.5 \pm 3.1	11.7 \pm 1.5 ^a	
86 mM	No inoculada	91 \pm 15 ^b	66 \pm 7 ^b	122 \pm 13 ^b	2.7 \pm 0.7	<L.R.	6.4 \pm 0.6 ^b	14.1 \pm 2.4	6.7 \pm 1.9 ^b	
	OR133	114 \pm 5 ^b	74 \pm 5 ^b	133 \pm 6 ^b	2.9 \pm 1.7	<L.R.	7.7 \pm 0.6 ^b	16.5 \pm 1.4	8.2 \pm 1.9 ^b	
Inoculación: plántula										
0 mM	No inoculada	290 \pm 25 ^a	186 \pm 22 ^a	191 \pm 5 ^a	10.0 \pm 2.0	43.0 \pm 6.5 ^a	12.7 \pm 1.4 ^a	32.6 \pm 4.5 ^a	14.3 \pm 1.7 ^b	
	OR133	177 \pm 20 ^b	128 \pm 13 ^b	159 \pm 18 ^a	5.1 \pm 1.5	17.2 \pm 5.2 ^b	15.9 \pm 3.3 ^a	35.1 \pm 4.0 ^a	24.4 \pm 5.3 ^a	
86 mM	No inoculada	200 \pm 10 ^b	87 \pm 12 ^c	75 \pm 5 ^b	<L.R.	7.9 \pm 2.0 ^b	8.6 \pm 0.6 ^c	20.6 \pm 4.0 ^b	9.2 \pm 0.7 ^{bc}	
	OR133	167 \pm 30 ^b	107 \pm 12 ^{bc}	113 \pm 15 ^b	9.6 \pm 3.4	20.2 \pm 4.7 ^b	2.9 \pm 0.9 ^d	26.3 \pm 9.0 ^{ab}	3.0 \pm 0.9 ^c	

IV.4. Discusión

Un amplio porcentaje de las especies de marisma, a pesar de ser la mayoría halófitas, tiene condicionada la germinación por la salinidad (Shumway y Bertness, 1992; Wahid *et al.*, 1999). *A. macrostachyum* es una de estas especies (Vicente *et al.*, 2007) de forma que, aumentos en la salinidad van afectando a su germinación (Khan *et al.*, 2006) hasta inhibirla completamente a partir del 3-4 % NaCl (Rubio-Casal *et al.*, 2003; Vicente *et al.*, 2009). Sus semillas, a alta concentración de sal, entran en un estado de dormancia, estado en el que permanecen hasta que el medio recupera unas condiciones idóneas para la germinación (Pujol *et al.*, 2000). Esto se debe, básicamente, a que el potencial osmótico del suelo imposibilita una correcta hidratación de la semilla (Pujol *et al.*, 2000). En nuestro caso, el retraso en la imbibición de la semilla se detectó en la primera semana en los dos tratamientos salinos, coincidiendo con lo descrito por Rubio-Casal *et al.* (2003) y por Vicente *et al.* (2009). Sin embargo, al igual que en el Capítulo III, la presencia de la bacteria permitió que el tratamiento con sal comenzase a germinar más rápido. Con relación a este hecho, se ha constatado que la presencia de bacterias con propiedades PGP facilita la germinación de las semillas frente al estrés salino. Nuestros datos vendrían a corroborar los obtenidos por Din *et al.* (2019) quienes demostraron que cepas de *Bacillus* poseedoras de la enzima ACC desaminasa facilitaban la germinación de semillas de trigo, al ser capaces de degradar el ACC (precursor del etileno) producido en respuesta a dicho estrés. Asimismo, esta mejora en la germinación podría ser debida a la capacidad proteolítica de la cepa OR133 (actividad lipasa y proteasa), pues debilitaría la cubierta de la semilla facilitando la entrada del agua, acelerando así su germinación en un medio salino, hecho ya descrito previamente (Navarro-Torre *et al.*, 2017).

Atendiendo al bajo número de hongos que aparecen en las placas de germinación en los tratamientos inoculados con la cepa OR133 de *P. lurida*, cabe resaltar que los datos obtenidos concuerdan con los descritos por Abanda-Nkpwatt *et al.* (2006), en los que una cepa de *P. lurida* fue capaz de controlar *in vitro* el crecimiento de hongos patógenos. Esto podría deberse, de igual modo, a la capacidad proteolítica que presenta la bacteria. Además, en esta Tesis por primera vez, se describe la capacidad de *P. lurida* para controlar el número de colonias de hongos en un medio salino.

Respecto al efecto que tuvieron la inoculación y la sal sobre la cantidad de biomasa producida, tanto aérea como subterránea, cabe destacar que, al igual que en el Capítulo III, las mayores biomásas se produjeron en presencia de sal. Sin embargo, en

este ensayo el efecto del inóculo fue inverso al del capítulo anterior; esto es, su efecto fue notable cuando *A. macrostachyum* creció a 86 mM NaCl. Además, hay que indicar que el momento de la inoculación influyó, pues se dio un efecto potenciador entre la cepa y la sal cuando lo inoculado fueron las semillas. Estos datos contrastan con los obtenidos por Navarro-Torre *et al.* (2017) quienes encontraron que la interacción de bacterias endófitas con la planta solo se daba en situaciones de alto estrés salino (1040 mM), no observando resultados a concentraciones de sal menores (0 y 510 mM).

Este efecto potenciador de la bacteria y la sal en inoculaciones más tempranas (semilla) puede ser el resultado de diferentes hechos. Por un lado, la colonización bacteriana de la raíz es un proceso fundamental en la interacción planta-microorganismo (Lugtenberg y Kamilova, 2009). Y es obvio que, al inocular la semilla, la colonización se facilita frente a la inoculación de una planta con un sistema radical desarrollado. Además, *P. lurida* podría tener un carácter endófito (Mora-Ruiz *et al.* 2016) lo que igualmente, otorgaría beneficios a la planta. Así, una inoculación más temprana adelantaría la colonización endofítica de la misma, permitiendo a la bacteria ejercer su función promotora durante un periodo de tiempo más extenso. Por otro lado, a parte de la colonización de la raíz y de las propiedades PGP descritas para esta cepa (AIA, solubilización de fosfatos y ACC desaminasa), pudiera ser que la bacteria aumentase la disponibilidad del sodio para la planta, factor vital para una planta halófila estricta como *A. macrostachyum*, bien por su propio metabolismo (modificando el pH de la rizosfera) o bien mediante la excreción de quelantes.

Igualmente, en los tratamientos “semilla” el incremento en biomasa podría estar relacionado con la biometría de la planta. Para explicar este hecho habría que tener en cuenta la superficie fotosintética de cada tratamiento. Así, vemos que todos los tratamientos con sal presentaron diámetros mayores en sus ramas. Esto, unido al hecho de que el tratamiento inoculado desde semilla y con sal presentase la mayor longitud, le otorgaron a este tratamiento una ventaja para fijar más CO₂, al poseer una mayor superficie fotosintética, que pudo destinar a crecer (Redondo-Gómez *et al.*, 2010).

Un último aspecto sobre la biometría de las plantas se observó en la longitud de las raíces. Así, en los tratamientos “semilla” las raíces fueron más largas en los tratamientos inoculados, mientras que en los tratamientos “plántulas” las raíces fueron moldeadas por la presencia de la sal. Es decir, el desarrollo de la raíz de *A. macrostachyum* estuvo condicionado por el primer factor al que estuvo expuesta la planta; esta idea de

plasticidad en la raíz a causa de factores post-embionarios ya fue descrita por Müller y Schmidt (2004) en una planta modelo como es *Arabidopsis*.

A. macrostachyum es una halófito obligada, con lo cual en un tratamiento sin sal o con una concentración baja de la misma, se puede considerar que la planta se encuentra en un estado estresado o subóptimo, respectivamente, lo que explicaría las diferencias observadas en el contenido hídrico en estos tratamientos (Tabla 21). Sin embargo, la presencia de la cepa OR133 ayudó a disminuir dicho déficit hídrico, probablemente por la presencia de la enzima ACC desaminasa. Como se mencionó anteriormente, esta enzima utiliza el ACC como sustrato, con lo que la planta produce menos etileno, no percibe la situación estresante y, por tanto, no desarrolla los síntomas propios de la situación (Morgan y Drew, 1997; Mayak *et al.*, 2004a; 2004b; Saikia *et al.*, 2018; Salem *et al.*, 2018).

Respecto al intercambio de gases y la concentración de pigmentos, no se observó un efecto claro de la bacteria sobre estas variables. Un patrón preciso fue que el inoculante no alterase la fotosíntesis de *A. macrostachyum* en ausencia de sal, corroborando lo ya descrito por Navarro-Torre *et al.* (2017). La diferencia observada en los datos de *A. macrostachyum* inoculado desde semilla respecto a los resultados obtenidos en el Capítulo III en el que algunos inoculantes mejoraron la fotosíntesis a 0 mM de sal, podría deberse a que las propiedades PGP de cada cepa actúan de diferente modo sobre *A. macrostachyum*. Por otro lado, las tendencias opuestas observadas en la variable A dependiendo del momento de la primera inoculación, es posible que se deban más a otros factores ambientales de mayor calado sobre la fotosíntesis (por ejemplo, la temperatura) que al propio inóculo.

En conclusión, la cepa OR133 podría ser propuesta como inoculante para *A. macrostachyum*, tanto por sus características de biocontrol como de promoción de crecimiento, al igual que la cepa de *P. lurida* descrita por Siunova *et al.* (2017).

IV.5. Bibliografía

Abanda-Nkpwatt, D., Krimm, U., Schreiber, L. y Schwab, W. 2006. Dual antagonism of aldehydes and epiphytic bacteria from strawberry leaf surfaces against the pathogenic fungus *Botrytis cinerea* *in vitro*. *BioControl*, 51 (3): 279-291.

- Din, B. U., Sarfraz, S., Xia, Y., Kamran, M. A., Javed, M. T., Sultan, T., Munis, M. F. H. y Chaudhary, H. J.** 2019. Mechanistic elucidation of germination potential and growth of wheat inoculated with exopolysaccharide and ACC-deaminase producing *Bacillus* strains under induced salinity stress. *Ecotoxicology and environmental safety*, 183: 109466.
- Duarte, B., Goessling, J. W., Marques, J. C. y Caçador, I.** 2015. Ecophysiological constraints of aster tripolium under extreme thermal events impacts: merging biophysical, biochemical and genetic insights. *Plant Physiology and Biochemistry*, 97: 217-228.
- Hoagland, D. R. y Arnon, D. I.** 1950. The water culture method for growing plants without soil. *Circular, California Agricultural Experiment Station*, 347:1-32.
- Khan, M. A., Ahmed, M. Z. y Hameed, A.** 2006. Effect of sea salt and l-ascorbic acid on the seed germination of halophytes. *Journal of Arid Environments*, 67 (3): 535-540.
- Küpper, H., Seibert, S. y Parameswaran, A.** 2007. Fast, sensitive, and inexpensive alternative to analytical pigment HPLC: quantification of chlorophylls and carotenoids in crude extracts by fitting with Gauss peak Spectra. *Analytical Chemistry*, 79 (20): 7611-7627.
- Lugtenberg, B. y Kamilova, F.** 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63: 541-556.
- Mayak, S., Tirosh, T. y Glick, B. R.** 2004a. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Science*, 166 (2): 525-530.
- Mayak, S., Tirosh, T. y Glick, B. R.** 2004b. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42 (6): 565-572.

- Mora-Ruiz, M. D. R., Font-Verdera, F., Orfila, A., Rita, J. y Rossello-Mora, R.** 2016. Endophytic microbial diversity of the halophyte *Arthrocnemum macrostachyum* across plant compartments. *FEMS Microbiology Ecology*, 92 (9): <http://dx.doi.org/10.1093/femsec/fiw145>
- Morgan, P. W. y Drew, M. C.** 1997. Ethylene and plant responses to stress. *Physiologia Plantarum*, 100 (3): 620-630.
- Müller, M. y Schmidt, W.** 2004. Environmentally induced plasticity of root hair development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 134 (1): 409-419.
- Navarro-Torre, S., Barcia-Piedras, J. M., Mateos-Naranjo, E., Redondo-Gómez, S., Camacho, M., Caviedes, M. A., Pajuelo, E. y Rodríguez-Llorente, I. D.** 2017. Assessing the role of endophytic bacteria in the halophyte *Arthrocnemum macrostachyum* salt tolerance. *Plant Biology*, 19: 249-256.
- Pujol, J. A., Calvo, J. F. y Ramírez-Díaz, L.** 2000. Recovery of germination from different osmotic conditions by four halophytes from southeastern Spain. *Annals of Botany*, 85 (2): 279-286.
- Redondo-Gómez, S., Mateos- Naranjo, E., Figueroa-Clemente, M. E. y Davy, A. J.** 2010. Salt Stimulation of Growth and Photosynthesis in an Extreme Halophyte, *Arthrocnemum macrostachyum*. *Plant Biology*, 12: 79-87.
- Rubio-Casal, A. E., Castillo, J. M., Luque, C. J., y Figueroa, M. E.** 2003. Influence of salinity on germination and seeds viability of two primary colonizers of Mediterranean salt pans. *Journal of Arid Environments*, 53 (2): 145-154.
- Saikia, J., Sarma, R. K., Dhandia, R., Yadav, A., Bharali, R., Gupta, V. K. y Saikia, R.** 2018. Alleviation of drought stress in pulse crops with ACC deaminase producing rhizobacteria isolated from acidic soil of Northeast India. *Scientific Reports*, 8 (1), article number 3560.

- Salem, G., Stromberger, M. E., Byrne, P. F., Manter, D. K., El-Feki, W. y Weir, T. L.** 2018. Genotype-specific response of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) to irrigation and inoculation with ACC deaminase bacteria. *Rhizosphere*, 8: 1-7.
- Shumway, S. W. y Bertness, M. D.** 1992. Salt stress limitation of seedling recruitment in a salt marsh plant community. *Oecologia*, 92 (4): 490-497.
- Siunova, T. V., Anokhina, T. O., Sizova, O. I., Sokolov, S. L., Sazonova, O. I., Kochetkov, V. V., Boronin, A. M., Patil, S. G. y Chudhari, A. B.** 2017. PGPR pseudomonas strains promising for the development of bioformulations for plant protection and stimulation. *Biotekhnologiya*, 33 (2): 56-67.
- Vicente, M. J., Conesa, E., Álvarez-Rogel, J., Franco, J. A. y Martínez-Sánchez, J. J.** 2007. Effects of various salts on the germination of three perennial salt marsh species. *Aquatic Botany*, 87 (2): 167-170.
- Vicente, M. J., Conesa, E., Alvarez-Rogel, J., Franco, J. A. y Martínez-Sánchez, J. J.** 2009. Relationships between salt type and seed germination in three plant species growing in salt marsh soils of semi-arid Mediterranean environments. *Arid land research and management*, 23 (2): 103-114.
- Wahid, A., Rasul E. y Rao, A.** 1999. Germination of seeds and propagules under salt stress, en *Handbook of Plant and Crop Stress*. Marcel Dekker Inc., New York, USA, 1198 pp.

CAPÍTULO V

**Mejora en la eficiencia del uso del agua en el
proceso de fitodesalinización de
A. macrostachyum mediante la
aplicación de un consorcio
bacteriano**

V.1. Objetivos

Los objetivos de este capítulo de la Tesis fueron dos: (1) demostrar que la fitodesalinización realizada por *A. macrostachyum* en suelos agrícolas mejora con la aplicación de un consorcio bacteriano y (2) comprobar la viabilidad del suelo fitodesalinizado para el cultivo de leguminosas.

V.2. Materiales y Métodos

V.2.1. Microorganismos

Para la inoculación de *A. macrostachyum* se utilizó un consorcio bacteriano formado por las cepas productoras de auxinas, Hv16 y RTE9. Estas cepas fueron seleccionadas para formar el consorcio en base a los resultados obtenidos en el capítulo III. Antes de realizar el consorcio, se llevó a cabo un estudio de compatibilidad entre ambas cepas. Para ello, se utilizó una colonia aislada de cada cepa para inocular, de forma conjunta, un matraz con 50 ml de CN, que se mantuvo durante 48 h en agitación a 28 °C. Después de ese periodo de incubación, se confirmó la presencia de ambas bacterias mediante siembra en superficie de diluciones seriadas en placas de CN solidificado con 16 g l⁻¹ de agar (Bacto Agar de BD[®], España); confirmando así que el número de colonias de cada cepa era similar (aprox. 10⁸ células ml⁻¹). Para inocular las plantas de *A. macrostachyum* con tres meses de edad, se utilizó 1.5 ml de una suspensión bacteriana que contenía 10⁸ células ml⁻¹ de cada cepa, previamente crecida de forma individual y comprobada su producción de auxinas.

Con el objeto de elegir el simbiote adecuado para las plantas de judía y alfalfa que se iban a usar en el ensayo de recuperación de suelos salinos, se realizó un ensayo previo. Para ello, se inoculó cada leguminosa con 3 cepas diferentes de su simbiote, a tres concentraciones de sal (0, 50 y 300 mM). Se mantuvieron durante 6 semanas en condiciones controladas y se seleccionó aquella cepa bacteriana que permitió un mejor crecimiento de las plantas, tanto en ausencia de sal como a 50 mM (datos no mostrados). Así, para inocular *Phaseolus vulgaris* se utilizó la cepa ISP42 de *Rhizobium etli* y para inocular *Medicago sativa* se usó la cepa ORT11 de *Ensifer meliloti*. Los rizobios crecieron en medio YM (Behringer, 1974), incubándose en agitación a 180 rpm y a una temperatura de 28 °C, durante 3 días.

V.2.2. Material vegetal

Las semillas de *A. macrostachyum* fueron recolectadas de plantas naturales de las marismas de Odiel, Huelva (37° 13' 22.2" N - 6° 57' 46.0" O) en septiembre de 2016, y se conservaron a 5 °C hasta su utilización. Las semillas se desinfectaron (1' en hipoclorito de sodio al 10 % seguido de 7 lavados con agua destilada) y se dispusieron en placas de petri con agar-agua (1 %) que se colocaron en un germinador (dispositivo científico ASL® M-92004, España) con un régimen de 10 horas de luz (400-700 nm, 35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a 20 °C; y 14 h de oscuridad a 5 °C durante 21 días (Redondo-Gómez *et al.*, 2010). Posteriormente, las plántulas se colocaron en semilleros rellenos de perlita, que se pusieron en bandejas (5 x 39 x 53 cm) y se regaron con 3 l de solución de Hoagland al 20 % (Hoagland y Arnon, 1950). Se marcó en las bandejas el nivel al que llegó la solución y este se mantuvo durante tres meses (hasta el inicio del ensayo), reponiendo la solución necesaria hasta alcanzar dicho nivel. Las soluciones completas se reemplazaron cada dos semanas.

Las semillas de judía (*Phaseolus vulgaris*, variedad Negro Jamapa) y alfalfa (*Medicago sativa*, variedad Aragón) proceden de la colección de semillas del Dr. Francisco Temprano-Vera del centro IFAPA Las Torres (Alcalá del Río, Sevilla, España). La desinfección de la judía se realizó con un lavado con etanol 96 % durante 30", seguido de otro lavado con hipoclorito de sodio al 10 % durante 7' y ocho lavados con H₂O_a estéril. Para la alfalfa se realizó de igual manera salvo el lavado con hipoclorito de sodio, que fue al 6 % durante 15'. Posteriormente, las semillas se pregerminaron en placas de agar-agua (1 %) durante 24-48 h (previas de la siembra) a 28 °C y en un régimen de oscuridad total.

V.2.3. Ensayo 1: Fitodesalización

V.2.3.1. Suelo

Para este ensayo se recolectó un suelo de las marismas del Lebrija (36° 54' 25.1" N - 6° 10' 30.6" O) en mayo de 2016. Es un suelo franco arcilloso salino, caracterizado por un pH de 7.9 y una CE de 5.51 dS m⁻¹. Los ensayos se realizaron en bandejas no perforadas, rellenas con una mezcla de 2.6 kg de suelo al que se le añadió 1 kg de arena sílice (para evitar la compactación del sustrato).

Se establecieron tres tratamientos de suelo diferentes (n = 6): suelo salino (S) y dos suelos salinos cultivados con *A. macrostachyum*, uno inoculado (F+) y otro sin inocular (F-). Cada réplica consistió en una bandeja (5 x 30 x 45 cm) llena con la mezcla

de suelo descrita previamente, en condiciones de no lixiviación. Para los tratamientos F+ y F-, se sembraron, de forma equidistante, seis plantas de *A. macrostachyum* por bandeja. El ensayo se realizó en un invernadero de la Universidad de Sevilla (37° 21' 41.9" N - 5° 59' 15.9" O) con temperatura controlada, que oscilaba entre 21-25 °C, 40-60 % de humedad relativa y luz natural durante 67 días. El riego semanal de los suelos fue de 1200 ml de agua destilada uniformemente repartidos. Al final del experimento, los tres suelos resultantes de los tratamientos (S, F- y F+) se utilizaron para el ensayo 2.

V.2.3.2. Conductividad eléctrica

El análisis de la conductividad eléctrica (EC) se llevó a cabo de forma continua, colocándose en tres bandejas por tratamiento una sonda específica TEROS11 (Decagon[®], USA), que registraba la CE cada 30 min, almacenando los datos en un DataLogger Em50 (Decagon[®], USA).

V.2.3.3. Velocidad de fitodesalización

De acuerdo con Rabhi *et al.* (2015), se calculó la tasa de fitodesalización (R_{PH}) como la cantidad de Na^+ extraída por unidad de área y tiempo:

$$(1) R_{PH} = \Delta Q Na^+ / \Delta t \text{ (kg Na ha}^{-1} \text{ día}^{-1}\text{)}$$

donde ΔQNa = la diferencia entre las concentraciones de Na^+ al principio y al final del experimento; y Δt , el número de días del experimento.

La cantidad de sodio se estimó a partir de la CE (Rhoades y Corwin, 1981):

$$(2) QNa^+ = CE * 640 / 1000 \text{ (g Na}^+\text{)}$$

donde QNa^+ es la concentración de sodio soluble en el suelo; y CE la conductancia eléctrica del suelo en $mS m^{-1}$.

V.2.3.4. Crecimiento de *A. macrostachyum*

Se cosecharon diez plantas de los tratamientos F- y F+ al principio y al final del experimento y se separaron en raíces y ramas. Tras medir el peso fresco, se cuantificó el peso turgente de las ramas al igual que en el Capítulo III (apartado III.2.5.2.). Luego, el material vegetal se secó a 60 °C durante 48 h para obtener el peso seco.

La tasa de crecimiento relativo (RGR) de las plantas completas se calculó mediante la fórmula:

$$(3) \text{ RGR} = (\ln B_f - \ln B_i) * D^{-1} \text{ (g g}^{-1} \text{ día}^{-1}\text{)}$$

donde B_f = masa seca final de diez plantas, B_i = masa seca inicial y D = duración del experimento en días.

El contenido hídrico relativo de las ramas (CHR) se calculó como:

$$(4) \text{ CHR} = (\text{FW} - \text{DW}) * (\text{TG} - \text{DW})^{-1} * 100$$

donde FW, TG y DW son los pesos fresco, turgente y seco de las ramas, respectivamente.

V.2.3.5. Intercambio de gases de *A. macrostachyum*

Se realizaron las mediciones y cálculos como se describieron en el Capítulo III (apartado III.2.3.2.2.).

V.2.4. Ensayo 2: calidad del suelo fitodesalinizado

V.2.4.1. Germinación de las leguminosas

Una vez cosechadas las plantas de *A. macrostachyum*, en cada bandeja se sembraron de forma equidistante y a 1.5 cm de profundidad, 6 semillas pregerminadas de judía y 9 de alfalfa por bandeja ($n = 6$). Una vez colocadas las semillas se inocularon con 1 ml de la cepa adecuada (apartado V.2.1) y se cubrieron con una envoltura de film transparente para mantener una humedad constante. La emergencia se registró diariamente a lo largo de 30 días. Durante todo el ensayo se mantuvo el riego semanal de 1.2 l con agua destilada.

Se determinaron tres características de emergencia: el porcentaje de emergencia final, el número de días hasta la primera emergencia y el tiempo medio de emergencia (MTE), que se calculó utilizando una ecuación modificada de Brenchley y Probert (1998):

$$(5) \text{ MTE} = \sum_i (n_i * d_i) / N_i$$

donde n es el número de semillas emergidas hasta el día i ; d es el período de incubación en días y N es el número total de semillas emergidas. Los valores más bajos de MTE indican una emergencia más rápida.

V.2.4.2. Crecimiento vegetal e intercambio de gases de las leguminosas

Tras el mes de seguimiento de la emergencia, las plantas se dejaron crecer durante otros 30 días. Antes de cosechar las plantas de cada tratamiento se midió el intercambio de gases en la primera hoja madura de 6 plantas al azar (Capítulo III, apartado III.2.5.3.). A continuación, se cosecharon las plantas, tanto la parte aérea como la raíz, se secaron a 60 °C durante 48 h y se pesaron.

V.2.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Statistix 10 (Analytical Software®, USA). La normalidad de los datos se verificó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de la varianza con la prueba de Brown-Forsythe. Todos los datos se analizaron utilizando ANOVA de una vía. Por último, en todas las variables se testaron las diferencias significativas mediante la prueba LSD de Fisher ($p < 0.05$), a excepción del R_{PH} y las variables de *A. macrostachyum* que se analizaron mediante la prueba t-Student ($p < 0.05$).

V.3. Resultados

V.3.1. Ensayo 1: fitodesalinización con *A. macrostachyum*

V.3.1.1. Conductividad eléctrica

Al inicio del ensayo se partía de suelos contaminados por sal, caracterizados por presentar una CE de $5.51 \text{ dS m}^{-1} \pm 0.14 \text{ dS m}^{-1}$. Tras crecer plantas de *A. macrostachyum* en dichos suelos durante un periodo de 67 días, se obtuvo un descenso en la CE del suelo cercano al 80% (con un E. E. de 0.18 dS m^{-1}), sin mostrar diferencias entre el tratamiento con y sin inocular (LSD de Fisher; $p < 0.05$). Durante el periodo de descontaminación, se detectó que la eliminación de sal fue más pronunciada durante los primeros 20 días de tratamiento (Figura 30).

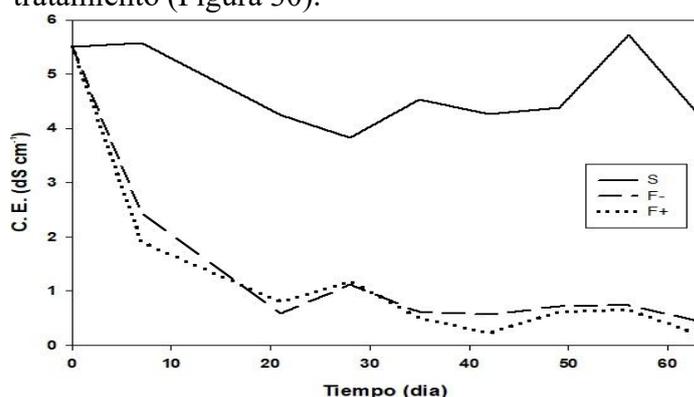


Figura 30. Conductividad eléctrica del suelo durante 67 días de fitodesalinización: suelo salino (S), suelo salino remediado con *A. macrostachyum* sin inocular (F-), suelo salino remediado con *A. macrostachyum* inoculado (F+). Los valores son medias, con un E.E. de 0.18 dS m^{-1} ($n = 3$).

V.3.1.2. Velocidad de fitodesalinización

Tras cuantificar la CE final de los suelos, se pudo estimar la cantidad de sodio que quedó en los suelos (QNa^+) mediante la fórmula (2). Esto a su vez permitió cuantificar la velocidad de fitodesalinización (R_{PH}), comprobándose que fue idéntica en ambos tratamientos de remediación, aproximadamente $3.7 \text{ kg Na ha}^{-1} \text{ día}^{-1}$ (t-Student; $p < 0.05$).

V.3.1.3. Crecimiento de *A. macrostachyum*

Con el fin de determinar si había diferencias en el crecimiento de las plantas de *A. macrostachyum* según hubiesen sido inoculadas o no, éstas se cosecharon en los tratamientos de descontaminación al finalizar el primer ensayo. Los datos mostraron que no hubo diferencias de biomasa en la parte aérea ni en la subterránea, lo que implica que tampoco se observaron diferencias en la proporción raíz / rama, ni en el RGR (Tabla 24).

Por el contrario, los datos obtenidos de CHR mostraron que, en el tratamiento inoculado, *A. macrostachyum* presentó un CHR significativamente superior al alcanzado por el tratamiento no inoculado (Tabla 24).

Tabla 24. Parámetros del crecimiento vegetal de *A. macrostachyum* en dos tratamientos de fitorremediación durante 67 días: *A. macrostachyum* no inoculado (F-) y *A. macrostachyum* inoculado (F+). Los valores son medias \pm E.E. ($n = 30$). Las letras indican medias dentro de una variable analizada que son significativamente diferentes entre sí (t-Student; $p < 0.05$).

	Tratamientos	
	F-	F+
Peso seco rama (g)	1.48 ± 0.09	1.34 ± 0.11
Peso seco raíz (mg)	344 ± 19	304 ± 21
Tasa raíz / rama	0.33 ± 0.10	0.27 ± 0.04
Contenido hídrico relativo rama (%)	87.1 ± 1.3^b	91.9 ± 1.4^a
RGR ($\text{mg g}^{-1} \text{ día}^{-1}$)	17 ± 2	15 ± 2

V.3.1.4. Intercambio de gases

El tratamiento no inoculado presentó una mayor tasa de fijación de CO_2 (A). A su vez, es destacable que la conductancia estomática (g_s) se redujo a la mitad en el tratamiento inoculado. Por último, y relacionando los dos parámetros anteriores, cabe resaltar la diferencia significativa obtenida en la eficiencia intrínseca del uso del agua

(i WUE) de manera que, el tratamiento F+ fue más eficiente que el tratamiento F- (Tabla 25).

Tabla 25. Parámetros del intercambio de gases de *A. macrostachyum* en dos tratamientos de fitorremediación durante 67 días: *A. macrostachyum* no inoculado (F-) y *A. macrostachyum* inoculado (F+). Los valores son medias \pm E. E. (n = 30). Las letras indican medias dentro de una variable analizada que son significativamente diferentes entre sí (t-Student; $p < 0.05$).

	Tratamientos	
	F-	F+
A ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	7.37 ± 0.75^a	5.04 ± 0.59^b
g_s ($\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	96.4 ± 15.9^a	52.0 ± 6.6^b
C_i ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)	249 ± 8	228 ± 9
i WUE ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)	81 ± 5^a	102 ± 6^b

V.3.2. Experimento 2: calidad del suelo fitodesalinizado

V.3.2.1. Germinación de las leguminosas

Una vez realizada la desalinización con plantas de *A. macrostachyum*, se observó una recuperación de los suelos, pues ambos permitieron el crecimiento de los cultivos de judía y alfalfa. En los suelos tratados con *A. macrostachyum* germinaron un 40 % más de semillas de judía (*P. vulgaris*) que, además, emergieron antes y más rápido que en el suelo no tratado (Tabla 26). Respecto a la germinación de la alfalfa (*M. sativa*), destacó cómo se acortaron los tiempos para la emergencia, ya que las semillas emergieron casi 10 días antes en los suelos fitodesalinizados. Además, la velocidad de emergencia fue mucho mayor (Tabla 26). Para ambos cultivos, el efecto de la inoculación bacteriana no fue significativo (tratamientos F- vs F+) en la emergencia.

Tabla 26. Características de la emergencia de *P. vulgaris* y *M. sativa* cultivados en tres suelos durante 30 días: suelo salino (S), suelo salino remediado con *A. macrostachyum* sin inocular (F-), suelo salino remediado con *A. macrostachyum* inoculado (F+). Los valores son medias \pm E. E. (n = 36 para *P. vulgaris* y 54 para *M. sativa*). Las letras indican que las medias dentro de una variable analizada son significativamente diferentes entre sí (LSD de Fisher; $p < 0.05$).

Tratamiento	<i>P. vulgaris</i>			<i>M. sativa</i>		
	Emergencia total	Primera emergencia	MTE	Emergencia total	Primera emergencia	MTE
	(%)	(d)		(%)	(d)	
S	61 \pm 10 ^b	8.5 \pm 5.1 ^a	8.5 \pm 1.7 ^a	72 \pm 10	8.5 \pm 5.2 ^a	13.0 \pm 1.1 ^a
F-	100 \pm 0 ^a	3.3 \pm 0.5 ^b	4.3 \pm 0.5 ^b	81 \pm 3	2 \pm 0.6 ^b	3.6 \pm 0.6 ^b
F+	100 \pm 0 ^a	3.3 \pm 1.2 ^b	4.9 \pm 0.5 ^b	69 \pm 3	2.5 \pm 0.5 ^b	4.8 \pm 0.7 ^b

V.3.2.2. Crecimiento vegetal e intercambio de gases de las leguminosas

A parte de ver la respuesta en la germinación de las semillas de judía y alfalfa, éstas se dejaron crecer para comprobar su viabilidad en los tres suelos. Así, tras 30 días de crecimiento de la judía, se observó que el tratamiento F- produjo de forma significativa una mayor cantidad de biomasa, tanto aérea como de raíces, respecto a *P. vulgaris* crecida en el tratamiento S. Los dos suelos tratados con *A. macrostachyum* produjeron la misma cantidad de biomasa (Tabla 27). Del mismo modo, la tasa de fijación de CO₂ fue significativamente menor en el tratamiento salino respecto a los recuperados y los estomas del tratamiento salino permanecieron cerca de un 66 % más cerrados que los de los tratamientos F- y F+ (Tabla 28).

Tabla 27. Biomasa de la parte aérea y de la raíz de *P. vulgaris* y *M. sativa* cultivados en tres suelos durante 30 días: suelo salino (S), suelo salino remediado con *A. macrostachyum* sin inocular (F-), suelo salino remediado con *A. macrostachyum* inoculado (F+). Los valores son medias \pm E. E. (n = 36 para *P. vulgaris* y 54 para *M. sativa*). Las letras indican que las medias dentro de una variable analizada son significativamente diferentes entre sí (LSD de Fisher; $p < 0.05$).

Tratamiento	<i>P. vulgaris</i>		<i>M. sativa</i>	
	Peso seco aéreo	Peso seco raíz	Peso seco aéreo	Peso seco raíz
	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)
S	442 \pm 42 ^b	100 \pm 10 ^b	33 \pm 9 ^b	29 \pm 6 ^b
F-	581 \pm 48 ^a	140 \pm 9 ^a	72 \pm 12 ^a	84 \pm 23 ^a
F+	556 \pm 59 ^{ab}	123 \pm 13 ^{ab}	86 \pm 10 ^a	79 \pm 7 ^a

En la alfalfa, la merma en la producción vegetal obtenida en el tratamiento salino es considerable, tanto en los valores de parte aérea como en los de raíces, ya que produjo menos de la mitad de la biomasa generada en los tratamientos fitodesalinizados (Tabla 27). Respecto al intercambio gaseoso, hubo un ascenso significativo en el valor de A en las plantas crecidas en los tratamientos desalinizados, respecto al obtenido en las crecidas en el tratamiento salino. A su vez, en el tratamiento F+ el valor de la g_s llegó a ser más del doble que en el tratamiento salino (Tabla 28).

Tabla 28. Parámetros del intercambio de gases de *P. vulgaris* y *M. sativa* cultivados en tres suelos durante 30 días: suelo salino (S), suelo salino remediado con *A. macrostachyum* sin inocular (F-), suelo salino remediado con *A. macrostachyum* inoculado (F+). Los valores son medias \pm E. E. (n = 6). Las letras indican que las medias dentro de una variable analizada son significativamente diferentes entre sí (LSD de Fisher; $p < 0.05$).

Tratamiento	<i>P. vulgaris</i>			<i>M. sativa</i>		
	A ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	g_s ($\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	C_i ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)	A ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	g_s ($\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	C_i ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)
S	2.1 \pm 0.6 ^b	20 \pm 6 ^b	260 \pm 28 ^a	9.6 \pm 2.1 ^b	190 \pm 55 ^b	295 \pm 13 ^a
F-	7.4 \pm 0.5 ^a	57 \pm 4 ^a	165 \pm 5 ^b	17.0 \pm 3.1 ^a	263 \pm 84 ^{ab}	255 \pm 17 ^b
F+	7.5 \pm 0.5 ^a	61 \pm 11 ^a	174 \pm 7 ^b	18.8 \pm 1.6 ^a	459 \pm 68 ^a	308 \pm 6 ^a

V.4. Discusión

Un aumento en la CE de un suelo evidencia el deterioro que está sufriendo debido a una acumulación de sales (Rhoades, 1989). Por tanto, la notable reducción obtenida en este trabajo por los dos tratamientos con *A. macrostachyum* (inoculado y sin inocular) en dicho parámetro, muestra la efectividad de la desalinización realizada. Los datos obtenidos concuerdan con lo descrito en el Capítulo I de esta Tesis Doctoral, donde se obtuvo un descenso del 30 % en la CE, utilizando la misma especie vegetal. Consecuentes con el descenso de la CE son los valores de R_{PH} obtenidos, muy próximos a los descritos por Rabhi *et al.* (2009) al utilizar las especies halófitas *Suaeda fruticosa* y *Arthrocnemum indicum* en un ensayo de fitodesalinización. La disminución del valor de R_{PH} respecto al obtenido en el Capítulo I, podría deberse a que este suelo es más arcilloso que el utilizado en dicho Capítulo, con lo que las arcillas podrían estar adsorbiendo una mayor cantidad de sodio (Navarro-García y Navarro-García, 2013).

La gestión de los recursos hídricos que presenta un organismo es fundamental para su supervivencia. En este sentido, se puede decir que gracias a las bacterias *A.*

macrostachyum presentó una mayor capacidad de acumular agua en sus tejidos, lo cual quedó reflejado en un aumento en el CHR del tratamiento F+.

Esa mejora en la capacidad de retener agua puede estar relacionada a su vez con la regulación de la fotosíntesis. Y es que, dicha regulación, se llevó a cabo mediante el cierre estomático, marcado por el bajo valor de g_s y por el descenso en el valor de A , lo cual permitió que *A. macrostachyum* presentase una mayor $iWUE$. Esta mejora en el estado hídrico de la planta gracias a la regulación de los parámetros fotosintéticos ya fue recogida en la revisión que realizó Buckley (2005). Del mismo modo, la mejora obtenida en el estado hídrico de las plantas tras ser inoculadas concuerda con lo descrito por Vivas *et al.* (2003) quienes obtuvieron plantas de lechuga más eficientes respecto al uso del agua, tras ser inoculadas con *Bacillus sp.* y *Glomus intraradices*.

Como se ha citado anteriormente, el descenso del valor de g_s en el tratamiento inoculado es reflejo del cierre estomático (Jarvis y McNaughton, 1986). Respecto a la caída del valor de g_s en condiciones salinas en presencia de un inoculo, Hidri *et al.* (2016) describieron un efecto similar en algunos ecotipos de *Sulla carnosa* crecida con 200 mM NaCl, al aplicarle cualquiera de las dos cepas bacterianas productoras de AIA que utilizaron (*Pseudomonas sp* y *Bacillus sp*). Dicho descenso podría deberse a una respuesta conjunta de diferentes factores de la planta como la concentración de potasio, el estado redox y/o la concentración de CO₂.

Hasta ahora se ha visto como *A. macrostachyum* en el tratamiento inoculado economiza el agua que utiliza (mayor CHR e $iWUE$), parámetros que influyen en la desalinización de la siguiente manera. Está descrito que las plantas se comportan como una bomba extractora de agua (y solutos) del suelo (Gil-Martínez, 1995), de hecho ese mecanismo es la base para la remediación que se ha llevado a cabo en esta Tesis, la fitoextracción. Para que se produzca la toma de la solución del suelo por parte de una planta, es necesario la existencia de un flujo continuo de agua suelo-planta-atmósfera (McDowell *et al.*, 2008). Dicho flujo, a su vez, está regulado por la planta mediante la apertura y cierre de sus estomas (cuantificado mediante el valor de g_s); es decir, que para que una planta extraiga una mayor cantidad de solución del suelo, necesita bombear una mayor cantidad de agua a la atmósfera. Y es en este sentido, en el que los dos tratamientos de desalinización (F- y F+) se han comportado de igual manera, pues han eliminado la misma cantidad de sal (valores de CE y R_{PH} idénticos). Sin embargo, el tratamiento inoculado (F+) lo ha realizado con un valor de g_s cercano a la mitad del que presentó *A.*

macrostachyum no inoculado, lo que se traduce en un ahorro de agua en la fitodesalinización provocado por la inoculación.

Otro aspecto destacable es, cómo el inóculo favorece mantener la concentración de CO₂ intercelular (C_i) a pesar del cierre estomático y a una menor tasa de fijación de CO₂. Esto hecho supone un avance frente a otros inoculantes utilizados en halófitas que provocan el decaimiento de todos los parámetros fotosintéticos (Jia *et al.* 2018), provocando diferentes problemas de índole metabólico, como problemas de fotorespiración en los que, debido a la baja tensión de CO₂, la Rubisco fijaría O₂ en vez de CO₂ (Farquhar y Sharkey, 1982).

Centrándonos en la recuperación de los suelos para su uso agrícola, podemos decir que el resultado fue satisfactorio. Respecto a la judía, no hay estudios de la variedad Negro Jamapa creciendo en suelos restaurados por un exceso de salinidad, pero sí existen estudios con otras variedades de *P. vulgaris* y los efectos perjudiciales que la sal produce tanto en la semilla (Bayuelo-Jiménez, 2002), como en la planta (Seemann y Critchley, 1985). En esta Tesis Doctoral, el papel negativo de la salinidad sobre la germinación coincide con lo descrito por Bayuelo-Jiménez (2002) y, podría relacionarse con un problema de imbibición de la semilla (El-Madidi *et al.*, 2004; El-Tayeb, 2005). Por otro lado, la planta de judía (como gliófita) al crecer en un tratamiento salino sufrió una alteración en su estado hídrico. Esta situación se tradujo en un descenso, tanto en el valor de g_s como en la producción de biomasa, hechos ya descritos por Franzini *et al.* (2019) al exponer esta misma especie vegetal a una concentración de 100 mM de NaCl. Pero, gracias a la desalinización realizada, la planta no sufre deshidratación y, por tanto, vuelve a abrir los estomas (aumento en la g_s), permitiendo fijar mayor CO₂ (ascenso de A) conforme a lo descrito por Ashraf (2001). A su vez, ese mayor valor de A podría verse reflejado en un aumento en la cantidad de biomasa aérea.

Respecto a la inoculación, el tratamiento inoculado presentó, en general, una biomasa intermedia entre el control y el tratamiento F-; esto podría deberse a que las bacterias PGP inoculadas (Hv16 y RTE9) hayan ejercido una cierta inhibición sobre la cepa de rizobio utilizada (ISP42). De hecho, las plantas del tratamiento F+ mostraron un menor número de nódulos (datos no mostrados) que las del tratamiento F-.

En el caso de la alfalfa, aunque no se vio afectada la emergencia total, si se dio a continuación una merma en el crecimiento. Respecto a la emergencia, no hay estudios con la variedad Aragón de la alfalfa y los efectos que tiene la sal sobre ella, pero hay investigaciones que hablan de una amplia tolerancia a la sal en la germinación, según la

variedad empleada de *M. sativa* (Johnson *et al.*, 1992; Gao *et al.*, 2019). Otro aspecto diferente es el desarrollo de la plántula ya que, aunque no se detectaron problemas en la emergencia, *M. sativa* no logró desarrollarse. Esta situación ya fue descrita por Malcolm *et al.* (2003) en un ensayo en perlita y soluciones crecientes de NaCl, observando que el tratamiento salino produjo menos biomasa debido a la deshidratación que sufren las plantas por el exceso de sal. Al igual que sucedió con la judía, la alfalfa es un cultivo que, a pesar de la tolerancia de algunas variedades a la sal, se considera un gliófito, por lo cual la presencia de sal en el suelo le produce estrés. En nuestro caso, se observó el mismo comportamiento que en la judía. Así, en los tratamientos fitodesalinizados se produjo tanto una apertura estomática (ascenso de la g_s), como una subida en la fijación de CO₂ y, de forma consecuente, hubo mayor cantidad de fotosintatos para la producción de biomasa.

En general, se observó que la inoculación con las cepas Hv16 y RTE9 permitió a *A. macrostachyum* una mejora en la gestión de los recursos hídricos, sin que ello mermase su capacidad de fitodesalinizar.

V.5. Bibliografía

Ashraf, M. 2001. Relationships between growth and gas exchange characteristics in some salt-tolerant amphidiploid *Brassica* species in relation to their diploid parents. *Environmental and Experimental Botany*, 45 (2): 155-163.

Bayuelo-Jiménez, J. S., Craig, R. y Lynch, J. P. 2002. Salinity tolerance of *Phaseolus* species during germination and early seedling growth. *Crop Science*, 42(5): 1584-1594.

Behringer, J. E. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General and Applied Microbiology*, 84: 188-198.

Brenchley, J. L. y Probert, R. J. 1998. Seed germination responses to some environmental factors in the seagrass *Zostera capricorni* from eastern Australia. *Aquatic Botany Volume*, 62 (3): 177-188.

Buckley, T. N. 2005. The control of stomata by water balance. *New Phytologist*, 168 (2): 275-292.

- El-Madidi, S., El-Baroudi, B. y Aameur, F.** 2004. Effects of salinity on germination and early growth of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Cultivars International Journal of Agriculture & Biology*, 6:1560-8530.
- El-Tayeb, M.** 2005. Response of barley grains to the interactive effect of salinity and salicylic acid. *Plant Growth Regulation*, 45: 215-224.
- Farquhar, G. D. y Sharkey, T. D.** 1982. Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual review of plant physiology*, 33 (1): 317-345.
- Franzini, V. I., Azcón, R., Ruiz-Lozano, J. M. y Aroca, R.** 2019. Rhizobial symbiosis modifies root hydraulic properties in bean plants under non-stressed and salinity-stressed conditions. *Planta*, 249 (4): 1207-1215.
- Gao, Y., Cui, Y., Long, R., Sun, Y., Zhang, T., Yang, Q. y Kang, J.** 2019. Salt-stress induced proteomic changes of two contrasting alfalfa cultivars during germination stage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99 (3): 1384-1396.
- Gil-Martínez, F.** 1995. Elementos de fisiología vegetal. Relaciones hídricas. Nutrición mineral. Transporte. Metabolismo. Mundi-Prensa, Madrid, España, 1147 pp.
- Hidri, R., Barea, J. M., Metoui-Ben Mahmoud, O., Abdelly, C. y Azcón, R.** 2016. Impact of microbial inoculation on biomass accumulation by *Sulla carnosa* provenances, and in regulating nutrition, physiological and antioxidant activities of this species under non-saline and saline conditions. *Journal of Plant Physiology*, 201: 28-41.
- Hoagland, D. R. y Arnon, D. I.** 1950. The water culture method for growing plants without soil. *Circular, California Agricultural Experiment Station*, 347:1-32.
- Jarvis, P. G. y McNaughton, K. G.** 1986. Stomatal control of transpiration: scaling up from leaf to region. *Advances in Ecological Research*, 15 (C): 1-49.
- Jia, T. T., Chang, W., Fan, X. X., y Song, F.** 2018. Effects of Arbuscular mycorrhizal fungi on photosynthetic and chlorophyll fluorescence characteristics in *Elaeagnus angustifolia* seedlings under salt stress. *Acta Ecologica Sinica*, 38, 1337-1347.
- Johnson, D. W., Smith, S. E. y Dobrenz, A. K.** 1992. Selection for increased forage yield in alfalfa at different NaCl levels. *Euphytica*, 60 (1): 27-35.

- Malcolm, C. V., Lindley, V. A., O'Leary, J. W., Runciman, H. V. y Barrett-Lennard, E. G.** 2003. Halophyte and glycophyte salt tolerance at germination and the establishment of halophyte shrubs in saline environments. *Plant and Soil*, 253 (1): 171-185.
- McDowell, N., Pockman, W. T., Allen, C. D., Breshears, D. D., Cobb, N., Kolb, T., Plaut, J., Sperry, J., West, A., Williams, D. G. y Yezpez, E. A.** 2008. Mechanisms of plant survival and mortality during drought: Why do some plants survive while others succumb to drought? *New Phytologist*, 178 (4): 719-739.
- Navarro-García, G. y Navarro-García, S.** 2013. Química agrícola: química del suelo y de los nutrientes esenciales para las plantas. Mundi-Prensa, Madrid, España, 508 pp.
- Rabhi, M., Hafsi, C., Lakhdar, A., Hajji, S., Barhoumi, Z., Hamrouni, M., Abdelly, C. y Smaoui, A.** 2009. Evaluation of the capacity of three halophytes to desalinate their rhizosphere as grown on saline soils under nonleaching conditions. *African Journal of Ecology*, 47: 463-468.
- Rabhi, M., Atia, A., Abdelly, C. y Smaoui, A.** 2015. New parameters for a better evaluation of vegetative bioremediation, leaching, and phytodesalination. *Journal of Theoretical Biology*, 383: 7-11.
- Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Figueroa, M. E. y Davy, A. J.** 2010. Salt stimulation of growth and photosynthesis in an extreme halophyte, *Arthrocnemum macrostachyum*. *Plant Biology*, 12 (1): 79-87.
- Rhoades, J. D. y Corwin, D. L.** 1981. Determining soil electrical conductivity-depth relations using an inductive electromagnetic soil conductivity meter. *Soil Science Society of America Journal*, 45: 255-260.
- Rhoades, J. D.** 1989. Soil electrical conductivity and soil salinity: new formulations and calibrations. *Soil Science Society of America Journal*, 53 (2): 433-439.
- Seemann, J. R. y Critchley, C.** 1985. Effects of salt stress on the growth, ion content, stomatal behaviour and photosynthetic capacity of a salt-sensitive species, *Phaseolus vulgaris* L. *Planta*, 164 (2): 151-162.

- Vivas, A., Marulanda, A., Ruiz-Lozano, J. M., Barea, J. M., y Azcón, R. 2003.**
Influence of a *Bacillus sp.* on physiological activities of two arbuscular mycorrhizal fungi and on plant responses to PEG-induced drought stress. *Mycorrhiza*, 13 (5): 249-256.

DISCUSIÓN GENERAL

Estamos inmersos en una sociedad orientada a la globalización y al consumismo, que está llevando a la sobreexplotación de los recursos naturales, y con ello provocando alteraciones en el planeta Tierra a una velocidad que jamás había ocurrido (Cox *et al.*, 2000; Davidson y Janssens, 2006; Nicholls y Cazenave, 2010; Steffen *et al.*, 2015).

Cualquier ecosistema del planeta, ya sea natural, seminatural (como los sistemas agrícolas que utilizamos) o antrópico, presenta equilibrios de materia y energía entre los organismos que lo conforman y el medio que los rodea. Y dichos equilibrios, basándose en la teoría de Gaia, están en homeostasis dinámica, es decir, que los diferentes elementos que lo conforman intentan compensar la variación amoldándose a la nueva situación (Lovelock, 1988). Pero en la actualidad la especie humana está consumiendo tantos recursos y tan rápido, que los ecosistemas no son capaces de llegar a estabilizarse.

Un claro ejemplo de esta alteración es la necesidad de alimentos para la población. Desde la Revolución industrial el ser humano está creciendo de forma exponencial, y se espera que así continúe (Steffen *et al.*, 2015). Esto está llevando a una situación en la que las explotaciones agrícolas producen tanto que los suelos no son capaces de regenerar los nutrientes, con lo que se van empobreciendo. Debido a esta pérdida de fertilidad del suelo, nos vemos abocados a abonarlos; pero al no consumirse todos los nutrientes a igual velocidad, se produce la acumulación de alguno de ellos, lo que provoca la salinización del suelo (Cañedo *et al.*, 2016). Además, como regla general, mayores producciones requieren un mayor consumo de agua, lo que conlleva la sobreexplotación de acuíferos que, a su vez también se salinizan, provocando que pierdan calidad o directamente desaparezcan (Cañedo *et al.*, 2016). Es decir, una mala gestión de las zonas agrícolas hace que se pierda fertilidad, teniendo que aumentar la superficie para la obtención de alimento (Tilman *et al.*, 2002).

El ejemplo de mala práctica anterior puede potenciarse debido a otras actividades de origen humano. Así, la emisión de gases de efecto invernadero en algunas zonas provoca un aumento de temperatura y/o una mayor amplitud en los periodos entre lluvias, lo cual acrecienta los problemas para la agricultura. Todas estas alteraciones fomentan el problema de la desertificación en muchas zonas, siendo este uno de los factores de mayor impacto en el Cambio Climático Global que está sufriendo nuestro planeta (IPCC, 2013).

Frente a tal situación, es necesario presentar acciones correctoras. En este sentido, la ONU realizó una declaración de intenciones en la que marcaba unas líneas a seguir frente a la desertificación, tanto para el norte de África como para Europa, siendo una de ellas el evitar la salinización del medio (Naciones Unidas, 2017).

Dentro de la búsqueda de métodos para disminuir el exceso de salinidad de los suelos, es donde se encuadra el trabajo de esta Tesis. Así, la fitodesalinización puede ser un método de remediación, eficiente por sí mismo o complementario a otras acciones, para recuperar los suelos que han perdido calidad para su uso agrícola debido al exceso de sal. Además, al utilizar plantas se considera que es una alternativa amigable con el medioambiente y no presenta costes económicos elevados frente a otros métodos más eficientes (Qadir *et al.*, 2014).

Existe un grupo de especies vegetales, de diferente origen filogenético, que se distribuye en ecosistemas con ambientes extremos (altas temperaturas, sequía, salinidad, bajo potencial rédox, etc.) como saladares, marismas o dunas. Dichas plantas se han adaptado a estos ecosistemas gracias a la aparición de ciertas propiedades fisiológicas, atípicas en el resto de las especies vegetales, que las hacen susceptibles de ser utilizadas como herramientas biotecnológicas (Glenn *et al.*, 1999). Así, *A. macrostachyum* (planta utilizada en esta Tesis Doctoral), esta descrita por una de esas propiedades, su carácter halófilo. Esto se traduce en una acumulación de sal en sus tallos suculentos (Khan *et al.*, 2005) y, además, en una estimulación de su fotosíntesis y una mejora de su crecimiento, en presencia de la sal (Redondo-Gómez *et al.*, 2010). Estas cualidades sitúan a *A. macrostachyum* en objetivo idóneo para ser utilizado en procesos de fitodesalinización.

En el Capítulo I de esta Tesis se ha llevado a cabo un ensayo de invernadero en el que, por primera vez, se ha podido demostrar la capacidad de *A. macrostachyum* para remediar un suelo afectado por un exceso de sal. Aun siendo bastantes los trabajos que han descrito especies vegetales que pueden ser usadas en procesos de desalinización (Rabhi *et al.*, 2010; Jlassi *et al.*, 2013; Muchate *et al.*, 2016), en esta Tesis, además, se ha puesto de manifiesto cómo *A. macrostachyum* en comparación con otras especies vegetales, lo hace en un plazo más corto de tiempo. Aún más, se ha demostrado que, dependiendo del momento en el que la halófita se exponga por primera vez a la sal, va a variar su tasa de fitodesalinización relativa.

Una vez demostrado que *A. macrostachyum* era capaz de desalinizar un suelo, se planteó potenciar dicha capacidad. Con esta idea, se usaron bacterias como biofertilizantes de *A. macrostachyum*, es decir, se seleccionaron bacterias que fomentasen el crecimiento de la planta, potenciando así su capacidad de eliminar el exceso de sal del suelo. Se realizó una colección bacteriana con cepas aisladas del suelo con el que se iba a trabajar (Capítulo II). Se emplearon bacterias autóctonas con el fin de evitar alteraciones de la biodiversidad y/o de las funciones de otras bacterias del ecosistema (Singh y

Agrawal, 2008; De Araujo *et al.*, 2010). Como *A. macrostachyum* crece en dos paisajes diferentes de la marisma de Lebrija, marisma natural y canales de riego, se tomaron muestras de la rizosfera de la halófito en ambos sitios, pues la actividad agrícola podía haber alterado la diversidad bacteriana del suelo (Diacono y Montemurro, 2010). De la misma manera, la estacionalidad que caracteriza al clima mediterráneo nos llevó a tomar muestras en verano y otoño. Así pudimos determinar de qué manera distintos factores abióticos (temperatura y salinidad) influían en la composición de las comunidades bacterianas de la rizosfera de *A. macrostachyum*, observándose que en verano es el periodo del año en el que hay mayor posibilidad de encontrar cepas con propiedades PGP; situación similar a la descrita por Žifčáková *et al.* (2016), quienes encontraron una disminución en las funciones de los microorganismos del suelo de un bosque desde el verano al otoño. Y es que, los ecosistemas con ambientes extremos (como puede ser el verano en el Sur de la península Ibérica), son proclives a presentar cepas con propiedades beneficiosas para las plantas (Verma *et al.*, 2017). Se puede decir que los estudios estacionales son interesantes, pues aportan nuevas perspectivas sobre la dinámica de biodiversidad de un suelo. Además, pueden abarcarse desde diversos puntos de vista; así Schutter *et al.* (2001) demostraron la variación de las cepas bacterianas entre estaciones analizando los FAMES (ésteres metílicos de ácidos grasos de las membranas celulares), mientras que Nadal-Rocamora *et al.* (2015) realizaron un análisis funcional en el que contemplaron las propiedades y actividades que realizan las bacterias. En este sentido, el análisis de las propiedades PGP llevado a cabo en esta Tesis Doctoral siguió la misma tendencia que la descrita por Navarro-Torre *et al.* (2017) utilizando la misma halófito, tanto en el porcentaje de propiedades PGP cómo en la forma en que estas se asociaron. Este estudio se realizó con la finalidad de seleccionar bacterias PGP, por lo que la colección bacteriana se caracterizó en base a seis propiedades que se consideraron interesantes para mejorar la fitodesalinización (Apéndice 2).

Aunque no fue el objetivo de esta Tesis, orientada a un campo más aplicado, dentro del Proyecto en el que se realizaron estos trabajos también se describió la biodiversidad bacteriana de las zonas de muestreadas mediante secuenciación masiva del gen ARNr 16S. Con ello, Camacho *et al.* (2020) compararon las muestras utilizadas en esta Tesis y concluyeron que la mayor biodiversidad se presentó en la marisma en verano, diferenciándose del canal y que, en otoño, las muestras eran prácticamente semejantes. Según sus análisis, las diferencias atendieron más a una mezcla de factores abióticos que a la presencia de *A. macrostachyum* (factor biótico).

Una vez descrita la amplia colección de rizobacterias, se comprobó el efecto que estas bacterias podría tener sobre el crecimiento de *A. macrostachyum* (Capítulo III). Debido al alto número de cepas potencialmente útiles como biofertilizantes para dicha planta, se realizó una primera selección usando semillas de colza, ya que es un sistema más rápido y sensible a la inoculación bacteriana, en especial a las bacterias productoras de auxinas (Penrose y Glick, 2003). Tras la selección de las bacterias con las que se iba a trabajar, se decidió probar los inóculos de forma individual, pues, aunque hay estudios que abogan por inóculos mixtos (Shaharoon et al., 2006; Dary et al., 2010; Upadhyay et al., 2012), se quería conocer el efecto que cada bacteria *per se* ejercía sobre la planta.

A su vez, se quiso estudiar si la presencia de sal era un factor que provocase algún tipo de efecto en la interacción bacteria-planta. Relacionado con esta idea, Navarro-Torre et al. (2017), ya habían estudiado el efecto que bacterias endófitas de *A. macrostachyum* ejercían sobre esta misma planta a concentraciones altas de sal (510-1030mM). Por eso, en este capítulo nos centramos en los posibles efectos a una concentración de sal que se considera moderada para una halófito, 171 mM NaCl. De esta manera, se observó el beneficio que las distintas cepas bacterianas producían sobre *A. macrostachyum* a diferentes niveles de desarrollo de la planta. Así, la presencia de las cepas Hv16 y RTE9 solventó el efecto negativo en la germinación que suele tener la sal, incluso en plantas halófilas, al no permitir la hidratación de la semilla (Wahid et al., 1999). A continuación, a nivel de plántulas, se observó que aquellas inoculadas con las cepas Hv16 y C58, presentaban una mayor superficie de ramas. Esto se considera un factor importante en los inicios del ciclo de la planta, ya que, en este tipo de plantas carnosas, las hojas aparecen fusionadas al tallo, con lo cual se relaciona con una mayor superficie para poder realizar la fotosíntesis (Redondo-Gómez et al., 2010). Más tarde, en plantas adultas de *A. macrostachyum* crecidas sin sal, se observó que la inoculación con las cepas Hv16 y C58 provocaba un aumento de peso tanto en la parte aérea como en la raíz, lo que se considera un efecto positivo, pues la ausencia de sal se considera un factor de estrés para una halófito estricta como *A. macrostachyum* (Flowers y Colmer, 2008). Incluso en tratamientos en los que *A. macrostachyum* creció con sal, los inóculos tendían a aumentar la cantidad de raíz, hecho fundamental para facilitar la absorción de nutrientes en general (Richardson et al., 2009) y, en concreto, para la remediación de sal mediante fitoextracción, objeto de estudio en esta Tesis Doctoral.

Por otro lado, se planteó qué efecto tendrían los inoculantes, seleccionados en el ensayo anterior, sobre esquejes de *A. macrostachyum*. Esta idea surgió pensando en la

multiplicación de *A. macrostachyum* para una futura remediación de suelo y en los diferentes inconvenientes que puede presentar el hacerlo desde semilla. Y es que la multiplicación de *A. macrostachyum* mediante semillas no es un proceso rápido, pues al ser una planta perenne su ciclo de vida es más lento que el de otras especies anuales de su misma familia. Además, las semillas que se producen cada año pierden viabilidad rápidamente con lo cual, un año en el que la cosecha sea mala podría poner en jaque la multiplicación. Por último, la multiplicación por esquejes o estaquillado, evitaría la variabilidad genética a la hora de realizar investigaciones o de seleccionar individuos adecuados para la multiplicación. Este sistema alternativo, que puede ser usado a lo largo de todo el año, podría verse potenciado por el uso de bacterias. Así, se comprobó cómo gracias a la presencia de las cepas Hv16 o C58 los esquejes presentaban una mayor cantidad de raíces, hecho fundamental en el proceso de estaquillado para la supervivencia y desarrollo de los esquejes.

El siguiente capítulo es producto de dos cuestiones que se deseaban abordar. Por un lado, debido a los ensayos del Capítulo III y las diferencias observadas entre los ensayos realizados con semillas y esquejes, nos planteamos comprobar si el efecto que tenía una bacteria sobre la planta (con interacción de la sal) era el mismo dependiendo del estadio en el que se inoculase *A. macrostachyum*. Por otro lado, conociendo el potencial de las bacterias PGP que presentan la actividad enzimática ACC desaminasa y su influencia para evitar que las plantas detecten señales de estrés (Mayak *et al.*, 2004), se quiso estudiar el efecto de una bacteria con dicha propiedad sobre *A. macrostachyum* en condiciones de ausencia de sal y baja salinidad (86 mM), que pueden considerarse como situaciones de estrés y subóptima respectivamente (Capítulo IV).

A nivel de semillas, se obtuvieron resultados similares a los del Capítulo III, de manera que la cepa OR133 facilitó la germinación en una situación de estrés como es la presencia de sal. Por otro lado, lo más reseñable de este capítulo es la sinergia que hay entre la bacteria y la sal sobre la biomasa de ramas y raíces, de manera que al inocular *A. macrostachyum*, en estado de semilla, la planta generó un 72 % más de biomasa. Son escasos los trabajos que han estudiado la inoculación en semillas y plantas a la vez para analizar el crecimiento vegetal diferencial. Así, Martínez *et al.* (2007) inocularon plantas de pino con esporas de un hongo micorrícico en dos tiempos diferentes, pero no obtuvieron ninguna diferencia en tamaño ni forma. En nuestro caso, la mejora de la biomasa podría deberse al tiempo que la bacteria tarda en colonizar la raíz, ya que, al

inocular la semilla, la bacteria comienza la colonización desde la radícula, mientras que al inocular plantas adultas el proceso de colonización es mucho más lento.

Además, no son muchos los estudios en los que se aíslan bacterias rizosféricas de una halófito para ser aplicadas sobre ella misma, pues lo más común es utilizarlas sobre otros cultivos que presentan problemas para desarrollarse en un medio salino. Dentro de los estudios que aplicaron los aislados sobre la propia halófito, la observación más común fue el efecto positivo del inóculo sobre plantas que presentaban estrés por exceso de sal. Así, encontramos ejemplos como el de Navarro-Torres *et al.* (2017) que describieron el efecto positivo de bacterias endófitas sobre plantas de *A. macrostachyum* crecidas a 1030 mM NaCl; o el de Komaresofla *et al.* (2019), que expusieron los beneficios que ejerce un consorcio de bacterias rizosféricas y endófitas, sobre plantas de *Salicornia sp* crecidas entre 400-600 mM NaCl. Por lo tanto, en el Capítulo IV de esta Tesis Doctoral, se muestra el primer estudio en el que se ha observado un efecto positivo de la inoculación en plantas halófitas cuando estas han crecido cerca de su óptimo de sal.

Una vez integrados los datos de los ensayos anteriores y, con el objeto de comprobar si la fitodesalinización llevada a cabo por *A. macrostachyum* se veía influenciada por la inoculación bacteriana, se realizó un último ensayo de remediación en un suelo contaminado con un exceso de sal moderado (Capítulo V). Como ya se conocían los efectos que cada cepa bacteriana originaba, de forma individual, sobre *A. macrostachyum*, se formuló un inoculante compuesto por las dos bacterias que habían presentado los mejores resultados en el Capítulo III. Además, y gracias a los datos obtenidos en el primer capítulo de esta Tesis, las plantas de *A. macrostachyum* se crecieron sin sal, pues ya se había determinado que la velocidad de fitodesalinización era mayor en esas condiciones. La inoculación no se realizó en las semillas, sino en el momento de comenzar la fitodesalinización, con el objetivo de no generar diferencias de biomasa respecto al tratamiento sin inocular (Capítulos III y IV), ya que la biomasa de la planta influye en la toma del sodio (Capítulo I).

Con todas esas apreciaciones y los datos obtenidos, se concluyó que la fitodesalinización realizada por *A. macrostachyum* permitió recuperar un suelo afectado por exceso de sal, para un posterior uso agrícola. Además, la inoculación con bacterias PGP posibilitó una mejora en la eficiencia en el uso del agua, gracias a la regulación de la tasa de conductancia estomática. Dicha mejora en la gestión de los recursos hídricos es un factor interesante y debería tenerse en cuenta en los planes de fitodesalinización, ya

que, una porción importante de las zonas agrícolas afectadas por la salinización presenta limitaciones hídricas al estar asociada a climas áridos.

Así, con el trabajo realizado en esta Tesis Doctoral, se pone de manifiesto el potencial que presenta el uso de microorganismos autóctonos para mejorar el papel de las plantas como bioherramientas, contribuyendo a un desarrollo más sostenible del planeta.

Para finalizar, es necesario realizar un esbozo sobre las posibles vías de investigación que se abren camino a partir de los conocimientos adquiridos en esta Tesis Doctoral.

A raíz de comparar los valores de la tasa de fitodesalinización (R_{PH}) entre los Capítulos I y V, y observar que eran diferentes, se pensó que este hecho podría estar relacionado con la concentración de NaCl presente en el suelo, pues esta era mayor en el Capítulo I. Por ello, sería interesante determinar si la capacidad fitodesalinizadora de *A. macrostachyum* también depende de la concentración de sal presente en el suelo o, si la diferencia de potencial osmótico entre el suelo y la planta condiciona la capacidad de extracción de *A. macrostachyum*.

Trayendo a colación los resultados de interacción bacteria-planta de los Capítulos III, IV y V, es evidente que, aun obteniendo resultados satisfactorios, sería necesario indagar en las bases de dicha interacción para intentar potenciarla. Se debería abordar el estudio, a nivel genético, de la respuesta diferencial que las distintas cepas provocan sobre *A. macrostachyum*, pues como se ha observado, no parece que todas las cepas actúen de igual manera (Capítulos III y IV).

Sin olvidar la idea del párrafo anterior, creemos que es muy importante abundar, desde diferentes niveles, en la respuesta que *A. macrostachyum* genera en la fitodesalinización con respecto al uso del agua. Es de gran importancia que se pueda aumentar la eficiencia de la fitodesalinización respecto al uso de los recursos hídricos si se quiere que esta técnica sea útil en distintas regiones del planeta.

Por otro lado, esta Tesis Doctoral ha generado una amplia colección bacteriana, llegándose a utilizar algunos de sus aislamientos en ensayos de plantas bajo condiciones controladas; pero si algo cuenta la historia de la ciencia, es que muchos de los inoculantes seleccionados en el laboratorio muestran en el campo un bajo rendimiento. Por ello, es necesario que los ensayos de fitodesalinización asistida por microorganismos, se extiendan a experimentos de campo para demostrar que es un sistema eficaz. Nunca sin olvidar que son necesarios estudios transversales, como los de prácticas de manejo agrícola que favorezcan tanto a las bacterias como a la planta o de métodos para lograr

que la inoculación sea exitosa y a la vez, económica para el agricultor. Y, aunque se han utilizado bacterias autóctonas, también sería relevante monitorizar el suelo desde el punto de vista del microbioma para saber cómo el inoculante modula al resto de poblaciones y viceversa.

Además, esta colección de bacterias halotolerantes con potencial de promover el crecimiento de las plantas, podría ser muy útil para la búsqueda de cepas que confiriesen resistencia tanto a la salinidad como a otros factores abióticos a diferentes cultivos que presenten limitaciones debido a condiciones adversas (sequía, altas temperaturas, etc.).

Por último, a la vez que se realizan estudios para obtener la fortificación de cultivos gliófitos mediante la inoculación con bacterias PGP (Hall *et al.*, 1996; Khalid *et al.*, 2004; Mayak *et al.*, 2004; Dey *et al.*, 2004; Orhan *et al.*, 2006), se podría hacer hincapié en aquellos encaminados al aprovechamiento, como complemento alimenticio, de las plantas utilizadas en proyectos de fitodesalinización. El uso de *A. macrostachyum* en remediación debido a su distribución cosmopolita en la región mediterránea y a su carácter perenne, queda más que justificado. Si, además, a través de la inoculación obtenemos una mejora nutricional en la planta, sería muy interesante que ésta, una vez recolectada, pudiera ser utilizada bien como alimento para el ganado (Barroso *et al.*, 2005), bien para la alimentación humana (Glenn *et al.*, 1999; Khan y Gul, 2002; Flowers, 2004).

Bibliografía

Barroso, F., Pedreno, A., Martínez, T., Robles, A. y González-Rebollar, J. 2005.

Potencialidad de las especies C4 como alimento para el ganado en repoblaciones de zonas semiáridas, en XLV Reunión Científica de la SEEP. *Producciones Agroganaderas: Gestión Eficiente y Conservación del Medio Natural*, 1: 347–353.

Camacho, M., Barcia-Piedras, J. M., Redondo-Gómez, S. y Camacho, M. 2020.

Mediterranean seasonality and the halophyte *Arthrocnemum macrostachyum* determine the bacterial community in salt marsh soils in Southwest Spain. *Applied Soil Ecology*, aceptado.

Cañedo-Argüelles, M., Hawkins, C. P., Kefford, B. J., Schäfer, R. B., Dyack, B. J., Brucet, S., Buchwalter, D., Dunlop, J., Frör, O., Lazorchak, J., Coring, E., Fernandez, H. R., Goodfellow, W., González Achem, A. L., Hatfield-Dodds,

- S., Karimov, B. K., Mensah, P., Olson, J. R., Piscart, C., Prat, N., Ponsá, S., Schulz, C. J., y Timpano A. J.** 2016. Saving freshwater from salts. *Science*, 351 (6276): 914-916.
- Cox, P. M., Betts, R. A., Jones, C. D., Spall, S. A. y Totterdell, I. J.** 2000. Acceleration of global warming due to carbon-cycle feedbacks in a coupled climate model. *Nature*, 408 (6809): 184.
- Dary, M., Chamber-Pérez, M. A., Palomares, A. J. y Pajuelo, E.** 2010. "In situ" phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. *Journal of Hazardous Materials*, 177 (1-3): 323-330.
- Davidson, E. A. y Janssens, I. A.** 2006. Temperature sensitivity of soil carbon decomposition and feedbacks to climate change. *Nature*, 440 (7081): 165.
- De Araujo A. S. F., de Melo, W. J. y Singh R. P.** 2010. Municipal solid waste compost amendment in agricultural soil: changes in soil microbial biomass. *Reviews in Environmental Science and Bio-Technology*, 9: 41-49.
- Dey, R., Pal, K. K., Bhatt, D. M. y Chauhan, S. M.** 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological research*, 159 (4): 371-394.
- Diacono, M. y Montemurro, F.** 2010. Long-term effects of organic amendments on soil fertility. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 30: 401-422.
- Ebadi, A., Sima, N. A. K., Olamaee, M., Hashemi, M., y Nasrabadi, R. G.** 2018. Remediation of saline soils contaminated with crude oil using the halophyte *Salicornia persica* in conjunction with hydrocarbon-degrading bacteria. *Journal of Environmental Management*, 219: 260-268.
- Flowers, T. J.** 2004. Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental botany*, 55 (396): 307-319.
- Flowers, T. J. y Colmer, T. D.** 2008. Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist*, 179 (4): 945-963.

- Glenn, E. P., Brown, J. J. y Blumwald, E.** 1999. Salt tolerance and crop potential of halophytes. *Critical reviews in plant sciences*, 18 (2): 227-255.
- Hall, J. A., Peirson, D., Ghosh, S. y Glick, B.** 1996. Root elongation in various agronomic crops by the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Israel Journal of Plant Sciences*, 44 (1): 37-42.
- IPCC.** 2013. The Physical Science Basis. Anexe III Glossary. https://archive.ipcc.ch/report/ar5/wg1/index_es.shtml (último acceso: 19/07/2019)
- Jlassi, A., Zorrig, W., Khouni, A. E., Lakhdar, A., Smaoui, A., Abdely, C. y Rabhi, M.** 2013. Phytodesalination of a moderately-salt-affected soil by *Sulla carnosa*. *International journal of phytoremediation*, 15 (4): 398-404.
- Khalid, A., Arshad, M. y Zahir, Z. A.** 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*, 96 (3): 473-480.
- Khan, M. y Gul, B.** 2002. *Arthrocnemum macrostachyum*: a potential case for agriculture using above seawater salinity. *Tasks for Vegetation Science Prospects for Saline Agriculture*, 37: 353-364.
- Khan M. A., Ungar I. A. y Showalter A. M.** 2005. Salt stimulation and tolerance in an intertidal stem-succulent halophyte. *Journal of Plant Nutrition*, 28: 1365-1374.
- Komaresofla, B. R., Alikhani, H. A., Etesami, H. y Khoshkholgh-Sima, N. A.** 2019. Improved growth and salinity tolerance of the halophyte *Salicornia sp.* by co-inoculation with endophytic and rhizosphere bacteria. *Applied Soil Ecology*, 138, 160-170.
- Lovelock, J.** 1988. The Ages of Gaia: a biography of our living Earth. Norton, Nueva York, USA, 255 pp.
- Martínez, D. B., Barroetaveña, C. y Rajchenberga, M.** 2007. Influence of the fertilization regime and the time of inoculum application in the mycorrhization rate of *Pinus ponderosa* in nursery. *Bosque*, 28 (3):226-233.

- Mayak, S., Tirosh, T. y Glick, B. R.** 2004. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant physiology and Biochemistry*, 42 (6): 565-572.
- Muchate, N. S., Nikalje, G. C., Rajurkar, N. S., Suprasanna, P. y Nikam, T. D.** 2016. Physiological responses of the halophyte *Sesuvium portulacastrum* to salt stress and their relevance for saline soil bio-reclamation. *Flora*, 224: 96-105.
- Naciones Unidas.** 2017. Convención de las Naciones Unidas de lucha contra la desertificación, en los países afectados por sequía grave o desertificación, en particular en África. https://www.unccd.int/sites/default/files/relevant-links/2017-08/UNCCD_Convention_text_SPA.pdf (último acceso: 19/07/2019)
- Nadal-Rocamora, I.** 2015. Alteraciones fisiológicas, metabólicas y de la composición de las poblaciones bacterianas de la microbiota de un suelo agrícola tras la aplicación de residuos orgánicos urbanos (Tesis Doctoral). *Universidad complutense de Madrid*, Madrid, España, 276 pp.
- Navarro-Torre, S., Barcia-Piedras, J. M., Mateos-Naranjo, E., Redondo-Gómez, S., Camacho, M., Caviedes, M. A., Pajuelo, E. y Rodríguez-Llorente, I. D.** 2017. Assessing the role of endophytic bacteria in the halophyte *Arthrocnemum macrostachyum* salt tolerance. *Plant Biology*, 19: 249-256.
- Nicholls, R. J. y Cazenave, A.** 2010. Sea-level rise and its impact on coastal zones. *Science*, 328 (5985): 1517-1520.
- Orhan, E., Esitken, A., Ercisli, S., Turan, M. y Sahin, F.** 2006. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Scientia Horticulturae*, 111 (1): 38-43.
- Penrose, D. M. y Glick, B. R.** 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum*, 118 (1):10-15.
- Qadir, M., Quillerou, E., Nangia, V., Murtaza, G., Singh, M., Thomas, R. J., Drechsel, P. y Noble, A. D.** 2014. Economics of salt-induced land degradation and restoration. *Natural Resources Forum*, 38 (4): 282-295.

- Rabhi, M., Ferchichi, S., Jouini, J., Hamrouni, M. H., Koyro, H. W., Ranieri, A., Abdelly, C. y Smaoui, A.** 2010. Phytodesalination of a salt-affected soil with the halophyte *Sesuvium portulacastrum* L. to arrange in advance the requirements for the successful growth of a glycophytic crop. *Bioresource technology*, 101 (17): 6822-6828.
- Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Figueroa, M. E. y Davy, A. J.** 2010. Salt stimulation of growth and photosynthesis in an extreme halophyte, *Arthrocnemum macrostachyum*. *Plant Biology*, 12: 79-87.
- Richardson, A. E., Barea, J. M., McNeill, A. M. y Prigent-Combaret, C.** 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil*, 321: 305-339.
- Schutter, M., Sandeno, J. y Dick, R.** 2001. Seasonal, soil type, and alternative management influences on microbial communities of vegetable cropping systems. *Biology and Fertility of Soils*, 34 (6): 397-410.
- Shaharoon, B., Arshad, M. y Zahir, Z. A.** 2006. Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiata* L.). **Letters in applied microbiology**, 42 (2): 155-159.
- Singh, R. P. y Agrawal M.** 2008. Potential benefits and risks of land application of sewage sludge. *Waste Management*, 28: 347-358.
- Steffen, W., Broadgate, W., Deutsch, L., Gaffney, O. y Ludwig, C.** 2015. The trajectory of the Anthropocene: the great acceleration. *The Anthropocene Review*, 2 (1): 81-98.
- Tilman, D., Cassman, K. G., Matson, P. A., Naylor, R. y Polasky, S.** 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, 418 (6898): 671.

- Upadhyay, S. K., Singh, J. S., Saxena, A. K. y Singh, D. P.** 2012. Impact of PGPR inoculation on growth and antioxidant status of wheat under saline conditions. *Plant Biology*, 14 (4): 605-611.
- Verma, P., Yadav, A. N., Kumar, V., Singh, D. P. y Saxena, A. K.** 2017. Beneficial Plant-Microbes Interactions: Biodiversity of Microbes from Diverse Extreme Environments and Its Impact for Crop Improvement, en *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives*. Springer, Singapore, 657 pp.
- Wahid, A., Rasul E. y Rao, A.** 1999. Germination of seeds and propagules under salt stress, en *Handbook of Plant and Crop Stress*. Marcel Dekker Inc., New York, USA, 1198 pp.
- Žifčáková, L., Větrovský, T., Howe, A. y Baldrian, P.** 2016. Microbial activity in forest soil reflects the changes in ecosystem properties between summer and winter. *Environmental microbiology*, 18 (1): 288-301.

CONCLUSIONES

1. La exposición previa a la sal es tan determinante como la biomasa vegetal para la capacidad desalinizadora de *A. macrostachyum*. Las plantas crecidas sin sal muestran una tasa de fitodesalinización similar a las crecidas con una salinidad óptima (con una biomasa inicial mayor), debido a la tasa de fitodesalinización relativa más alta de las primeras.
2. La rizosfera de la halófito *A. macrostachyum* es una zona de muestreo adecuada para la selección de bacterias con propiedades promotoras del crecimiento vegetal, siendo el verano la estación más propicia para ello.
3. Las cepas bacterianas RTE9, Hv16 y OR133 compensan el efecto negativo que produce el NaCl sobre la germinación de *A. macrostachyum*, incrementando los porcentajes de germinación bajo estas condiciones.
4. Las cepas Hv16 y OR133 reducen el desarrollo de hongos en las semillas de *A. macrostachyum* en presencia de sal, mientras que la cepa OR133 ejerce también su actividad de biocontrol en ausencia de esta.
5. Los efectos de la interacción planta-microorganismo son más evidentes cuando *A. macrostachyum* se inocula desde semilla, siendo los efectos casi nulos cuando la inoculación se realiza a nivel de planta.
6. Las cepas bacterianas Hv16, C58 y RTE 9 potencian el desarrollo de la biomasa de ramas y raíces en plantas de *A. macrostachyum* crecidas bajo condiciones de déficit salino (0 mM).
7. En condiciones óptimas de sal, las cepas Hv16, C58 y RTE9 inducen una mayor producción de raíces en las plantas de *A. macrostachyum*.
8. Las cepas Hv16 y C58 potencian el estaquillado de *A. macrostachyum* al estimular una mayor biomasa radical en los esquejes.

9. La inoculación con la cepa OR133 a concentraciones subóptimas de sal produce un efecto sinérgico, incrementando la biomasa de ramas y raíces de *A. macrostachyum*.
10. La fitodesalinización que realiza *A. macrostachyum* en los suelos agrícolas es efectiva, permitiendo el posterior establecimiento y desarrollo de distintos cultivos.
11. La coinoculación con las cepas Hv16 y RTE9 mejora la gestión de los recursos hídricos por parte de *A. macrostachyum* sin mermar por ello su capacidad fitodesalinizadora.

APÉNDICE I

Medios y reactivos

Solución de sales minerales (Vincent, 1970)

Componente	Cantidad
K ₂ HPO ₄	500 mg
MgSO ₄ *7H ₂ O	200 mg
NaCl	100 mg
CaCl ₂	50 mg
H ₂ O _d	1 l

Medios para el crecimiento de bacterias**Medio mínimo Nfb** (Döbereiner, 1980)

Componente	Cantidad
L-ácido málico	2.5 g
K ₂ HPO ₄	500 mg
MgSO ₄ *7H ₂ O	200 mg
NaCl	100 mg
CaCl ₂	20 mg
KOH	4.5 g
NH ₄ Cl	500 mg
Solución de microelementos	2 ml
FeEDTA (1,64 p/v, acuoso)	0.4 ml
Biotina	100 mg
H ₂ O _d	1 l
pH	6.8 ± 0.2
Solución de microelementos	
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0.2 g
MgSO ₄ *H ₂ O	1 g

Medio de Vincent (Vincent, 1970)

Componente	Cantidad
D-Manitol	10 g
Extracto de levadura	800 mg
MgSO ₄ *7H ₂ O	200 mg
K ₂ HPO ₄	0,50 g
NaCl	100 mg
Cl ₂ Ca	50 mg
H ₂ O _d	1 l
pH	6.9 ± 0.1

Medio CAS (Alexander y Zureber, 1991)

Componente	Cantidad
Solución 1 (solución indicadora de Fe-CAS)	
FeCl ₃ *6H ₂ O 1 mM (en 10 mM HCl)	10 ml
Solución acuosa de CAS (1,21 mg ml ⁻¹)	50 ml
Solución acuosa de HDTMA (1.82 mg ml ⁻¹)	40 ml
Solución 2 (solución tampón)	
PIPES	30.24 g
KH ₂ PO ₄	0.3 g
NaCl	0.5 g
NH ₄ Cl	1 g
H ₂ O _d	800 ml
pH (ajustado con KOH 50%)	6.8
Solución 3	
Glucosa	2 g
Manitol	2 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	493 mg
CaCl ₂	11 mg
MnSO ₄ *H ₂ O	1.17 mg
H ₃ BO ₃	1.4 mg
CuSO ₄ *5H ₂ O	0.04 mg

ZnSO ₄ *7H ₂ O	1.2 mg
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	1 mg
Solución 4	
Casaminoácidos	3 g
H ₂ O _d	30 ml

Medio PVK (Pikovskaya. 1948)

Componente	Cantidad
Glucosa	10 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	500 mg
MgSO ₄ *7H ₂ O	100 mg
Extracto de levadura	500 mg
KCl	200 mg
NaCl	200 mg
FeSO ₂ *7H ₂ O	2 mg
MnSO ₄ *H ₂ O	2 mg
Ca ₂ (PO ₄) ₅	5.0 g
H ₂ O _d	1 l
pH	7.0 ± 0.2

Si el medio a utilizar era sólido se le añadió 16 g l⁻¹ de agar.

Si la cepa requería sal para crecer, al medio se añadió NaCl hasta los 350 mM.

Todos los medios descritos en este apartado fueron previamente esterilizados mediante autoclave (20 minutos a 121 °C).

Medio TY (Behringer, 1974)

Componente	Cantidad
Extracto de levadura	3 g
Triptona	5 g
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,65 g
H ₂ O _d	Completar hasta 1
pH	6.8-7.0

Antibióticos**Cicloheximida**

Componente	Cantidad
Chx	200 mg
Etanol 96 %	4 ml
H ₂ O _d	6 ml

Reactivos**Salkowski (Patten y Glick, 2002)**

Componente	Cantidad
H ₂ SO ₄ 96%	150 ml
H ₂ O _d	250 ml
FeCl ₃ 0.5 M	7.5 ml

Soluciones nutritivas para plantas**Medio Hewitt (Hewitt, 1952)**

Componente	Cantidad
Solución 1	10ml
Solución 2	20 ml
Solución 3	10 ml
Solución 4	10 ml
Solución 5	1 ml
H ₂ O _d	949 ml
pH	6.5
Solución 1	
NO ₃	40.44 g l ⁻¹
Solución 2	
NO ₃ Ca*4H ₂ O	47.23 g l ⁻¹
Solución 3	
SO ₄ Mg*7H ₂ O	36.97 g l ⁻¹
PO ₄ H ₂ K	272 mg l ⁻¹

Solución 4	
NaEDTAFe	4.21 g l ⁻¹
Solución 5	
SO ₄ Mn*4H ₂ O	2.23 g l ⁻¹
BO ₃ H ₃	3.09 g l ⁻¹

Medio Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950)

Componente	Cantidad
Solución 1	1 ml
Solución 2	2 ml
NH ₄ (H ₂ PO ₄)	115 mg l ⁻¹
MgSO ₄ *7H ₂ O	493 mg l ⁻¹
Ca(NO ₃)*4H ₂ O	945 mg l ⁻¹
KNO ₃	607 mg l ⁻¹
H ₂ O _d	997 ml
Solución 1	
BO ₃ H ₃	2.86 g l ⁻¹
MnCl ₂ *4H ₂ O	180 mg l ⁻¹
ZnSO ₄ *7H ₂ O	222 mg l ⁻¹
CuSO ₄ *5H ₂ O	80 mg l ⁻¹
H ₂ MoO ₄ * H ₂ O	20 mg l ⁻¹
Solución 2	
EDDHAFe	5 mg l ⁻¹
pH	6.5

APÉNDICE II

Colección bacteriana

Cepa	Zona	Estación	Temp. (40 °C)	Salinidad	Sideróforos	Fosfatos	Auxinas	Biofilm
Hv1	Marisma	Otoño	0	0	0	0	0	0
Hv2	Marisma	Otoño	0	0	2	1	0	0
Hv3a	Marisma	Otoño	0	0	0	0	0	0
Hv3b	Marisma	Otoño	0	0	0	0	0	0
Hv4	Marisma	Otoño	0	0	0	0	1	0
Hv6	Marisma	Otoño	0	1	0	0	0	0
Hv7	Marisma	Otoño	0	0	0	0	0	1
Hv8	Marisma	Otoño	0	1	0	0	0	0
Hv9	Marisma	Otoño	0	0	0	0	0	0
Hv10	Marisma	Otoño	0	1	0	0	0	0
Hv11	Marisma	Otoño	0	0	0	0	0	0
Hv12	Marisma	Otoño	0	0	0	0	0	1
Hv13	Marisma	Otoño	0	0	0	0	1	1
Hv14	Marisma	Otoño	0	2	0	0	0	0
Hv14a	Marisma	Otoño	0	0	0	0	0	0
Hv14b	Marisma	Otoño	0	2	0	0	0	0
Hv16	Marisma	Otoño	0	1	2	0	4	0
Hvs1	Marisma	Otoño	0	0	0	0	0	0
Hvs2	Marisma	Otoño	0	1	0	0	0	0
Hvs3	Marisma	Otoño	0	1	0	0	0	0
Hvs4	Marisma	Otoño	0	1	1	0	0	0
Hvs5	Marisma	Otoño	0	0	0	0	0	1
Hvs6	Marisma	Otoño	0	1	3	0	0	0
Hvs7	Marisma	Otoño	0	0	0	0	1	0

Cepa	Zona	Estación	Temp. (40 °C)	Salinidad	Sideróforos	Fosfatos	Auxinas	Biofilm
Hvs8	Marisma	Otoño	0	0	0	0	2	0
Hvs9	Marisma	Otoño	0	0	0	0	1	1
Hvs10	Marisma	Otoño	0	0	0	0	0	0
Hvs11	Marisma	Otoño	0	0	0	0	2	0
Hvs12	Marisma	Otoño	0	0	0	0	1	0
Hvs13	Marisma	Otoño	0	1	1	0	0	0
Hvs13a	Marisma	Otoño	0	0	0	0	1	0
Hvs13b	Marisma	Otoño	0	0	0	0	0	0
Hvs14	Marisma	Otoño	0	1	0	0	4	0
Hvs16	Marisma	Otoño	0	0	0	0	0	0
Hvs18	Marisma	Otoño	0	3	0	0	0	0
C1	Canal de riego	Otoño	0	1	3	0	0	0
C2	Canal de riego	Otoño	0	1	1	0	0	0
C3	Canal de riego	Otoño	0	0	1	0	0	0
C4	Canal de riego	Otoño	0	0	1	2	0	0
C5	Canal de riego	Otoño	0	1	1	0	0	0
C6	Canal de riego	Otoño	0	1	0	0	0	0
C7	Canal de riego	Otoño	0	0	2	1	0	0
C8	Canal de riego	Otoño	0	0	0	0	1	1
C9	Canal de riego	Otoño	0	0	0	0	0	1
C10a	Canal de riego	Otoño	0	0	0	0	0	0
C10b	Canal de riego	Otoño	0	1	0	0	0	0
C11	Canal de riego	Otoño	0	1	1	1	0	0
C12	Canal de riego	Otoño	0	0	0	0	0	0

Cepa	Zona	Estación	Temp. (40 °C)	Salinidad	Sideróforos	Fosfatos	Auxinas	Biofilm
C13b	Canal de riego	Otoño	0	0	0	0	0	0
C14	Canal de riego	Otoño	0	2	0	0	0	0
C15	Canal de riego	Otoño	0	1	0	0	0	0
C16	Canal de riego	Otoño	0	1	0	0	0	1
C17	Canal de riego	Otoño	0	1	0	0	0	0
C18	Canal de riego	Otoño	0	0	0	3	0	0
C20	Canal de riego	Otoño	0	1	0	0	0	1
C21	Canal de riego	Otoño	0	1	0	0	1	0
C22	Canal de riego	Otoño	0	0	0	0	0	0
C23	Canal de riego	Otoño	0	1	0	0	1	0
C24	Canal de riego	Otoño	0	1	0	0	0	0
C25	Canal de riego	Otoño	0	0	0	0	0	0
C26	Canal de riego	Otoño	0	1	0	0	0	0
C27	Canal de riego	Otoño	0	1	0	0	0	0
Cs1	Canal de riego	Otoño	0	1	0	0	0	1
Cs2	Canal de riego	Otoño	0	1	1	0	0	0
Cs3	Canal de riego	Otoño	0	0	0	0	0	0
Cs4	Canal de riego	Otoño	0	0	1	0	0	0
Cs5	Canal de riego	Otoño	0	1	0	0	2	0
Cs6	Canal de riego	Otoño	0	1	0	0	0	0
Cs7	Canal de riego	Otoño	0	0	3	0	0	0
Cs8	Canal de riego	Otoño	0	0	0	0	0	0
Cs9	Canal de riego	Otoño	0	0	2	0	0	0
Cs10	Canal de riego	Otoño	0	0	0	0	0	0

Cepa	Zona	Estación	Temp. (40 °C)	Salinidad	Sideróforos	Fosfatos	Auxinas	Biofilm
Cs11	Canal de riego	Otoño	0	1	1	0	0	0
Cs12	Canal de riego	Otoño	0	1	3	0	0	0
Cs13	Canal de riego	Otoño	0	0	0	0	0	0
Cs14	Canal de riego	Otoño	0	0	0	0	0	0
Cs15	Canal de riego	Otoño	0	0	0	0	0	0
Cs16a	Canal de riego	Otoño	0	0	0	0	0	0
Cs16b	Canal de riego	Otoño	0	1	0	0	0	0
Cs17	Canal de riego	Otoño	0	0	0	0	0	0
Cs18	Canal de riego	Otoño	0	0	0	0	0	0
Cs19	Canal de riego	Otoño	0	1	1	0	0	0
Cs20	Canal de riego	Otoño	0	0	0	0	0	0
Cs20a	Canal de riego	Otoño	0	0	0	0	0	0
Cs21	Canal de riego	Otoño	0	0	0	0	0	0
Cs22	Canal de riego	Otoño	0	1	0	0	1	0
Cs23	Canal de riego	Otoño	0	1	0	1	0	0
Cs24	Canal de riego	Otoño	0	0	0	0	0	0
Cs25	Canal de riego	Otoño	0	2	0	0	0	0
Cs26	Canal de riego	Otoño	0	1	0	0	0	0
Cs27	Canal de riego	Otoño	0	0	0	3	0	0
Hv51	Marisma	Verano	1	0	0	1	0	0
Hv52	Marisma	Verano	1	1	1	2	0	0
Hv53	Marisma	Verano	0	0	0	0	0	0
Hv54	Marisma	Verano	0	3	1	0	1	0
Hv55	Marisma	Verano	0	0	1	0	2	0

Cepa	Zona	Estación	Temp. (40 °C)	Salinidad	Sideróforos	Fosfatos	Auxinas	Biofilm
Hv56	Marisma	Verano	0	1	0	0	1	0
Hv57	Marisma	Verano	0	0	0	0	0	0
Hv58	Marisma	Verano	0	0	3	0	0	0
Hv59	Marisma	Verano	0	0	0	0	0	0
Hv60	Marisma	Verano	0	1	0	0	0	0
Hv61	Marisma	Verano	0	0	0	0	1	0
Hv62	Marisma	Verano	0	1	0	0	1	0
Hv63	Marisma	Verano	0	1	0	0	0	0
Hv64	Marisma	Verano	0	1	0	0	0	0
Hv65	Marisma	Verano	0	2	0	0	1	0
Hv66	Marisma	Verano	0	1	1	0	1	0
Hv67	Marisma	Verano	0	0	3	4	0	0
Hv68	Marisma	Verano	0	0	3	4	0	0
Hv69	Marisma	Verano	0	0	3	4	0	0
Hv70	Marisma	Verano	0	0	2	0	0	0
Hv71	Marisma	Verano	0	0	0	0	0	0
Hv72	Marisma	Verano	0	0	2	0	1	0
Hv73	Marisma	Verano	0	0	1	0	1	0
Hv74	Marisma	Verano	0	0	1	0	1	0
Hv75	Marisma	Verano	0	0	2	0	1	0
Hv76	Marisma	Verano	0	1	2	0	1	0
Hv77	Marisma	Verano	0	0	0	0	0	0
Hv78	Marisma	Verano	0	1	0	0	0	0
Hv79	Marisma	Verano	0	0	1	0	3	1

Cepa	Zona	Estación	Temp. (40 °C)	Salinidad	Sideróforos	Fosfatos	Auxinas	Biofilm
Hv80	Marisma	Verano	0	0	0	0	0	0
Hvs51	Marisma	Verano	0	1	0	0	0	0
Hvs52	Marisma	Verano	0	1	0	0	0	0
Hvs53	Marisma	Verano	0	1	0	0	0	0
Hvs54	Marisma	Verano	0	1	0	0	0	0
Hvs55	Marisma	Verano	0	4	0	0	1	0
Hvs56	Marisma	Verano	0	1	0	0	0	1
Hvs57	Marisma	Verano	0	1	2	0	0	0
Hvs58	Marisma	Verano	0	1	0	0	1	1
Hvs59	Marisma	Verano	0	0	2	0	0	0
Hvs60	Marisma	Verano	0	0	0	0	1	1
Hvs61	Marisma	Verano	1	0	2	0	0	0
Hvs62	Marisma	Verano	1	0	2	0	0	0
Hvs63	Marisma	Verano	0	0	2	0	1	0
Hvs64	Marisma	Verano	0	4	1	0	0	0
Hvs65	Marisma	Verano	0	1	0	0	0	0
Hvs66	Marisma	Verano	0	3	1	0	1	0
Hvs67	Marisma	Verano	0	0	0	0	0	0
Hvs68	Marisma	Verano	0	1	2	0	0	1
Hvs69	Marisma	Verano	0	1	2	0	1	0
Hvs70	Marisma	Verano	0	0	2	0	1	0
Hvs71	Marisma	Verano	0	1	2	0	1	0
Hvs72	Marisma	Verano	0	1	1	0	1	0
Hvs73	Marisma	Verano	0	3	1	0	1	0

Cepa	Zona	Estación	Temp. (40 °C)	Salinidad	Sideróforos	Fosfatos	Auxinas	Biofilm
Hvs74	Marisma	Verano	0	1	1	0	0	0
Hvs75	Marisma	Verano	0	2	0	0	0	1
Hvs76	Marisma	Verano	0	0	1	0	4	1
Hvs77	Marisma	Verano	0	0	2	0	0	0
Hvs78	Marisma	Verano	0	1	0	0	0	0
Hvs79	Marisma	Verano	0	0	2	0	0	0
Hvs80	Marisma	Verano	0	0	2	0	0	0
Hvs81	Marisma	Verano	0	2	2	0	0	0
C51	Canal de riego	Verano	0	0	0	0	0	0
C52	Canal de riego	Verano	0	0	2	0	0	0
C53	Canal de riego	Verano	0	0	0	0	1	0
C54	Canal de riego	Verano	0	0	0	0	0	0
C55	Canal de riego	Verano	0	0	1	0	1	0
C56	Canal de riego	Verano	0	0	0	0	0	1
C57	Canal de riego	Verano	0	0	0	0	0	0
C58	Canal de riego	Verano	0	0	1	0	4	0
C59	Canal de riego	Verano	0	0	0	0	3	0
C60	Canal de riego	Verano	0	0	1	0	0	0
C61	Canal de riego	Verano	0	0	1	0	1	0
C62	Canal de riego	Verano	0	0	1	0	2	1
C63	Canal de riego	Verano	0	0	1	0	1	0
C65	Canal de riego	Verano	0	0	1	0	1	0
C66	Canal de riego	Verano	0	0	1	0	0	0
C67	Canal de riego	Verano	0	0	0	0	0	0

Cepa	Zona	Estación	Temp. (40 °C)	Salinidad	Sideróforos	Fosfatos	Auxinas	Biofilm
C68	Canal de riego	Verano	0	0	0	0	1	0
C69	Canal de riego	Verano	0	0	0	0	2	0
Cs51	Canal de riego	Verano	0	0	0	0	0	0
Cs52	Canal de riego	Verano	0	0	0	0	0	0
Cs53	Canal de riego	Verano	0	0	1	0	1	1
Cs54	Canal de riego	Verano	0	0	1	0	0	1
Cs55	Canal de riego	Verano	0	0	2	0	1	0
Cs56	Canal de riego	Verano	0	0	2	0	0	0
Cs57	Canal de riego	Verano	0	0	1	0	1	1
Cs58	Canal de riego	Verano	0	0	2	0	0	1
Cs59	Canal de riego	Verano	0	2	3	1	0	0
Cs60	Canal de riego	Verano	0	0	1	0	0	0
Cs61	Canal de riego	Verano	0	1	1	0	2	1
Cs62	Canal de riego	Verano	0	0	2	0	0	0
Cs62	Canal de riego	Verano	0	0	2	0	0	0

AGRADECIMIENTOS

Es el momento de echar una mirada atrás y recordar a todos aquellos que han caminado de alguna manera durante este periplo. Si tu nombre no aparece entre estas líneas no te creas que es por carencia de afecto, sino porque mi mente es un hervidero de recuerdos. Por ello, te regalo mis primeras palabras de agradecimiento por haber contribuido a mi gran sueño de terminar este Tesis Doctoral.

En primer lugar tengo que estar muy agradecido a mis dos directoras de Tesis, las Dras. Susana Redondo y María Camacho, pues sin ellas esta obra jamás hubiese sido posible. Las dos caras de una misma moneda y muy afortunado de haber aprendido vosotras. A ambas gracias por vuestra paciencia infinita. Susana, creíste en mí desde un principio, me enseñaste a tener los pies en el suelo y te debo todo lo que sé en el ámbito de la planificación. María, desde aquella vez que me dijiste “tú estás tonto” me has demostrado cómo simplificar cualquier situación, sin olvidar que hay que disfrutar cada segundo. Nunca podré saldar la deuda que tengo con vosotras.

Voy a continuar dando las gracias a las personas con las que di mis primeros pasos en Biología en la Universidad de Sevilla. En un plano especial está el Dr. Enrique Mateos, pues este “*cap de faba*” siempre te admirará por las miles de horas haciendo ciencia (y sin un armario de las hipótesis). Luego, no puedo olvidar a mi mejor amigo y compañero de andanzas en el invernadero, el otro componente del “*Compactation Team*”, gracias al Dr. Jesús Alberto Pérez-Romero (qué bien suena) por tener siempre una sonrisa en su cara.

Sin moverme muchos metros de la facultad, están los dos mejores técnicos del servicio de Invernaderos del CITIUS: Jose (¡Viva el Betis manquepierda!) y Jesús (la mejor persona que existe a pesar de ser palanga). No puedo olvidarme de todo el personal del departamento de Biología Vegetal y Ecología que me han apoyado y el poco espacio para tanta gratitud a expresar. Pero me vais a permitir unas palabras de congratulación con varias personas. Así le agradezco a la Dra. Raque Parra su capacidad de medir ramitas; a la Dra. María Zunzunegui por sus constantes ánimos; a Rosa Cabrera por arreglarme cada papeleo; y a mi Mercedes por tantas horas de charlas y cuidarme cada mañana.

Por supuesto a todos los alumnos internos (Merce, Albertos, Ángel, Aníbal, Juan, Mercedes, Pablo y Raquel), de TFG (Rebeca Ger, Marta Trigo, Alberto Portero y Nazaret Fernández), y TFM (Rebeca Ger -de nuevo-, María Vasseur y Carmen Pérez) que aportaron su granito de arena que pueda defender esta Tesis. Y no me voy de la Universidad sin demostrar mi aprecio a la gran familia del grupo de Fitomicrobiomas

como herramientas biotecnológicas la Facultad de Farmacia (Nacho, Eloísa, Miguel Ángel, Jennifer, Salva y Karina) pues con trabajo codo con codo logramos algunas publicaciones.

Mi singladura me llevó a establecerme en el Centro IFAPA Las Torres, y allí de nuevo hay un grupo de personas maravillosas que tienen todo mi cariño por aportarme algo en esta fase de mi vida. Así no puedo olvidarme de Dr. Francisco Temprano y su vasto conocimiento sobre cultivos (en especial de altramuces), soluciones nutritivas, edafología y un sinfín de historias de toda una vida. Al hablar de Paco tengo que mencionar a la Dra. Dulce Rodríguez, por sus consejos y capacidad de tener el laboratorio impoluto. Degustar mi fruta de la mañana era un placer gracias a los cotilleos con Manoli y Rocío. Allí también me topé con grandes personas de otros campos de la ciencia como mi entomólogo favorito, Sergio, quién me enseñó que el periodo de la Tesis es “jodido” para todos. Y a Migue alias “el todoterreno”, por sus conocimientos sobre el laboratorio y el análisis de muestras (y su don de palabra y toque con la guitarra). Y sería una negligencia olvidar a el resto de becario y todas las risas echadas. Natalia, en breve podré utilizar la taza que me regalaste de “Dr. Bacia”. Miguel, amigo, gracias por tu calidad en todos los aspectos. Jopi, ahora ya sé que los ángeles caminan entre los humanos.

Un gran reto en esta fase de mi vida fue saltar el charco, y con más miedo que vergüenza experimenté que buena gente hay en todos los rincones. Y por ello doy las gracias a la Dra. Yanina Idaszkin por acogerme tanto en su grupo en el CENPAT como en su familia, y espero aun tener muchas cosas que hacer juntos. Al Dr. Federico Márquez por demostrarme que la Filosofía encaja a la perfección con la Biología. A Agus y Jaz y su constante cariño y ganas de jugar. También tengo que acordarme del Dr. Pablo Bouza por su constante ayuda en mi estancia, sus conocimientos en Geología y sus charlas tan agradables. Y no puedo abandonar el CENPAT sin mandar un gran abrazo de afecto al Bocha, sin ti los muestreos por esos caminos hubiesen sido imposible; y al Bebo, por rescatarnos de un mar de alga y enseñarme a apreciar el sabor de los Jorgitos. Bueno, a todos ustedes les debo una nueva tortilla.

Grandes amigos también hice cuando vinieron desde otras partes del mundo a trabajar junto a mis grupos de investigación. Así que muchas gracias por lo aprendido de Danieli Delello (aprender de ella a trabajar con plantas acuáticas y dejar que una chica me invite); Giacoco Puglielli (una radler no es cerveza); Yousef Ouni (allá donde estés mi querido amigo); Warda Sidhoum; y Mohammed Mesnoua (muchas experiencias en sus idas y venidas).

Una persona sin amistades es menos persona, y por ello lanzo al aire un agradecimiento a esas personas que la vida te coloca y que deciden quedarse a tu lado. A Antonio, Gildo, Santi, Dani, Marcos, Mila y los viajecitos a Isla Cristina. A Pili y Cristina, por vuestro apoyo aunque no nos vemos físicamente desde la Uni. A Macarena y sus esfuerzos por quedar una vez al año. A Mara por dejarme ser su Travolta. A Rosa por preguntarme cada día cómo estoy. A Silvia por animarme y mantenerme en línea. Isaac Castro y nuestra eterna amistad por mucho tiempo y/o espacio que nos separen. Sergio, Carmen, Hermanos Lima, Ale, Luis, Toñi (pa'una vez que sales), Ana-Alberto-Hugo (no se os olvida). A Laura, amiga y compañera, por corregirme cada párrafo que te envié, por enseñarme a patinar (casi muriendo en el intento) y a tomarse la vida con otro prisma. La lista es interminable, gracias a todos mis amigos.

Para finalizar, último voy a dedicarle las últimas palabras de este trabajo a mi familia, a todos vosotros que me sufrís constantemente, normalmente de buenas (pero también cuando estaba raro). Queridos padres, como todo hijo, tendré la deuda de por vida gracias por cuidarme y darme una enseñanza que me ha permitido llegar tan alto (y aún me queda mucho por hacer, y a vosotros por verlo). A mi hermano Manu, por estar ahí sin dar casi “ruido”, pero siempre pudiendo contar contigo cuando lo necesito. A mi abuela María, por su cariño y recetas. A todos mis tíos en general, y en concreto a mi tía Reyes (y su exceso de pasión hacia mi persona y trabajo); a mi tío Manuel Vicente (y todo su cariño y pelis vistas); a mi tía Pepi (y las puertas de su casas siempre abiertas); a mi tío Jose (por tantas cosas vividas juntos); y a mi tía Toñi (y sus ganas de que siempre le dé un achuchón). A todos ellos les uno mi afecto hacia mis primos (sois muchos para citarlos). Y por último, agradecerles su apoyo a grupo de personas que no dudo que velan por mí desde otro lugar mucho mejor que este: abuela Francisca (por tu cariño y saber estar a la altura siempre); abuelo José (por llevarme sobre tus hombros a la cazar cocodrilos y gamusinos); abuelo Manolo (por demostrarme que hay que disfrutar cada momento de la vida); tito Jesús (es mejor levantarse antes y no ir corriendo); y tito y Dr. Paco Piedras (siempre creíste en mí y muchas veces tuve que asirme con fuerza a ese recuerdo).

A todos vosotros, una vez más, gratitud infinita.

