

Efecto de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (*Medicago sativa* L.) en dos tipos de suelo, cobre y composta

Effect of plant growth promoting bacteria (*Medicago sativa* L.) in two types of soil, copper, and compost

Mario Francisco Santoyo-de la Cruz¹, Abdul Khalil-Gardezi^{1*}, Guillermo Carrillo-Castañeda¹, Héctor Manuel Ortega-Escobar¹, Oscar Raúl Mancilla-Villa³, Juan Enrique Rubiños-Panta¹, José Abel López-Buenfil¹, Mario Ulises Larque-Saavedra², Gabriel Haro-Aguilar¹, Cristian Alejandro Ali-Gamboa¹

¹Departamento de sistemas computacionales, Universidad Autónoma Metropolitana-Azcapotzalco. Alcaldía Azcapotzalco, CDMX.

²Departamento de producción agrícola, Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de la Costa Sur, Autlán, Estado de Jalisco.

³Departamento de Hidrociencias, Colegio de Postgraduados-Montecillo. Texcoco, Estado de México. C. P. 56230. Tel. 5959520200 ext. 1165. kabdul@colpos.mx

*Autor de correspondencia

Resumen

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal interactúan con distintos tratamientos o metales presentes en suelos enriquecidos con composta, que mejoran las condiciones del suelo y benefician al crecimiento de la planta. El objetivo fue analizar el desarrollo de *Medicago sativa* con rizobacterias en condiciones de estrés. Se germinaron semillas de alfalfa de dos variedades (Victoria y Aragón), inoculadas con dos rizobacterias; se trasplantaron en invernadero y se adicionó sulfato de cobre, composta, en dos tipos de suelo (regado con aguas residuales y aguas de pozo). El suelo residual presentó significancia en el número de hojas y altura de la planta, la variedad Victoria en el número de hojas, la cepa M40 en el diámetro del tallo y la composta con 37 g en longitud de raíz. El uso de rizobacterias asociadas a la raíz en combinación con composta y metales pesados permite desarrollar tecnologías con beneficios para la *Medicago sativa*.

Palabras clave: Composta; inoculación de bacterias; metales pesados; fitorremediación; *Pseudomonas* spp.

Abstract

Plant growth promoting rhizobacteria interact with different treatments or metals present in soils enriched with compost that improve soil conditions and benefit plant growth. The objective was to analyze the development of *Medicago sativa* with rhizobacteria under stress conditions. Alfalfa seeds of two varieties (Victoria and Aragón) were germinated, inoculated with two rhizobacteria, and transplanted in a greenhouse, copper sulfate added, compost, in two types of soil (irrigated with wastewater and well water). The residual soil presented significance in the number of leaves and height of the plant, the Victoria variety in the number of leaves, the M40 strain in stem diameter, and the compost with 37 g in root length. The use of root-associated rhizobacteria in combination with compost and heavy metals allows developing technologies with benefits for *Medicago sativa*.

Keywords: Compost; bacterial inoculation; heavy metals; phytoremediation; *Pseudomonas* spp.

Recibido: 06 de mayo de 2022

Aceptado: 03 de febrero de 2023

Publicado: 08 de marzo de 2023

Cómo citar: Santoyo-de la Cruz, M. F., Khalil-Gardezi, A., Carrillo-Castañeda, G., Ortega-Escobar, H. M., Mancilla-Villa, O. R., Rubiños-Panta, J. E., López-Buenfil, J. A., Larque-Saavedra, M. U., Haro-Aguilar, G., & Ali-Gamboa, C. A. (2023). Efecto de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (*Medicago sativa* L.) en dos tipos de suelo, cobre y composta. *Acta Universitaria* 33, e3569. doi: <http://doi.org/10.15174/au.2023.3569>

Introducción

Los metales pesados como el plomo (Pb^{2+}), cromo (Cr^{2+}), arsénico (As^{3-}), zinc (Zn^{2+}), cadmio (Cd^{2+}), cobre (Cu^{2+}), mercurio (Hg^{2+}) y níquel (Ni^{2+}) tienen alta densidad y alto peso atómico. Estos elementos existen naturalmente en el suelo, pero podrían contaminarlo con su acumulación derivada de diversas actividades geológicas y especialmente antropogénicas, incluida la expansión de áreas industriales, la minería, la eliminación de desechos metálicos, las gasolinas y pinturas con plomo, así como la aplicación de fertilizantes al suelo, estiércol animal, aguas residuales, lodos, plaguicidas, riego con aguas residuales, residuos de combustión de carbón y derrames de productos petroquímicos (Chen & Li, 2018). El suelo contaminado con metales pesados podría presentar riesgos para los humanos a través del contacto directo, la cadena alimentaria y la contaminación de las aguas subterráneas; de hecho, la contaminación por metales pesados ha provocado grandes pérdidas económicas (Chen & Li, 2018).

Dado que la tasa de crecimiento de las plantas seleccionadas para la fitorremediación juega un papel importante en la cantidad de metales pesados extraídos del suelo, cualquier método que aumente el crecimiento y la biomasa de la planta puede incrementar la absorción de metales pesados por parte de la planta y su estructura (Abbaszadeh-Dahaji *et al.*, 2019). Uno de los métodos para favorecer la biomasa vegetal en la fitorremediación es la aplicación de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, ya que pueden mejorar la biomasa vegetal y la eficiencia de la fitorremediación mediante varios mecanismos, como la producción de hormonas vegetales y sideróforos, aumentando la disponibilidad de hierro (Fe^{3+}), aumentando la disponibilidad de fósforo (P) al solubilizar compuestos de P insolubles y reduciendo el etileno producido en condiciones de estrés mediante la producción de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa. Las rizobacterias promueven el crecimiento de las plantas, mejoran al aumentar la biodisponibilidad de varios elementos esenciales, protegen contra los patógenos de las plantas y mejoran la estructura del suelo (Abbaszadeh-Dahaji *et al.*, 2019).

El género *Medicago* de la familia Fabaceae es uno de los más utilizados en la investigación en biotecnología. Contiene al menos 87 especies, pero solo algunas de ellas han sido probadas para su uso en fitorremediación. El miembro más conocido de este género es la alfalfa (*Medicago sativa* L.), un importante cultivo forrajero. La eficacia de la alfalfa en la limpieza de suelos de hidrocarburos de petróleo, incluidos los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), se ha demostrado en muchos estudios (Panchenko *et al.*, 2017). En contraste, la información sobre el potencial de fitorremediación de otras especies de *Medicago* es limitada. Algunas ventajas de esta planta son que no es exigente para las condiciones del suelo y es resistente al pisoteo, debido a las raíces laterales bien desarrolladas de su sistema de raíces primarias (Panchenko *et al.*, 2017).

Se ha estudiado el efecto de ciertos metales pesados y la absorción en la planta de alfalfa a varios valores de pH, y también se ha demostrado su potencial en la fitorremediación (Peralta-Videa *et al.*, 2002). Por su parte, ciertos aislamientos bacterianos promueven el desarrollo de las plántulas de alfalfa (Carrillo-Castañeda *et al.*, 2002a), aumentan la capacidad de asimilación de cobre de la planta (Carrillo-Castañeda *et al.*, 2002b) y modulan el intercambio de cobre entre la raíz y la parte aérea de esta planta (Carrillo-Castañeda *et al.*, 2005).

Por ello, el objetivo de este estudio es analizar el desarrollo de *Medicago sativa* L. en dos variedades (Victoria y Aragón) con el uso de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal con sulfato de cobre pentahidratado y en dos tipos de suelos (regados con aguas limpias y regados con aguas residuales), y se consideran las mediciones de las variables agronómicas.

Materiales y métodos

Recolección de suelos

El suelo utilizado es de origen agrícola de dos fuentes (regado con aguas limpias y regado con aguas residuales) de la comunidad de Tocuila, Texcoco, Estado de México, el cual se recolectó en el mes de junio del 2021. Se recolectó suelo limpio en las coordenadas geográficas 19° 31' 11.3" N y 98° 54' 58.2" W, en tres capas con diferentes profundidades (0 cm-10 cm, 10 cm-20 cm y 20 cm-40 cm), donde el área del terreno fue de 1 ha. La segunda recolección fue en suelo regado con aguas residuales domésticas y de algunas industrias pequeñas de la zona, en las coordenadas geográficas 19° 30' 39.2" N y 98° 56' 26.7" W, en tres capas con diferentes profundidades (0 cm-10 cm, 10 cm-20 cm y 20 cm-40 cm), donde el área del terreno fue de 1 ha. Las muestras se llevaron al Laboratorio Nacional de Investigación y Servicio Agroalimentario y Forestal de la Universidad Autónoma Chapingo para determinar la fertilidad y metales pesados, de acuerdo con el método recomendado por la Norma Oficial Mexicana NOM 021-SEMARNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis (Diario Oficial de la Federación DOF, 2002). Además, se determinaron la conductividad eléctrica (CE) y pH en una relación 1:2, la densidad aparente por el método de la probeta, la textura por el método de Bouyoucos y la materia orgánica por el método de combustión en analizador de carbono orgánico. Adicionalmente, se cuantificó boro (B^{3+}): azometina-H en espectrofotómetro ultravioleta-visible; se cuantificó nitrógeno: extracción con cloruro de potasio (KCL) en analizador por inyección de flujo; se cuantificó los micronutrientes con DTPA y se cuantificó los metales pesados en espectrofotómetro de absorción atómica: Níquel (Ni^{2+}), Cadmio (Cd^{2+}), Cromo (Cr^{2+}), Cobre (Cu^{2+}), Hierro (Fe^{3+}), Manganeso (Mg^{2+}) y Zinc (Zn^{2+}); se cuantificó plomo (Pb^{2+}) y arsénico (As^{3-}): espectrofotómetro de emisión óptica acoplado a plasma; se cuantificó las bases intercambiables: extracción con acetato de amonio; se cuantificó calcio (Ca^{2+}) y magnesio (Mg^{2+}): espectrofotómetro de absorción atómica y se cuantificó sodio (Na^+) y potasio (K^+): flamometría. Posteriormente, se homogenizó el suelo de los perfiles para traspasarlo a las macetas.

Inoculación de semillas

Se usaron semillas de dos variedades de alfalfa (Victoria y Aragón) que fueron adquiridas en tiendas especializadas de semillas agrícolas. Para realizar la inoculación de las semillas, los cultivos bacterianos de *Pseudomonas fluorescens* provenientes del banco de bacterias del laboratorio de genética molecular del Colegio de Postgraduados, se prepararon en placas de Petri que contenían medio B de King que se incubaron durante 24 h a 28 °C-30 °C. A partir de los cultivos, se prepararon suspensiones bacterianas en agua destilada estéril ajustado entre 0.8 y 1 de turbidez (660 nm). Para preparar el medio B de King (Carrillo-Castañeda *et al.*, 2002b) se procede a suspender 38 g del medio en un litro de agua destilada. Se agregó 10 ml de glicerol de la marca Richchem, se mezcló bien y disolvió por calentamiento agitando con frecuencia. Posteriormente, se hirvió la mezcla durante un minuto hasta su completa disolución, se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos y se dejó enfriar a 45 °C-50 °C. Para el medio de cultivo se utilizó peptona, que proporciona nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento, también ayuda en la producción de fluoresceína. El hidrogenofosfato de potasio de la marca Baker es una fuente de fósforo, y el sulfato de magnesio proporciona cationes para activar la producción de fluoresceína. El glicerol es una fuente de carbono. El agar bacteriológico de la marca Bioxon es el agente solidificante. Este medio promueve la producción de pyoverdina, un pigmento fluorescente amarillo-verde que puede oxidarse a amarillo, es soluble en agua y, a diferencia de la picrocianina, no es soluble en cloroformo. El pigmento se difunde por todo el medio, y el color amarillo verdoso fluorescente se observa mediante el uso de una lámpara UV (Laboratorio de bacterias [Condalab], 2021).

A partir del banco de bacterias, se prepararon los cultivos de las cepas de bacterias para inocular las muestras de semillas de las dos variedades de alfalfa. La inoculación de semillas se realizó en dos bloques, con tres repeticiones cada una. En el primer bloque se probó la cepa M40 y en el segundo bloque la cepa M67. Las semillas se mezclaron con la suspensión bacteriana (con 0.8 ml de suspensión bacteriana), esta preparación se dejó durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las semillas inoculadas se colocaron sobre dos láminas de papel de filtro humedecidas con 4 mL de agua destilada en cajas Petri de plástico de 9 cm de diámetro. Las semillas inoculadas de alfalfa fueron sembradas ese mismo día en charolas germinadoras con Peat Moss.

Trasplante y arreglo factorial

Al cabo de 30 días, las plántulas fueron trasplantadas a macetas plásticas de 4 kg, en un invernadero ubicado en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, con arreglo factorial de 3x2x2x2 en tres repeticiones de 48 unidades experimentales cada una, con los siguientes tratamientos (Tabla 1).

Tabla 1. Tratamientos aplicados a (*Medicago sativa*).

Tratamientos			
Composta	0 g	17.5 g	37 g
Cepas de bacterias	M40	M67	
Sulfato de cobre pentahidratado (CuSO ₄ · 5H ₂ O, 10 ⁻⁴ M)	0 ml	4 ml	
Variedades de alfalfa	Victoria	Guerrero	
Suelos	Regado con aguas residuales	Regado con aguas limpias	

Fuente: Elaboración propia.

Medición de variables agronómicas

Las mediciones de las variables agronómicas se hicieron en dos fechas (Tabla 2):

Tabla 2. Variables agronómicas medidas en el crecimiento de las plantas de *Medicago sativa* L. y la forma en que se midió.

Variables agronómicas	Método	Primera fecha (a los 65 días de trasplante)	Segunda fecha (a los 95 días de trasplante)
1. Longitud de tallo (cm)		✓	✓
2. Altura de planta (cm)	Regla métrica (Gardezi et al., 2022a).	✓	✓
3. Longitud de raíz (cm)			✓
4. Clorofila (SPAD)	(SPAD) Konica Minolta en hojas (Gardezi et al., 2022a).	✓	✓
5. Diámetro de tallo	Vernier calibrador (Gardezi et al., 2022b).	✓	✓
6. Número de hojas	Conteo visual de hojas (Gardezi et al., 2022b).	✓	✓
7. Área foliar (m ²)	Li-Cor LAI-2000, se mide cada metro cuadrado (Gardezi et al., 2022a).		✓
8. Biomasa seca de raíz (gr)			✓
9. Biomasa seca aérea (gr)	Secado en estufa y peso en balanza digital (Gardezi et al., 2022b).		✓
10. Volumen radical (cm ³)	Se sumerge la raíz en la probeta de 100 ml (Gardezi et al., 2022a).		✓

Fuente: Elaboración propia.

La Figura 1 muestra la forma de medir el volumen radical con la probeta de 100 mL, donde se sumerge la raíz y se escribe la diferencia de volumen, se mide la longitud de raíz de inicio a fin y la biomasa seca aérea se pesa en la báscula digital en la fecha dos (Gardezi *et al.*, 2022a).



Figura 1. a) Medición de volumen radical de Alfalfa, b) Medición de longitud de raíz de Alfalfa y c) Medición de biomasa seca aérea de Alfalfa.

Fuente: Elaboración propia.

Análisis estadístico

Se realizó análisis de varianza a los datos de las variables agronómicas con nivel de significancia de ($p \leq 0.05$), así como comparaciones de medias con la prueba de Tuckey. Además, se hicieron pruebas de Fisher (F) para saber si existe diferencia entre los efectos promedio de los niveles de los factores principales o entre las combinaciones de los niveles de los factores ($p \leq 0.05$), esto con el uso del software SAS/STAT 15.1.

Resultados

Los resultados de los análisis de suelos indican que son de textura franco limosas, franco arcillosas y franco arenosas. Los resultados del estudio de análisis de fertilidad de suelos, así como el de metales pesados se muestran en la Tabla 3.

Se presentan las interacciones de las variables agronómicas de *Medicago sativa* L. con respecto a la fuente de variación, con la prueba de Fisher, en donde se muestra cuáles factores mostraron alguna interacción con las variables de interés para la fecha uno (a los 65 días de trasplante) (Tabla 4) y cuáles para la fecha dos (a los 95 días de trasplante) (Tabla 5).

Tabla 3. Resultados del análisis de laboratorio de fertilidad y metales pesados de las muestras de suelo que se usaron en las unidades experimentales.

Variables de fertilidad y metales pesados	Unidad	Profundidad del perfil en centímetros (cm)		
		0-5	10-20	20-40
pH		7.49	7.9	7.29
Densidad aparente	g cm^{-3}	1.22	1.25	1.11
Conductividad eléctrica	dS cm^{-1}	0.78	1.91	0.37
Nitrógeno		12.97	70.04	19.74
Boro		1.51	1.74	1.55
Materia orgánica		3.06	2.63	2.62
Calcio		6966	7743	2518
Magnesio		1618	1702	1276
Sodio		1180	2320	92
Potasio		752	684	630
Cobre		1.8	1.5	1.1
Hierro		15.58	16.14	10.6
Manganeso		13.53	15.98	17.74
Zinc		5.71	2.51	1.69
Plomo	mg kg^{-1}	0.86	0.72	0.73
Cadmio		0.04	0.04	0.03
Cromo		0.0	0.05	0.0
Níquel		1.28	0.28	0.15
Arsénico		0.0	0.0	0.03
Fosforo		98	144	198
CIC	$\text{cmol+}/\text{kg}$	30	34	33

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4. Interacciones entre las fuentes de variación y las variables agronómicas de *Medicago sativa* L. a los 65 días de trasplante.

Fuente de variación	Grados de libertad	Variables agronómicas				
		Y1	Y2	Y3	Y4	Y5
Variedad	1					
Cepa	1					
Variedad-cepa	1					
Suelo	1					Y5
Variedad-suelo	1					
Cepa-suelo	1			Y3		
Variedad-cepa-suelo	1					
Composta	2					
Variedad-composta	2	Y1				
Cepa-composta	2					
Variedad-cepa-composta	2					
Suelo-composta	2					
Variedad-suelo-composta	2					
Cepa-suelo-composta	2					
Variedad-cepa-suelo-composta	2					
Cobre	1					
Variedad-cobre	1		Y2			
Cepa-cobre	1					
Variedad-cepa-cobre	1			Y3		
Suelo-cobre	1			Y3		
Variedad-suelo-cobre	1					
Cepa-suelo-cobre	1					
Variedad-cepa-suelo-cobre	1					
Composta-cobre	2					
Variedad-composta-cobre	2					
Cepa-composta-cobre	2		Y2			
Variedad-cepa-composta-cobre	2					
Suelo-composta-cobre	2					
Variedad-suelo-composta-cobre	2					
Cepa-suelo-composta-cobre	2				Y4	
Variedad-cepa-suelo-composta-cobre	2					
Tratamientos	47			Error		
				96		

Y1 = Longitud del tallo; Y2 = Altura de planta; Y3 = Diámetro del tallo; Y4 = Clorofila; Y5 = Número de hojas

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 5. Interacciones entre las fuentes de variación y las variables agronómicas de *Medicago sativa* L. a los 95 días de trasplante.

Fuente de variación	Grados de libertad	Variables agronómicas									
		Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9	Y10
Variedad	1					Y5		Y7	Y8		
Cepa	1								Y8		Y10
Variedad- cepa	1	Y1									
Suelo	1										
Variedad- suelo	1						Y6				
Cepa- suelo	1					Y5			Y8		
Variedad- cepa- suelo	1								Y8		
Composta	2										
Variedad- composta	2										
Cepa- composta	2										
Variedad- cepa- composta	2								Y8		
Suelo- composta	2			Y3		Y5					
Variedad- suelo- composta	2										
Cepa- suelo- composta	2										
Variedad- cepa- suelo- composta	2										
Cobre	1		Y2								
Variedad- cobre	1										
Cepa- cobre	1										
Variedad- cepa- cobre	1										
Suelo- cobre	1										
Variedad- suelo- cobre	1										
Cepa- suelo- cobre	1										
Variedad- cepa- suelo- cobre	1										
Composta- cobre	2			Y3					Y8		
Variedad- composta- cobre	2										
Cepa- composta- cobre	2		Y2								
Variedad- cepa- composta- cobre	2										
Suelo- composta- cobre	2										
Variedad- suelo- composta- cobre	2										
Cepa- suelo- composta- cobre	2										
Variedad- cepa- suelo- composta- cobre	2							Y6	Y8		
Tratamientos								Error			
	47							96			

Y1 = Longitud del tallo; Y2 = Altura de planta; Y3 = Diámetro del tallo; Y4 = Clorofila; Y5 = Número de hojas; Y6 = Área foliar; Y7 = Biomasa seca de raíz; Y8 = Biomasa seca aérea; Y9 = Volumen radical; Y10 = Longitud de raíz.

Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 6 se muestra las estadísticas de comparación de medias con la prueba de Tukey, en donde se analizan los efectos de las variables agronómicas de *Medicago sativa* y los tratamientos seleccionados en el experimento, a los 65 días de trasplante y a los 95 días de trasplante (Tabla 7).

Tabla 6. Características agronómicas de *Medicago sativa* L. asociadas con los tratamientos mencionados en la fecha uno.

Tratamientos	Longitud de tallo		Altura de planta		Diámetro del tallo		Clorofila		Número de hojas	
Sin Cu	55.1944	B	61.3194	A	0.3500	A	70.5319	A	106.9028	A
Con Cu	56.9583	A	62.4028	A	0.3556	A	69.3403	A	105.3056	A
Suelo limpio	56.0972	A	62.0694	A	0.3542	A	70.0514	A	103.7361	B
Suelo residual	56.0556	A	61.6528	A	0.3514	A	69.8208	A	108.4722	A
Cepa M40	55.8750	A	62.0417	A	0.3472	B	69.7250	A	106.5278	A
Cepa M67	56.2778	A	61.6806	A	0.3883	A	70.1472	A	105.6806	A
Var. Victoria	56.3056	A	62.0833	A	0.3500	A	69.1514	A	105.7222	A
Var. Aragón	55.8472	A	61.6389	A	0.3556	A	70.7208	A	106.4861	A
0 gr de composta	56.3542	A	61.9375	A	0.3521	A	70.9646	A	103.5625	A
17 gr de composta	55.2917	A	61.1875	A	0.3604	A	70.6917	A	106.2292	A
37 gr de composta	56.5833	A	62.4583	A	0.3458	A	68.1521	A	108.5208	A

Nota: Valores con letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$).
Fuente: Elaboración propia.

Tabla 7. Características agronómicas de *Medicago sativa* L. asociadas con los tratamientos mencionados en la fecha dos.

Factores	Long. de tallo		Altura de planta		Diámetro del tallo		Clorofila		Número de hojas		Área foliar		Biomasa seca raíz		Biomasa seca aérea		Vol. radical		Long. de raíz	
Sin Cu	59.10	A	63.07	A	0.38	A	63.29	A	121.75	A	0.60	A	13.76	A	12.46	A	44.21	A	28.46	A
Con Cu	60.31	A	64.61	A	0.36	A	63.74	A	119.11	A	0.61	A	12.83	A	11.59	A	40.63	B	29.71	A
Suelo limpio	59.54	A	64.21	B	0.37	A	63.17	A	119.93	A	0.59	A	13.89	A	11.85	A	40.72	A	29.58	A
Suelo residual	59.86	A	69.47	A	0.37	A	63.86	A	120.93	A	0.62	A	12.70	A	12.21	A	42.11	A	28.58	A
Cepa M40	59.28	A	63.60	A	0.37	A	63.19	A	119.51	A	0.61	A	12.23	A	11.47	B	41.71	A	28.29	B
Cepa M67	60.13	A	64.08	A	0.37	A	63.84	A	121.35	A	0.60	A	14.36	A	12.59	A	41.13	A	29.88	A
Var. Victoria	60.15	A	63.43	A	0.36	A	63.44	A	123.28	A	0.60	A	11.43	B	11.72	A	39.11	A	29.11	A
Var. Aragón	59.25	A	64.25	A	0.38	A	63.59	A	117.58	B	0.61	A	15.16	A	12.34	A	43.72	A	29.06	A
0 gr de composta	60.27	A	64.21	A	0.36	A	65.23	A	120.48	A	0.61	A	11.88	A	11.52	A	39.00	A	28.88	C
17 gr de composta	58.56	A	62.67	A	0.37	A	62.02	A	119.92	A	0.66	A	12.75	A	12.19	A	40.85	A	29.81	B
37 gr de composta	60.27	A	64.65	A	0.37	A	63.30	A	120.90	A	0.53	A	15.26	A	12.37	A	44.40	A	31.56	A

Nota: Valores con letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$).
Fuente: Elaboración propia.

Discusión

En la primera fecha de medición se detectó significancia en la longitud de tallo con la presencia de cobre y se observa que también hay significancia sin la presencia de cobre en la variable de volumen radical en la segunda fecha de medición (Tabla 3 y 4). Wenliang *et al.* (2019) encontraron en su investigación mayores brotes en 73% y mayores raíces en 61% en plantas inoculadas con rizobacterias y en suelo contaminado con cobre, esto lo atribuyen a la traslocación de cobre desde las raíces a los brotes de alfalfa. Además de la fijación de N, las rizobacterias resistentes a los metales han demostrado la producción de sustancias reguladoras del crecimiento de las plantas.

Por lo anterior, el cobre representa cierto beneficio al crecimiento de esta planta y demuestra que puede bioacumular cobre sin afectar la planta. Sin embargo, en este estudio también se observa interacción de los factores variedad-cobre, variedad-cepa-cobre, suelo-cobre y cepa-suelo-composta-cobre en la altura de la planta, clorofila, diámetro del tallo y altura de la planta (Tabla 5 y 6). En el caso del trabajo de Wenliang *et al.* (2020), encontraron que la absorción de cobre fue menor en brotes sin tratamiento de rizobacterias en relación con brotes con tratamiento, lo que sugiere que la inoculación de rizobacterias reduce la fitotoxicidad inducida por la acumulación de cobre, mejora los niveles de nutrición del suelo contaminado con cobre y promueve el crecimiento de las plantas al regular los microorganismos asociados con el ciclo de nutrientes, además de la fitoestabilización de cobre.

El suelo representa una parte importante en el desarrollo de la planta. Los iones calcio y magnesio son los más representativos en este estudio, con promedio en los tres perfiles de 5742 mg kg⁻¹ y 1532 mg kg⁻¹ respectivamente, mientras que el ion sodio también es elevado (1180 mg kg⁻¹), por lo que el riesgo de salinidad y sodicidad es alto. Se conoce que la zona de muestreo presenta salinidad en algunos puntos debido a los coloides que absorben una proporción alta de sodio y dado que el efecto del sodio es el contrario al del calcio, habrá dispersión y no floculación, en este caso no se forman agregados y el suelo se mantiene disperso, siendo su permeabilidad baja y su aireación muy pobre (Santoyo *et al.*, 2021) (Tabla 2).

El suelo residual presentó diferencia significativa con el número de hojas en la primera fecha de medición, al igual que con la altura de la planta en la segunda fecha de medición. En el trabajo de Gardezi *et al.* (2020), donde se inocularon *Prosopis laevigata* en dos tipos de suelo, se menciona que los suelos utilizados afectaron principalmente el crecimiento de la parte del brote y se encontró interacción entre los dos suelos utilizados y la inoculación con *Glomus* sp. en la altura de la planta y el número de ramas, de igual forma, con la materia orgánica aplicada tuvo una triple interacción con el número de hojas. En este sentido, el suelo es fuente de nutrimentos como el nitrógeno inorgánico, potasio y calcio, los cuales mejoran el crecimiento de las plantas. En el estudio de fertilidad de suelo (Tabla 2) indica que estos nutrimentos se encuentran presentes en suficientes cantidades de acuerdo con el estudio de suelo realizado en este estudio.

Además, el factor suelo tuvo interacción en la fecha uno con el número de hojas, en el factor cepa-suelo en el diámetro del tallo, en el factor suelo-cobre en el diámetro del tallo y en el factor cepa-suelo-composta-cobre en clorofila. En la segunda fecha de medición se notó más interacción del factor suelo en el área foliar, biomasa seca aérea, diámetro de tallo, número de hojas y área foliar. En los resultados de Wenliang *et al.* (2019) se encontró un aumento significativo en el contenido de carbono de biomasa microbiana y nitrógeno de biomasa microbiana del suelo con la inoculación con *P. mucilaginosus* y *S. meliloti* en relación con el control no inoculado, lo que sugiere que la inoculación con rizobacterias puede mejorar la calidad del suelo debido a la mayor biomasa del cultivo después de la inoculación; lo que conduciría al retorno de más residuos orgánicos y exudados al suelo; acelerando así la acumulación de biomasa microbiana. Esta actividad podría aumentar las enzimas del suelo: sacarasa, catalasa, fosfatasa ácida y β -glucosidasa.

En la fecha uno de medición, la variedad no presenta significancia con ninguna variable agronómica, pero sí en la fecha dos en el número de hojas y biomasa seca de raíz en la variedad Victoria. En el trabajo de Raklami *et al.* (2021) se evaluaron cuatro variedades de alfalfa (Dennate, Esicilia, Ameristand y Siriver) para analizar la fitotoxicidad de metales pesados (Cu^{2+} , Pb^{2+} y Zn^{2+}) con rizobacterias, y se encontró una caída importante de la tasa de germinación y elongación de raíces a 2 mM de Cu^{2+} . Sin embargo, solo llega a germinar la variedad Dennate, lo que muestra que las variedades de alfalfa tienen diferentes niveles de sensibilidad, por lo que algunas variedades tendrán mejores efectos en su crecimiento, como el caso de la variedad Victoria que respondió mejor.

Los factores de variedad-composta presentan interacción en la longitud del tallo, variedad-cobre en altura de la planta y variedad-cepa-cobre en el diámetro del tallo. Las variedades pueden presentar preferencia con las cepas, como lo mencionan Tabares-da Rosa *et al.* (2019), quienes encontraron el establecimiento de una relación simbiótica entre *Medicago sativa*, *Medicago littoralis* y *Medicago tonata*, alfalfas anuales que crecen naturalmente en suelos de pH neutro a alcalino con rizobios de *Sinorhizobium meliloti* y *Sinorhizobium medicae*, basándose en una caracterización genotípica y bioquímica, donde se adaptaban a diferentes especies del género *Medicago*. También se menciona que puede deberse al origen de la alfalfa o al tipo de suelo presente como en suelos ácidos; el rendimiento de los genotipos de alfalfa es consecuencia de su tolerancia a la acidez donde se pueden ver beneficiadas las cepas inoculantes de rizobios.

La cepa M40 presenta significancia en el diámetro del tallo en la primera fecha de medición y no vuelve a presentarse significancia en ninguna variable en la fecha dos. Flores-Duarte *et al.* (2022) probaron, en condiciones de invernadero, *Medicago sativa* con cepas de *Pseudomonas* y como sustrato un suelo pobre en nutrientes. Estos investigadores encontraron que tanto la longitud y el tamaño de las plantas como el número de hojas aumentaron significativamente con la inoculación individual. Los valores más altos se obtuvieron con la inoculación en asociación con otras cepas en la biomasa total de las plantas, por lo que se comprueba que las cepas de rizobacterias pueden funcionar mejor individualmente o en asociación con otras cepas. Se menciona que esto es debido a que las rizobacterias pueden ayudar al crecimiento de las plantas a través de mecanismos directos e indirectos, por lo que la presencia de *Pseudomonas* en el crecimiento de alfalfa, como el género más representado entre las bacterias cultivables, es omnipresente en el suelo y tiene una adaptabilidad genética, ambiental y fisiológica bien conocida para sobrevivir en cualquier ambiente.

Por otro lado, se observa interacción con los factores cepa-suelo, variedad-cepa-cobre en el diámetro del tallo; cepa-composta-cobre en altura de planta y en el factor cepa-suelo-composta-cobre en la variable de clorofila. En el trabajo de Daur *et al.* (2018) se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el control inoculado con rizobacterias y los pigmentos fotosintéticos en las cepas JD-14 (97.9%) y JD-2 (97.6%), las cuales se inocularon en alfalfa, mientras que el valor más bajo se observó para las plantas control no inoculadas (79.1%); todas las cepas de rizobacterias aumentaron el pigmento fotosintético contenido en plantas de alfalfa. El mayor contenido de clorofila en las plantas da como resultado una mayor tasa fotosintética, convirtiendo más dióxido de carbono y agua en glucosa, lo que estimula el metabolismo y eventualmente aumenta el crecimiento de las plantas en condiciones de estrés por metales pesados (Daur *et al.*, 2018).

Además, en este estudio se encontró un aumento considerable en la altura de la planta, el diámetro de tallo y el peso fresco y seco de las plantas de alfalfa inoculadas en comparación con el control no inoculado. La alfalfa es conocida por su alto consumo de agua, y la inoculación bacteriana ayudaría en el desarrollo de un sistema de raíces más eficaces que puede absorber más agua del suelo profundo en condiciones de estrés.

La composta no presenta significancia en la fecha uno de medición, pero sí en la fecha dos de medición (37 g) en la longitud de raíz. En el estudio de Olivério *et al.* (2022) se menciona que la adición de composta orgánica en combinación con rizobacterias para promover el crecimiento de soja presentaron mayor crecimiento que las plantas testigo; además, aumentó la biomasa seca de raíz, biomasa de nódulos y clorofila, resultados muy parecidos a los de este trabajo.

Se observó que el factor composta tiene interacción en combinación con la variedad en la longitud del tallo, cepa y cobre en altura de la planta y con los factores de cepa-suelo-cobre en clorofila. Di Lenola *et al.* (2020) reportaron que encontraron efectos sinérgicos en el aumento de la calidad del suelo en términos de actividad y estructura microbiana; al agregar composta en alfalfa, la composta proporcionó propiedades complementarias de promoción del crecimiento de alfalfa.

Conclusiones

La leguminosa *Medicago sativa* presentó significancias estadísticas en la longitud del tallo y volumen radical con cobre. El suelo residual presentó significancia con el número de hojas y altura de la planta, la variedad Victoria en el número de hojas, la cepa M40 en el diámetro del tallo y la composta con 37 g en longitud de raíz. Los factores de variedad, cobre, composta y suelo influyen significativamente en el número de hojas, diámetro de tallo, longitud de tallo, altura de la planta, clorofila, biomasa seca aérea y de raíz y área foliar. El uso de rizobacterias asociadas a la raíz, en combinación con diferentes dosis de composta, permite desarrollar tecnologías para el establecimiento de cultivos como la alfalfa en suelos regados con aguas residuales y aguas limpias contaminados con cobre, además de que pueden utilizarse como herramientas biotecnológicas en la restauración ecológica de suelos degradados y en la promoción de la agricultura sostenible.

Agradecimientos

Agradecimiento al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología del estado de México por el apoyo económico recibido durante el desarrollo de cátedras (COMECyT) y al Colegio de Postgraduados campus Montecillo por el uso de sus instalaciones como el laboratorio, invernadero y equipos.

Conflicto de interés

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

Referencias

- Abbaszadeh-Dahaji, P., Baniasad-Asgari, A., & Hamidpour, M. (2019). The effect of Cu-resistant plant growth-promoting rhizobacteria and EDTA on phytoremediation efficiency of plants in a Cu-contaminated soil. *Environmental science pollution research*, 26, 31822–31833. doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06334-0>
- Carrillo-Castañeda, G., Juárez-Muños, J., Peralta-Videa, J. R., Gómez, E., Tiemannb, K. J., Duarte-Gardea, M., & Gardea-Torresdey, J. L. (2002a). Alfalfa growth promotion by bacteria grown under iron limiting conditions. *Advances in Environmental Research*, 6(3), 391-399. doi: [https://doi.org/10.1016/S1093-0191\(02\)00054-0](https://doi.org/10.1016/S1093-0191(02)00054-0)
- Carrillo-Castañeda, G., Juárez, J., Peralta-Videa, J. R., Gómez, E., & Gardea-Torresdey, J. L. (2005). Modulation of uptake and translocation of iron and copper from root to shoot in common bean by siderophore-producing microorganisms. *Journal of Plant Nutrition*, 28(10), 1853-1865. doi: <https://doi.org/10.1080/01904160500251340>
- Carrillo-Castañeda, G., Juárez, J., Peralta-Videa, J. R., Gómez, E., & Gardea-Torresdey, J. L. (2002b). Plant growth-promoting bacteria promote copper and iron translocation from root to shoot in alfalfa seedlings. *Journal of Plant Nutrition*, 26(9), 1801-1814. doi: <https://doi.org/10.1081/PLN-120023284>
- Chen, W., & Li, H. (2018). Cost-effectiveness analysis for soil heavy metal contamination treatments. *Water, Air, & Soil Pollution*, 229(126). doi: <https://doi.org/10.1007/s11270-018-3784-3>
- Condalab (2019). *Medio King B ISO para la identificación y enumeración de Pseudomonas aeruginosa por filtración de membrana*. https://www.condalab.com/int/es/index.php?controller=attachment&id_attachment=10792
- Daur, I., Saad, M. M., Eida, A. A., Ahmad, S., Shah, Z., Ihsan, M. Z., Muhammad, Y., Sohrab, S. S., & Hirt, H. (2018). Boosting alfalfa (*Medicago sativa* L.) production with rhizobacteria from various plants in Saudi Arabia. *Frontiers in microbiology*, 9, 477. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00477>
- Di Lenola, M., Barra, A., Ancona, V., Laudicina, V., A., Garbini, G. L., Mascolo, G., & Grenni, P. (2020). Combined effects of compost and *Medicago Sativa* in recovery a PCB contaminated soil. *Water*, 12(3), 860. doi: <https://doi.org/10.3390/w12030860>
- Diario Oficial de la Federación (DOF). (2002). Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, *Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudios, muestreo y análisis*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat). http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=717582&fecha=31/12/2002
- Flores-Duarte, N. J., Mateos-Naranjo, E., Redondo-Gómez, S., Pajuelo, E., Rodríguez-Llorente, I. D., & Navarro-Torre, S. (2022). Role of nodulation-enhancing rhizobacteria in the promotion of *Medicago sativa* development in nutrient-poor soils. *Plants*, 11(9), 1164. doi: <https://doi.org/10.3390/plants11091164>
- Gardezi, A. K, Trejo-Pérez, R, Carrillo-Castañeda, G., Flores-Magdaleno, H., Márquez, S. R., Valdés, E., Ortega, M., Larqué, M. U., & Haro, G. (2020). Effect of *Pseudomonas fluorescens* in the germination and growth of *Prosopis laevigata* under greenhouse conditions. *International Journal of Environmental & Agriculture Research*, 6(12), 10-17. doi: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.4405050>
- Gardezi, A. K, Romero, K. N., Carrillo, G., Flores, H., Flores, H., López, J. A., Ortega, H. M., Escalona, M. J., Larque, M. U., & Haro, G. (2022a). Evaluación del vigor en el cultivo de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) utilizando rizobacterias con fines de fitorremediación bajo condiciones de estrés ocasionado por sulfato de cobre (CuSO₄). *Nova Scientia*, 14(29), 1-18. doi: <https://doi.org/10.21640/ns.v14i29.3037>
- Gardezi, A. K, Marquez, S. R., Flores, H., Flores-Gallardo, H., Santoyo, M. F., López, J. A., Ortega, H. M., García, H., Escalona, M. J., Meraz, N., Larque, M. U., & Haro, G. (2022b). Effect of endomycorrhizae (*Glomus intraradices*) and organic matter on the growth of cactus pear (*Opuntia albicarpa*) in two soil types. *Nova Scientia*, 14(29), 1-13. doi: <http://doi.org/10.21640/ns.v14i29.3049>

- Olivério, G. L., Araujo, F. F., de Araujo, A. P., Bonifacio, A., & Ferreira, A. S. (2022). Rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungus presented distinct and specific effects on soybean growth when inoculated with organic compost. *Rhizosphere*, 22, 100513. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100513>
- Panchenko, L., Muratova, A., & Turkovskaya, O. (2017). Comparison of the phytoremediation potentials of *Medicago falcata* L. and *Medicago sativa* L. in aged oil-sludge-contaminated soil. *Environmental Science Pollution Research*, 24, 3117-3130. doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8025-y>
- Peralta-Videa, J. R., Gardea-Torresdey, J. L., Gómez, E., Tiemann, K. J., Parsons, J. G., & Carrillo, G. (2002). Effect of mixed cadmium, copper, nickel and zinc at different pHs upon alfalfa growth and heavy metal uptake. *Environmental Pollution*, 119(3), 291-301. doi: [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00105-7](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00105-7)
- Raklami, A., Oubane, M., Meddich, A., Hafidi, M., Marschner, B., Heinze, S., & Oufdou, K. (2021). Phytotoxicity and genotoxicity as a new approach to assess heavy metals effect on *Medicago sativa* L.: role of metallo-resistant rhizobacteria. *Environmental technology & innovation*, 24, 101833. doi: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101833>
- Santoyo, M. F., Flores, H., Khali-Gardezi, A., Mancilla-Villa, O. R., & Rubiños-Panta, J. E. (2021). Composición iónica y comparación de índices de salinidad de suelo agrícola de Texcoco, México. *Nova Scientia*, 13(27), 1-20. doi: <https://doi.org/10.21640/ns.v13i27.2789>
- Tabares-da Rosa, S., Signorelli, S., Del Papa, M. F., Sabatini, O., Reyno, R., Lattanzi, F., Rebuffo, M., Sanjuán, J., & Monza, J. (2019). Rhizobia inoculants for alfalfa in acid soils: a proposal for Uruguay. *Agrociencia*, 23(2), 4-16. doi: <https://dx.doi.org/10.31285/agro.23.120>
- Wenliang, J., Lei, L., Linchuan, F., Yongxing, C., Chengjiao, D., & Hao, W. (2019). Impact of co-inoculation with plant-growth-promoting rhizobacteria and rhizobium on the biochemical responses of alfalfa-soil system in copper contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 167, 218-226. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.016>
- Wenliang, J., Xiaolian, J., Lei, L., Guoting, S., Wei, Z., Chengjiao, D., & Linchuan, F. (2020). Rhizobacteria inoculation benefits nutrient availability for phytostabilization in copper contaminated soil: drivers from bacterial community structures in rhizosphere. *Applied Soil Ecology*, 150, 103450. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103450>