



***Bacillus mycoides* y ácidos húmicos como bioestimulantes de fríjol caupí bajo estrés por salinidad**

***Bacillus mycoides* and humic acids as biostimulants of cowpea under salinity stress**

Jocelyn Beleño-Carrillo^{1*} ; Liliana Gómez-Gómez² ; Nelson Osvaldo Valero-Valero³ 

¹Universidad Popular del Cesar, Grupo de Investigación en Microbiología Agrícola y Ambiental. Valledupar - Cesar, Colombia; e-mail: jocelynbeleno@unicesar.edu.co

²Universidad Popular del Cesar, Facultad de Ciencias Básicas y Educación. Valledupar - Cesar, Colombia; e-mail: lilianagomez@unicesar.edu.co

³Universidad de La Guajira, Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas. Riohacha - Guajira, Colombia; e-mail: nvalerov@uniguajira.edu.co

*autor de correspondencia: jocelynbeleno@unicesar.edu.co

Cómo citar: Beleño-Carrillo, J.; Gómez-Gómez, L.; Valero-Valero, N.O. 2022. *Bacillus mycoides* y ácidos húmicos como bioestimulantes de fríjol caupí bajo estrés por salinidad. Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 25(2):e1974. <http://doi.org/10.31910/rudca.v25.n2.2022.1974>

Artículo de acceso abierto publicado por Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, bajo una Licencia Creative Commons CC BY-NC 4.0

Publicación oficial de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, Institución de Educación Superior Acreditada de Alta Calidad por el Ministerio de Educación Nacional.

Recibido: noviembre 25 de 2021

Aceptado: noviembre 16 de 2022

Editado por: Helber Adrián Arévalo Maldonado

RESUMEN

Los bioestimulantes tienen gran potencial en la agricultura, no solo por aumentar el crecimiento de las plantas, sino porque también promueven la tolerancia frente a diferentes tipos de estrés. En este estudio, se evaluó el efecto de dos bioestimulantes *Bacillus mycoides*, inmovilizado en perlas de alginato y ácidos húmicos (AH), en plantas de fríjol caupí, cultivadas en un suelo salino, bajo los siguientes tratamientos: 1) solución de AH, mediante aspersión foliar, 2) suspensión de *B. mycoides*, inmovilizado en perlas aplicado en la rizósfera y 3) solución de AH + suspensión de *B. mycoides* inmovilizado; el tratamiento control fueron plantas sin aplicación de bioestimulantes. Se determinó el contenido hídrico relativo, el índice de contenido de clorofila, además del contenido de prolina y polifenoles, como indicadores de tolerancia al estrés. El tratamiento 3 generó un aumento de 11,27 % en el contenido hídrico relativo, mientras que con el tratamiento 2, se observó un incremento significativo del 48,33 %, en el índice de contenido de clorofila y del 49,07 %, en el contenido de prolina, lo cual, se sugiere la estimulación de mecanismos de tolerancia frente al estrés salino. La activación de estos mecanismos, observada con tratamientos que

incluyen la inmovilización de *B. mycoides*, sugiere que esta forma de aplicación de la bacteria puede contribuir a mejorar las condiciones de crecimiento de plantas de fríjol caupí sometidas a estrés salino y puede ser probada en otras plantas de interés agrícola, en regiones afectadas por la salinidad.

Palabras clave: Ácidos húmicos; *Bacillus mycoides*; Bioestimulantes; salinidad; estrés.

ABSTRACT

Biostimulants have great potential in agriculture enhancing plant growth as well as stimulating tolerance to different types of stress. In this study, the effect of two biostimulants, *Bacillus mycoides* immobilized in alginate beads and humic acids (HA), was evaluated in cowpea plants grown in saline soil, following treatments were evaluated: 1) HA solution applied through foliar spray, 2) suspension of immobilized *B. mycoides* in beads applied around in the rhizosphere and 3) HA solution + immobilized *B. mycoides* suspension. Plants without biostimulant application were considered as control treatment. Relative water content (RWC),

chlorophyll content index (CCI), proline, and polyphenol content were determined as indicators of stress tolerance mechanisms expression. Treatment 3 generated an increase of 11.27 % in RWC, while with treatment 2 a significant increase of 48.33 % in CCI and 49.07 % in proline content was observed; these results suggest the stimulation of tolerance mechanisms against salt stress. Effects exhibited after the treatments with immobilized *B. mycooides* suggest that this way of application of the bacteria can contribute to improving the growth and adaptation of cowpea plants subjected to salt stress and can be tested in other plants of agricultural interest over saline stress affection.

Keywords: *Bacillus mycooides*; Biostimulants; Humic acids; Salinity; stress.

INTRODUCCIÓN

La salinización de los suelos es una forma de degradación, que disminuye drásticamente su calidad y su capacidad productiva. Alrededor del 20 % de las tierras de riego, que producen un tercio de los alimentos del mundo, están afectadas por la salinidad (Machado & Serralheiro, 2017). La concentración de sales conlleva a la degradación de los suelos, al disminuir la porosidad y la permeabilidad e incrementar la compactación (Mata-Fernández *et al.* 2014).

Indistintamente del origen de la salinidad natural o antrópica, en zonas con baja precipitación, se pueden presentar procesos de salinización, debido a que la evaporación del agua deja en el suelo sales que no son disueltas, ni redistribuidas y, por tanto, se acumulan (Mazuela Águila, 2013). Las plantas sometidas a estrés salino pueden presentar disminución en la tasa de germinación, disminución en la longitud del tallo y del área foliar, menor desarrollo de las raíces y número de frutos y reducción en el peso fresco del tallo y las hojas (Can Chulim *et al.* 2014; Goykovic Cortés & Saavedra Del Real, 2007; Cardona *et al.* 2018). Los efectos negativos de la salinidad en las plantas se presentan porque este fenómeno genera toxicidad, desbalance nutricional, incremento de especies reactivas del oxígeno, pero, principalmente, estrés hídrico, el cual, reduce la capacidad de las plantas de obtener agua, generando un déficit en el potencial osmótico y, por tanto, produce cambios metabólicos similares a los causados por el marchitamiento (Machado & Serralheiro, 2017).

Una opción para mejorar el crecimiento y el desarrollo de las plantas de cultivo bajo condiciones de estrés salino es la aplicación de bioestimulantes, debido a que estos agentes tienen efectos positivos sobre el crecimiento vegetal, pero también pueden tenerlo sobre la tolerancia a distintos tipos de estrés biótico y abiótico (Van Oosten *et al.* 2017). La adaptación o tolerancia a la salinidad está regulada por mecanismos moleculares, bioquímicos y fisiológicos; algunos de estos son: homeostasis iónica, activación de enzimas o compuestos antioxidantes, acumulación de solutos compatibles y protección osmótica (Gupta & Huang, 2014). En este sentido, bioestimulantes, como las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) y los ácidos húmicos (AH), han demostrado diferentes beneficios para las plantas contribuyendo, tanto a la

estimulación de su crecimiento como a la mejora en la tolerancia, cuando crecen en condiciones de estrés salino (Ouni *et al.* 2014; Sánchez López *et al.* 2016; Esringü *et al.* 2016).

La zona norte del departamento del Cesar presenta suelos con alta susceptibilidad a la salinización (IDEAM *et al.* 2017), esta situación se acentúa en el corregimiento de Guacoche, en el municipio de Valledupar, debido a las bajas precipitaciones propias del clima semiárido (OTEC, 2015). Estas condiciones pueden afectar la productividad en cultivos de importancia para la agricultura familiar, entre ellos, el frijol caupí, reconocido por su alto contenido proteico y de minerales esenciales. La relevancia de este cultivo en el municipio de Valledupar, se refleja al registrar la mayor cantidad de productores en la región Caribe (Martínez Reina *et al.* 2020).

Teniendo en cuenta lo anterior, en este trabajo se evaluó el efecto de la aplicación de dos agentes bioestimulantes, *Bacillus mycooides* y AH sobre el crecimiento de plantas de frijol caupí, en un suelo que presenta condiciones de estrés salino, determinando variables relacionadas con la expresión de mecanismos de tolerancia a la salinidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de los bioestimulantes. La cepa *Bacillus mycooides* str. BGSC1-DN3 fue obtenida de la colección de bacterias promotoras de crecimiento vegetal del laboratorio del Grupo de investigación en Microbiología Agrícola y Ambiental, de la Universidad Popular del Cesar. Esta cepa fue previamente tipificada, mediante análisis de secuenciación del gen ribosomal 16S; en ensayos previos (datos no publicados), esta bacteria promovió el crecimiento en plántulas de frijol caupí y maíz, en condiciones de laboratorio. Otras cepas de *B. mycooides* han estimulado el crecimiento de plantas, como papa, girasol y tomate (Ambrosini *et al.* 2016; González F. & Fuentes M., 2017; Yi *et al.* 2018). A partir de un cultivo de la cepa en caldo nutritivo, se preparó un inóculo de *B. mycooides*, a una concentración de 1×10^8 UFC mL⁻¹, ajustada mediante espectrofotometría, hasta alcanzar una absorbancia de 0,2, a una longitud de onda de 600 nm. Se siguió un protocolo de inmovilización celular, desarrollado entre el grupo de Microbiología Agrícola y el grupo DSP-ASIC Builden Group, de la Universidad Popular del Cesar, para encapsular las células de *B. mycooides* presentes en el inóculo bacteriano, utilizando alginato de sodio comestible al 1 % y una solución de cloruro de calcio al 4 %, en un dispositivo extrusor de perlas de alginato.

Los AH, se obtuvieron a partir de un carbón de bajo rango tipo lignito, mediante solubilización bacteriana del carbón, siguiendo el protocolo descrito por Valero *et al.* (2014), empleando una cepa de *Microbacterium* sp. A partir de este método de extracción bacteriano, se pueden obtener AH con diferencias en su estructura supramolecular, las cuales, están relacionadas con un mayor grado de bioactividad frente a los AH, obtenidos de manera tradicional (Valero *et al.* 2018). Posteriormente, se preparó una solución de AH, a una concentración de 100 mg L⁻¹ de AH, en cloruro de calcio 2 mM.

Desarrollo del experimento. El estudio, se realizó en un terreno periurbano, ubicado en el corregimiento de Guacoche (Valledupar), a una latitud de 10°49'72.71" N y longitud 73°16'74.88" O; este predio ha estado dedicado tradicionalmente a la agricultura familiar. El suelo presenta un pH de 7,8, un alto contenido de iones de calcio, magnesio, sodio, sulfatos y bicarbonatos y una conductividad eléctrica de 5,8 dS m⁻¹, medida en el extracto de saturación, por lo que se clasifica como suelo salino (Shahid *et al.* 2018).

El experimento, se estableció bajo un diseño en bloques completos al azar, con 4 tratamientos, 2 bloques y 6 repeticiones por tratamiento. Para el establecimiento del experimento, se hicieron surcos de 30 cm de ancho, con una distancia de 60 cm entre ellos, se sembraron semillas de fríjol caupí a dos o tres centímetros de profundidad, colocando una semilla de frijol por sitio y a una distancia de 20 cm entre plantas.

Después de ocho días de la siembra, tras la emergencia de las plántulas, se aplicaron los siguientes tratamientos: 1) bioestimulación de la planta, aplicando AH en solución, mediante aspersión foliar (AH); 2) bioestimulación de la planta, aplicando en la rizosfera una suspensión del inóculo de *B. mycooides*, inmovilizado en perlas de alginato (P) y 3) bioestimulación de la planta, mediante aplicación combinada de la solución de AH por aspersión foliar y la suspensión de *B. mycooides* inmovilizado (PAH). Las plantas sin aplicación de bioestimulantes, se tomaron como tratamiento control. Se aplicó riego por aspersión cada tres días, el control de malezas se realizó de forma manual.

Variables evaluadas. 70 días después de la germinación, se registraron las mediciones de las variables respuesta. Para ello, se escogieron al azar doce plantas por tratamiento, para medir los siguientes parámetros indicadores de tolerancia al estrés: 1) contenido hídrico relativo (CHR), 2) índice de contenido de clorofila, 3) concentración de prolina y 4) concentración de polifenoles.

Para la determinación de CHR, se midió la masa fresca de tres hojas por planta; luego, las hojas se colocaron en cámara húmeda por dos horas, para llevarlas a saturación hídrica. Posteriormente, se retiraron las hojas, se removió el exceso de agua y se determinó el peso en condición de turgencia y después se secaron las hojas, en un horno en horno a 70 °C, hasta peso constante, para medir la masa seca. El CHR, se calculó aplicando la expresión $CHR = \frac{mf - ms}{mt - ms} \times 100$, donde, *mf* masa fresca, *ms* masa seca y *mt* masa a plena turgencia (Melgarejo *et al.* 2010).

Para estimar el contenido total de clorofila, se empleó el medidor de clorofila CCM 200 plus Opti ciencias. Los medidores portátiles no destructivos se han utilizado con éxito en algunas especies, registrando altas correlaciones con la determinación de clorofila en laboratorio (Mendoza-Tafolla *et al.* 2022). Las lecturas, se realizaron en tres hojas del tercio medio de cada planta, tomando este dato en cinco ubicaciones aleatorias para cada hoja; las cinco lecturas, se promediaron para obtener una sola lectura por hoja.

La determinación de prolina, se realizó a partir de un macerado de hojas frescas, utilizando nitrógeno líquido; se agregaron 10

mL de etanol grado reactivo por cada gramo de tejido macerado. La mezcla, se dejó reposar 12 horas a 4 °C y, posteriormente, fue centrifugada a 3000 rpm, por 10 min. El contenido de prolina fue medido por espectrofotometría, utilizando una mezcla de reacción de ninhidrina en ácido acético, etanol y agua, según el método propuesto por Carillo & Gibon (2011).

Los polifenoles, se cuantificaron a partir de un extracto obtenido al pesar 1 g de hojas pulverizadas, al cual, se adicionaron 10 mL de metanol al 96 % y se dejó reposar por dos horas. Posteriormente, se agregó el reactivo Folin- Ciocalteu y una solución de NaCO₃ al 20 % y se midió la absorbancia a 760 nm, siguiendo el protocolo descrito por Salgado-Chávez *et al.* (2020). La concentración de polifenoles fue estimada con base en una curva estándar de ácido gálico, usado como patrón de referencia para la determinación de compuestos fenólicos y se expresó en términos de mg/g EAG (equivalente de ácido gálico).

Análisis estadístico. Para cada una de las variables registradas, se determinaron los parámetros de normalidad de los datos, se realizó el análisis de varianza y la prueba de Tukey, para determinar diferencias significativas entre tratamientos, además de la correlación de Pearson, para determinar la relación entre las variables, con una confianza del 95 %, mediante el programa estadístico Minitab 18.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El índice de contenido de clorofila presentó incremento en todas las plantas sometidas a los tratamientos con bioestimulantes, con respecto a las plantas del tratamiento control (Tabla 1), se observa un aumento del 48,33 %, estadísticamente significativo, en respuesta al tratamiento P.

La disminución en el contenido de clorofila es una respuesta común de las plantas ante factores causantes de estrés, como la salinidad, que reducen los niveles de pigmentos fotosintéticos, ya sea que inhiban la síntesis de precursores de los pigmentos o afecten estructuralmente los cloroplastos (Chávez Suárez *et al.* 2015), de modo que los fotosistemas absorben luz de manera poco eficiente, reduciendo su capacidad fotosintética (Liu *et al.* 2018). Por tanto, el incremento en el contenido de clorofila observado en respuesta a la aplicación de este tratamiento, se puede relacionar como efecto asociado en la mitigación del estrés. Esta observación concuerda con resultados previos reportados por Chen *et al.* (2016), quienes encontraron que el contenido de clorofila aumentó significativamente en plantas de maíz, con la inoculación de la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens*, en condiciones de estrés salino. Igualmente, Li & Jiang (2017) observaron protección contra la salinidad con un incremento en el contenido de clorofila en maíz, al aplicar *B. aquimaris*.

Los valores de prolina fueron superiores en las plantas sometidas al tratamiento P, con un aumento del 49,07 %, siendo estadísticamente significativa la diferencia respecto a los demás tratamientos (Tabla 1). El incremento en la síntesis y posterior acumulación de prolina en plantas estresadas, no solo como producto de la inducción de la biosíntesis, sino por la inactivación de la degradación de este

Tabla 1. Valores medios de clorofila, contenido hídrico relativo, prolina y polifenoles, en plantas de frijol caupí, en respuesta a la aplicación de *B. mycooides* y ácidos húmicos.

Tratamiento	Clorofila (CCI)	CHR (%)	Prolina (%)	Polifenoles (mg/g EAG)
P	88,92±22,9 ^a	64,99±6,4 ^{ab}	8,05±2,5 ^a	1,84±0,5 ^a
PAH	66,96±29 ^{ab}	65,19±7,9 ^a	6,61±1,6 ^{ab}	1,83±0,7 ^a
AH	66,64±19,7 ^{ab}	58,76±2,2 ^b	5,40±2,0 ^b	2,11±1,1 ^a
Control	59,77±13,2 ^b	58,41±4,4 ^b	5,04±0,9 ^b	2,72±1,0 ^a

CHR=Contenido hídrico relativo; Tratamientos bioestimulación de la planta aplicando en la rizosfera; P= suspensión del inóculo de *B. mycooides* inmovilizado en perlas de alginato; PAH= solución de ácidos húmicos + suspensión de *B. mycooides* inmovilizado; AH=solución de ácidos húmicos.

Los promedios con diferente letra son estadísticamente significativos, $p \leq 0,05$.

aminoácido (Reddy *et al.* 2004), es un indicador de tolerancia al estrés, debido a que la prolina es uno de los principales solutos compatibles que se acumulan en las plantas sometidas a estas condiciones y se produce como resultado de un mecanismo de ajuste osmótico, que permite mantener la absorción de agua y la presión de turgencia, evitando los daños causados por el desbalance hídrico. La prolina, también está relacionada con la estabilización de estructuras sub-celulares, membranas, proteínas y eliminación de radicales libres (Pereyra Cardozo & Quiriban, 2014), por lo que promueve ciertas funciones celulares, que le permiten a la planta mitigar las condiciones adversas de crecimiento.

De acuerdo con lo anterior, el incremento en el contenido de prolina observado en respuesta a la aplicación de *B. mycooides*, inmovilizado en perlas, se puede deber a la activación de este mecanismo de osmorregulación, el cual, pudo contribuir a que las plantas mantuvieran un buen estado fisiológico y aminorar el estrés salino, reflejado en el aumento del contenido hídrico y de clorofila, variables con las que se observó una correlación positiva (Tabla 2).

La acumulación de prolina, como efecto de la aplicación de microorganismos promotores del crecimiento vegetal, se reporta en frijol caupí, por Manaf & Zayed (2015), quienes evidenciaron incrementos de prolina en presencia de micorrizas y *Pseudomonas fluorescens*, al aumentar los niveles de sales, así como Bano & Fatima (2009), quienes coinocularon cepas de *Rhizobium* sp. y *Pseudomonas* sp. en maíz, afectado por la salinidad. Se ha demostrado la capacidad de la prolina, ya sea libre o unida a polipéptidos, para reaccionar directamente con H_2O_2 y OH^- y formar radicales libres estables (Liang *et al.* 2013). El papel de la prolina, como desintoxicador de radicales libres, ocasionado por PGPR, ha sido evidenciado por Upadhyay *et al.* (2012), al reportar un aumento en el contenido de prolina, mientras que la actividad de las enzimas antioxidantes se redujo significativamente en plantas de trigo, tratadas con *B. subtilis* y *Arthrobacter* sp.

El contenido hídrico relativo (CHR) mostró un aumento significativo en respuesta a la aplicación del tratamiento PAH, con un incremento del 11,61 % (Tabla 1). Teniendo en cuenta

Tabla 2. Correlaciones entre las variables clorofila, contenido hídrico relativo prolina y polifenoles.

Parámetros	Clorofila	CHR	Polifenoles
CHR	0,48*		
Polifenoles	0,28	-0,24	
Prolina	0,42*	0,34*	- 0,26

CHR=Contenido hídrico relativo; Tratamientos bioestimulación de la planta aplicando en la rizosfera; P= suspensión del inóculo de *B. mycooides* inmovilizado en perlas de alginato; PAH= solución de ácidos húmicos + suspensión de *B. mycooides* inmovilizado; AH=solución de ácidos húmicos.

Los promedios con diferente letra son estadísticamente significativos, $p \leq 0,05$.

que la salinidad conlleva principalmente al estrés hídrico y, en consecuencia, a la reducción de la capacidad de las plantas de obtener agua, un aumento en esta variable puede denotar una mejora del estado hídrico de las plantas. Este aumento, se puede deber a una disminución en la pérdida de agua regulada por las estomas o una mayor capacidad de absorción y retención de agua, como resultado de un ajuste osmótico (Shtaya *et al.* 2019). Un resultado similar fue obtenido por Saghafi *et al.* (2018), quienes reportaron incrementos en el CHR hasta de un 8,78 %, con cepas de *Rhizobium*, aplicadas en canola bajo estrés salino. En similares condiciones de estrés,

Karlidag *et al.* (2010) observaron un aumento en el contenido hídrico en fresas, al tratarlas con varias cepas PGPR. mientras que, Khorasaninejad *et al.* (2018), reportan un incremento en CHR proporcional a la concentración de AH, aplicados en plantas de *Echinacea purpurea*, bajo estrés hídrico.

En general, los resultados presentados sugieren la activación de mecanismos de ajuste osmótico en las plantas, los cuales, ayudaron a mantener la absorción de agua y la presión de turgencia. El ajuste osmótico, se puede dar por la biosíntesis de osmolitos orgánicos y

la acumulación de iones (Lamz Piedra & González Cepero, 2013); con base en la correlación positiva entre el contenido hídrico y los valores de prolina (Tabla 2), se puede sugerir que el tratamiento de bioestimulación con *B. mycooides* mejoró el estado hídrico de las plantas de frijol caupí, como consecuencia de la acumulación de prolina, como soluto compatible y este efecto es mejorado por la aplicación conjunta de la bacteria y AH. Al respecto, Chen *et al.* (2007) obtuvieron niveles más altos de prolina libre y, en consecuencia, una mayor tolerancia al estrés osmótico, en plantas de *A. thaliana*, al introducirle genes derivados de *B. subtilis*.

El estrés salino puede conllevar al estrés oxidativo, a causa del aumento de las especies reactivas del oxígeno, los cuales, pueden alterar el metabolismo celular (Eyidogan & Öz, 2007). Los polifenoles hacen parte del sistema antioxidante de las plantas y se sintetizan en situaciones de estrés, para proteger las estructuras celulares frente al daño oxidativo. Respecto a la cuantificación de polifenoles, se observó una tendencia a la disminución del contenido en las plantas tratadas con bioestimulantes; sin embargo, para esta determinación, no hubo diferencia significativa entre tratamientos (Tabla 1).

Del presente estudio, se puede concluir, que las afectaciones fisiológicas causadas por estrés salino en plantas de frijol caupí pueden ser atenuadas con la aplicación de bioestimulantes a base de *B. mycooides*, inmovilizado en perlas de alginato, puesto que se evidenció mejora del estado hídrico y la capacidad fotosintética de las plantas, al obtener mayores valores de CHR y clorofila, con tratamientos donde estaba presente esta bacteria. La tolerancia a la salinidad se relacionó con la producción y la acumulación de prolina, soluto compatible asociado con la osmorregulación. Lo observado justifica la continuidad de estudios con la aplicación de *B. mycooides*, inmovilizado en perlas y permite plantear ensayos en otros cultivos de importancia para la agricultura familiar, en regiones con suelos que presenten problemas de salinidad, con miras al desarrollo de un bioinoculante.

Agradecimientos. Los autores agradecen a la Universidad Popular del Cesar, por la financiación del presente estudio, en el marco del proyecto de investigación de convocatoria interna “Efecto del tratamiento con ácidos húmicos y bacterias promotoras del crecimiento vegetal sobre plantas de interés para la agricultura urbana en el departamento del Cesar”. También, se agradece a la Universidad de La Guajira, por la cooperación técnica para el desarrollo de los trabajos de laboratorio. Conflicto de intereses: El manuscrito fue preparado y revisado con la participación de todos los autores, quienes declaran no tener algún conflicto de intereses que coloque en riesgo la validez de los resultados presentados.

REFERENCIAS

1. AMBROSINI, A.; STEFANSKI, T.; LISBOA, B.B.; BENEDUZI, A.; VARGAS, L.K.; PASSAGLIA, L.M.P. 2016. Diazotrophic bacilli isolated from the sunflower rhizosphere and the potential of *Bacillus mycooides* B38V as biofertiliser. *Annals of Applied Biology*. 168(1):93-110. <http://dx.doi.org/10.1111/aab.12245>
2. BANO, A.; FATIMA, M. 2009. Salt tolerance in *Zea mays* (L) following inoculation with *Rhizobium* and *Pseudomonas*. *Biology and Fertility of Soils*. 45(4):405-413. <http://dx.doi.org/10.1007/s00374-008-0344-9>
3. CAN CHULIM, A.; RAMÍREZ GUERRERO, L.G.; ORTEGA ESCOBAR, H.M.; CRUZ CRESPO, E.; FLORES ROMÁN, D.; SÁNCHEZ BERNAL, E.I.; MADUEÑO MOLINA, A. 2014. Germinación y crecimiento de plántulas de *Phaseolus vulgaris* L. en condiciones de salinidad. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 5(5):753-763. <http://dx.doi.org/10.29312/remexca.v5i5.898>
4. CARDONA, W.A.; GUTIÉRREZ D., J.S.; MONSALVE C., O.I.; BONILLA C., C.R. 2018. Efecto de la salinidad sobre el crecimiento vegetativo de plantas de mora castilla (*Rubus glaucus* Benth.) micorrizadas y sin micorrizar. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*. 11(2):253-266. <http://dx.doi.org/10.17584/rcch.2017v11i2.6109>
5. CARILLO, P.; GIBON, Y. 2011. Protocol: extraction and determination of proline. 4p. Disponible desde Internet en: <http://prometheuswiki.publish.csiro.au/tiki-index.php?page=PROTOCOL%3A+Extraction+and+determination+of+proline> (con acceso 24/05/2019)
6. CHÁVEZ SUÁREZ, L.; ÁLVAREZ FONSECA, A.; RAMÍREZ FERNÁNDEZ, R.; INFANTE FONSECA, S.; CASTRO, L.L.; GARCÍA RODRÍGUEZ, B.; GARCÍA ALCÁNTARA, A.; FONSECA ARIAS, M. 2015. Efecto de la salinidad sobre el contenido relativo de agua y la concentración de pigmentos en tres genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Centro Agrícola*. 42(3):19-24.
7. CHEN, L.; LIU, Y.; WU, G.; VERONICAN NJERI, K.; SHEN, Q.; ZHANG, N.; ZHANG, R. 2016. Induced maize salt tolerance by rhizosphere inoculation of *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. *Physiologia plantarum*. 158(1):34-44. <https://doi.org/10.1111/ppl.12441>
8. CHEN, M.; WEI, H.; CAO, J.; LIU, R.; WANG, Y.; ZHENG, C. 2007. Expression of *Bacillus subtilis proBA* genes and reduction of feedback inhibition of proline synthesis increases proline production and confers osmotolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 40(3):396-403. <http://dx.doi.org/10.5483/BMBRep.2007.40.3.396>
9. ESRINGÜ, A.; KAYNAR, D.; TURAN, M.; ERCISLI, S. 2016. Ameliorative effect of humic acid and plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on hungarian vetch plants under salinity stress. *Communications in soil science and plant analysis*. 47(5):602-618. <https://doi.org/10.1080/00103624.2016.1141922>

10. EYIDOĞAN, F.; ÖZ, M.T. 2007. Effect of salinity on anti-oxidant responses of chickpea seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*. 29:485-493. <http://dx.doi.org/10.1007/s11738-007-0059-9>
11. GONZÁLEZ F, H.; FUENTES M., N. 2017. Mecanismo de acción de cinco microorganismos promotores de crecimiento vegetal. *Revista De Ciencias Agrícolas*. 34(1):17-31. <http://dx.doi.org/10.22267/rcia.173401.60>
12. GOYKOVIC CORTÉS, V.; SAAVEDRA DEL REAL, G. 2007. Algunos efectos de la salinidad en el cultivo del tomate y prácticas agronómicas de su manejo. *Idesia (Arica)*. 25(3):47-58. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292007000300006>
13. GUPTA, B.; HUANG, B. 2014. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *International Journal of Genomics*. 2014:701596. <https://doi.org/10.1155/2014/701596>
14. INSTITUTO DE HIDROLOGÍA, METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES, IDEAM; CORPORACIÓN AUTÓNOMA REGIONAL DE CUNDINAMARCA, CAR; UNIVERSIDAD DE CIENCIAS APLICADAS Y AMBIENTALES U.D.C.A. 2017. Protocolo para la identificación y evaluación de la degradación de suelos por salinización. IDEAM. 109p. Disponible desde internet en: http://observatorio.epacartagena.gov.co/wp-content/uploads/2017/05/Protocolo_Salinizacion-DE-SUELOS-.compress.ed.pdf (con acceso 30/04/2021)
15. KARLIDAG, H.; ESITKEN, A.; YILDIRIM, E.; DONMEZ, M.F.; TURAN, M. 2010. Effects of plant growth promoting bacteria on yield, growth, leaf water content, membrane permeability, and ionic composition of strawberry under saline conditions. *Journal of plant nutrition*. 34(1):34-45. <http://dx.doi.org/10.1080/01904167.2011.531357>
16. KHORASANINEJAD, S.; ALIZADEH AHMADABADI, A.; HEMMATI, K. 2018. The effect of humic acid on leaf morphophysiological and phytochemical properties of *Echinacea purpurea* L. under water deficit stress. *Scientia Horticulturae*. 239:314-323. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2018.03.015>
17. LAMZ PIEDRA, A.; GONZÁLEZ CEPERO, M.C. 2013. La salinidad como problema en la agricultura: la mejora vegetal una solución inmediata. *Cultivos tropicales*. 34(4):31-42.
18. LI, H.Q.; JIANG, X.W. 2017. Inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) improves salt tolerance of maize seedling. *Russian Journal of Plant Physiology*. 64:235-241. <https://doi.org/10.1134/S1021443717020078>
19. LIANG, X.; ZHANG, L.; NATARAJAN, S.K.; BECKER, D.F. 2013. Proline mechanisms of stress survival. *Antioxidants & redox signaling*. 19(9):998-1011. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5074>
20. LIU, X.; LI, L.; LI, M.; SU, L.; LIAN, S.; ZHANG, B.; LI, X.; GE, K.; LI, L. 2018. AhGLK1 affects chlorophyll biosynthesis and photosynthesis in peanut leaves during recovery from drought. *Scientific reports*. 8:2250. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20542-7>
21. MACHADO, R.M.A.; SERRALHEIRO, R.P. 2017. Soil salinity: Effect on vegetable crop growth. Management practices to prevent and mitigate soil salinization. *Horticulturae*. 3(2):30. <https://doi.org/10.3390/horticulturae3020030>
22. MANAF, H.H.; ZAYED, M.S. 2015. Productivity of cowpea as affected by salt stress in presence of endomycorrhizae and *Pseudomonas fluorescens*. *Annals of Agricultural Sciences*. 60(2):219-226. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2015.10.013>
23. MARTÍNEZ REINA, A.M.; TORDECILLA ZUMAQUE, L.; GRANDETT MARTÍNEZ, L.M.; RODRÍGUEZ PINTO, M. DEL V.; CORDERO CORDERO, C.C. 2020. Caracterización Fríjol Caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp): perspectiva socioeconómica y tecnológica en el Caribe colombiano. *Ciencia y Agricultura*. 17(2):12-22. <http://dx.doi.org/10.19053/01228420.v17.n2.2020.10644>
24. MATA-FERNÁNDEZ, I.; RODRÍGUEZ-GAMIÑO, M.L.; LÓPEZ-BLANCO, J.; VELA-CORREA, G. 2014. Dinámica de la salinidad en los suelos. *Revista Digital del Departamento El Hombre y su Ambiente*. 1(5):26-35.
25. MAZUELA ÁGUILA, P.C. 2013. Agricultura en zonas áridas y semiáridas. *Idesia (Arica)*. 31(2):3-4. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292013000200001>
26. MELGAREJO, L.M.; ROMERO, S.; HERNÁNDEZ, S.; BARRERA, J.; SOLARTE, M.E.; SUÁREZ, D.; PÉREZ, L.V.; ROJAS, A.; CRUZ, M.; MORENO, L.; CRESPO, S.; PÉREZ, W. 2010. Experimentos en fisiología vegetal. Universidad Nacional de Colombia (Bogotá). 279p.
27. MENDOZA-TAFOLLA, R.; JUAREZ-LÓPEZ, P.; ONTIVEROS-CAPURATA, R.; ALIA-TEJACAL, I.; GUILLEN-SÁNCHEZ, D.; VILLEGAS-TORRES, O.; CHÁVEZ-BÁRCENAS, A. 2022. Estimación de la concentración de clorofila, nitrógeno y biomasa en arúgula (*Eruca sativa* mill.) mediante mediciones portátiles no destructivas. *Bioagro*. 34(2):151-162. <https://doi.org/10.51372/bioagro342.5>

28. OBSERVATORIO DE TERRITORIOS ÉTNICOS Y CAMPESINOS, OTEC. 2015. Ficha para sistematización de información: Consejo Comunitario Los Cardonales. Pontificia Universidad Javeriana. Disponible desde internet en: <https://consejos.etnoterritorios.org/es/listado-de-consejos?id=a0f45e9ca226c5c853a9a970dea3cead> (con acceso 22/07/2020)
29. OUNI, Y.; GHNAYA, T.; MONTEMURRO, F.; ABDELLEY, C.H.; LAKHDAR, A. 2014. The role of humic substances in mitigating the harmful effects of soil salinity and improve plant productivity. *International Journal of Plant Production*. 8(3):353-374.
<https://doi.org/10.22069/IJPP.2014.1614>
30. PEREYRA CARDOZO, M.; QUIRIBAN, A. 2014. Las proteínas en la tolerancia al estrés hídrico en plantas. *Semiárida*. 24(1):55-67.
31. REDDY, A.R.; CHAITANYA, K.V.; VIVEKANANDAN, M. 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of plant physiology*. 161(11):1189-1202.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.01.013>
32. SAGHAFI, D.; GHORBANPOUR, M.; LAJAYER, B.A. 2018. Efficiency of *Rhizobium* strains as plant growth promoting rhizobacteria on morpho-physiological properties of *Brassica napus* L. under salinity stress. *Journal of soil science and plant nutrition*. 18(1):253-268.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162018005000903>
33. SALGADO-CHÁVEZ, J.A.; PALACIO-VALENCIA, A.E.; VALERO-VALERO, N.O. 2020. Actividad antioxidante e influencia del periodo climático sobre el contenido de polifenoles totales en *Merremia aegyptia*. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 18(2):82-93.
[https://doi.org/10.18684/bsaa\(18\)82-93](https://doi.org/10.18684/bsaa(18)82-93)
34. SÁNCHEZ LÓPEZ, D.B.; PÉREZ PAZOS, J.V.; DAVID HINESTROZA, H.A. 2016. Efecto de las PGPB sobre el crecimiento *Pennisetum clandestinum* bajo condiciones de estrés salino. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 18(1):65-72.
<http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.50413>
35. SHAHID, S.A.; ZAMAN, M.; HENG, L. 2018. Introduction to soil salinity, sodicity and diagnostics techniques. In: *Guideline for salinity assessment, mitigation and adaptation using nuclear and related techniques*. Springer, Cham. p.1-42.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-96190-3_1
36. SHTAYA, M.J.Y.; YASIN, A.; FATOOM, J.; JEBREEN, M. 2019. The effect of salinity on leaf relative water content and chlorophyll content of three wheat (*Triticum aestivum* L.) landraces from Palestine. *Hebron University Research Journal*. 8:52-65.
37. UPADHYAY, S.K.; SINGH, J.S.; SAXENA, A.K.; SINGH, D.P. 2012. Impact of PGPR inoculation on growth and antioxidant status of wheat under saline conditions. *Plant Biology*. 14(4):605-611.
<https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2011.00533.x>
38. VALERO, N.; GÓMEZ, L.; PANTOJA, M.; RAMÍREZ, R. 2014. Production of humic substances through coal-solubilizing bacteria. *Brazilian Journal of microbiology*. 45(3):911-918.
<https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000300021>
39. VALERO, N.O.; SALGADO, J.A.; CORZO, D. 2018. Metodología Sencilla para Evaluar Bioactividad de Ácidos Húmicos obtenidos de Lignito Mediante Extracción Alcalina y Bacterias Solubilizadoras de Carbón. *Información tecnológica*. 29(4):75-82.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642018000400075>
40. VAN OOSTEN, M.J.; PEPE, O.; DE PASCALE, S.; SILLETI, S.; MAGGIO, A. 2017. The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. *Chemical and biological technologies in agricultura*. 4.
<https://doi.org/10.1186/s40538-017-0089-5>
41. YI, Y.; LI, Z.; SONG, C.; KUIPERS, O.P. 2018. Exploring plant-microbe interactions of the rhizobacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus mycoides* by use of the CRISPR-Cas9 system. *Environmental microbiology*. 20(12):4245-4260.
<http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.14305>