

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

**Efecto en la salinidad de suelos chinamperos a partir de la aplicación  
de un inóculo fúngico y su evaluación como biofertilizante.**

Tesis que presenta:

**Escobar Flores Nayeli Saraib**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Directora de Tesis: Dra. Refugio Rodríguez Vázquez

Ciudad de México  
Noviembre 2020

## **Agradecimientos**

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento económico con número 890859, otorgado durante el período de este proyecto.*

*A la Dra. Refugio Rodríguez Vázquez por la dirección y apoyo brindado para hacer posible la presente investigación.*

*Al CINVESTAV, por abrirme sus puertas y otorgar todas las facilidades para llevar a cabo esta investigación. Al laboratorio Nacional de Servicios Experimentales, especialmente a la ingeniera Lorena Ramírez, por su atenta colaboración y tiempo. A la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares en especial al Dr. Daniel Estrada, siempre apasionado y comprometido con su trabajo.*

*Al Comité Tutorial, por su tiempo, apoyo y respaldo. A la Dra. Hidalgo por siempre animarme a mejorar y a sentirme orgullosa de mi trabajo; al Dr. Zúñiga por transmitir sus experiencias previas. ¡Gracias!*

*A cada miembro del laboratorio de Xenobióticos del Departamento de Biotecnología que a bien siempre me tendieron su ayuda.*

*A la Dra. Anbu Landa, por estar siempre presente y acompañarme en la realización de este proyecto, incluso estando lejos; por cada enseñanza, aprendizaje y regaño que siempre fueron para construir y construirme. ¡Lo logramos!*

*A cada uno de mis compañeros de estudio Janeth, Dani, Juan Jo, Sam, Juan y Jess, por siempre enseñarme algo nuevo y por obligarme a estudiar más de lo que me creía capaz. Todos me ayudaron a concluir el posgrado compartiendo su conocimiento, pero sobre todo compartiendo su amistad incondicional. ¡Gracias por los buenos ratos!*

*A mi amiga Janeth, por siempre estar.*

*A Oscar V., por los sacrificios, por apoyarme y motivarme a seguir mis sueños sin importar nada.*

*A los Valenzuela Muñoz por adoptarme y abrazarme en su familia y siempre brindarme su ayuda, todos colaboraron para que esto se llevara a cabo. Este triunfo también es de ustedes.*

## **Dedicatoria**

*A toda mi familia.*

*A mi mamá y abuelitos.*

*A mis hermanas Cielo y Juanita<sup>†</sup>*

*A mi mejor amigo, compañero y cómplice de vida: Oscar A.V. M.*

## CONTENIDO

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>i</b>
<b>INDICE DE TABLAS</b>	<b>ii</b>
<b>GLOSARIO</b>	<b>iii</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>iv</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. Justificación	2
1.2. Objetivo general	3
1.2.1. Objetivos particulares	3
1.3. Hipótesis	3
<b>II. ANTECEDENTES</b>	<b>4</b>
2.1. Suelos Agrícolas	4
2.1.1. Capacidad de intercambio catiónico	4
2.1.2. Influencia del pH en los suelos	5
2.1.3. Nutrición vegetal, disposición general de nutrientes	5
2.1.4. Salinidad de suelos	7
2.1.4.1. Suelos salinos	9
2.1.4.2. Suelos sódicos	9
2.1.4.3. Suelos salinos sódicos	10
2.1.5. Efecto de la salinidad de suelos en las plantas	10
2.1.5.1. Daño osmótico	10
2.1.5.2. Daño iónico	11
2.1.6. Remediación de salinidad	11
2.2. Fósforo en suelos	12
2.2.1. Fósforo orgánico	12
2.2.2. Fósforo inorgánico	13
2.2.3. Mecanismos de disposición de fósforo en suelos	13
2.2.3.1. Influencia del pH	14
2.2.3.2. Influencia de los Microorganismos	15
2.2.3.3. Influencia de ácidos orgánicos	17
2.2.3.4. Influencia de las enzimas	18
2.4. Biofertilizantes	19
2.4.1. Clasificación de biofertilizantes	19
2.5. Potencial del género <i>Penicillium sp</i> como biofertilizante	20
2.6. Antecedentes de cáscara de naranja y su interacción con <i>Penicillium sp.</i>	22
2.7. Contexto actual de la zona de estudio	23
2.7.1. Problemática ambiental de la zona de estudio	24
2.7.2. Problemática agrícola de la zona de estudio	25

<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>26</b>
3.1 Localización del área experimental.	26
3.2 Métodos	26
3.2.1 Caracterización del suelo de estudio	27
3.2.2 Aislamiento del inóculo fúngico de cáscara de naranja	27
3.2.2.1 Caracterización del inóculo fúngico	27
3.2.3 Determinación de producción de ácidos orgánicos	28
3.2.4 Monitoreo del pH	29
3.2.4.1 pH en cáscara de naranja	29
3.2.5 Optimización del sistema de remediación de suelo	29
3.2.5.1 Diseño experimental	30
3.2.5.2 Variables de respuesta	31
3.2.6 Bioensayos bajo invernadero en el cultivo de lechuga	31
3.2.6.1 Bioensayo a partir de suelo biorremediado	31
3.2.6.2 Fitotoxicidad: Límite máximo permisible	32
3.2.6.3 Fitotoxicidad: Tiempo mínimo de siembra	33
3.2.6.4 Eficiencia fisiológica y dinámica de crecimiento	33
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>35</b>
4.1 Caracterización del suelo de estudio	35
4.2 Caracterización de inóculo fúngico aislado de cáscara de naranja	40
4.2.1 Caracterización macroscópica y microscópica	40
4.2.2 Caracterización molecular	43
4.2.2.1 <i>Penicillium crustosum</i>	45
4.2.2.2 <i>Penicillium steckii</i>	45
4.2.2.3 <i>Penicillium citrinum</i>	45
4.3 Capacidad de producción de ácidos orgánicos	47
4.3.1 Ácidos Orgánicos en cáscara de naranja	47
4.3.2 Ácidos Orgánicos en cáscara de naranja inoculada	48
4.4 Monitoreo del pH	50
4.4.1 pH en cáscara de naranja	50
4.5 Optimización del sistema de remediación de suelo	52
4.5.1 Conductividad eléctrica	51
4.5.2 pH	55
4.5.3 Fósforo disponible	58
4.6 Bioensayos bajo invernadero en cultivo de lechuga	61
4.6.1 Bioensayo a partir de suelo biorremediado	61
4.6.2 Fitotoxicidad: Límite máximo permisible	68
4.6.3 Fitotoxicidad: Tiempo mínimo de siembra	72
4.6.4 Eficiencia fisiológica y dinámica de crecimiento	76

<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>85</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES</b>	<b>87</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>89</b>
<b>VIII. ANEXOS</b>	<b>95</b>
ANEXO 1 Elementos esenciales para las plantas	95
ANEXO 2 Condiciones ambientales promedio	96
ANEXO 3 Secuencia del fragmento 16S-ITS1-5.8S-ITS2-26S de las cepas	98
ANEXO 4 Imágenes de Extracción de Ácidos orgánicos	99
ANEXO 5 Imágenes de Aislamiento de Cepas	100
ANEXO 6 Imágenes Tratamientos de Optimización de Remediación	101
ANEXO 7 Imágenes de Bioensayos	102

## ÍNDICE DE FIGURAS

		<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b>	Influencia del pH sobre la disponibilidad de nutrientes	5
<b>Figura 2.</b>	Intercambio de nutrientes en las plantas	6
<b>Figura 3.</b>	Equilibrio de las formas de fósforo en el suelo	13
<b>Figura 4.</b>	Fijación del fósforo en los suelos de acuerdo con el pH	14
<b>Figura 5.</b>	Concentración de ortofosfatos de acuerdo con el pH	15
<b>Figura 6.</b>	Contribución los microorganismos del suelo en la asimilación de P	16
<b>Figura 7.</b>	Clasificación de los biofertilizantes de acuerdo con su función	19
<b>Figura 8.</b>	Diagrama de una Chinampa	23
<b>Figura 9.</b>	Tamaños de soporte a partir de residuos de cáscara de naranja	30
<b>Figura 10.</b>	Características microscópicas de las cepas aisladas de cáscara de naranja	41
<b>Figura 11.</b>	Características microscópicas de las cepas aisladas de cáscara de naranja	42
<b>Figura 12.</b>	Dendograma de similitud de la secuencia consenso del fragmento 16S-ITS1-5.8S-ITS2-26S de las cepas identificadas	44
<b>Figura 13.</b>	Identificación de Ac. Orgánicos en cáscara de naranja	48
<b>Figura 14.</b>	Identificación de Ac. Orgánicos en cáscara de naranja inoculada	49
<b>Figura 15.</b>	pH de la Cáscara de Naranja a través del tiempo	51
<b>Figura 16.</b>	Interacción de factores estadísticamente significativos en la reducción de CE	53
<b>Figura 17.</b>	Interacción de factores estadísticamente significativos en la reducción de CE	54
<b>Figura 18.</b>	Interacción de los factores tamaño de cáscara de naranja y humedad en el pH	56
<b>Figura 19.</b>	Interacción de los factores colonización y humedad en el pH	57
<b>Figura 20.</b>	Interacción de factores estadísticamente significativos para la disposición de P asimilable	59
<b>Figura 21.</b>	Interacción de factores estadísticamente significativos para la producción de hojas	61
<b>Figura 22.</b>	Interacción de factores estadísticamente significativos para la longitud de lechuga	63
<b>Figura 23.</b>	Interacción de factores significativos para la longitud aérea de lechuga	64
<b>Figura 24.</b>	Interacción de factores estadísticamente significativos para la longitud de raíz de lechuga	65
<b>Figura 25.</b>	Comportamiento del peso seco total en el control negativo ajustado al modelo	76
<b>Figura 26.</b>	Comportamiento del peso seco total con aplicación de CN ajustado al modelo	77
<b>Figura 27.</b>	Comportamiento del peso seco total con aplicación de CNI ajustado al modelo	78
<b>Figura 28.</b>	Tasa relativa de crecimiento en plántulas de lechuga ( $\text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$ )	80
<b>Figura 29.</b>	Índice de área foliar en plántulas de lechuga	81
<b>Figura 30.</b>	Tasa de asimilación neta en plántulas de lechuga ( $\text{g cm}^{-2} \text{d}^{-1}$ )	88
<b>Figura 31.</b>	Área Foliar Específica en plántulas de lechuga ( $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ )	83
<b>Figura 32.</b>	Relación de Área Foliar en plántulas de lechuga ( $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ )	84

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> Clasificación de los suelos salinos	8
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de los métodos de remediación de salinidad	11
<b>Tabla 3.</b> Microorganismos solubilizadores de fósforo	17
<b>Tabla 4.</b> Producción de ácidos orgánicos por especies de <i>Penicillium</i> solubilizadores de fosfato	19
<b>Tabla 5.</b> Composición de cáscara de naranja	22
<b>Tabla 6.</b> Estado del sistema chinampero	25
<b>Tabla 7.</b> Variables independientes: Tratamientos y niveles.	30
<b>Tabla 8.</b> Matriz de distribución de tratamientos de remediación	31
<b>Tabla 9.</b> Dosis de aplicación de cáscara de naranja para LMP	32
<b>Tabla 10.</b> Tratamientos para la evaluación de fitotoxicidad en plántulas de lechuga	33
<b>Tabla 11.</b> Análisis químico de suelo de estudio	35
<b>Tabla 12.</b> Determinación de parámetros de salinidad	36
<b>Tabla 13.</b> Bases intercambiables	37
<b>Tabla 14.</b> Micronutrientes del suelo	38
<b>Tabla 15.</b> Metales contaminantes en el suelo	38
<b>Tabla 16.</b> Análisis de plaguicidas en suelo de estudio	39
<b>Tabla 17.</b> Prueba de medias LSD de conductividad eléctrica	55
<b>Tabla 18.</b> Prueba de medias LSD de pH	57
<b>Tabla 19.</b> Fósforo asimilable de suelos tratados <i>Ex situ</i>	60
<b>Tabla 20.</b> Número de hojas por planta en suelo biorremediado	61
<b>Tabla 21.</b> Longitud de planta en suelo biorremediado	63
<b>Tabla 22.</b> Longitud aerea de planta en suelo biorremediado	64
<b>Tabla 23.</b> Longitud radicular de planta en suelo biorremediado	65
<b>Tabla 24.</b> Peso fresco en suelo biorremediado	66
<b>Tabla 25.</b> Peso seco en suelo biorremediado	67
<b>Tabla 26.</b> Variables fitométricas de lechuga a partir de diferentes dosis de CNI	69
<b>Tabla 27.</b> Variables fitométricas de lechuga a partir de diferentes dosis de CNI	70
<b>Tabla 28.</b> Variables fitométricas de lechuga a partir de diferentes dosis de CN	71
<b>Tabla 29.</b> Variables fitométricas de lechuga a partir de diferentes dosis de CN	72
<b>Tabla 30.</b> Parámetros fisiológicos a diferentes tiempos de aplicación.	73
<b>Tabla 31.</b> Parámetros fisiológicos a diferentes tiempos de aplicación	74

## **GLOSARIO**

<b>AFE</b>	Área foliar específica
<b>CE</b>	Conductividad eléctrica
<b>CN</b>	Cáscara de naranja
<b>CNI</b>	Cáscara de naranja inoculada
<b>DDS</b>	Días después de la siembra
<b>DADS</b>	Día de aplicación después de la siembra
<b>HSP</b>	Hongos solubilizadores de fósforo
<b>IAF</b>	Índice de área foliar
<b>MO</b>	Materia orgánica
<b>MSP</b>	Microorganismos solubilizadores de fósforo
<b>PSI</b>	Porcentaje de sodio intercambiable
<b>P</b>	Fósforo
<b>RAS</b>	Relación de adsorción de sodio
<b>RAF</b>	Relación de área foliar
<b>TAN</b>	Tasa de asimilación neta
<b>TCC</b>	Tasa de crecimiento de cultivo
<b>TCR</b>	Tasa relativa de crecimiento

## RESUMEN

Xochimilco es una zona ampliamente reconocida por los sistemas agrícolas tradicionales denominados “chinampas”, tales sistemas son islas rodeadas de canales de agua, que junto con las altas concentraciones de materia orgánica de los suelos originan alta capacidad productiva en los cultivos. Sin embargo, actualmente dicha agricultura ancestral es afectada, debido a la baja calidad del agua de riego que proviene de los canales y a las prácticas agrícolas incorrectas; como el uso de estiércol sin tratar y aplicaciones excesivas de agroquímicos. Dichas actividades han ocasionado la contaminación del agua y del suelo, incluyendo un aumento en la salinidad lo cual tiene un impacto social y económico, causado por el abandono de las “chinampas”. Acerca del problema ambiental, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto en la salinidad y la solubilización de P en el suelo de una “chinampa”, a partir de los ácidos orgánicos producidos por un inóculo fúngico de residuos de naranja. Así como evaluar el efecto en el desarrollo de plantas de lechuga a partir de la adición del inóculo, para determinar su actividad como biofertilizante. Se llevó a cabo la identificación de los hongos pertenecientes al inóculo de CN, así como la determinación cualitativa de los ácidos orgánicos producidos por el inóculo. Los principales parámetros de suelo evaluados fueron la CE, pH y P disponible, con las condiciones de cultivo optimizadas a través de un diseño experimental factorial fraccionado  $2^{5-2}$ . Los factores evaluados, fueron; la adición del inóculo, la utilización de material orgánico como fuente de carbono, la proporción de material orgánico y naranja, la cantidad de CN y la humedad del suelo. Se evaluaron los parámetros fitométricos; número de hojas, longitud, peso fresco y peso seco de raíz, hoja y planta. Se evaluaron bioensayos para determinar la dosis y tiempo de aplicación de CNI, así como el comportamiento de las plantas durante y después del proceso de remediación. Los bioensayos indicaron que existe una inhibición en el desarrollo de las plantas con aplicación simultánea de CNI y la siembra, contrario a la siembra posterior a los 30 días de aplicación del CNI, donde las hojas, longitud aérea y biomasa del cultivo fueron mejoradas. La aplicación de CN bajo las condiciones de estudio disminuyó la salinidad  $4 \text{ dS m}^{-1}$  después de 30 días de remediación y aumentó el P disponible de  $0.32$  a  $2.30 \text{ mg kg}^{-1} \text{ s}$ . Estos resultados convierten al inóculo fúngico, en una estrategia viable para mitigar la salinidad de suelos chinamperos y aumentar la disponibilidad de P para las plantas.

## SUMMARY

Xochimilco is an area widely recognized for the traditional agricultural systems called "chinampas", such systems are islands surrounded by water channels, factor that, together with the high concentrations of organic matter in the soils originate high productive capacity of crops. However, nowadays this ancestral agriculture is affected, due to the low quality of irrigation water that comes from the canals and incorrect agricultural practices; such as the use of untreated manure and excessive applications of pesticides and agrochemicals. These activities have caused water and soil contamination, including an increase in salinity, which has a social and economic impact, caused by the abandonment of the "chinampas". Regarding the environmental problem, the objective of this work was to evaluate the effect on salinity and solubilization of P in the soil of a "chinampa", from the organic acids produced by a fungal inoculum of orange residues. As well as evaluating the effect on the development of lettuce plants from the addition of the inoculum, to determine its activity as a biofertilizer. The identification of the fungi belonging to the CN inoculum was carried out, as well as the qualitative determination of the organic acids produced by the inoculum. The main soil parameters evaluated were the EC, pH and P available, with the cultivation conditions optimized through a 25-2 fractional factorial experimental design. The evaluated factors were; the addition of the inoculum, the use of organic material as a carbon source, the proportion of organic material and orange, the amount of CN and the soil moisture. The phytometric parameters were evaluated; number of leaves, length, fresh weight and dry weight of root, leaf and plant. Bioassays were evaluated to determine the dose and time of application of CN, as well as the behavior of the plants during and after the remediation process. The bioassays indicated that there is an inhibition in the development of plants with simultaneous application of CN and sowing, contrary to sowing after 30 days of application of CN, where the leaves, aerial length and biomass of the crop were improved. The application of CN under the study conditions decreased salinity 4 dS m<sup>-1</sup> after 30 days of remediation and increased the available P from 0.32 to 2.30 mg kg<sup>-1</sup> s. These results make the fungal inoculum a viable strategy to mitigate the salinity of chinamperos soils and increase the availability of P for plants.

## I. INTRODUCCIÓN

La salinidad de suelos impide que los nutrientes vegetales sean asimilados de forma óptima, situación que a la larga causa deficiencias en la nutrición de las plantas y por ende provoca un efecto negativo en la calidad de cultivos sensibles a la salinidad misma.

El fósforo (P) es un macronutriente de papel clave para la nutrición de plantas y en consecuencia para la productividad agrícola, aunque su presencia en los suelos está en elevadas concentraciones, la gran mayoría del P se encuentra no disponible para las plantas y menos del 10% entra en el ciclo biogeoquímico; es así como las deficiencias de P son comunes en las plantas y debido a ello las aplicaciones de fertilizantes fosforados al suelo son necesarias para mantener la productividad de los cultivos (Li et. al., 2016), situación que a la larga resulta en problemas ambientales que inciden en la calidad de los suelos. Existen microorganismos capaces de solubilizar P insoluble a través de diferentes mecanismos, transformando el P de forma que las plantas lo puedan absorber. En vista de lo anterior, es de amplio interés el estudio de inoculantes en las que se incluyan determinados géneros y especies de bacterias, hongos y actinomyces con potencial solubilizador de P, para aumentar la capacidad de absorción de las plantas y con ello el rendimiento de los cultivos.

De esta forma la utilización de microorganismos como biofertilizantes es considerada una alternativa viable para mejorar la producción de cultivos y sustituir parcial o totalmente los fertilizantes químicos. La utilización de técnicas biotecnológicas puede impactar la seguridad alimentaria a través de prácticas sostenibles en la agricultura y de esa forma mejorar y aprovechar los recursos naturales (Cano et. al., 2017). En este sentido los hongos pertenecientes al género *Penicillium*, son conocidos por producir numerosas micotoxinas y ácidos orgánicos que disminuyen el pH del medio y tienen la capacidad de solubilizar el fosfato del mismo. Los mecanismos por los cuales este género de hongo estimula el crecimiento de la planta y la absorción de fósforo no se conocen totalmente. De manera que el objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto y la relación entre la salinidad y la solubilización del fósforo, a partir de la aplicación de residuos de naranja con un inóculo fúngico y la producción de ácidos orgánicos, así como su influencia en el desarrollo del cultivo de lechuga en un suelo salino de la zona chinampera de la Ciudad de México.

## 1.1 Justificación

La seguridad alimentaria es una de las grandes problemáticas a resolver debido a la sobrepoblación que compromete el abasto de alimentos a futuro. Cano y colaboradores (2017) plantean que en el año 2050 existirá la necesidad de aumentar 70% la producción de alimentos. Este panorama en grandes ciudades como la Ciudad de México, resulta alarmante puesto que la superficie para la producción de alimentos es cada vez más reducida por el crecimiento urbano o en su caso el abandono del campo por la escasa productividad de los suelos. Los sistemas agrícolas chinamperos son un claro ejemplo de tal problemática, debido a que de las 20 922 chinampas sólo 3 586 están activas (González et. al., 2016). Los suelos de chinampas se caracterizan por su salinidad y sodicidad, que durante temporadas secas muestran una fuerte concentración de sales en la superficie de la mayoría de los suelos (Krasilnikov et. al., 2011). Un problema común es la utilización de agua de riego con alta concentración de sales por los procesos de evaporación y la imposibilidad del suelo de drenar las sales, así como la aplicación excesiva de fertilizantes fosfóricos, producen un exceso de solutos en la superficie del suelo. Lo anterior provoca una producción de alimentos ineficiente y costosa, que conduce a la pérdida de la fertilidad y daño al medio ambiente. El uso de microorganismos solubilizadores de fosfato en la producción de cultivos es un método alternativo investigado para satisfacer la demanda de fósforo de los cultivos (Yin et. al, 2015).

La utilización de residuos agroindustriales para la producción microbiana de ácidos orgánicos utilizando fermentaciones en estado sólido es un concepto interesante, por los bajos costos de la materia prima y los beneficios ambientales (Gaind, 2017). Uno de los residuos importantes por su cantidad, proviene de los cítricos, que económicamente, tienen la producción más grande del mundo en comparación con otras frutas y los patógenos que hospedan causan pérdidas en los frutos, lo que representa casi el 50% del desperdicio de cítricos (Ladanyia, 2010). De ahí la importancia de generar alternativas viables como la biorremediación de suelos con residuos cítricos que permitan que los microorganismos que colonizan la cáscara de naranja sean aprovechados de forma segura en la agricultura y con ello tener la capacidad de buscar soluciones a problemáticas como la salinidad y alcalinidad de suelos a través de la solubilización de sales como las de P y usarlo como biofertilizante, tal como se planea en la presente investigación.

## **1.2 Objetivo general**

Evaluar el efecto de un inóculo fúngico de residuos de naranja y sus ácidos orgánicos en la salinidad y solubilización de fósforo en suelos agrícolas, y su influencia en el desarrollo de cultivos de lechuga.

### **1.2.1 Objetivos particulares**

- Analizar la relación entre los ácidos orgánicos con la reducción de sales y la disponibilidad de fósforo en un suelo salino de la zona chinampera de la Ciudad de México.
- Determinar la actividad como biofertilizante de un inóculo fúngico de residuos de la cáscara de naranja, aplicados a un suelo salino cultivado con lechuga.
- Definir los parámetros de utilización del inóculo fúngico para su funcionamiento como biofertilizante a partir de las aplicaciones de residuos de naranja a plántulas de lechuga en un suelo salino.

## **1.3 Hipótesis**

Los ácidos orgánicos desarrollados a partir del inóculo de residuos de la cáscara de naranja dulce (*Citrus sinensis*, L. Osbeck) favorecerán la disminución de sales y su solubilización, en particular las de fósforo presentes en suelos agrícolas, y ello se favorecerá el desarrollo del cultivo de lechuga.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Suelos Agrícolas

La palabra suelo proviene del latín *solurn* que significa piso, no obstante, el concepto de suelo depende del criterio de estudio, que puede referirse a su función, formación, origen, características o conservación (FAO, 2015). Cabildo y colaboradores (2013) lo definieron como el producto de la degradación de la roca madre y las sustancias orgánicas, estas últimas representan entre el 2 y 5 % del suelo superficial y provienen de la constante transformación de materia orgánica y microorganismos, mientras que las partículas minerales son clasificadas por su tamaño en arena, limo y arcilla, ello determina la capacidad porosa para almacenar agua o aire.

#### 2.1.1 Capacidad de intercambio catiónico

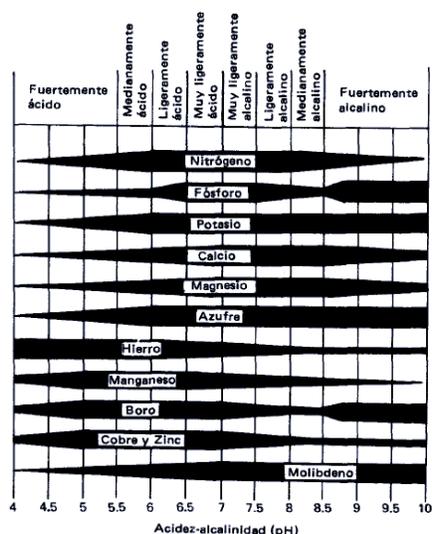
El proceso de intercambio de cationes que sucede en las partículas del suelo con carga negativa (arcillas y humus) es reversible e ilimitado y de él depende la eficiencia de la nutrición de las plantas. Ramos (2006), define a la capacidad de intercambio catiónico (CIC), como la propiedad de los minerales de arcilla y materia orgánica para adsorber cationes de la fase líquida del suelo, desadsorbiendo al mismo tiempo cantidades equivalentes de otros cationes.

De tal manera que la disponibilidad de los nutrientes en la solución del suelo depende de la fuerza con la cual los iones están retenidos en él, por ello no todos los cationes son adsorbidos con la misma intensidad. A mayor número de cargas mayor será el poder de fijación, razón por la cual los cationes divalentes  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  son principalmente adsorbidos con respecto a los monovalentes como  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$ . Navarro y Navarro (2003), consideran una energía de fijación decreciente según el orden:  $\text{H}^+ > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Na}^+$ .

Independientemente de las diferentes concentraciones de cada catión, existe entre ellos un equilibrio, lo cual indica que toda modificación en la concentración de un catión, lleva a una reacción de cambio, al modificarse el equilibrio entre ellos; los factores que son capaces de alterar este equilibrio son: las lluvias o riegos abundantes pueden diluir la disolución del suelo, la absorción de cationes por la planta, aportaciones de fertilizantes solubles, respiración de las raíces y microorganismos que producen  $\text{H}^+$  (Bidwell, 1993).

### 2.1.2 Influencia del pH en los suelos

El desarrollo de plantas y microorganismos depende de la disponibilidad, solubilidad y movilidad de los nutrientes, fenómenos que a su vez dependen del pH de los suelos. El efecto de acidez o alcalinidad influye directamente sobre la disponibilidad de los nutrientes, como se observa en la Figura 1, en la cual la anchura de las bandas representa la solubilidad de cada nutriente de acuerdo con el pH del suelo, es así que entre 6.5 y 7.5 existe un mayor balance en la disponibilidad de nutrientes para las plantas.



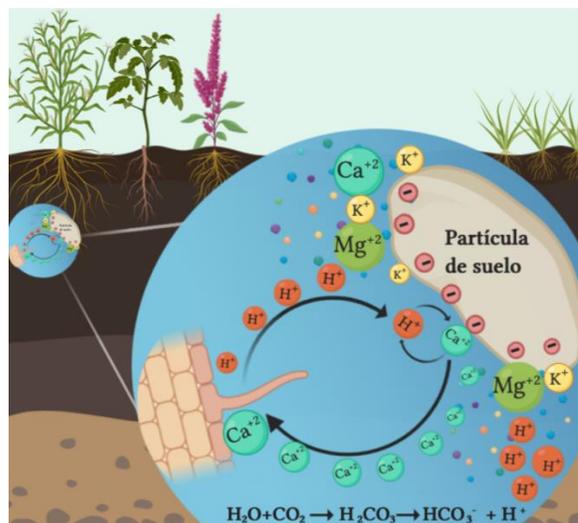
**Figura 1** Influencia del pH sobre la disponibilidad de nutrientes (Freeman, 1970 citado por Navarro y Navarro, 2003)

### 2.1.3 Nutrición vegetal, disposición general de nutrientes

Como se ha mencionado, los iones disueltos en la fase acuosa son los que están disponibles para las raíces de las plantas, las cuales utilizan como materia prima los nutrientes minerales, dióxido de carbono y agua, para transformar los compuestos inorgánicos en compuestos orgánicos. Es por ello, que Bidwell (1993) indica que la fertilidad del suelo depende del estado dinámico de los nutrientes debido a las tasas de adición y remoción de nutrientes, así mismo depende de la concentración de los nutrientes en solución acuosa y no únicamente de la cantidad de elementos que en sí mismo el suelo contenga. De acuerdo con Campbell y Reece (2007), existen 17 nutrientes esenciales para completar el ciclo de vida de las plantas (Anexo 1), de entre ellos, los macronutrientes son requeridos en cantidades grandes y son los principales elementos de los compuestos orgánicos que conforman a las plantas.

En el caso de los micronutrientes requeridos en cantidades pequeñas que funcionan como cofactores e intervienen en las reacciones enzimáticas.

El mecanismo de adsorción de nutrientes suele explicarse mediante dos teorías: la de intercambio por contacto y la de intercambio por ácido carbónico. En la primera, el intercambio se lleva a cabo únicamente a partir del contacto de la raíz con los iones que son transferidos a la planta. Sin embargo, la teoría con mayor validación a través de diversas investigaciones es la del intercambio del ácido carbónico (Figura 2), la cual plantea que la disolución del suelo representa el medio entre el intercambio de iones de la raíz y los coloides del suelo y es explicado a partir de la liberación de dióxido de carbono por la raíz, el cual reacciona con el agua dando lugar al ácido carbónico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ), que se disocia al ponerse en contacto con el suelo, aportando iones  $\text{H}^+$ . Estos iones se difunden y llevan a cabo el intercambio de los minerales (+) que están adsorbidos en la superficie del suelo (-), siendo así desplazados o liberados los nutrientes a la solución del suelo para difundirse hacia la raíz de las plantas hasta absorberse (Campbell y Reece, 2007; Navarro y Navarro, 2003).



**Figura 2** Intercambio de nutrientes en las plantas (Modificado a partir de Campbell y Reece, 2007)

Como se mencionó, las secreciones de los pelos radiculares liberan  $\text{CO}_2$  hacia la solución del suelo, que reacciona con el  $\text{H}_2\text{O}$ , formando  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , la disociación de este ácido aporta los iones  $\text{H}^+$ , que como se observa en la figura ayudan a que los nutrientes estén disponibles, puesto que provocan el desplazamiento minerales de carga positiva ( $\text{Ca}^+$ ) que estaban fuertemente unidos a las partículas del suelo, este desplazamiento origina que minerales como el  $\text{Ca}^+$  estén disponibles para ser aprovechados por las plantas.

Con lo expresado anteriormente es posible determinar que un nutriente es asimilable cuando se encuentra soluble en la disolución del suelo y es poco disponible cuando esta inmóvil al estar unido a él.

#### **2.1.4 Salinidad de suelos**

La salinidad puede tener origen endógeno por la disolución de minerales formadores de suelo o exógeno, debido a aportes de sales externos a las condiciones naturales del suelo. Las prácticas como; el riego con agua de baja calidad y la aplicación de fertilizantes en dosis por encima de las requeridas por los cultivos, han provocado la salinización exógena de los suelos.

El movimiento del agua es el proceso determinante para la salinidad, pues la circulación descendente lixivia las sales solubles, por el contrario, la evaporación del agua provoca la circulación ascendente que produce acumulación de sales en la superficie del suelo (Cabildo et. al., 2013; Taiz y Zeiger, 2006), las sales pueden encontrarse en el suelo precipitadas en forma de cristales, disueltas en la solución o retenidas en el complejo de cambio. Por lo que el contenido de sales en cualquiera de estas tres situaciones cambia continuamente debido a la humedad edáfica, pasando de una situación a otra (Maldonado, 2012).

Los elementos que participan en los suelos salinos son:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{SO}_4^{2-}$ ; en áreas continentales suelen predominar los  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  y  $\text{Cl}^-$ ; y en las llanuras costeras, la sal predominante es el  $\text{NaCl}$ . A veces el carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) se forma en el propio sitio, a partir del  $\text{CO}_2$  de la atmósfera y del  $\text{Na}^+$  contenido en el suelo. Las sales que normalmente suelen acumularse formando encostramientos blancos, son en forma de cloruros ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{KCl}$ ) sulfatos ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ) y carbonatos ( $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{MgCO}_3$ ) (Cabildo et. al., 2013; Ramos, 2006).

En los suelos salinos existen dos escenarios: uno donde el calcio es dominante de forma que el complejo adsorbente está saturado principalmente de  $\text{Ca}^{2+}$  y en minoría de  $\text{Na}^+$ ; en este caso el suelo es estable y conserva su estructura. El segundo escenario es donde el  $\text{Ca}$  está ausente y predomina el ión  $\text{Na}^+$ , el cual en presencia de agua se hidroliza liberando el ión  $\text{Na}^+$  en la solución ( $\text{CO}_3\text{Na}_2$ ), en este caso el pH se eleva, las arcillas se dispersan y la estructura del suelo se degrada (Maldonado, 2012; Otero et. al., 2007). Es así como al predominio de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  se le denomina salinización, y a los suelos con dominancia de

Na<sup>+</sup>, producen alcalinización o sodificación. De acuerdo con diversos autores (Otero et. al., 2007; Taiz y Zeiger, 2006; Valencia,2013) para caracterizar a los suelos con problemas de salinidad, alcalinidad o ambas se utilizan tres parámetros principales:

- Conductividad eléctrica (CE): es la capacidad de una solución de transmitir electricidad, es obtenida mediante el extracto de saturación de una masa de suelo, su expresión es en dSiemens por metro, entonces la CE refleja la concentración de sales solubles en la disolución. A mayor concentración de sales en el agua del extracto, mayor es su conductividad eléctrica y reduce además su potencial osmótico, es decir, es mayor la presión osmótica.
- Porcentaje de Sodio Intercambiable (PSI): que es un índice que proporciona el porcentaje relativo de sodio adsorbido en el complejo de intercambio del suelo.
- pH del suelo: representa el grado de nivel de acidez, neutralidad o alcalinidad.

Los parámetros mencionados anteriormente logran caracterizar y clasificar a los suelos salinos, distinguiendo de un suelo normal a uno salino, sódico o salino sódico; siendo estos últimos los que provocan mayor daño en los cultivos y de más dificultad para ser tratados.

**Tabla 1** Clasificación de los suelos salinos

<b>Clasificación</b>	<b>pH</b>	<b>CE (ds m<sup>-1</sup>)</b>	<b>PSI (%)</b>	<b>Características</b>
<b>Suelo normal</b>	-	< 4	<15	Crecimiento óptimo de plantas
<b>Suelo ligeramente salino</b>	< 8.5	2 a 4	<15	Efecto negativo en plantas sensibles
<b>Suelo salino</b>	< 8.5	> 4	<15	Afectación a la mayoría de las plantas
<b>Suelo sódico</b>	> 8.5	< 4	>15	Crecimiento de plantas tolerantes
<b>Suelo salino-sódico</b>	> 8.5	> 4	>15	Pocas plantas pueden desarrollarse

Modificada a partir de (Maldonado, 2012; Otero et. al., 2007; Salcedo, 2002; Valencia, 2005)

Existen otros indicadores auxiliares provenientes de los análisis de las muestras de suelos que pueden ser utilizados, dependiendo de los objetivos de estudio, por mencionar algunos se encuentra la relación de adsorción de Sodio (RAS), la relación calcio sodio (Ca/Na), la relación de sodio intercambiable (RSI), porcentaje de Na<sup>+</sup> y Mg<sup>+</sup>, potencial zeta, coeficiente de dispersión, estabilidad estructural, curvas de retención de humedad, conductividad hidráulica, etc., (Otero et. al., 2007). Cabe mencionar que, a lo largo del presente trabajo, los parámetros utilizados fueron; CE y pH, principalmente.

#### 2.1.4.1 Suelos Salinos

Son suelos que presentan una CE de  $4 \text{ dS m}^{-1}$  o más, un PSI menor al 15% y generalmente su pH es menor a 8.5, frecuentemente presentan costras salinas blancas en la superficie llamado, álcali blanco. Las sales que frecuentemente son encontradas en los suelos salinos son:

- Cloruros: NaCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, KCl
- Carbonatos Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- Sulfatos MgSO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Bicarbonatos NaHC
- Nitratos NaNO<sub>3</sub>, KNO<sub>3</sub>

Los cloruros (Cl<sup>-</sup>) y sulfatos (SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>) son las principales sales formadas en este proceso, el Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> y Na<sup>+</sup> son los cationes que mayormente se unen a los cloruros y a los sulfatos para formar sales, con menor frecuencia se encuentra el potasio, los bicarbonatos, carbonatos y nitratos (Navarro y Navarro, 2003; Valencia, 2013).

Los Cl<sup>-</sup> son sales muy solubles y con una toxicidad alta. El NaCl es la sal más frecuente en suelos salinos y afecta la solubilidad de otras sales, la acumulación de MgCl<sub>2</sub> se produce en suelos con una salinidad extremadamente alta y es altamente tóxica para las plantas, es así como la remediación de estos los suelos es difícil. Con respecto a las sales de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el MgSO<sub>4</sub>, se pueden dar lugar a eflorescencias blancas al ser transportadas a la superficie del suelo en tiempos de sequía, son muy solubles y altamente tóxicas. El orden de toxicidad decreciente de los sulfatos es: K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> < Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> < MgSO<sub>4</sub> (Ramos, 2006). En los suelos salinos las bases intercambiables están presentes aproximadamente en las siguientes proporciones: Ca<sup>2+</sup> 80%; Mg<sup>+2</sup> 15%, Na<sup>+</sup> y K en 0.5% (Valencia, 2013).

#### 2.1.4.2 Suelos sódicos

Los suelos sódicos con frecuencia se encuentran en regiones áridas y semiáridas son suelos con PSI mayor a 15, CE menor a  $4 \text{ dS m}^{-1}$ , pH entre 8.5 y 10. En los suelos de este tipo, los principales daños son físicos pues existe pérdida de la estructura del suelo. Los daños químicos provocan toxicidad en el metabolismo y afectan la nutrición de plantas, debido a la acción del Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y NaHCO<sub>3</sub>, a la poca disposición de P y K, y por el exceso de Na<sup>+</sup>. La concentración de Na<sup>+</sup> frente al Ca<sup>+2</sup> y Mg<sup>+2</sup> en la solución del suelo es superior al 70% (Aceves, 2011; Ramos, 2006; Valencia, 2013).

### **2.1.4.3 Suelos salinos sódicos**

Se forman como resultado de los procesos combinados de salinización y acumulación de sodio, el pH en este caso no supera el 8, tienen un PSI mayor de 15, una CE mayor de 4.0 dSm<sup>-1</sup>. La principal característica que Navarro y Navarro (2003) plantean, se basa en la disposición de sales solubles que permiten que el alto contenido de sodio no resulte dañino. Sin embargo, mencionan que si el exceso de sales solubles es lavado y las sales se lixivian, el pH se incrementa a valores mayores de 8.5, lo cual provoca la hidrolización del complejo sódico, que es un fenómeno que aumenta la concentración de OH<sup>-</sup>, lo cual incide en el aumento de la toxicidad del Na, es así como la materia orgánica se dispersa fuertemente y se distribuye en el suelo, dando un color oscuro, razón por la cual este tipo de suelo es también llamado álcali negro. Este efecto de hidrolización del complejo sódico también sucede si hay presencia de carbonato o bicarbonato sódico, lo cual provoca toxicidad en las plantas.

### **2.1.5 Efecto de la salinidad de suelos en las plantas**

Tal como se observó en la Tabla 1, las plantas comienzan a resentir el aumento en la concentración de sales a partir de los 2 dS m<sup>-1</sup> y las afectaciones pueden ir del 20 al 50% de disminución en el rendimiento, de acuerdo con el incremento en la conductividad eléctrica. El estrés salino en las plantas tiene dos vertientes, una referente al estrés osmótico que a su vez provoca el estrés hídrico y otra referente al estrés iónico, que origina toxicidad en las plantas por el exceso de ciertos iones.

#### **2.1.5.1 Daño ósmotico**

La presión osmótica es definida, como la cantidad de energía necesaria para que las raíces sean capaces de adsorber el agua del suelo, este requerimiento energético es mayor en las plantas expuestas a suelos salinos.

El transporte de agua por ósmosis se lleva a cabo pasivamente desde la solución con menor concentración de soluto hacia la de mayor concentración. El potencial del soluto de una disolución es proporcional al número de moléculas de solutos disueltos en ella, a esto se le conoce como potencial osmótico y afecta la dirección de la ósmosis (Campbell y Reece, 2007). El exceso de solutos disueltos en la zona radicular reduce el potencial osmótico de las células radiculares y lo hacen más negativo, provocando un efecto homólogo al que produce el déficit hídrico del suelo en la planta.

### 2.1.5.2 Daño iónico

La toxicidad de las plantas debido a la presencia de ciertos iones es variable, ya que algunas sales que por si solas no son tóxicas en las plantas, tales como el sodio, cloro o bicarbonato, al estar presentes en grandes concentraciones provocan efectos negativos, contrario así en iones como el boro o el litio que son dañinos incluso en concentraciones muy bajas (Salcedo, 2002). Una relación anormal de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  y altas concentraciones de sales inactivan algunas enzimas e inhiben la síntesis de proteínas, debido a que a altas concentraciones el  $\text{Na}^+$  desplazan al  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana plasmática lo cual provoca un cambio en la permeabilidad de la membrana de las células, que puede ser observada por la pérdida de  $\text{K}^+$  en las células. Con concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en los cloroplastos se inhibe la fotosíntesis, situación que afecta la altura de la planta, la longitud de la raíz, la acumulación de materia fresca y seca, así como la supervivencia y el contenido de proteína y de azúcares (Mesa, 2003; Taiz y Zeiger, 2006).

### 2.1.6 Remediación de salinidad

La salinidad en los suelos regularmente es tratada por medio de métodos químicos como; la aplicación de ácido sulfúrico o yeso agrícola que intercambien el sodio por calcio, acompañado del lavado de las sales solubles con agua de baja salinidad, no obstante, estos métodos son costosos al ser aplicados en grandes extensiones salinas (Aceves, 2011).

De acuerdo con el tipo de salinidad presente en el suelo será el tipo de enmienda a realizar, tales métodos de recuperación son clasificados en la Tabla 2 de acuerdo con su prioridad, se pueden dividir los métodos más importantes con respecto a aquellos auxiliares.

**Tabla 2** Clasificación de los métodos de remediación de salinidad

Técnica	Método	Descripción
<b>Principales</b>	Químico	Aplicación de correctores químicos (yeso, cal-azufre)
	Hídrico	Aplicación de láminas de riego para el lavado
	Eléctrico	Aplicación de energía eléctrica al suelo
<b>Auxiliares</b>	Físico	-Inversión del perfil del suelo -Arado profundo -Subsoleo -Mezcla de arena
	Biológico	-Mejora orgánica -Abonado -Vegetación tolerante -Plantas resistentes
	Prácticas agrícolas	Selección de cultivos resistentes

Realizado a partir de Mesa, 2003; Manzano et. al., 2014; Salcedo, 2002.

## 2.2 Fósforo en los suelos

El fósforo es un macronutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas y proviene de la descomposición de la roca madre. La cantidad de fósforo total en el suelo es expresada como óxido fosfórico  $P_2O_5$  y puede clasificarse como inorgánico u orgánico. Es importante tener en cuenta que la mayor parte del fósforo en el suelo no es aprovechable por las plantas, debido a su gran insolubilidad.

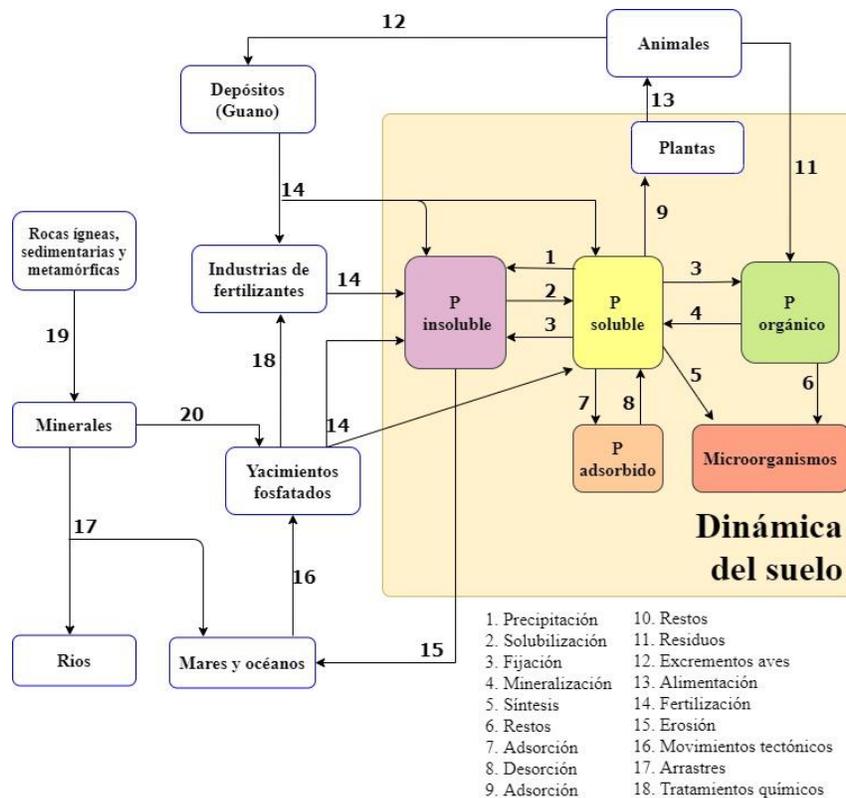
El P total está presente en el suelo en varias formas las cuales han sido definidas por su relación con otros componentes minerales u orgánicos, Henríquez (2015) menciona que se han identificado diferentes categorías de fósforo como el P lábil, P ligado a sesquióxidos de Fe/Al, P ligado a fosfatos de calcio, P ligado a formas orgánicas y finalmente una fracción de P residual u ocluido el cual está formado estructuras más complejas en el suelo que tienen muy baja disponibilidad para las plantas.

Sin embargo, el P solamente es absorbido por las plantas como anión fosfato monovalente ( $H_2PO_4^-$ ) y anión bivalente ( $HPO_4^{2-}$ ). Cota (1986) considera como las principales formas de fijación del P y por ende indisponibilidad para las plantas, al reemplazamiento de grupos-OH por aniones fosfato en la superficie de la arcilla (que será mayor en cuanto mayor sea la acidez del suelo); y a la fijación con los cationes que están adsorbidos a la arcilla los cuales actúan como unión o puente de fijación del fosfato, el caso más frecuente de unión es el  $Ca^{+2}$ , pero lo mismo sucede con el  $Mg^{+2}$ ,  $Al^{+3}$  y el  $Fe^{+3}$ . Los aniones de fosfato disponibles para las plantas son extremadamente reactivos y se fijan a través de la interacción con los cationes en el suelo como  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ , y  $Al^{3+}$ , para formar complejos de fosfato tricálcico insoluble, fosfato de magnesio, fosfato férrico y fosfato de aluminio, respectivamente (Yin, et. al., 2015).

La concentración del fósforo en su forma asimilable depende del equilibrio dinámico de la solución del suelo, la cual se observa en la Figura 3.

### 2.2.1 Fósforo orgánico

El P orgánico llega al suelo como fitina, fosfolípidos, nucleoproteínas y azúcares fosforilados contenidos en residuos vegetales; la cantidad de P orgánico en los suelos es variable, se puede establecer que se encuentra en una relación C:N:P aproximada de 100:10:1 (Cota, 1986).



**Figura 3** Equilibrio de las formas de fósforo en el suelo (Modificado a partir de Navarro y Navarro, 2003).

### 2.2.2 Fósforo inorgánico

El P inorgánico es casi siempre predominante con respecto al orgánico salvo en los suelos con altos contenidos de materia orgánica. Pueden clasificarse en dos grandes grupos: los que contienen hierro y aluminio y los que contienen calcio, éstos últimos son los de mayor importancia agronómica como el fosfato monocálcico  $(\text{PO}_4\text{H}_2)_2\text{Ca}\cdot\text{H}_2\text{O}$ , fosfato bicálcico  $\text{PO}_4\text{H}\text{Ca}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y fosfato tricálcico  $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$  (Navarro y Navarro, 2003).

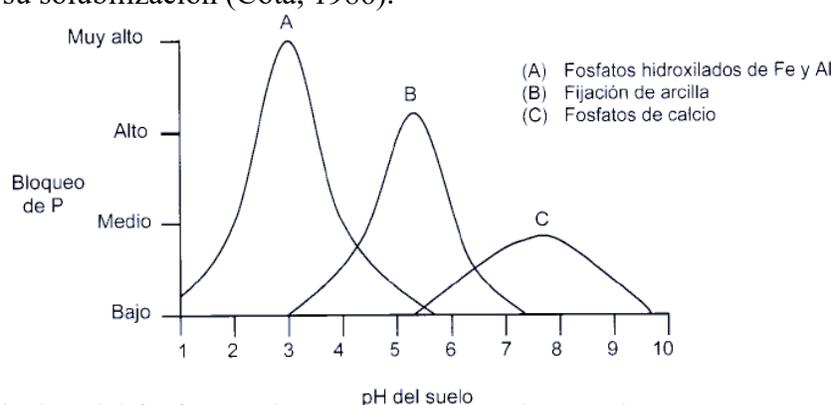
### 2.2.3 Mecanismos de disposición de fósforo en suelos

La principal característica del P en el suelo es su baja disponibilidad, puesto que, el P soluble se encuentra en el rango de 1 ppm o menos, ello limita el crecimiento y desarrollo de las plantas, lo cual ocasiona una mayor aplicación de fertilizantes fosfatados. Sin embargo, una alta proporción de los aniones fosfato en los fertilizantes sintéticos se unen en complejos insolubles, de manera que la eficiencia de asimilación de las plantas del P aplicado por fertilizantes va del 5% al 25% (Yin et. al., 2015).

Dadas estas condiciones, a continuación, se explican los principales mecanismos de disposición de fosfatos, donde se toma en cuenta la influencia que tienen factores como el pH, los microorganismos de la rizosfera, los ácidos orgánicos y las enzimas. No obstante, el mecanismo de disponibilidad de P aún es ampliamente estudiado y los factores mencionados anteriormente no son los únicos que existen, ejemplo de ello son los procesos como la asimilación de amonio, la cual provoca la liberación de protones que acidifican la rizosfera y por ende solubilizan P. En algunas investigaciones también se asocia a la acidificación con la presencia de CO<sub>2</sub> generado durante la respiración de tanto raíces como microorganismos (Pradhan y Sukla, 2005; Serna et. al., 2017; Scervino, 2010).

### 2.2.3.1 Influencia del pH

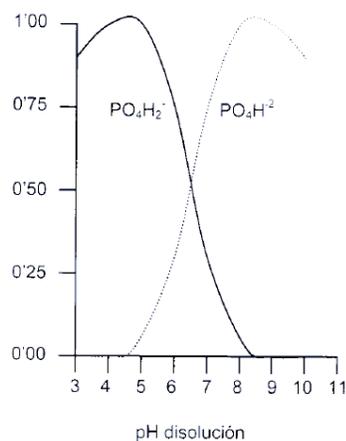
El pH es uno de los principales factores que controlan la asimilación del P, la solubilidad de los fosfatos de Ca, Al y Fe se asemejan en suelos donde el pH va de 6 a 7, además de que en suelos ácidos con pH menor a 6.5 el Fe y Al son asimilables, provocando la precipitación del P y convirtiéndose en fosfatos insolubles. En suelos salinos a pH mayores a 7.5 el P precipita, debido al calcio, mientras tanto, el exceso de sales sódicas en pH por encima de 8.5 contribuye a su solubilización (Cota, 1986).



**Figura 4** Fijación del fósforo en los suelos de acuerdo con el pH (Navarro y Navarro, 2003)

Tal como lo muestra la Figura 4, a pH entre 6.5 y 7 el fósforo se encuentra en su máxima capacidad de asimilación y disponibilidad para los cultivos, ya que la precipitación cálcica es mínima (curva C). Así mismo, se puede observar que en las partes mínimas de la curva de fijación de las arcillas (B), en los valores de pH de 3.5 y 7 existe una mínima adsorción por las arcillas del suelo manteniendo al P en las formas utilizables y de fácil intercambio.

Existen tres formas de ortofosfatos  $\text{PO}_4\text{H}_2^-$ ,  $\text{PO}_2\text{H}^{-2}$  y  $\text{PO}_4^{-3}$  ésta última es la forma monovalente y es la más asimilable para las plantas y como se indica en la Figura 5, domina cuando el pH es menor a 7, su concentración máxima se encuentra a pH de 4 y su concentración mínima es a pH de 9. Por el contrario, el fosfato en forma divalente ( $\text{PO}_2\text{H}^{-2}$ ) alcanza su máxima concentración a pH de 9, y los dos iones se encuentran en equilibrio a pH de 7.



**Figura 5** Concentración de ortofosfatos de acuerdo con el pH (Navarro y Navarro, 2003)

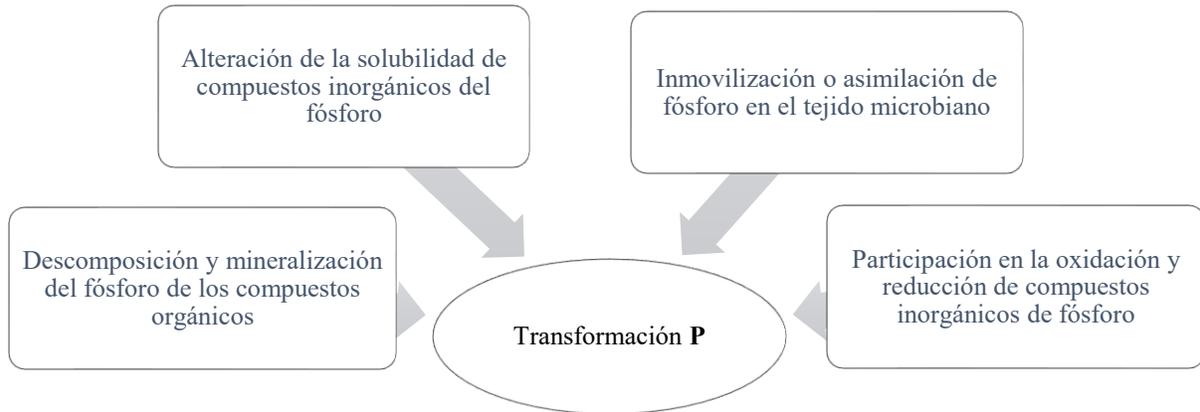
### 2.2.3.2 Influencia de los Microorganismos

La solubilización de P está mediada por microorganismos heterotróficos asociados con las raíces, debido a sus requerimientos de carbono y nitrógeno (Scervino et. al., 2011). Hasta cierto punto los microorganismos podrían considerarse como competidores del fósforo para las plantas, no obstante, la disponibilidad del fósforo inorgánico es altamente influenciada por los microorganismos. En el suelo, la eficiencia de los organismos para usar P es muy baja porque el P aplicado como fertilizante está fijado por aluminio o hierro en suelos ácidos y por calcio en suelos alcalinos. Como se planteó en el punto 2.1.3 del presente trabajo, algunos autores contemplan la teoría del desprendimiento de dióxido de carbono durante los procesos metabólicos de los microorganismos, que en presencia de agua forman ácido carbónico, el cual disuelve poco a poco al fosfato insoluble, es así como los iones fosfato liberados, pueden ser absorbidos por los microorganismos, ó plantas del suelo. La contribución atribuida a los microorganismos se observa en la Figura 6.

Cota en 1986, mencionó otras formas en las que el fósforo puede transformarse por acción de microorganismos, por dos procesos:

- La transformación de los metafosfatos en ortofosfatos
- La reducción de fosfatos a fosfitos, hipofosfitos y fosfuros

La transformación del fósforo a formas asimilables partir de la actividad microbiana son:



**Figura 6** Contribución los microorganismos del suelo en la asimilación de P (modificado de Cota, 1986)

Existen diversos estudios enfocados a los MSP, en los cuales se menciona que los hongos solubilizadores de fósforo (HSF) tienen una capacidad diez veces mayor para secretar ácidos orgánicos que las bacterias, por lo tanto, los HSF se consideran candidatos principales en el grupo de MSP (Li et. al., 2016). Se ha observado que los HSP disuelven el P inorgánico debido a los ácidos orgánicos producidos que, en algunos casos, causan una disminución del pH. Entre estos organismos se encuentran especies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* y *Eupenicillium*, que se consideran "organismos clave" en el ciclo del P. La mayoría de ellos solubilizan fosfatos de calcio inorgánicos y tienen una capacidad limitada de solubilizar fosfatos de aluminio o hierro (Scervino et. al., 2011).

Las principales investigaciones sobre solubilización de fósforo se han enfocado en los microorganismos mostrados en la Tabla 3, en la cual se puede observar la predominancia de las especies bacterianas sobre el estudio de hongos.

**Tabla 3.** Microorganismos solubilizadores de fósforo (MSP)

<b>Hongos</b>	<i>Glomus fasciculatum</i> , <i>Glomus geosporum</i> , <i>Glomus mosseae</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Penicillium oxalicum</i>
<b>Bacterias</b>	<i>Bacillus sp.</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>Rhizobium sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P.</i> <i>pseudoalcaligenes</i> , <i>P. putida</i> , <i>Acinetobacter haemolyticus</i> , <i>Agrobacterium sp.</i> , <i>Azospirillum brasilense</i> , <i>Azotobacter chroococcum</i> ; <i>Burkholderia sp.</i> , <i>B. cepacia</i> , <i>B.</i> <i>unamae</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Enterobacter sp.</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>Herbaspirillum sp.</i> , <i>Klebsiella sp.</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Micrococcus sp.</i> , <i>Oceanobacillus picturae</i> , <i>Ochrobactrum haematophilum</i> , <i>Phosphobacterium sp.</i> , <i>Rhodospseudomonas sp.</i> , <i>Serratia sp.</i>

(Realizado a partir de Restrepo et. al., 2017)

### 2.2.3.3 Influencia de ácidos orgánicos

El origen de los ácidos orgánicos se considera por la descomposición microbiana de diversos materiales vegetales y participan en muchos procesos biológicos, puesto que son intermedios en los ciclos metabólicos, catabolismo y anabolismo de aminoácidos y se acumulan y consumen conjuntamente con varios procesos de respiración microbiana, también forman parte importante de las secreciones de plantas (Xiao y Wu, 2014). En el caso de los ácidos orgánicos fúngicos, estos se obtienen a partir de la fermentación de azúcar simple o compleja (Gaid, 2017).

En la rizósfera, los ácidos orgánicos juegan un papel muy importante en la movilización de nutrientes y la protección contra la toxicidad del Al, además, pueden aumentar la tasa de meteorización de los minerales primarios. También se ha planteado la hipótesis de que desempeñan un papel clave en los procesos de formación de suelo a largo plazo e interfieren con la migración y la transformación e incluso la biodisponibilidad de metales y contaminantes en el suelo a través de diferentes mecanismos (Xiao y Wu, 2014).

El mecanismo más importante en la solubilización de P es la secreción de ácidos orgánicos sintetizados por los microorganismos solubilizadores de fosfato. Restrepo y colaboradores en 2017, retoman la existencia dos mecanismos reportados en diversas investigaciones, para la solubilización del fósforo inorgánico:

- El intercambio del ácido: por ejemplo, los H<sup>+</sup> provenientes del citrato se intercambian por el P ligado a la superficie de los cristales del Al (OH)<sub>3</sub> o Fe (OH)<sub>3</sub>, reduciendo y liberando el fósforo.

- La concentración de los ácidos orgánicos producidos por los microorganismos, a través de sus grupos hidroxil y carboxil quelan los cationes unidos al fosfato y los hacen solubles.

Autores (Cota, 1986; Gaiñd, 2017; Liao et. al., 2018; Ñustes y Acevedo 2005; Restrepo et. al., 2017; Yin et. al., 2005) confirman que la solubilidad de los compuestos inorgánicos del fósforo se debe a la producción microbiana de ácidos orgánicos como producto final de la hidrólisis celulósica de muchos microorganismos, de entre ellos, hongos del suelo que pueden producir ácido láctico, glicólico, cítrico, fórmico, acético, propiónico, fumárico y succínico los cuales acidifican los alrededores del suelo y pueden solubilizar el P de complejos minerales insolubles como: compuestos como fosfato tricálcico, rocas fosfóricas, apatita sintética y apatitas naturales. Dentro de las atribuciones de los ácidos orgánicos es su capacidad quelante que puede acomplejar calcio, cobre, níquel, manganeso, hierro y aluminio de las sales fosfatadas y con ello llevar a cabo la solubilización del fósforo.

La capacidad de secreción de ácidos orgánicos está determinada por los genes, pero también puede verse afectada por las condiciones ambientales. Por ejemplo, el carbono y el nitrógeno podrían afectar los tipos de ácidos orgánicos y la solubilización de fosfatos. Un alto C / P aumentará la producción de ácidos orgánicos, y varias relaciones C / N y N / P afectan el crecimiento de microbios (Li et. al., 2016). De acuerdo con diversos autores la concentración y el tipo de ácidos orgánicos producidos, están altamente influenciadas por las fuentes de P y N en el medio, igualmente se han evaluado su producción ante azúcares como fuentes de carbono como glucosa, galactosa, maltosa y sacarosa; todos estos factores intervienen a su vez en la solubilización de P (Scervino et. al., 2011; Coutinho, et. al., 2012; Jacoby et.al., 2017; Tahir et. al., 2013).

#### **2.2.3.4 Influencia de las enzimas**

La solubilización del fósforo orgánico es posible mediante la acción de enzimas hidrolíticas extracelulares, que permiten la reducción de macromoléculas a oligómeros y monómeros, estas enzimas son capaces de liberar fósforo orgánico y se clasifican en: fosfomonoesterasas o fosfatasa, fitasa y por ultimo las fosfonatasas y liasas. Las primeras son las de mayor actividad en los suelos y son las que efectúan la defosforilación de los enlaces fosfoéster o fosfoanhidridos presentes en la materia orgánica; las fitasas liberan el fósforo del ácido fítico,

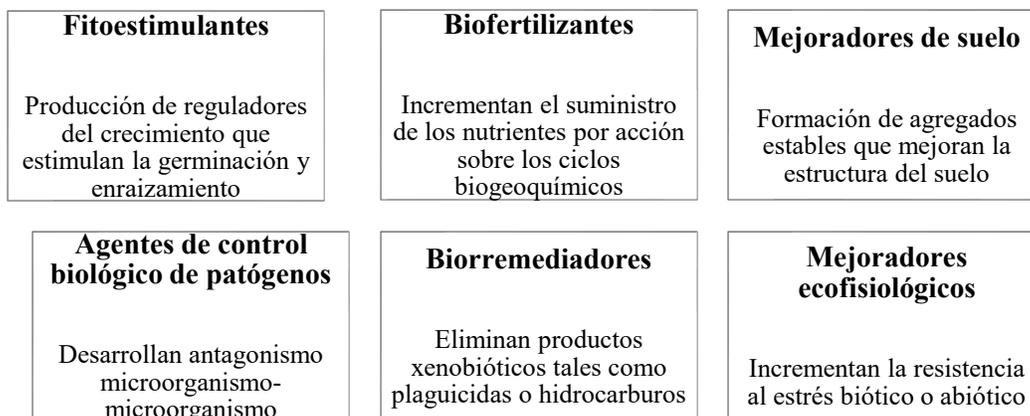
y las fosfonatasas son enzimas que llevan a cabo la ruptura del enlace C-P presente en fosfonatos orgánicos (Restrepo et. al., 2017).

## 2.4 Biofertilizantes

La fertilización ha cubierto la necesidad de optimizar el rendimiento de los cultivos, no obstante, el alto costo aunado con la aplicación desmedida resulta en la baja rentabilidad y el daño ambiental, haciendo menos viable su uso, Jacoby y colaboradores (2017) le atribuyen las alteraciones a los ciclos biogeoquímicos, la degradación del suelo, la eutrofización de las vías fluviales y las emisiones de gases de efecto invernadero. Cerca de un 20% a un 40% de los fertilizantes aplicados al suelo son absorbidos por las plantas, de ahí que los biofertilizantes son una opción viable para la sustitución total o parcial de la aplicación de fertilizantes inorgánicos (Grageda et.al., 2012). Los biofertilizantes son aquellas sustancias que contienen microorganismos vivos, no patógenos, que al ser inoculados en plantas, semillas o suelo son capaces de vivir asociados o en simbiosis con la rizosfera o en el interior de las raíces, lo cual favorece la nutrición y rendimiento de los cultivos, promoviendo el crecimiento de las plantas (Aguirre et. al., 2012; Grageda et. al., 2012; Restrepo et. al., 2017).

### 2.4.1 Clasificación de biofertilizantes

Existe una distinción entre los biofertilizantes que contienen microorganismos y los productos orgánicos como; el estiércol, residuos de cosechas, composta y vermicomposta que al ser incorporados al suelo favorecen su nutrición, pero son reconocidos como fertilizantes orgánicos (Aguado, 2012). Es común que se maneje una clasificación que corresponde a la función de los biofertilizantes, como se muestra en la Figura 7.



**Figura 7** Clasificación de los biofertilizantes de acuerdo con su función

De igual modo existen muchos otros beneficios en la utilización de los biofertilizantes, como el aumento de la capacidad de las plantas para absorber agua y nutrientes, la reducción de fertilización química, aumento del crecimiento de las plántulas, incremento del enraizamiento de esquejes, aumento del vigor de las plántulas, biocontrol de fitopatógenos, reducción de los tiempos de cosecha y extensión de los tiempos de producción, incremento del rendimiento de los cultivos, aumento de la calidad de los frutos, reducción de la contaminación ambiental, biorremediación de suelos contaminados por derivados del petróleo y metales pesados, así como la degradación de contaminantes orgánicos como plaguicidas y bifenilos policlorados (Grageda et. al., 2012).

Entre los biofertilizantes que incrementan la disponibilidad de nutrientes, se encuentran los que contienen microorganismos solubilizadores de fósforo (MSP), que como se ha tratado a lo largo del presente trabajo, la situación de indisponibilidad de fósforo requiere la implementación de técnicas que dispongan a las plantas de este macronutriente, siendo los MSP, alternativas prometedoras.

### **2.5 Potencial del género *Penicillium* sp como biofertilizante**

El género *Penicillium* forma parte de los hongos que de forma natural se encuentran en muchos suelos, Scervino y colaboradores (2011), resaltan su dominancia como hongos involucrados en el ciclo del P, las dos anteriores resultan importantes en el presente trabajo puesto que la adición de hongos endémicos podría aumentar las posibilidades de que éstos se adapten a las condiciones del suelo en cuestión y también que se favorezca su actividad solubilizadora y con ello su función como biofertilizante.

Las especies de *Penicillium* han sido de interés en la solubilización de P en sistemas de fermentación o para ser inoculados directamente en el suelo. Dentro de las ventajas de estos hongos se encuentra la tolerancia a altas concentraciones de metales pesados y mayor tolerancia a la acidez o alcalinidad, con respecto a las bacterias. Las especies de *Penicillium* que solubilizan P, también pueden tolerar concentraciones de sal de hasta el 20% (Flores et. al., 2014). Existen investigaciones previas que evalúan la capacidad de solubilización del P por especies de *Penicillium*, ejemplo de ello es *Penicillium radicum* que libera ácido glucónico, responsable de la quelación de  $Al^{+3}$  lo cual resulta determinante para la

solubilización del fosfato de aluminio coloidal (Whitelaw et. al., 1999). En cuanto a *P. oxalicum* aislado de suelos calcáreos, solubilizó 1862.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$  de P, comparado con 1413  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de *Aspergillus niger* y *P. bilaii*, como control positivo que después de 13 días solubilizó 1797 $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Yin et. al., 2015). En el caso de *Penicillium janthinellum* aislado de la rizósfera de arroz y producido como biofertilizante concentrado líquido para uso agrícola, se obtuvieron resultados positivos tales como: mayor desarrollo radicular y aéreo, mayor sanidad en el cultivo y aumento de la producción hasta en 38% (Ñustes y Acevedo 2005). Existe evidencia que demuestra que el tipo y la concentración de ácidos orgánicos producidos por cada especie de *Penicillium* varían según la fuente de P, C, o N disponible, en la Tabla 4 se observa la variedad de especies estudiadas en la producción de ácidos orgánicos.

En 1987 Mert y Ekmekci evaluaron la tolerancia de salinidad provocada por NaCl en cepas de *Penicillium chrysogenum* extraídas de la rizósfera, los resultados mostraron que la cepa se inhibe el crecimiento vegetativo, pero por el contrario aumentó un 173% el crecimiento reproductivo con respecto al control, en medios salinos con CE de 12.5. También se presentó un incremento en el contenido de ácidos orgánicos con respecto a la comparación entre la cepa *Aspergillus flavus*, relacionándolo con el crecimiento reproductivo.

**Tabla 4.** Producción de ácidos orgánicos por especies de *Penicillium* solubilizadoras de fosfato

Microorganismo	Ácidos orgánicos predominantes
<i>Penicillium canescens</i>	Oxálico, cítrico, glucónico, succínico
<i>Penicillium rugulosum</i>	Glucónico
<i>Penicillium radicum</i>	Glucónico
<i>Penicillium variable</i>	Glucónico
<i>Penicillium bilaji</i>	Cítrico, oxálico
<i>Penicillium implicissimum</i>	Cítrico
<i>Penicillium digitatum</i>	Succínico, cítrico, tartárico
<i>Penicillium purpurogenum</i>	Glucónico, cítrico, fumárico
<i>Penicillium ochrochloron</i>	Cítrico, málico, glucónico
<i>Penicillium oxalicum</i>	Cítrico, fórmico, láctico, málico y succínico
<i>Penicillium purpurogenum</i>	Glucónico, Valérico, Cítrico
<i>Penicillium janthinellum</i>	Glucorónico, Fumárico

(Realizado a partir de Flores et. al., 2014; Scervino et. al., 2011; Scervino et. al., 2010; Serna et. al., 2017; Yin et. al., 2015)

## 2.6 Antecedentes de cáscara de naranja y su interacción con *Penicillium sp.*

La cáscara de naranja es de los principales desechos sólidos de la industria de procesamiento de frutas, puesto que los residuos son de hasta el 50% de la biomasa del fruto. La degradación efectiva de la cáscara fresca es una preocupación, puesto que, aunque comúnmente el residuo se seca para la extracción de la pectina o se granula para la alimentación animal, el alto costo de secado, la baja concentración de proteína y la alta fermentación hace que este desperdicio sea menos viable para tales aplicaciones (Gaind, 2017). La caracterización de la cáscara de naranja se presenta en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Composición de cáscara de naranja (Gaind, 2017)

Parámetros	Cáscara de naranja
pH	4.92 ± 0.12
Humedad %	81.60 ± 1.80
MO %	95.20 ± 2.30
TOC %	49.03 ± 1.02
N Total %	1.60 ± 0.30
P Total %	0.10 ± 0.01
K Total %	0.75 ± 0.02
Celulosa %	12.70 ± 0.90
Hemicelulosa %	5.30 ± 0.45
Lignina %	0.20 ± 0.01

TOC= Carbono Orgánico Total

Costa y colaboradores (2019) señalan como principales patógenos a *P. italicum* y *P. digitatum*, mientras que Gaind (2017) señala a *P. expansum*, como la segunda causa de daño de cítricos, denominado moho azul. Con lo anterior *Penicillium* es la principal fuente de contaminación en etapa de postcosecha de cítricos, debido a que causa la enfermedad del moho verde en el 80% del total de la descomposición de frutas, las esporas se encuentran presentes en la atmósfera de los cultivos y la infección en la cáscara de cítricos contiene muchos compuestos bioactivos que estimulan el crecimiento de *Penicillium*, como los volátiles principales en la cáscara de varios cultivares de cítricos son limoneno, mirceno,  $\alpha$ -pineno y  $\beta$ -pineno, los dos primeros estimulan el alargamiento del tubo germinal de *Penicillium italicum* (Veljović et. al., 2017). Vilanova y colaboradores (2014) resaltan que estas especies pertenecen a la clasificación de hongos acidificantes por su capacidad de modificar el pH.

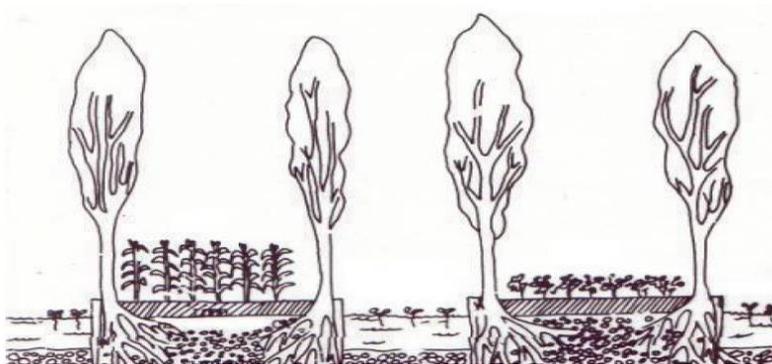
Durante la colonización del tejido de cáscara de cítricos infectado, se acidifica debido a la acumulación de ácidos orgánicos (principalmente ácido cítrico y glucónico); modulando así el pH en el tejido colonizado, los patógenos acercan las condiciones ambientales al óptimo, para la producción de enzimas hidrolíticas y metabolitos secundarios, asegurando un pH óptimo, para realizar plenamente las funciones fisiológicas y mejorando así su virulencia (Zhang et. al., 2013; Vilanova, et. al., 2014).

Existe una estrecha relación entre el pH y la patogenicidad de *Penicillium*, por ello, el pH es una señal crítica para indicar la virulencia en hongos patógenos de plantas.

## 2.7 Contexto de la zona de estudio

Xochimilco es un territorio lacustre del sur de la ciudad que aloja un complejo ecosistema cultural y medio ambiental, donde aún persiste una agricultura ancestral lacustre de origen prehispánico (Delgadillo, 2009). El sistema agrícola chinampero representa la base de la Declaratoria como Patrimonio Cultural de la Humanidad otorgada por la UNESCO en el año de 1987, a una zona de 7 534 ha localizada en las delegaciones de Xochimilco, Tláhuac y Milpa Alta de la Ciudad de México (González et. al., 2016).

El término chinampa deriva de la palabra náhuatl “chinamitl”, que significa un área encerrada por un seto o bastones, el término es utilizado para designar tierras agrícolas en un ambiente de humedal, en el que las parcelas se elevan por encima del nivel del agua y están rodeadas de canales (Figura 8). La construcción de suelos artificiales, es decir los campos elevados son conocidos por su alta productividad y sostenibilidad, incluso bajo cultivos intensivos y continuos, puesto que el suelo de la profundidad de los canales se usa como fertilizante (Morehart 2012; Krasilnikov et. al., 2011).



**Figura 8** Diagrama de una chinampa

Moncada (1982), plantea la posibilidad de que las chinampas hayan sido planeadas y construidas por el pueblo teotihuacano, que por el desarrollo que alcanzó parece ser el único capaz de desarrollar una agricultura intensiva en esa época. Las chinampas se hicieron por acumulación de materia orgánica, sedimentos lacustres francos o cualquier material que sirviera para consolidar las islas, separados por un sistema de canales, que servían para la comunicación y el drenaje, la superficie del suelo está aproximadamente a un metro sobre el nivel del agua (Krasilnikov et. al., 2011; Ramos 2006).

### **2.7.1 Problemática ambiental en la zona de estudio**

A medida que la ciudad ha crecido el Valle se ha desecado. La mayoría de los manantiales que antes alimentaban el Lago de Chalco-Xochimilco han sido entubados con un enorme ducto que lleva el agua a la ciudad, dejando a las chinampas demasiado altas y secas. Actualmente la práctica de nivelación de chinampas ya no se sigue y se trata de utilizar lo menos posible abono verde, incrementando el uso inmoderado de fertilizantes químicos, todo lo cual ha repercutido el desequilibrio del ecosistema. La utilización de lirio acuático y su alta proliferación en los canales lo convierte en una plaga e impide el acceso a las chinampas más alejadas de los embarcaderos, las chinampas de bajo nivel se inundan frecuentemente en la época de lluvias, con la consecuente pérdida del cultivo (Ramos, 2006).

Predomina la pérdida de las actividades rurales sobre las actividades turísticas, recreativas y urbanas; lo cual empeoró en la década de 1950, cuando los canales de agua se comenzaron a llenar con agua reciclada, para destinar toda el agua de los manantiales para el consumo de la ciudad, con lo cual, las actividades agrícolas perdieron productividad. El impacto de la urbanización no es sólo físico: en el año 2005 sólo el 3% de la población se dedicaba a la agricultura, el 95% de las chinampas del centro de Xochimilco estaban abandonadas y varias chinampas improductivas habían sucumbido al mercado inmobiliario irregular (Delgadillo, 2009).

En la región chinampera de Xochimilco y Tláhuac, se presenta un deterioro ambiental severo. Las chinampas están en peligro de desaparecer, debido al crecimiento urbano, a la sobreexplotación de los mantos acuíferos y a la contaminación por sales, sodio y metales pesados contenidos en las aguas que provienen de una planta tratadora de agua (Ramos et. al., 2001).

### 2.7.2 Problemática Agrícola en la Zona de Estudio

Hasta el 2018 la delegación de Xochimilco en la CDMX ocupó el 4° lugar en la producción ocupando el 9.9% de la superficie sembrada de la ciudad, con 1680 ha. Sin embargo, en cuanto al valor de la producción Xochimilco ocupa el 2° lugar, al tener después de Milpa alta, el 27.5% del valor de la producción en la ciudad con 325 MDP (SIAP, 2018).

Del sistema el 17% de las chinampas se encuentran activas y el 83% son potenciales, es decir, actualmente no están cultivadas, pero son factibles de reactivarse. En términos de producción se orienta en un 64% a la siembra de hortalizas y el 36% restante al cultivo de flores, San Gregorio Atlapulco, el ejido de estudio para el presente trabajo tiene el 42.7% de esta producción con un predominio de hortalizas, siendo la zona con menor cantidad de chinampas abandonadas (Tabla 6), del centro al oriente el cultivo más empleado son distintas variedades de lechuga, mientras que del centro hacia el poniente hay mayoría de cultivos de verdolaga (González et. al., 2016).

Los suelos en la zona presentan condiciones favorables para la agricultura, puesto que se caracterizan por un alto rendimiento en la producción de una gran variedad de especies hortícolas y florícolas, pero su principal limitación es su elevada salinidad y alcalinidad. La desecación de gran parte del lago de Xochimilco y la acumulación de sales han afectado la agricultura chinampera (Ramos et. al., 2001). Aunado a que el agua de riego son aguas residuales que contienen una alta concentración de sales, metales tóxicos y organismos patógenos, que afectan el suelo, la fauna y la flora (Krasilnikov et. al., 2011).

**Tabla 6.** Estado del sistema chinampero (González et. al., 2016)

Zonas Chinamperas	Superficie		Cantidad de Chinampas		
	Ha	%	Activas	Abandonadas	Totales
<b>Xochimilco</b>	1 059	47	864	15 000	15 864
<b>San Gregorio Atlapulco</b>	484	22	1 530	530	2 060
<b>San Luis Tlaxialtemalco</b>	103	18	430	170	600
<b>San Pedro Tláhuac</b>	165	8	474	666	1 140
<b>San Andrés Mixquic</b>	404	5	288	970	1 258
<b>Total</b>	<b>2 215</b>	<b>100</b>	<b>3586</b>	<b>17 336</b>	<b>20 922</b>

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1- Localización del área experimental.**

En el presente trabajo se presentan las pruebas de remediación de suelo bajo condiciones de invernadero realizadas en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, en el cual se utilizó suelo salino perteneciente a una parcela con una superficie de 130 m<sup>2</sup>, del ejido de San Gregorio Atlapulco en la Alcaldía de Xochimilco, Ciudad de México, con coordenadas 19°15'37.7"N y 99°04'06.3"W.

#### **3.2- Métodos**

A lo largo del presente trabajo se llevó a cabo el seguimiento en la salinidad y solubilización de fósforo en un suelo salino chinampero a partir de la bioaumentación fúngica al suelo en el soporte sólido proveniente de residuos agrícolas, en este caso, la cáscara de naranja dulce (*Citrus sinensis*), con crecimiento de al menos tres cepas de hongos; la cual fue aplicada al suelo mediante tratamientos que constituyeron el inóculo con las condiciones ambientales que influyen en él. El inóculo se aplicó al suelo para disminuir los niveles de salinidad, medidos como conductividad eléctrica (CE) y el aumento de la solubilización de fósforo, así como el análisis en la modificación de la dinámica de los nutrientes presentes en el suelo antes y después de los tratamientos.

Mediante bioensayos fue evaluada la fitotoxicidad en plántulas de lechuga a partir de la aplicación de diferentes cantidades de la cáscara de naranja, tiempos e intervalos de aplicación; de forma complementaria se estudió la eficiencia fisiológica y dinámica de crecimiento de la lechuga a partir de la aplicación de los tratamientos.

Con el fin de analizar los mecanismos por los cuales el inóculo fúngico utilizado modifica la conductividad eléctrica y la disposición de fósforo, se llevó a cabo la identificación molecular de los hongos crecidos en la cáscara de naranja, mismos que forman parte de la técnica de bioaumentación al suelo. Una vez aislados e identificados, se determinó su capacidad para producir ácidos orgánicos.

### **3.2.1 Caracterización del suelo de estudio**

La caracterización física y química del suelo salino utilizado en la presente tesis fue determinada conforme a los parámetros de la NOM-021-RECNAT. Se llevó a cabo la medición de metales al inicio y al final de los tratamientos de remediación, por medio de espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), y a modo de referencia se analizó, el contenido de plaguicidas en el suelo por medio de cromatografía de gases.

### **3.2.2 Aislamiento del inóculo fúngico de cáscara de naranja**

Durante el presente trabajo, el inóculo fúngico utilizado para la bioaumentación en suelo consistió en tres cepas de hongos inicialmente desconocidas, crecidos en cáscara de naranja que utilizan naturalmente como sustrato después de haber sido sometida a condiciones específicas protegidas por la modificación a la patente 291975.

A los seis días del inicio de inoculación de la cáscara de naranja se realizó el aislamiento de las cepas que consistió en colocar 1 g de cáscara de naranja inoculada en 9 ml de solución salina al 0.85 %, de la cual se realizaron diluciones hasta obtener cultivos monospóricos, las diluciones pasaron por un Vortex por 30 segundos, de cada solución se tomaron 10  $\mu$ L que fueron sembrados en placas con medio de cultivo rosa de bengala, este medio funcionó como medio selectivo para distinguir el crecimiento de bacterias y levaduras, por otro lado los hongos fueron aislados en placas con medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA), hasta lograr la diferenciación macroscópica de las cepas fúngicas.

#### **3.2.2.1 Caracterización de cultivo fúngico**

Posterior al aislamiento del inóculo, se realizó la caracterización macroscópica a través de la diferenciación de los patrones de crecimiento de las colonias en el medio de cultivo sólido utilizado agar papa dextrosa (PDA); así como la caracterización microscópica para la cual se realizó un microcultivo para observar el micelio de cada especie aislada. Para cada una de las cepas se colocó un cuadro de 1 cm<sup>2</sup> de PDA en un portaobjetos contenido en una caja de Petri, en el agar se sembró el hongo en el centro y en los bordes del cuadro colocando en un cubreobjetos cerrando la caja Petri para incubarla durante tres días, momento en el cual se

tomó el cubreobjetos y observado en el microscopio óptico con tinciones de safranina y azul de metileno, utilizando el objetivo de 40x.

Una vez caracterizados los hongos de forma general, se seleccionaron los de mayor dominancia de crecimiento fúngico de la cáscara de naranja para su identificación en lo particular, para lo cual se realizó un análisis molecular a partir de la secuencia del fragmento 16S-ITS1-5.8S-ITS2-26S ribosomal para los hongos seleccionados.

La realización de la identificación molecular fue a partir de la siembra de las cepas, manteniéndolas por 48 horas a una temperatura de 28°C, de las cuales se tomaron 500 mg de biomasa para la extracción de ADN, por medio del kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep. La cantidad de ADN obtenida se calculó a partir de espectrofotómetro Epoch (BioTech). El fragmento 16S-ITS1-5.8S-ITS2-26S se amplificó usando los oligonucleótidos ITS5 y ITS4 de acuerdo con las condiciones previamente descritas por White (1990), a partir del ADN total obtenido. Se utilizó un gel de agarosa al 1% para comprobar el tamaño del fragmento esperado (500-800 nt) por 15 minutos a 100V.

### **3.2.3 Determinación de producción de ácidos orgánicos**

Con respecto a las características bioquímicas del inóculo fúngico utilizado, se evaluó el pH de la cáscara de naranja a lo largo del proceso de colonización, cada 24 horas durante 6 días. Para cada día de muestreo se tomó una muestra de 10 g de cáscara de naranja en proceso de inoculación, se colocó en 100 mL de agua desionizada, los cuales fueron molidos y filtrados con papel filtro de poro medio, al extracto obtenido se determinó el pH, mediante un potenciómetro de la marca Hanna, calibrado previamente.

Al día seis de colonización, se realizó la extracción de las muestras para realizar el análisis de ácidos orgánicos, dichas muestras consistieron en la extracción a partir de: cáscara de naranja sin inóculo (CN) y cáscara de naranja con inóculo (CNI), al analizarlos mediante cromatografía líquida de alta eficacia por detección de arreglo de diodos (HPLC).

Se realizó una extracción sólido-líquido, utilizando una solución de etanol puro con agua desionizada al 50%, por cada 20 mL de solución se agregaron 5 g de cáscara de naranja al cartucho de celulosa en el sistema Soxhlet, a una temperatura de 50° C durante 60 minutos. El segundo paso consistió en la extracción líquido-líquido en un rotavapor, a una temperatura de 40° C hasta la evaporación del disolvente. La muestra resultante fue filtrada a través de un cartucho Superclean LC-18 SPE, y posteriormente pasada por un filtro de nylon de 0.2 µm.

Finalmente se realizó una dilución 1:100 de la muestra, de la cual se inyectó 50 µl de ella al HPLC 3000 Dionex, Thermo Scientific, con detector UV a 210 nm y 50°C, utilizando una columna AMINEX HPX-87H 300 X 7.8 mm BIO-RAD, con una fase móvil de ácido sulfúrico al 0.05 M a un flujo de 0.6 ml min<sup>-1</sup>. Los picos en los cromatogramas fueron identificados a partir de un estándar (Acid Organic Standard, BIO-RAD) de los ácidos glucónico, oxálico, cítrico, tartárico, málico, succínico, fórmico y acético.

### **3.2.4 Monitoreo del pH**

#### **3.2.4.1 pH en cáscara de naranja**

El monitoreo de pH en la cáscara de naranja durante el tiempo de colonización se realizó cada 24 horas durante 7 días. Cada día se tomó una muestra de la cáscara de naranja de forma aleatoria de la solución patrón que se encontraba bajo condiciones ideales para ser inoculada por el cultivo fúngico. Los tratamientos realizados por triplicado, para ello se pesaron 30 gramos de cáscara de naranja con diámetro de 0.5 cm. Cada muestra fue molida durante 1 minuto con 300 mL de agua desionizada, el resultado de la molienda fue filtrado con papel de poro medio, la fase líquida fue monitoreada a través de un potenciómetro marca Hanna, del cual se obtuvieron los valores de pH de la muestra, con esos resultados fue posible dar seguimiento diario a la disminución de pH durante el proceso de inoculación con las especies fúngicas.

### **3.2.5 Optimización del sistema de biorremediación de suelo**

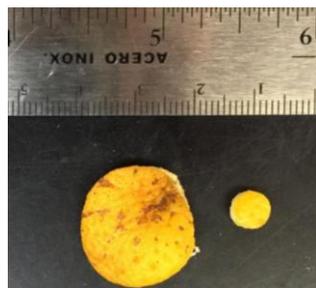
Durante esta etapa se evaluaron los factores que podrían interactuar entre ellos e interferir sobre la eficiencia en la técnica de remediación por bioaumentación, los factores estadísticamente significativos para la disminución de la conductividad eléctrica en el suelo de estudio fueron contemplados para la instalación de bioensayos posteriores.

Los tratamientos por evaluar para la selección de las condiciones de biorremediación consistieron en dos niveles para los factores: relación fuente de carbono y residuo de naranja, tiempo de colonización, humedad de suelo, tamaño de soporte (cáscara de naranja) y tipo de fuente de carbono.

**Tabla 7** Variables independientes: Tratamientos y niveles.

Tratamientos	Nivel Bajo (-)	Nivel Alto (+)
<b>Relación fuente de carbono y soporte</b>	1:1	1:2
<b>Tiempo de Colonización (Días)</b>	0	6
<b>Humedad (%)</b>	65	90
<b>Tamaño de soporte en cm (Cáscara de naranja)</b>	0.5	2
<b>Fuente de carbono (Rastrojo)</b>	Avena	Maíz

Los niveles de los factores evaluados corresponden a dos tiempos de colonización: 0 y 6 días; dos tamaños de soporte: 0.5 cm y 2 cm (Figura 9); dos niveles de humedad en suelo: 65% y 90%; fuentes de carbono: rastrojo de avena y maíz; con respecto a la proporción de soporte y fuente de carbono: 1:1 y 1:2. Tales tratamientos pueden observarse en la Tabla 8.



**Figura 9** Tamaños de soporte a partir de residuos de cáscara de naranja

### 3.2.5.1 Diseño Experimental

Se llevó a cabo un análisis factorial  $2^{5-2}$ , con tres réplicas para cada uno de los tratamientos, con un control negativo que consistió en aplicación de agua sin tratamiento. La matriz utilizada para el diseño factorial con variables y valores codificados se muestra en la Tabla 8.

**Tabla 8** Matriz de distribución de tratamientos de remediación

COLONIZACIÓN (DÍAS)		TAMAÑO SOPORTE (CM)		RELACIÓN CN/P	HUMEDAD (%)	FUENTE DE CARBONO
<b>T1</b>	-1 0	-1 0.5	+1 (1:1)	+1 90	+1 Maíz	
<b>T2</b>	-1 0	1 2.0	-1 (1:1)	+1 90	-1 Avena	
<b>T3</b>	1 6	1 2.0	+1 (1:2)	+1 90	+1 Maíz	
<b>T4</b>	<b>1 6</b>	-1 0.5	<b>-1 (1:2)</b>	-1 65	<b>+1 Maíz</b>	
<b>T5</b>	<b>-1 0</b>	-1 0.5	<b>+1 (1:1)</b>	-1 65	<b>-1 Avena</b>	
<b>T6</b>	1 6	1 2.0	+1 (1:2)	-1 65	-1 Avena	
<b>T7</b>	-1 0	1 2.0	-1 (1:1)	-1 65	+1 Maíz	
<b>T8</b>	1 6	-1 0.5	-1 (1:2)	+1 90	-1 Avena	

### 3.2.5.2 Variables de respuesta

Posterior a la etapa de bioaumentación fúngica se llevó a cabo la medición de pH, conductividad eléctrica, fósforo disponible para cada uno de los tratamientos del análisis factorial fraccionado. Una vez remediado el suelo, se instaló un bioensayo con plántulas de lechuga, de las cuales se evaluaron los parámetros fitométricos como altura de planta, peso seco, peso fresco, número de hojas y relación aérea y radicular.

### 3.2.6 Bioensayos bajo invernadero en el cultivo de lechuga

#### 3.2.6.1 Bioensayo a partir de suelo biorremediado

A partir de la remediación de los suelos bajo las condiciones y tratamientos establecidos en el punto 3.2.6, se tomaron muestras de estos suelos remediados con el fin de utilizarlos para sembrar lechuga y evaluar el efecto de las plantas crecidas en estos suelos previamente tratados, respetando los 8 tratamientos que fueron sometidos a las diferentes condiciones y agregando un control negativo, originando así 9 tratamientos.

Los suelos fueron colocados en almácigos con un acomodo aleatorio entre tratamientos, para cada uno de ellos se instalaron 10 unidades experimentales que constaron de 10 cavidades del almacigo, cada cavidad fue sembrada con 3 semillas de lechuga debido al porcentaje de germinación y de esa manera asegurar que en cada cavidad creciera una al menos una planta, a los diez días se retiró el excedente de plántulas para dejar el crecimiento de una por cavidad. Las semillas de lechuga crecieron bajo las condiciones ambientales de invernadero las cuales fueron monitoreadas y son enunciadas en el Anexo 2. El crecimiento de las plantas de lechuga se llevó hasta los 50 días después de la siembra, en ese momento fueron muestreados todos

los tratamientos. Para ello se extrajeron las plantas completas y se evaluaron las variables; longitud de hojas (aérea), longitud radicular, longitud total de la planta, así como el número de hojas, peso fresco y seco aéreo, así como el peso radicular y total de cada planta.

Las variables de longitud fueron medidas con una regla graduada, después de extraer las plantas del almácigo se mantuvieron en hielo para evitar su deshidratación y pérdida de peso, se limpió el excedente de suelo y en el caso de la longitud de toda la planta se midió desde la punta de la raíz más larga hasta el final de la última hoja. En el caso de la longitud radicular se midió desde la punta de la raíz más larga hasta el inicio de crecimiento de las hojas, a partir de este punto se midió la longitud aérea o también llamada la longitud de las hojas. El peso fresco fue medido en una balanza analítica, en la cual se pesaron las raíces y hojas por separado, así como la planta completa. Para obtener la biomasa del tejido vegetal o también llamado a lo largo del presente trabajo, peso seco, cada sección de la planta, raíces y hojas, fueron secadas por separado en una estufa durante 36 horas a 55° C, hasta obtener peso constante.

### 3.2.6.2 Fitotoxicidad: Límite máximo permisible.

Para definir la dosis óptima y con ello establecer el límite máximo permisible (LMP) de aplicación de naranja, en el cual las plantas de lechuga var. *italiana* puedan ser dañadas por las dosis probadas a 0.5%, 2%, 3% y 4% en peso seco con respecto a la cantidad de suelo a aplicar, los tratamientos fueron agregados con el mismo porcentaje de paja de maíz como fuente de carbono y los tratamientos se distribuyeron en dos bloques uno con naranja colonizada y otro con naranja sin colonizar. La aplicación fue al momento de la siembra de plántulas con cuatro días de haber sido germinadas en cajas Petrí para un crecimiento homogéneo. En el día 90 DDS se realizó el muestreo y se evaluó longitud de plántula, número de hojas, peso total de plántula, peso aéreo, longitud aérea de plántula, longitud radicular, biomasa aérea, biomasa total.

**Tabla 9** Dosis de aplicación de cáscara de naranja para LMP

<b>Tratamiento</b>	<b>Dosis de aplicación (%)</b>
<b>Control</b>	0.0
<b>T1</b>	0.5
<b>T2</b>	2.0
<b>T3</b>	3.0
<b>T4</b>	4.0

### 3.2.6.3 Fitotoxicidad: tiempo mínimo de siembra.

Se sembró lechuga *var. italiana* en suelo salino no tratado previamente, se instalaron dos bloques de tratamientos uno con aplicación de naranja inoculada y otro con naranja sin inóculo a una concentración de 1% en base seca con respecto a la cantidad de suelo a tratar, incluyendo 1% de paja de maíz como fuente de carbono, la aplicación fue realizada de forma escalonada después de la siembra (DDS), con una semana de diferencia entre cada aplicación durante cinco semanas, con el fin de observar el tiempo mínimo de siembra después de la aplicación de cáscara de naranja y con ello observar la tolerancia de las plántulas ante la aplicación del tratamiento. Los tratamientos descritos anteriormente pueden observarse en la Tabla 10.

El día 90 DDS se realizó la evaluación de las variables de respuesta fitométricas, tales como: longitud de plántula, número de hojas, peso total de plántula, peso aéreo, longitud aérea de plántula, longitud radicular, biomasa aérea, biomasa total y área foliar.

**Tabla 10** Tratamientos para la evaluación de fitotoxicidad en plántulas de lechuga

Tratamiento	Tiempo de aplicación <sup>1</sup>	Número de aplicación
Control	-	Siembra de semilla
T1	0	Siembra de semilla y primera aplicación
T2	7	Segunda aplicación
T3	14	Tercera aplicación
T4	21	Cuarta aplicación
T5	34	Quinta aplicación

<sup>1</sup>DDS

### 3.2.6.4 Eficiencia fisiológica y dinámica de crecimiento

Se llevó a cabo el monitoreo de índices de crecimiento de plántulas de lechuga *var. italiana* a lo largo de 100 días posteriores a la siembra, a partir del tratamiento en dos bloques, uno con aplicación de cáscara de naranja colonizada y otro de cáscara de naranja sin colonización. Misma que fue aplicada a una concentración del 1% en base seca con respecto a la cantidad de suelo, adicionando la misma proporción de paja de maíz como fuente de carbono.

Los tratamientos se realizaron al momento de la siembra de plántulas con crecimiento homogéneo, germinadas previamente en caja Petri con tres días previos. Se realizaron seis muestreos destructivos, con un intervalo de tiempo de quince días entre cada muestreo, el primer muestreo comenzó a los 21 DDS y el último de ellos concluyó el día 101 DDS, en

cada uno de ellos se realizó la medición de parámetros como longitud de plántula, número de hojas, peso total de planta, peso aéreo, longitud aérea de planta, longitud radicular, biomasa aérea, biomasa total y área foliar.

A partir de las variables de respuesta tomadas se calculó la tasa relativa de crecimiento (TRC), el índice de área foliar (IAF), la tasa de asimilación neta (TAN), el área foliar específica (AFE) y la relación de área foliar (RAF). Los índices anteriormente mencionados se obtuvieron a partir de las fórmulas presentes a continuación, donde  $W$  es la materia seca total en g;  $L_A$  es el área foliar;  $P$  es el área foliar por unidad de superficie de suelo en  $\text{cm}^2$ ;  $L_w$  es la materia seca foliar por planta en g;  $dW/dt$  es la variación de masa seca en función del tiempo.

(1)	...Tasa Relativa de Crecimiento	$\text{TRC} = \left(\frac{1}{W}\right) \left(\frac{dW}{dt}\right)$	$\text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$
(2)	Índice de Área Foliar	$\text{IAF} = \frac{L_A}{P}$	Adimensional
(3)	Área Foliar Específica	$\text{AFE} = \frac{L_A}{W}$	$\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$
(4)	Relación de Área Foliar	$\text{RAF} = \frac{L_A}{W}$	$\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$
(5)	Tasa de Asimilación Neta	$\text{TAN} = \left(\frac{1}{L_A}\right) \left(\frac{dW}{dt}\right)$	$\text{g cm}^{-2} \text{d}^{-1}$

La eficiencia fisiológica se estudió mediante los parámetros de crecimiento que se determinaron mediante el software MATLAB® y de acuerdo con el modelo matemático (7) que Carranza y colaboradores (2009), plantean para analizar el crecimiento de lechuga en un suelo salino, en tal modelo  $k > 0$  y  $0 < y < \alpha$ , usando  $k/\alpha$  como constante de proporcionalidad.

$$(7) \quad \frac{dy}{dt} = \frac{k}{\alpha} y (\alpha - y)$$

La curva de crecimiento (8) donde  $\alpha$  es la asíntota superior,  $y = \alpha$  cuando  $t \rightarrow \infty$ ;  $y = 0$  cuando  $x \rightarrow -\infty$  es la asíntota inferior;  $y$  es el tiempo en el que se alcanza la máxima tasa de crecimiento o punto de inflexión ( $W_m = k \alpha/4$ ), en tal punto  $y = \alpha/2$  y la función es la curva simétrica sigmoideal.

$$(8) \quad y = \frac{\alpha}{1 + e^{-k(t-y)}}$$

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Caracterización del suelo de estudio

Las condiciones físicas y químicas iniciales del suelo de estudio se enmarcan a continuación, se incluyen parámetros como la materia orgánica, pH, conductividad eléctrica, nitrógeno total, fósforo disponible, concentración total de nutrientes, criterios de salinidad, bases intercambiables y contaminantes como el contenido de plaguicidas y metales pesados.

En la Tabla 11, se presentan los parámetros de caracterización, los cuales indican que los niveles de nitrógeno y fósforo se encuentran por debajo de los óptimos, contrario así la materia orgánica que se encuentra en el rango muy alto, con un valor de 16.61% lo cual favorece la retención de nutrientes, que de otra forma podrían ser lixiviados (Bidwell, 1993) y confirman lo que Krasilnikov y colaboradores (2011) señalan sobre la predominancia de alto contenido de M.O. en las capas superficiales de suelos chinamperos, que es debida a su origen, pues a estos suelos le es integrado material orgánico del fondo de los canales.

**Tabla 11** Análisis químico de suelo de estudio

<b>Criterio</b>	<b>Valor Obtenido</b>	<b>Clasificación*</b>
<b>Materia Orgánica (%)</b>	16.61 ± 0.64	Muy alto
<b>Fósforo Disponible (mg kg<sup>-1</sup> suelo)</b>	0.32 ± 0.05	Bajo
<b>Fósforo Total (mg kg<sup>-1</sup> suelo)</b>	12.76 ± 1.52	NA
<b>Nitrógeno Total (mg kg<sup>-1</sup> suelo)</b>	0.29 ± 0.01	Muy bajo
<b>Nitrógeno Total (%)</b>	2.96 ± 0.11	Muy bajo
<b>Carbono Total (%)</b>	26.62 ± 0.88	NA
<b>Relación C:N</b>	8.96	NA

\*Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000

Es importante observar que la concentración de fósforo asimilable o disponible para las plantas se encuentra por debajo de los óptimos, al tener un valor de  $0.32 \text{ mg kg}^{-1}$  suelo, que con respecto a la presencia de fósforo total,  $12.76 \text{ mg kg}^{-1}$  suelo, podemos determinar que únicamente el 2.54% del fósforo total presente en el suelo se encuentra disponible para su asimilación por las plantas, Yin y colaboradores (2015) consideran que del 80 al 90% del fósforo es fijado en el suelo y transformado en formas insolubles para las plantas, lo cual es consistente con las condiciones iniciales del suelo chinampero de estudio.

Con respecto al nivel de salinidad al inicio del presente trabajo (Tabla 12) y de acuerdo con la normatividad de clasificación de suelos vigente (NOM-021) y diversos autores (Tabla 1), se comprobó que el suelo pertenece a la clasificación de salino con un riesgo de sodicidad bajo, lo cual fue determinado a partir de la obtención de la relación de adsorción de sodio (RAS) y del porcentaje de sodio intercambiable (PSI) que indican el porcentaje de  $\text{Na}^+$  en el complejo de cambio.

**Tabla 12** Determinación de parámetros de salinidad

<b>Criterio</b>	<b>Valor Obtenido</b>	<b>Clasificación</b>
<b>pH</b>	$5.52 \pm 0.22$	Moderadamente ácido
<b>Conductividad Eléctrica (<math>\text{dS m}^{-1}</math>)</b>	$6.63 \pm 0.08$	Salino
<b>RAS</b>	1.73	Riesgo de Sodicidad Bajo
<b>PSI</b>	1.27	Salino
<b>Bicarbonatos (<math>\text{mmol HCO}_3</math>)</b>	$0.30 \pm 0.00$	NA
<b>Carbonatos (<math>\text{mmol CO}_3^{2-}</math>)</b>	$0 \pm 0.00$	NA

Cabe resaltar que el suelo tiene un comportamiento ácido por su pH, pero con presencia de salinidad por el alto valor de conductividad eléctrica, lo cual muestra que el tipo de salinidad del suelo pertenece a la categoría de suelo salino no sódico. Otro de los indicadores del tipo de salinidad es la concentración de calcio y magnesio, que son dominantes sobre la concentración de sodio (Tabla 13).

Los carbonatos y bicarbonatos también están relacionados con la salinidad y están presentes en suelos con pH mayores a 9, dando condiciones de alcalinidad debido a la formación de OH. Los carbonatos están asociados a graves problemas de sodificación y el bicarbonato sódico es menos alcalino que el carbonato, debido a que el ácido carbónico neutraliza en parte el efecto alcalino (Ibañez et. al., 2004). Con base en lo anterior, en el presente suelo, la ausencia de carbonatos confirman que no se trata de un suelo con problemas de sodicidad y la presencia de bicarbonato en el suelo, aunque baja, podría sugerir que el sistema por sí mismo provoca cierta resistencia a la alcalinidad, lo cual explicaría el hecho de que el suelo a pesar de ser salino, no presenta alcalinidad, al tener un pH ácido, de 5.52.

Son consideradas bases intercambiables aquellos conjuntos de iones que están absorbidos sobre la superficie de las arcillas; Cuando un coloide del suelo está altamente saturado de cierto catión y tiene una concentración baja de otros cationes, éstos últimos son más difícilmente intercambiables (Bidwell, 1993). Con base en lo anterior, en el suelo de estudio el mayor porcentaje, 56%, es  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que el  $\text{Mg}^{2+}$  (5%), el  $\text{Na}^+$  (4%) y el Al (13%) por tanto estos últimos se fijarán de forma preferencial en los coloides del suelo al ser los cationes de menor concentración y por tanto serán más difícilmente desplazables en el complejo de cambio con respecto al  $\text{Ca}^{2+}$  y K, que serán más fácilmente encontrados en la solución del suelo para ser dispuestos por las plantas o intercambiados por los cationes libres (Tabla 13).

**Tabla 13** Bases intercambiables

<b>Bases intercambiables</b>	<b>% de bases intercambiables</b>	<b>mg kg<sup>-1</sup> de suelo</b>	<b><sup>a</sup>Cmol (+) kg<sup>-1</sup></b>	<b>Clasificación NOM-021</b>
<b>K</b>	20.31	1103.265	2.821	Clase Alta
<b>Ca</b>	56.35	3060.71	15.273	Clase Alta
<b>Mg</b>	5.20	282.818	2.326	Clase media
<b>Al</b>	13.25	720.0970	8.006	ND
<b>Na</b>	4.86	264.2005	1.149	ND

a. Miliequivalentes por cada 100g de suelo y que en la actualidad es expresada en Cmol(+)kg<sup>-1</sup>.

La CIC y las bases intercambiables tienen una estrecha relación entre sí, por ello en la Tabla 13 se encuentran los  $\text{mg kg}^{-1}$  de suelo y su conversión a  $\text{Cmol (+) kg}^{-1}$  misma que permite clasificarlo de acuerdo a la NOM-021, observando que el potasio y calcio se encuentran dentro de la clase alta en su contenido, de ahí la facilidad de estos a ser desplazados en las arcillas y ser absorbidos por las plantas.

Como se mencionó en la sección 2.1.3 del presente trabajo, los micronutrientes son elementos esenciales para el desarrollo de la planta pero que se requieren en cantidades usualmente menores a  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  de tejido; tales como hierro, cobre, zinc, manganeso, molibdeno, cloro, boro, cobalto y níquel (NOM-021). La información obtenida a partir del análisis de suelo por ICP-MS, presentó la composición de los micronutrientes manganeso, hierro y zinc mismos que se encuentran en cantidades superiores a las consideradas adecuadas por la norma, por su parte el cobre, molibdeno, cobalto y boro no están presentes en el suelo (Tabla 14).

**Tabla 14** Micronutrientes del suelo

<b>Micronutriente</b>	<b><math>\text{mg kg}^{-1}</math> de suelo</b>	<b>Clasificación NOM-021</b>
<b>Mn</b>	$10.193 \pm 1.186$	Adecuado
<b>Fe</b>	$3983.84 \pm 924$	Adecuado
<b>Zn</b>	$4.200 \pm 0.700$	Adecuado

Con respecto a los contaminantes presentes en el suelo, se observó que están presentes algunos metales pesados como; plomo y arsénico, sin embargo, su concentración es baja y se encuentra dentro de los rangos permitidos, situación que indica que la presencia de metales pesados no es una problemática en el suelo ni lo será en las plantas que crezcan en el (Tabla 15).

**Tabla 15** Metales contaminantes en el suelo

<b>Contaminante</b>	<b><math>\text{mg kg}^{-1}</math></b>	<b>Clasificación NOM-021</b>
<b>Pb</b>	$1.074 \pm 0.403$	Normal
<b>As</b>	$1.885 \pm 0.902$	No disponible

Por su parte, en los residuos de plaguicidas encontrados (Tabla 16), se puede prestar atención a los altos contenidos de los insecticidas clordano, paration, carbaril y malation, por mencionar algunos, siendo los de mayor concentración los insecticidas heptaclor y lindano en sus formas de hexacloruro de benceno  $\alpha$  y  $\beta$ .

**Tabla 16** Análisis de plaguicidas en suelo de estudio

<b>Plaguicida</b>	<b>Concentración mg kg<sup>-1</sup></b>
<b>d-BHC</b>	0.3127 ± 0.03
<b>a-BHC</b>	0.0670 ± 0.02
<b>b-BHC</b>	0.0020 ± 0.0004
<b>Toxafeno</b>	0.0005 ± 0.0002
<b>Malation</b>	0.0003 ± 0.00
<b>Heptacloro</b>	0.0023 ± 0.001
<b>Clordano</b>	0.0008 ± 0.0001
<b>Paration</b>	0.0005 ± 0.00
<b>Carbaril</b>	0.0005 ± 0.0002
<b>Heptacloro Epoxido</b>	0.0006 ± 0.0003
<b>p,p'-DDT</b>	0.0002 ± 0.0001
<b>Metoxicloro</b>	0.0007 ± 0.0007
<b>Mirex</b>	0.0007 ± 0.0002

Con respecto al análisis físico del suelo, se determinó que la clase textural a la cual pertenece es franco, es decir, que tiene una mezcla entre arenas (42.22%), limos (34.88%) y arcillas (22.68%), característica que le da una alta retención de agua y nutrientes, óptima para el desarrollo de las plantas.

## 4.2 Caracterización de inóculo fúngico aislado de cáscara de naranja

La cáscara de cítricos contiene muchos compuestos bioactivos que estimulan el crecimiento de especies de *Penicillium* como *P. digitatum*, *P. italicum* y *P. expansum*. Debido a características como el pH ácido, el contenido de fibra y la presencia de carbohidratos solubles e insolubles (pectina, celulosa y hemicelulosa) convierten a la cáscara de naranja en un potencial soporte para la producción microbiana de productos de valor agregado por medio de la fermentación de estado sólido (Gaird, 2017). Es así como a lo largo del presente trabajo se estudió la aplicación de cáscara de naranja inoculada con especies de *Penicillium*, para la aplicación a suelos, evaluando sus efectos.

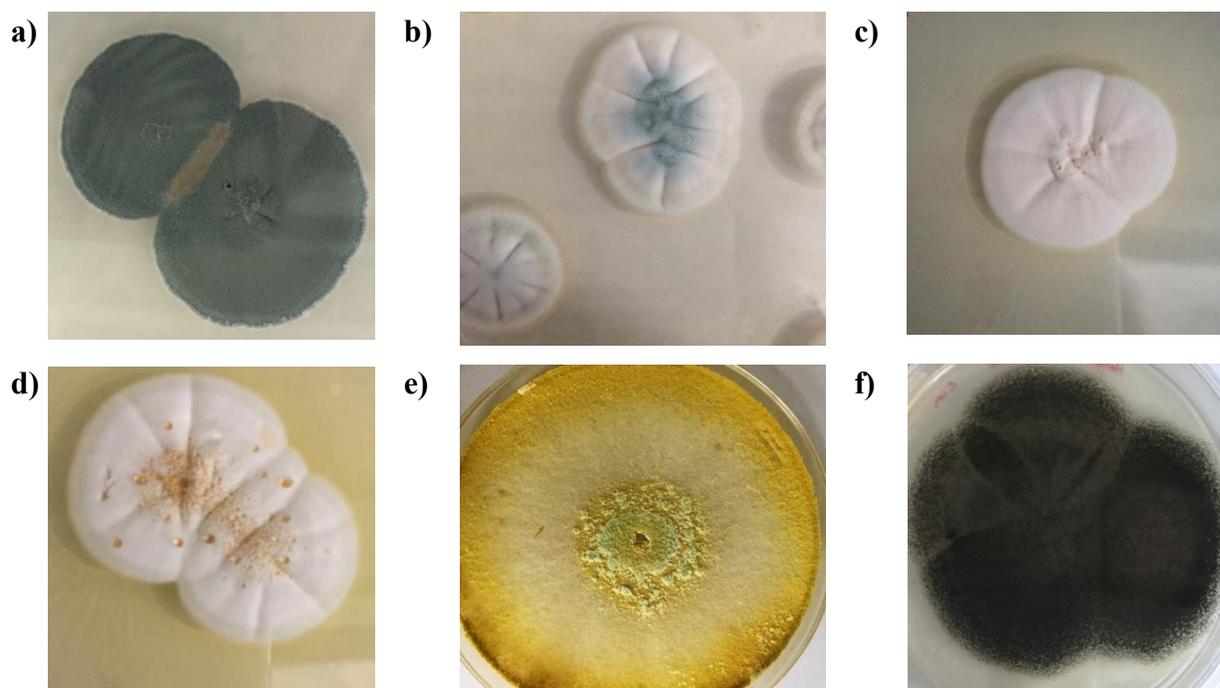
### 4.2.1 Caracterización macroscópica y microscópica

A partir del aislamiento microbiológico, se obtuvieron seis hongos de la cáscara de naranja que se emplearon para inocular el suelo, mismos que fueron diferenciados macroscópicamente (Figura 10) y observados microscópicamente (Figura 11). El criterio de selección fue enfocarse a las especies de mayor predominancia en el crecimiento de la cáscara de naranja. Cuatro de las cepas aisladas pertenecen al género *Penicillium* (Imágenes a-d). Una de las cepas aisladas tiene características morfológicas que presumen pertenece al género de *Aspergillus* (e), y la última de ellas no logró ser identificada al observarla al microscopio (e).

Como se observa en la Figura 10a, la apariencia de la cepa tiene una textura aterciopelada color verde opaco a verde grisáceo en algunas secciones, su crecimiento fue rápido, alcanzando un diámetro de 4 a 5 cm después de 7 días en incubación a 25° C en medio de cultivo PDA, su reverso es color crema, el crecimiento es redondo con bordes ligeramente irregulares con un ligero contorno blanco.

En la Figura 10b, se observa una cepa con apariencia globosa y estriada desde el centro, color blanca algodonosa en el crecimiento joven y color verde grisáceo en la maduración de los conidios, tuvo una esporulación baja con respecto a especies como la 10a, y un crecimiento lento de 2 a 2.5 cm de diámetro después de los 7 días de incubación a 25° C en medio de cultivo PDA. En cepas de crecimiento mayor a 7 días la cepa se tornaba de color totalmente verde en tonalidades azules a grisáceas.

**Figura 10.** Características macroscópicas de las cepas aisladas de cáscara de naranja



La observación de la cepa 10c coincide con lo que Arias y Piñeros (2008), quienes han reportado las características del hongo *Penicillium citrinum*, con caracteres como, crecimiento lento de colonias alcanzando un diámetro de 1.5 a 2.5 cm en 7 días, reverso amarillo, de colonia redonda y borde regular.

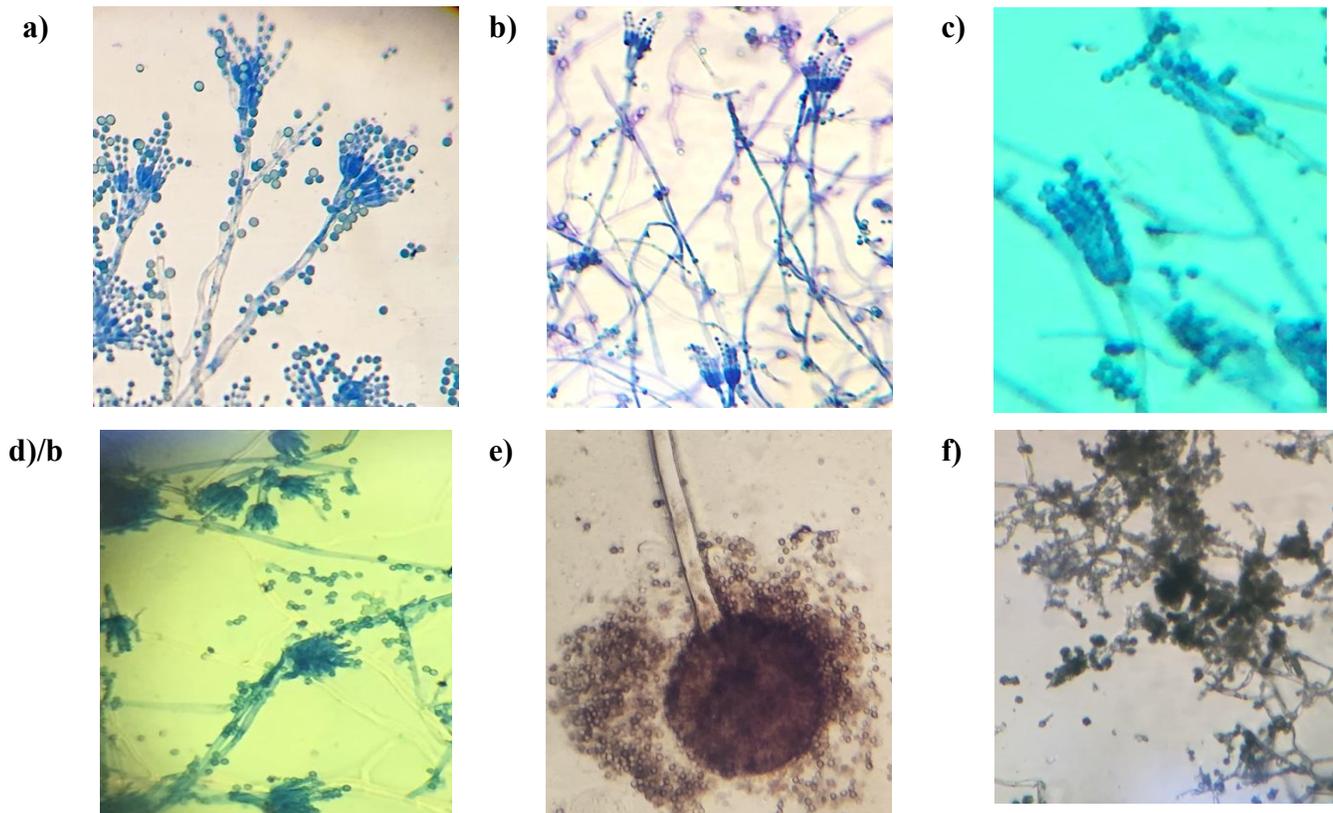
A través de la observación de las conidias de cada hongo mediante microcultivos (Figura 11), se determinó que cuatro de las cepas pertenecen al género *Penicillium* (Imágenes a-d), y que por tanto éste es el género dominante en el inóculo de la cáscara de naranja, razón por la cual fueron estas cepas las de interés de estudio a lo largo del presente trabajo.

Las especies de *Penicillium* son muy comunes, ya que se asocian con alimentos almacenados de seres humanos, excremento animal suelos y materiales de construcción y varios otros hábitats (Frisvard y Samson 2004). Pertenece al phylum Ascomycota, es un hongo de crecimiento rápido dando colonias blancas inicialmente, las cuales se cubren con los esporos y van tomando diferentes colores según la especie. El verticillum es fundamental en la clasificación del hongo, así pueden clasificarse en cuatro grandes grupos: monoverticillata, asimétrica, biverticillatasimétrica y poliverticillata (Arias y Piñeros, 2008).

La estructura que caracteriza a *Penicillium*, es el conidióforo que presenta en forma de pincel, a la cual se le debe el nombre del género, que proviene del latín *Penicillus* que es pincel pequeño. Los conidios se presentan en cadenas y son originados a partir de una célula especializada: la fialide; el conidióforo está unido al micelio mediante la estipe; entre la estipe y las fialides aparecen diferentes células, que se presentan agrupadas partiendo de un mismo punto desde el que se originan, la célula de soporte de la fialide se denomina métula y la célula de soporte de la métula se denomina rama (Martínez, 2003).

Se observan en la Figura 11a, los conidióforos que son terverticilados, las métulas son cilíndricas, los conidios tienen paredes lisas y globosas. Por su parte los conidióforos de la Figura 11b, se observan simétricamente biverticilado, con estípites lisos y largos, los conidios son de paredes lisas, ampliamente elipsoidales. Finalmente, la Figura 11c tiene conidióforos largos, de paredes lisas, con 3 a 5 métulas divergentes, fialides en forma cilíndrica, conidios producidos en columnas, globosas verticilado, estípites lisos, conidios globosos.

**Figura 11.** Características microscópicas de las cepas aisladas de cáscara de naranja



#### 4.2.2 Caracterización molecular

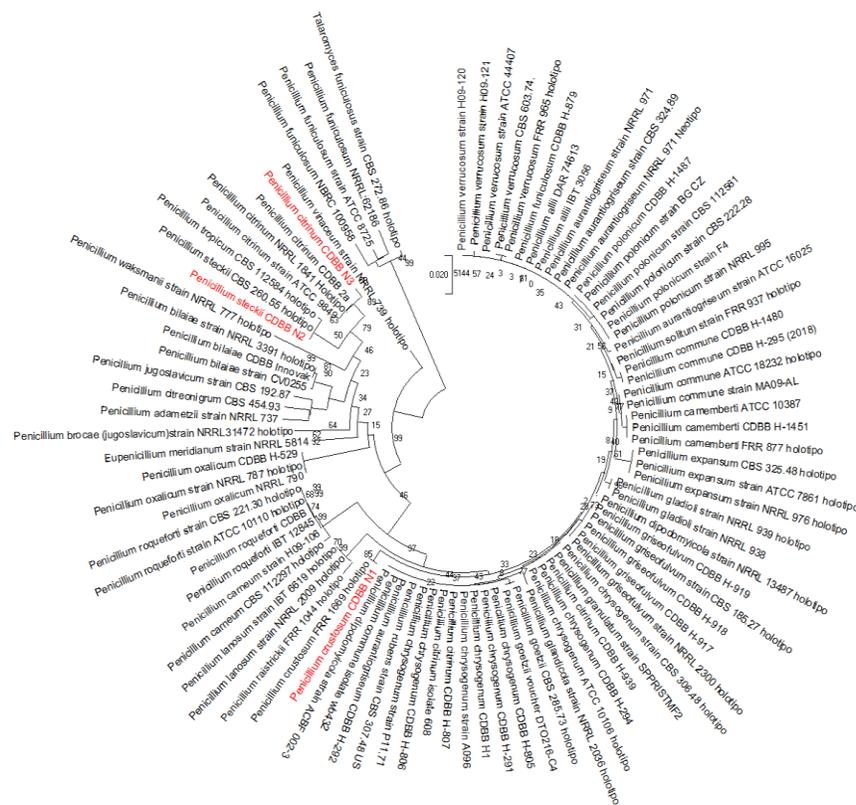
El subgénero *Penicillium* se encuentran entre los hongos filamentosos que están presentes con mayor frecuencia en alimentos como moho, sin embargo, la identificación de los 58 taxones del subgénero *Penicillium* es difícil, porque la micro morfología de las cepas es muy similar, así como las estructuras y la ramificación de los conidióforos, la forma y la ornamentación de los conidios por ello sus especies son consideradas las más difíciles de identificar (Frisvard y Samson 2004). Por lo anteriormente explicado, de las cuatro cepas preseleccionadas por pertenecer al género *Penicillium*, se tomó la estrategia económica de identificar molecularmente tres de ellas (Imágenes a-c), tomando como criterio de exclusión la cepa de mayor similitud con entre sí, descartando la cepa d. de la Figura 10 y 11.

Martinez en 2003, resalta que las especies de *Penicillium* presentan pequeñas distancias filogenéticas, mediante las regiones ITS se han conseguido separar distintas especies de este género, que anteriormente no estaban claramente distinguidas, dado que la mayoría presentan muy pocas diferencias entre sí, incluso menciona que algunas de las regiones ITS pueden llegar a ser idénticas, por ejemplo *P. crhysogenum* y *P. nalgiovense* o *P. commune* y *P. camemberti*. Es así que las cepas que contienen 5 o más sustituciones en las regiones ITS pertenecen a distintas especies.

En el análisis molecular de la cepa a. (Fig 10 y 11) la secuencia consenso obtenida con 518 nucleótidos indicó que corresponde a *Penicillium crustosum*, de la cepa b. se obtuvo una secuencia de un total 555 nucleótidos asociados a la especie *Penicillium steckii* y finalmente de la secuencia consenso con un total 339 nucleótidos de la cepa c., se determinó que pertenece a *Penicillium citrinum*; las tres fueron identificadas de acuerdo con la búsqueda BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) con una cobertura de la secuencia del 100% y una identidad del 99% y un número de acceso MN589639.1, MH857476.1 y MG962378.1 respectivamente. Las secuencias de los fragmentos 16S -ITS1-5.8S-ITS2-26S de cada una de las cepas se encuentran en el Anexo 3 del presente trabajo.

El dendograma de similitud de las secuencias consenso de las cepas identificadas, se muestra en la Figura 12, las cepas de interés se presentan en color rojo, en él se puede observar la cercanía taxonómica que existe entre las cepas *P. steckii* y *P. citrinum*, lo cual concuerda con lo que Houbraken y colaboradores (2010), que atendiendo a la relación que existe entre las dos especies, *Penicillium citrinum* fue extensamente examinada usando una combinación de  $\beta$ -tubulina parcial, calmodulina y datos de secuencia ITS, patrones de control y caracteres fenotípicos, donde se clasifica a la serie citrina y a ella pertenecen siete especies, de entre las que se encuentra *Penicillium steckii*. Los miembros de esta serie comparten tasas de crecimiento similares y tienen vértices terminales de m $\acute{e}$ tulas con pequeños conidios, esporulación moderada, con conidios de color blanco, verde grisáceo o gris azulado, ocasionalmente con pequeñas gotas de exudado amarillo claro o pálido, lo cual coincide con las dos especies aisladas *P. stecki* y *P. citrinum*.

**Figura 12.** Dendograma de similitud de la secuencia consenso del fragmento 16S-ITS1-5.8S-ITS2-26S de las cepas identificadas (color rojo)



#### **4.2.2.1 *Penicillium crustosum***

*P. crustosum* tiene una alta tasa de crecimiento y una producción muy alta de conidios, se encuentra en el queso, semillas oleaginosas, nueces, manzanas, granos de café, maíz, semillas de algodón, alimentos compuestos, cartón y es común en el suelo. Crece muy bien con poca agua y en un amplio rango de temperaturas, hasta ahora no se ha reportado alguna aplicación biotecnológica. Cuenta con conidióforos terverticilados, conidios con paredes lisas, globosas, color de conidio verde opaco a verde gris o verde azul en el margen de la colonia, color inverso en fuertemente amarillo. Como parte de sus extrolites, están penitrem A-G, roquefortine C-E, ácido terrestre y viridicatico, viridicatinas, hadacidina y andrastina A (Frisvard y Samson 2004).

#### **4.2.2.2 *Penicillium steckii***

Esta especie tiene una amplia distribución, ha sido reportada y aislada en Japón, Panamá, Venezuela, Bermudas, Egipto, Venezuela, Indonesia y Eslovenia, se ha aislado de tela de algodón, tierra, agua hipersalina, pez azul, heno de hierba costera, alcachofa y endófito de raíz de planta de café. Tiene una esporulación buena con conidios de verde a grisáceo, pequeñas gotas de exudado amarillo claro o débil, revertido tiene tonalidades crema a amarillo claro y esporulación buena, conidios de gris a verde, conidióforos de hifas superficiales, simétricamente biverticilado, estípites lisos, conidios de paredes lisas. Sus extrolitos constan de isocromantoxinas, quinolactacina, ácido tanzawaico E y F, y dentro de los no caracterizados fueron llamados "FON", "FOS", "phoe" y "STOK". *Penicillium steckii* fue colocado en sinonimia con *P. citrinum*. Sin embargo, tiempo después se amplió el concepto entre *P. citrinum* y *P. steckii*, señalando dentro de sus diferencias que las cepas de *P. steckii* no producen citrinina y no pueden crecer a 37 ° C (Houbraken et. al., 2010).

#### **4.2.2.3 *Penicillium citrinum***

*P. citrinum* es un microorganismo termofílico que resistente a la sequía, el rango de temperatura de crecimiento oscila entre 5 y 40 ° C, con crecimiento óptimo de 26 a 30° C, capaz de producir citrinina entre los 15 y 37 ° C, y el rango óptimo de pH se encuentra entre 5 y 7 (Sweeney y Dobson, 1998). Es una especie con esporulación moderada, con conidios de color verde grisáceo a gris azulado, aterciopelado, ocasionalmente con pequeñas gotas de

exudado claro o amarillo pálido, amarillo parduzco inverso. Conidióforos simétricamente biverticilado producidas abundantemente en aislamientos frescos. Esta especie ha sido aislada de varios sustratos como cereales tropicales, especias y ambientes interiores, es predominante en suelos tropicales y se ha reportado como endófito de la raíz, tallo y hojas de plantas de café y raíces de *Ixeris repens*. La interacción beneficiosa para la planta podría ser la producción de giberelinas, que mejora el crecimiento del tallo, y que se afirma que son producidas por *P. citrinum*. Pero también otros reguladores del crecimiento de las plantas, las citrinolactonas A y la esclerotinina C, sin embargo, se informa que la citrinina induce la motilidad de enjambre de *Paenibacillus polymyxa*, una rizobacteria promotora del crecimiento (Houbraken et. al., 2010).

Además, produce principalmente citrina y otros extrolitos como el ácido tanzowaico A, quinolactacinas, quinocitrininas, ácido asterico y la compactina, antraquinonas, agroclavina-1 y epoxiagroclavina-1, citrinadina A, scalusamidas AC, perinadina A, ciclocitrinols, ergosta-4,6,8 (14), 22-tetraen-3-ona, 2,3,4-trimetil-5,7-dihidroxibenzofurano y giberelinas. Las citrininas son micotoxinas, descubiertas por primera vez en este hongo y tiene características citotóxicas, actividades antimicrobianas y actividades de eliminación de radicales (Wang et. al., 2019). Sin embargo, la citrinina ha sido evaluada como una toxina renal que puede conducir necrosis de las células epiteliales y teratogenicidad hasta el momento no se ha establecido un estándar de toxicidad letal universal para el contenido de citrinina en los alimentos, sin embargo, estándares de la Unión Europea establecieron límites que oscilan entre 50 y 5000 ng g<sup>-1</sup> (Da Costa et. al., 2019).

La especie *P. citrinum*, es capaz de sintetizar un precursor de la pravastatina, fármaco utilizado como tratamiento para inhibir la síntesis de colesterol endógeno (Martínez, 2003). Dentro de los antecedentes que indican las alternativas de explotación de *P. citrinum* en el ámbito biotecnológico, da Costa y colaboradores en 2018 encontraron dos  $\beta$ -glucosidasas: las enzimas purificadas Pc $\beta$ Glu1 y Pc $\beta$ Glu2, utilizando salvado de trigo como fuente de carbono, mostrando características relevantes para ser aplicadas en procesos como la sacarificación de biomasa, producción de tenso activos biodegradables, síntesis de oligosacáridos, eliminación de glucósidos cianogénicos de la malta de sorgo utilizada en la

producción de cerveza africana y/o fuentes de energía potencialmente sostenibles (glucosa, etanol, hidrógeno y metano) a partir de la conversión de biomasa.

### **4.3 Capacidad de producción de ácidos orgánicos**

Es posible estimar la capacidad de solubilización de un microorganismo determinando la cantidad y naturaleza de los ácidos orgánicos producidos (Scervino, 2010). Existen ventajas de los ácidos orgánicos sobre los ácidos inorgánicos en los suelos, dentro de las cuales se encuentran los pocos efectos negativos para su calidad (como la salinización) y la liberación de más  $H^+$  debido a sus constantes de baja acidez que determinan la capacidad del ácido orgánico para cambiar la acidez de su ambiente (Xiao y Wu, 2014).

Por ello se llevó a cabo la identificación de los ácidos orgánicos presentes en la cáscara de naranja, así como los producidos por el inóculo fúngico crecido en ella.

#### **4.3.1 Ácidos Orgánicos de cáscara de naranja**

Los ácidos orgánicos detectados en cáscara de naranja sin inoculación de hongos sobre ella fueron el ácido glucónico, cítrico, succínico y acético. Tal como se observa en el cromatograma presentado en la Figura 13, los tiempos de retención en minutos corresponden a 6.0 para el ácido glucónico, 7.88 para el cítrico, 9.1 para el málico y 11.45 para el succínico, en el tiempo 9.8 existe un compuesto que persiste en cada una de las muestras, no obstante, no ha sido identificado a través de los estándares de ácidos orgánicos utilizados.

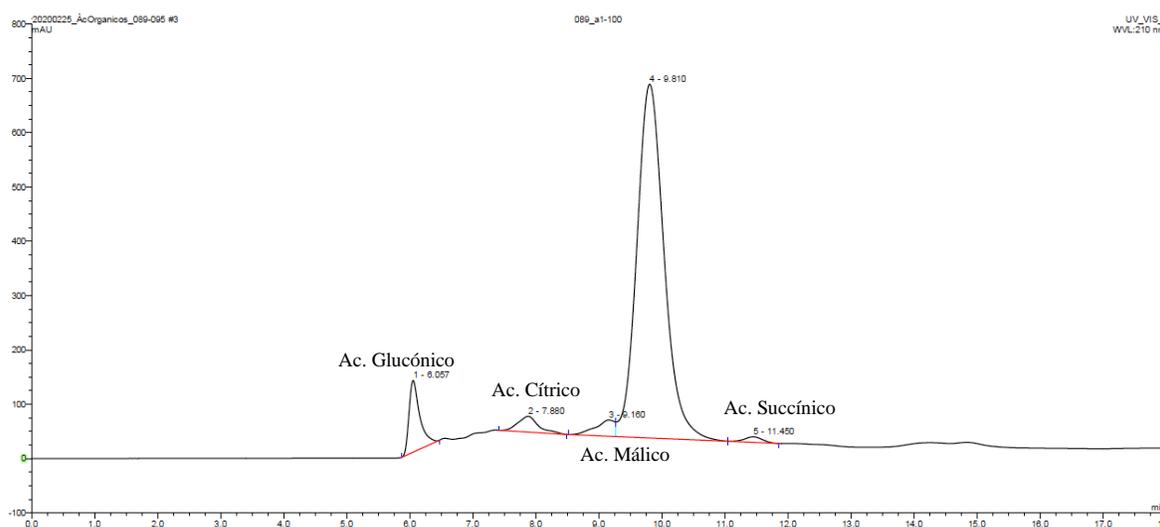
El área de los picos en el cromatograma correspondiente es proporcional a la concentración de los ácidos, por ello el orden de predominancia de cada uno de ellos es glucónico, cítrico, málico y succínico en menor medida.

Los ácidos orgánicos presentes en la cáscara de naranja sin inocular, fue distinta a los ácidos en cáscara de naranja inoculada, lo cual nos indica que existe una producción de ácidos orgánicos que está siendo metabolizada por los hongos de estudio en el presente trabajo.

En el caso de los ácidos orgánicos producidos a partir del crecimiento del inóculo fúngico en la cáscara de naranja, como se muestra en el cromatograma de la Figura 14, los tiempos de retención en minutos observados para cada uno de los picos corresponde a los ácidos

glucónico a 6.0, cítrico a 7.7, málico a 9.08, succínico a 11.7, fórmico a 13.31 y acético a 14.87, nuevamente el tiempo de retención de 9.81 no fue identificado, pues vuelve a aparecer y se conserva como en el caso de la cáscara de naranja sin inoculación. De acuerdo con las áreas y enunciando en orden de mayor a menor presencia de cada uno de los picos y por ende presumiblemente de mayor a menor concentración son succínico, glucónico, acético, cítrico, fórmico y málico.

**Figura 13.** Identificación de ácidos orgánicos en cáscara de naranja

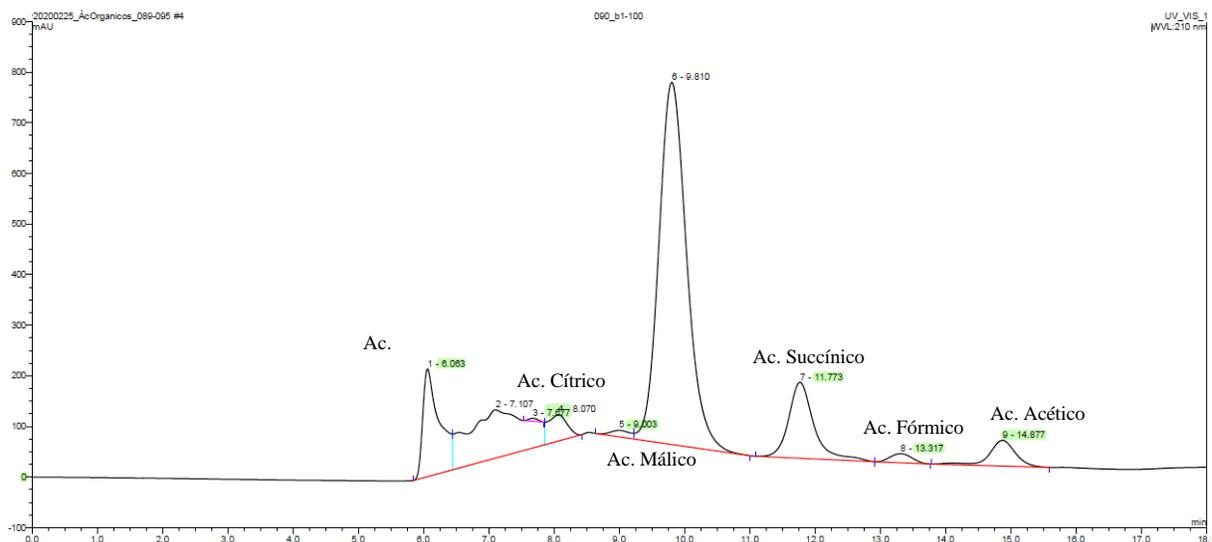


### 4.3.2 Ácidos Orgánicos de cáscara de naranja inoculada

Es muy importante resaltar que los ácidos que se incluyen en la cáscara de naranja inoculada con respecto a la cáscara sin inóculo son el fórmico y el acético, por su parte el ácido glucónico y succínico incrementaron su área, lo cual indica que estos ácidos están produciéndose por las especies de *Penicillium* crecidos en la cáscara de naranja aplicada al suelo.

Muchos de los estudios realizados sobre la capacidad de solubilizar P a través de la secreción de ácidos orgánicos, son enfocados mayormente a bacterias promotoras del crecimiento, de las cuales se ha reportado la producción de ácido oxálico, láctico, ácido 2-ceto-glucónico, málico, acético, cítrico, fórmico y glucónico (Tahir et. al., 2013). Éstos cinco últimos fueron encontrados en la cáscara de naranja con crecimiento de especies de *Penicillium*, lo cual hace a estos ácidos candidatos para el favorecimiento de la solubilización de P en el suelo.

**Figura 14.** Identificación de ácidos orgánicos en cáscara de naranja inoculada



En estudios previos han probado que los niveles de ácidos orgánicos de cáscaras inoculadas con diferentes especies de *Penicillium*, varían de acuerdo con la especie en si misma, así como con el estado de madurez de la naranja al ser cosechada, ello muestra una nueva variable a considerar en estudios a futuro para la presente línea de investigación, puesto que los autores reportan que los niveles más altos de ácido cítrico fueron variables al inocular la naranja con *P. expansum*, cambiando su concentración de acuerdo a las naranjas inmaduras y maduras (413 y 546  $\mu\text{g g}^{-1}$  FW, respectivamente). El ácido glucónico también mostró diferencias pues las naranjas inmaduras contenían niveles mayores de ácido glucónico que las maduras. Por su parte, en las naranjas inoculadas con *P. digitatum* el ácido galacturónico estuvo presente en los niveles más altos y mostró una reducción a medida que avanzaba la madurez de la naranja, contrario así en el ácido cítrico que a medida que avanzaba la madurez de la naranja, su concentración disminuyó (Vilanova et. al., 2014).

## 4.4 Monitoreo del pH

### 4.4.1 pH en cáscara de naranja

Con el fin de conocer la variación en los cambios del pH de la cáscara de naranja a partir de la producción de ácidos orgánicos y su inoculación con las especies de *Penicillium*, se llevó a cabo el monitoreo a lo largo de los días, con el fin de relacionar el posible efecto en la alcalinidad del suelo a través de la aplicación de cáscara de naranja.

Vilanova y colaboradores en 2014, señalan directamente a los ácidos orgánicos inducidos por *P. digitatum* y *P. expansum* como responsables de la disminución de pH en medio líquido, atribuyendo esta disminución a los ácidos ascórbico, oxálico, cítrico, fumárico, glucónico, galacturónico, málico. Por su parte en extracto de cáscara de naranja la combinación de ácidos málico y cítrico mostraron una mayor capacidad de acidificar y disminuir el pH del tejido de naranja de 4.9 a 2.9 también hacen una interesante observación al indicar que el pH es independiente a la madurez de las naranjas.

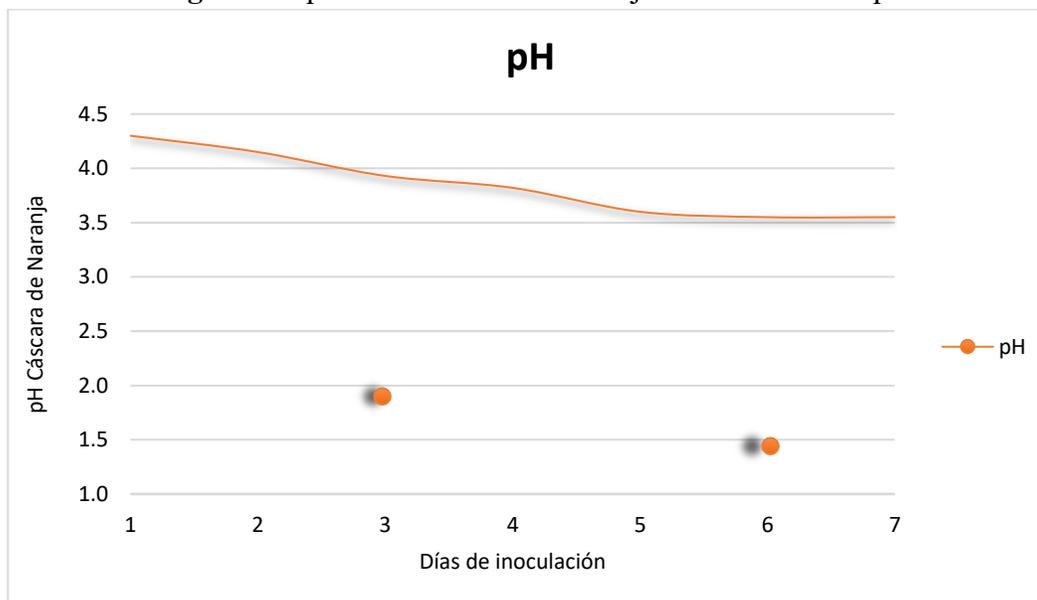
En el presente trabajo, la diferencia de pH que existió entre cáscara de naranja con y sin inóculo fúngico fue de 0.75 unidades de pH, a diferencia de lo que Costa y colaboradores en 2019, quienes consideraron la cáscara de naranja sana con pH de 4.77 y cáscara en descomposición por *Penicillium digitatum* con 3.12, en la cual existió una diferencia de pH de 1.65.

En la Figura 15, se observa que el pH de la cáscara de naranja sin inocular, correspondiente al día 1, es ácido con un valor de 4.3, a lo largo de los días en los que la cáscara de naranja se sometió a las condiciones para ser inoculada, el pH se mantuvo en valores que oscilaron alrededor de valores de 3.6 a partir del día cinco de inoculación, llegando hasta un valor ácido de 3.55 en el día seis, mismo que corresponde al tiempo de inoculación y aplicación en todos los tratamientos de remediación del presente trabajo.

Zhang y colaboradores en 2013, obtuvieron resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo, pues el valor de pH de la cáscara de los cítricos sin inoculación fue de 4.64, monitorearon el pH 24 h después de la inoculación de *Penicillium digitatum*, donde

disminuyó a 3.83, alcanzando un valor de 3.33 a las 48 h después de la inoculación, posterior a ello el pH permaneció relativamente estable.

**Figura 15.** pH de la cáscara de naranja a través del tiempo



Diversas investigaciones se han encargado de estudiar las consecuencias en el tejido de cáscara de naranja a partir de la inoculación de especies de *Penicillium*, indagando las estrategias por las cuales el hongo tiene éxito al colonizarla, siendo la reducción del pH una de las estrategias claves ya que el hongo acidifica el tejido infectado al producir ácidos orgánicos. Sin embargo, ésta estrategia no es la más importante, puesto que la patogenicidad fúngica en la naranja se ve sostenida por la supresión del peróxido de hidrógeno, producido por la naranja para defenderse de la hospedera de *P. digitatum*, para debilitar la capacidad de producción de peróxido de hidrogeno mediante catalasas del hongo huésped, la secreción de ácidos orgánicos por el mismo y la consecuente modificación del pH permiten que *Penicillium spp* logre la colonización en la naranja (Zhang et. Al., 2013; Vilanova, et. al., 2014; Costa et. al., 2019).

## 4.5 Optimización del sistema de remediación de suelo

En el presente apartado se definieron los factores de mayor influencia dentro del proceso de biorremediación del suelo, de los ocho tratamientos evaluados en el análisis factorial fraccionado se seleccionó el tratamiento que benefició mayormente las condiciones del suelo, para utilizarlas como estándares de remediación en los futuros bioensayos.

Como se mencionó en el apartado de metodos, los factores analizados fueron la proporción de fuente de carbono utilizada con respecto al soporte para la inoculación del hongo, considerando la relación de naranja y paja (NP), los tiempos de colonización del soporte (C), la cantidad de humedad de suelo (H) a lo largo del tratamiento, el tamaño del soporte o cáscara de naranja (T) y el tipo de fuente de carbono o paja adicionada (FC). La distribución de los factores por cada uno de los tratamientos puede retomarse de la Tabla 8.

### 4.5.1 Conductividad eléctrica

Tomando en cuenta la variable de respuesta relacionada directamente con la disminución de la salinidad en el suelo, evaluada por la conductividad electrica, el análisis factorial  $2^{5-2}$ , se obtuvo la ecuación del modelo para la disminución de la CE, que en términos de factores codificados es:

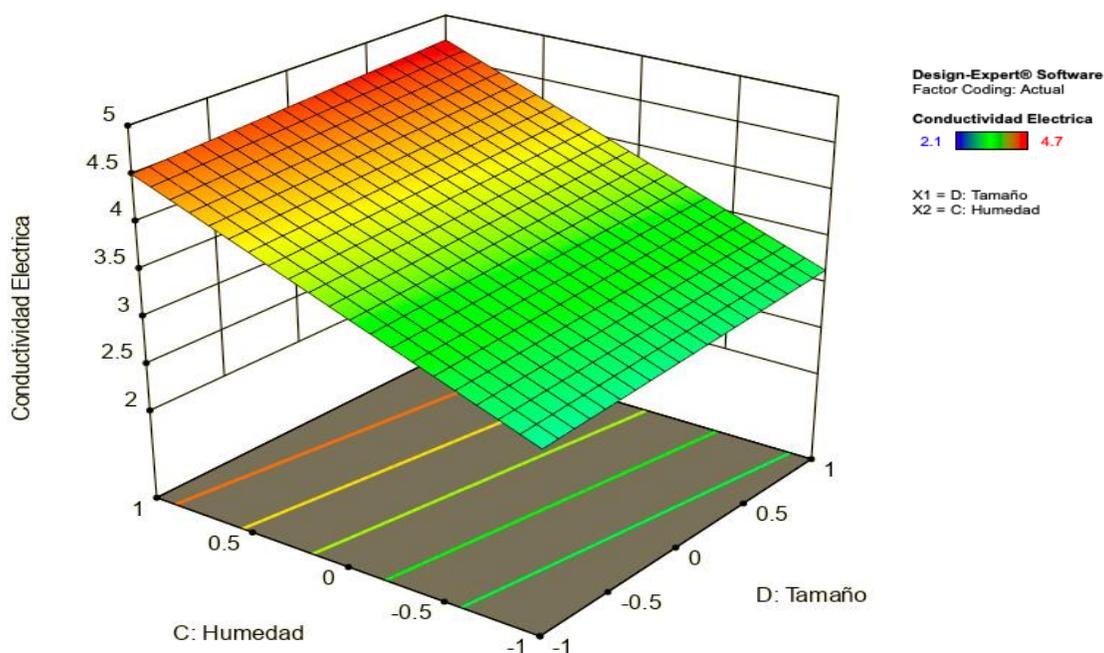
$$C.E. = 3.84 + 0.003NP - 0.070C - \mathbf{0.783H} - \mathbf{0.106T} - 0.007FC + 0.057CH + \mathbf{0.175C FC}$$

El modelo estadístico mostrado arriba tiene un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0.9188, y de acuerdo con el, los factores que son significativos y que influyen en la disminución de la CE y por ende de la salinidad fueron: la humedad del suelo en su nivel bajo (65%), el tamaño de la cáscara de naranja (0.5 cm) y la interacción de la colonización de la naranja (cáscara inoculada) y la fuente de carbono utilizada (rastreo de maíz), mostrando significancia estadística al obtener un p-value de 0.0001, 0.041 y 0.0017 respectivamente.

El factor de mayor efecto de acuerdo con el diseño experimental planteado, corresponde a la humedad del suelo a lo largo del experimento, con un 84% de contribución en la disminución de la CE. Tal como se observa en el extremo inferior derecho de la Figura 16, la CE disminuye cuando la humedad del suelo se mantiene con un 60% y cuando el tamaño de

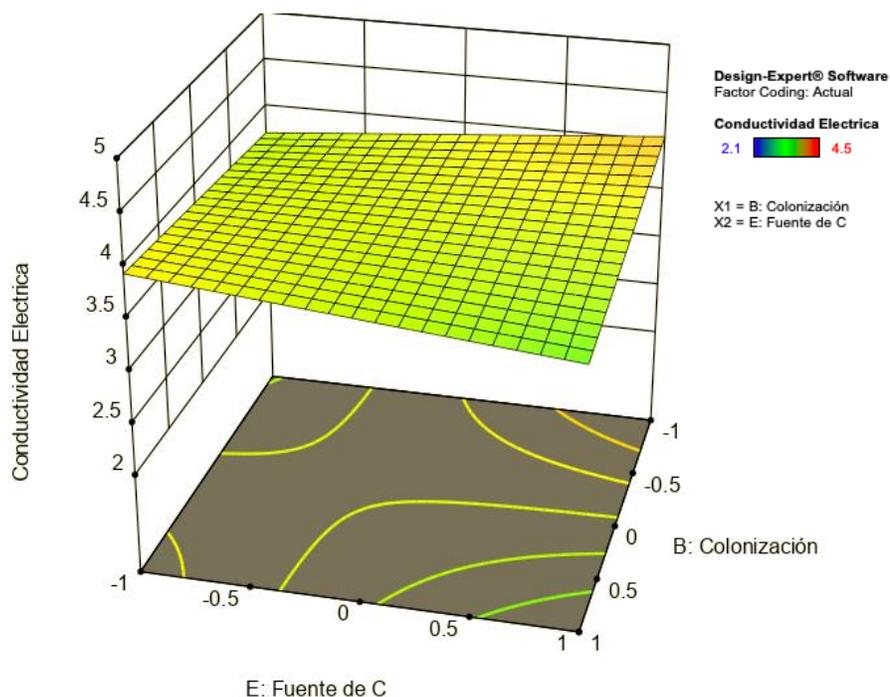
cáscara de naranja se aplica con un diámetro de 5mm, en ambos casos se trata de los niveles más bajos probados (-1).

**Figura 16.** Interacción de factores estadísticamente significativos en la reducción de CE.



Con respecto a la interacción de los dos factores que estadísticamente también influyen en la disminución de la CE, en este caso la colonización de la cáscara de naranja y la fuente de carbono, ambos en sus niveles altos (+1) es decir, naranja con inóculo y utilización de rastrojo de maíz como fuente de carbono adicionada. El comportamiento anteriormente explicado puede ser observado en el extremo inferior derecho de la Figura 16, donde las partes más sombreadas logran mostrar la disminución de la CE a partir de la interacción de los factores, es posible que esta influencia sea menor, con un 4.25% de contribución respecto a la influencia de la humedad presentada en la Figura 16, que tiene un porcentaje de contribución de 84.89%.

**Figura 17.** Interacción de factores estadísticamente significativos en la reducción de CE.



Para tener una apreciación mayor sobre los 8 tratamientos expuestos a diferentes condiciones se realizó una prueba de medias LSD con un intervalo de confianza del 95% (Tabla 17), donde se observa que los tratamientos 4, 5, 6 y 7 disminuyeron la CE del suelo hasta llevarlo de la clasificación de salino a moderadamente salino. De ellos los tratamientos que mantienen una similitud estadística y que a su vez presentaron los mejores resultados en la disminución de las sales, son los tratamientos 4 y 5 que no muestran diferencia significativa, al pertenecer al grupo estadístico d y cd con valores de  $2.63 \text{ dS m}^{-1}$  y  $2.91 \text{ dS m}^{-1}$  respectivamente. Los cuales disminuyeron hasta 4 unidades la conductividad con respecto a las condiciones presentadas inicialmente ( $6.63 \text{ dS m}^{-1}$ ), en este caso ambos tratamientos tuvieron en común los factores de tamaño de soporte a  $0.5 \text{ cm}$  y humedad de suelo a  $65\%$ , diferenciándose en el tiempo de colonización lo cual indicaría que el efecto de la colonización de la cáscara de naranja sobre la CE es indistinto, así como la fuente de carbono y la relación CN/P; que bien puede ser 1:2 o 1:1, lo cual indica que no existe una influencia de tales factores para que existan diferencias estadísticas significativas entre ambos tratamientos, y por tanto las condiciones ideales de estos factores serán determinados a partir de condiciones de viabilidad económica o práctica.

**Tabla 17** Prueba de comparación de medias LSD de la conductividad eléctrica

Tratamiento	CE (dS m <sup>-1</sup> )	Clasificación
<b>1</b>	4.69± 0.07 <b>a</b>	Suelo salino
<b>2</b>	4.56± 0.21 <b>a</b>	Suelo salino
<b>3</b>	4.53± 0.93 <b>a</b>	Suelo salino
<b>4</b>	<b>2.63± 0.15 d</b>	<b>Moderadamente salino</b>
<b>5</b>	<b>2.91± 0.16 cd</b>	<b>Moderadamente salino</b>
<b>6</b>	3.21± 0.69 <b>cb</b>	Moderadamente salino
<b>7</b>	3.45± 0.12 <b>b</b>	Moderadamente salino
<b>8</b>	4.68± 0.14 <b>a</b>	Suelo salino

Con respecto a los tratamientos 1, 2, 3 y 8 que a pesar de haber disminuído al menos 2dSm<sup>-1</sup> con respecto a las condiciones iniciales del suelo, estos conservan estadísticamente el mismo nivel de salinidad y la misma clasificación de suelos al tener una conductividad que va de 4.53 a 4.60 dS m<sup>-1</sup>, despues de la aplicación de los tratamientos. Por ende estos tratamientos con la combinación de factores respectiva, no fueron considerados para posteriores experimentos.

#### 4.5.2 pH

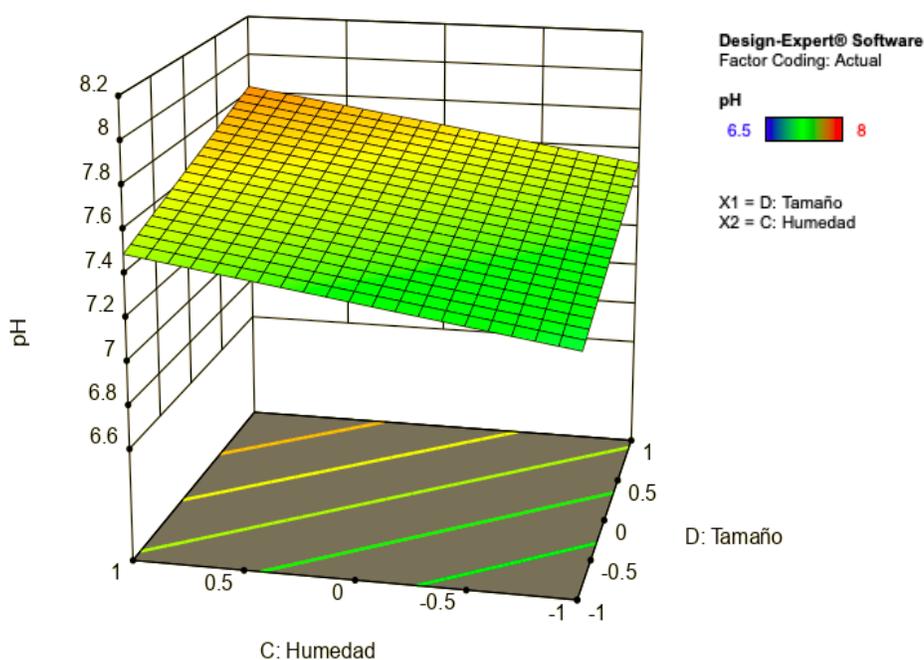
Mediante el analisis factorial fraccionado realizado para observar el efecto de los factores evaluados sobre la alcalinización del suelo con el pH; se obtuvo que los factores de mayor contribución fueron primordialmente el tamaño de soporte con 28% y la humedad del suelo con 22.70%, seguido de la fuente de carbono y la interacción de la colonización y humedad en ambos casos con una contribución del 11.22% y finalmenre la interacción de la colonización y fuente de carbono fue la más debil pues contribuyó con un 4.2%.

La ecuación del modelo estadístico en la influencia de la disminución del pH se muestra a continuación, donde los factores tienen una correlación (R<sup>2</sup>) de 0.80 y son marcados en negritas los factores significativos

$$pH = 7.52 + 0.039NP + 0.037C - \mathbf{0.151H} - \mathbf{0.169T} - \mathbf{0.106FC} + \mathbf{0.107CH} + \mathbf{0.065CFC}$$

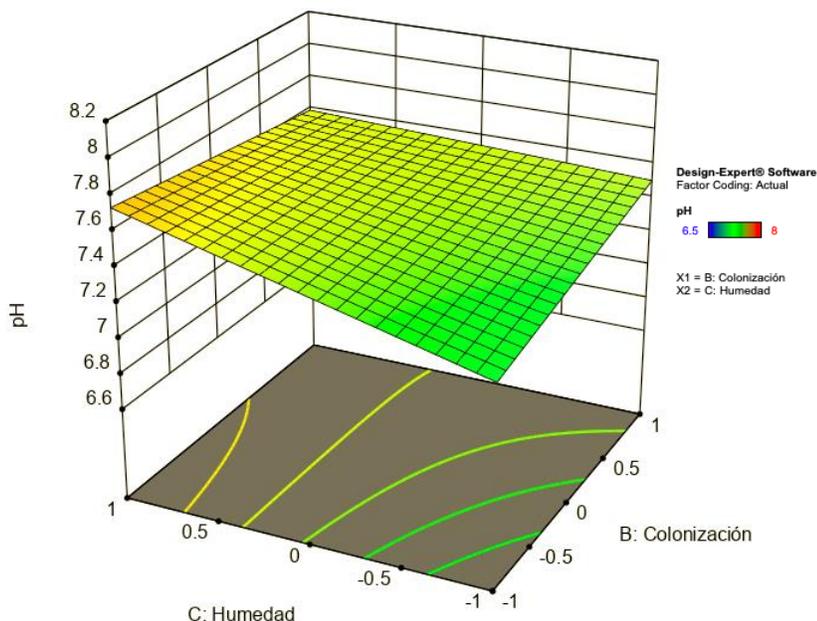
El tamaño de soporte (T) y la humedad del suelo (H) fueron los factores de mayor influencia en el pH, con un p- value de 0.0001 y en los dos casos con el nivel más bajo (-1) con un tamaño de soporte de 0.5 cm y 65% de humedad de suelo (Figura 18).

**Figura 18.** Interacción de tamaño de cáscara de naranja y humedad en el pH



Los siguientes factores que influenciaron con un 11% de contribución en el modelo fue la fuente de carbono en su nivel alto (1+), que fue el rastrojo de maíz (p-value 0.0305) y la interacción entre dos factores la humedad y colonización (p-value de 0.0009) en su nivel más bajo (-1), con una humedad del 65% en suelo y cáscara de naranja sin inoculación. El efecto mencionado de éste último se observa en la Figura 18, donde la parte inferior derecha muestra la mayor disminución del pH en el gráfico de superficie de respuesta presentado.

**Figura 19.** Interacción de factores colonización y humedad en el pH



Como fue posible apreciar en los gráficos de superficie de respuesta anteriores, el pH en todos los tratamientos osciló entre 7 y 7.78, lo cual indica que ninguno de los tratamientos acidificó el suelo lo suficiente y por ende no ocurrió una disminución numérica de la alcalinidad en ellos. Pero si se tuvieron diferencias estadísticas entre los tratamientos 4, 5 y 8, que fueron los de menor pH con un valor de 7.34, originando en ellos suelos neutros y el resto de los tratamientos que continuaron con la clasificación de medianamente alcalinos (Tabla 18).

**Tabla 18** Prueba de Medias LSD de pH

Tratamiento	pH		Clasificación
1	7.78 ± 0.14	a	Medianamente alcalino
2	7.69 ± 0.03	ba	Medianamente alcalino
3	7.84 ± 0.22	a	Medianamente alcalino
4	7.34 ± 0.23	c	Neutro
5	7.34 ± 0.23	c	Neutro
6	7.67 ± 0.21	ba	Medianamente alcalino
7	7.52 ± 0.07	bc	Medianamente alcalino
8	7.34 ± 0.04	c	Neutro

Es importante resaltar que los valores de pH en los suelos tratados tuvieron un comportamiento ascendente con respecto al pH de las condiciones iniciales del suelo de estudio, que fue de 5.52, esto a pesar que los tratamientos con cáscara de naranja disminuyeron, la concentración de sales disueltas en el extracto de saturación del suelo, no presentaron el mismo comportamiento el pH, que en lugar de mantenerse en el rango ácido, llegó a valores de neutros a medianamente alcalinos. Cabe aclarar, que las razones por las cuales existía la expectativa de que las aplicaciones de cáscara de naranja en sus diferentes condiciones, era que disminuyeran el pH, acidificando los extractos de saturación del suelo, y que la tendencia se debía a los ácidos orgánicos producidos por especies de *Penicillium*.

#### 4.5.3 Fósforo disponible

Del análisis estadístico del fósforo disponible en los suelos tratados y analizado a partir del diseño factorial fraccionado  $2^{5-2}$  se obtuvo la ecuación del modelo estadístico, con un coeficiente de correlación de 0.82, para el cual se eliminó en análisis de las interacciones entre los factores, puesto que no fueron significativas y aumentaban el error estadístico. Con ello fue posible observar, que los factores de mayor contribución fueron, primordialmente la humedad del suelo con 55.35%, seguido de la proporción de naranja (usada como fuente de carbono) y la paja a una relación N:P y el tamaño de cáscara de naranja, ambas con un 8.9% de contribución

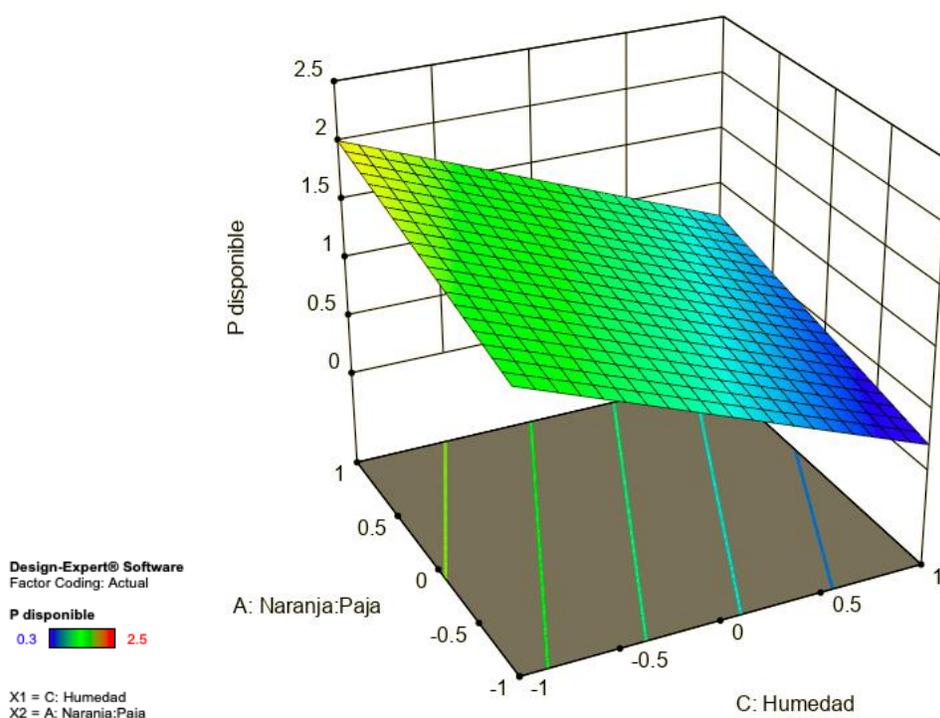
La ecuación se muestra a continuación, señalando los factores estadísticamente significativos con negritas.

$$P_{disponible} = 1.11 + \mathbf{0.257NP} + 0.2068C - \mathbf{0.641H} - \mathbf{0.256T} - 0.163FC$$

La humedad del suelo en su nivel más bajo (-1) con un porcentaje del 65% de humedad tuvo un efecto en el aumento de la disposición de fósforo asimilable en el suelo (p-value 0.0002), seguido de el tamaño del soporte, igualmente en su nivel bajo (-1) con un diámetro de 0.5 mm de cáscara de naranja (p-value 0.048) y finalmente la proporción naranja paja (p-value 0.047) en su nivel más alto (+1) con una proporción 1:2, es decir mayor cantidad de paja como fuente de carbono con respecto a la de naranja.

En la Figura 20, es posible observar en la parte superior derecha que los factores H (Humedad -1) y N:P(Naranja:Paja +) logran una mayor concentración de fósforo disponible. Este último aspecto, la proporción de naranja con respecto a la cantidad de paja como fuente de carbono, podría estar relacionada a lo que Scervino y colaboradores (2011) resaltan sobre la importancia de la producción de fuentes de carbono adecuadas, que permitan el crecimiento de los hongos solubilizadores de P, demostrando que la disponibilidad de fuentes de C fácilmente utilizables para aumentar la solubilización de P.

**Figura 20.** Interacción de factores estadísticamente significativos para la disposición de P asimilable



Como se ha mencionado con anterioridad, con el análisis de los tratamientos probados a lo largo del presente experimento se logró optimizar el proceso de aplicación de cáscara de naranja para disponer del fósforo de su forma no asimilable el suelo y con ello contemplar el efecto en la asimilación de sales de P (Tabla 19), además también se realizó una prueba de medias Tukey con un intervalo de confianza del 95%, donde se observa que los tratamientos que presentaron mayor concentración de P asimilable fueron los tratamientos 4, 5 y 6 pertenecientes al grupo estadístico a, con concentraciones de 2.30, 2.18 y 2.16 mg kg<sup>-1</sup> suelo respectivamente, en estos resultados se puede apreciar que la disposición de fósforo fue

altamente superior con respecto a la cantidad de fósforo en las condiciones iniciales del suelo que eran de 0.32 mg kg<sup>-1</sup>s, al aumentar hasta 2 mg de P o casi 7 veces más que las condiciones iniciales del suelo tratado. De estos tres tratamientos, el 4 fue el que presentó un mayor P asimilable, lo cual es consistente con ser el tratamiento que presentó una mayor disminución en la CE, tal tratamiento es el correspondiente a cáscara de naranja inoculada con especies de *Penicillium*, lo cual indica que este inóculo es capaz de aumentar la disposición de fósforo y por ende puede considerarse un inóculo solubilizador de fósforo.

Se observa como las aplicaciones de cáscara de naranja en las condiciones de relación naranja paja 1:1, con naranja colonizada a los seis días, una humedad del suelo de 65% con tamaño de soporte de 0.5 cm y fuente de carbono de paja de maíz propician la mayor disposición de P en el suelo. A pesar de lo anterior, de acuerdo con la clasificación de la NOM-021, esta concentración de fósforo continua dentro de los rangos bajos.

**Tabla 19** Fósforo asimilable de suelos tratados ex situ

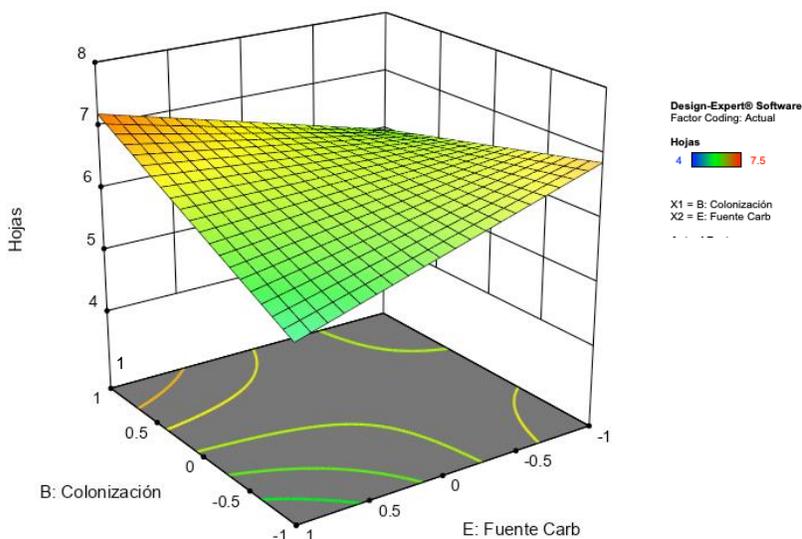
<b>Tratamiento</b>	<b>P mg kg<sup>-1</sup> suelo</b>
<b>1</b>	0.655± 0.01 b
<b>2</b>	0.423± 0.00 c
<b>3</b>	0.477± 0.00 c
<b>4</b>	2.306± 0.05 a
<b>5</b>	2.186± 0.02 a
<b>6</b>	2.165± 0.05 a
<b>7</b>	0.362± 0.01 c
<b>8</b>	0.333± 0.02 c

## 4.6 Bioensayos bajo invernadero en cultivo de lechuga

### 4.6.1 Bioensayo a partir de suelo biorremediado

En el actual bioensayo se analizaron datos fisiológicos en el crecimiento de plántulas de lechuga crecidas a partir de suelo biorremediado, los tratamientos fueron los mismos que los de la sección 4.5 *Optimización del sistema de remediación de suelo*, donde se analizaron los diferentes factores para el tratamiento del suelo que influenciaron la disminución de la salinidad y el aumento del fósforo disponible; en esta ocasión se analizaron las variables fitométricas de las plántulas de lechuga, a partir de tales tratamientos. De las variables analizadas mediante el diseño factorial  $2^{5-2}$  únicamente el número de hojas, la longitud de planta, longitud aérea y longitud radicular presentaron un coeficiente de correlación alto de 0.89, 0.73, 0.80 y 0.79, respectivamente. Lo cual indica, que los factores a los cuales fue sometido el suelo al ser biorremediado originó algún impacto en tales variables de respuesta en las plántulas de lechuga.

**Figura 21.** Interacción de factores estadísticamente significativos para la producción de hojas



De acuerdo con el análisis factorial realizado, el suelo biorremediado con factores como la humedad al 65% y la interacción entre la colonización con especies de *Penicillium* y la fuente de carbono de paja de maíz, dieron como resultado una mayor producción de hojas por planta con un 22% y 46% de contribución, respectivamente para tales factores de remediación en el sistema. Como se mencionó anteriormente, en la Figura 21, se observa en el extremo superior

izquierdo, que la mayor cantidad de hojas se presenta en suelos que fueron biorremediados con los factores de colonización y fuente de carbono en sus niveles más altos (+).

En la Tabla 20, se aprecia que la mayor producción de hojas en las plántulas de lechuga ocurrió en los tratamientos 3, 4 y 5, éstos dos últimos fueron suelos con condiciones similares de previa remediación, bajo condiciones en común como el tamaño de cáscara de naranja a 0.5 cm y proporción de naranja con paja. Por su parte los tratamientos 2, 5, 6, 7 y 8 tienen un comportamiento similar al control negativo o suelo que no fue remediado, con 6 hojas en todos los casos.

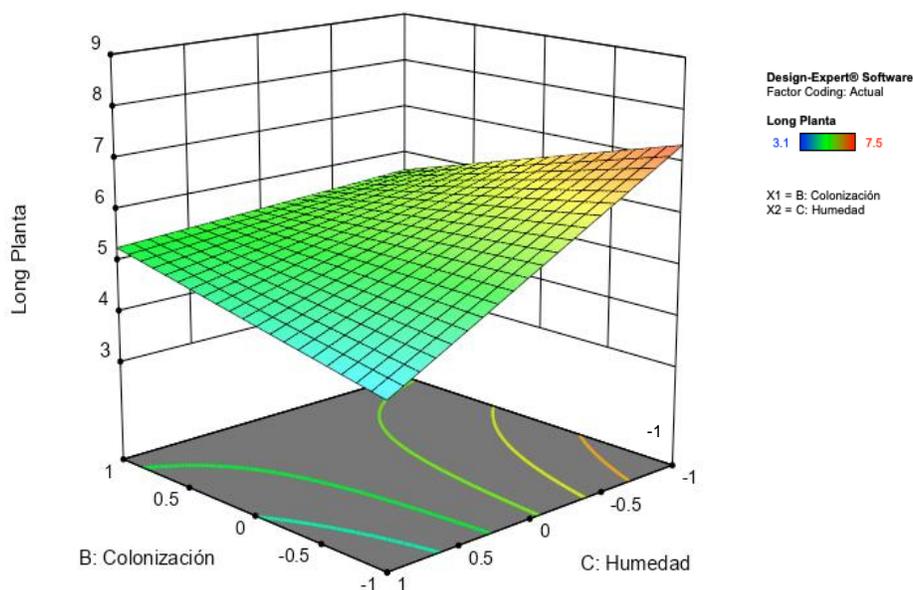
**Tabla 20** Número de hojas por planta en suelo biorremediado

<b>Tratamiento</b>	<b>Hojas</b>
<b>1</b>	4.60± 0.5 c
<b>2</b>	6.00± 0.0 b
<b>3</b>	7.00± 0.0 a
<b>4</b>	7.40± 0.5 a
<b>5</b>	7.40± 0.5 a
<b>6</b>	6.00± 0.0 b
<b>7</b>	6.20± 0.5 b
<b>8</b>	6.00± 0.4 b
<b>Control</b>	6.40± 0.5 b

La longitud total de las plántulas de lechuga crecida en suelos biorremediados con humedad en su nivel más bajo (-) y con la interacción de la colonización y la humedad en sus niveles altos (+) contribuyeron positivamente en la longitud de las lechugas, en un porcentaje del 40% y 25% respectivamente. Tal como se puede observar en la Figura 22, el extremo superior derecho indica que la naranja sin colonización y la humedad al 65% dieron las condiciones necesarias para que el suelo posterior a la biorremediación favoreciera el crecimiento total de las plantas de lechuga en su etapa temprana.

De acuerdo con la prueba de medias realizada (Tukey a 0.05), y con la Tabla 21, es posible apreciar que los tratamientos 5 y 7 no mostraron diferencias significativas presentando la mayor longitud de planta de 7.42, 7.26 y 7.74 cm, respectivamente. Es importante resaltar que estos tratamientos fueron adicionados con cáscara de naranja sin inóculo, tal como lo indica el análisis factorial fraccionado respectivo; seguidos de los tratamientos 3, 4 y 6, que presentaron una longitud de 5.70, 5.74 y 5.54 cm, respectivamente, tratamientos a los que les fue aplicada naranja con inóculo de *Penicillium*.

**Figura 22.** Interacción de factores estadísticamente significativos para la longitud de lechuga



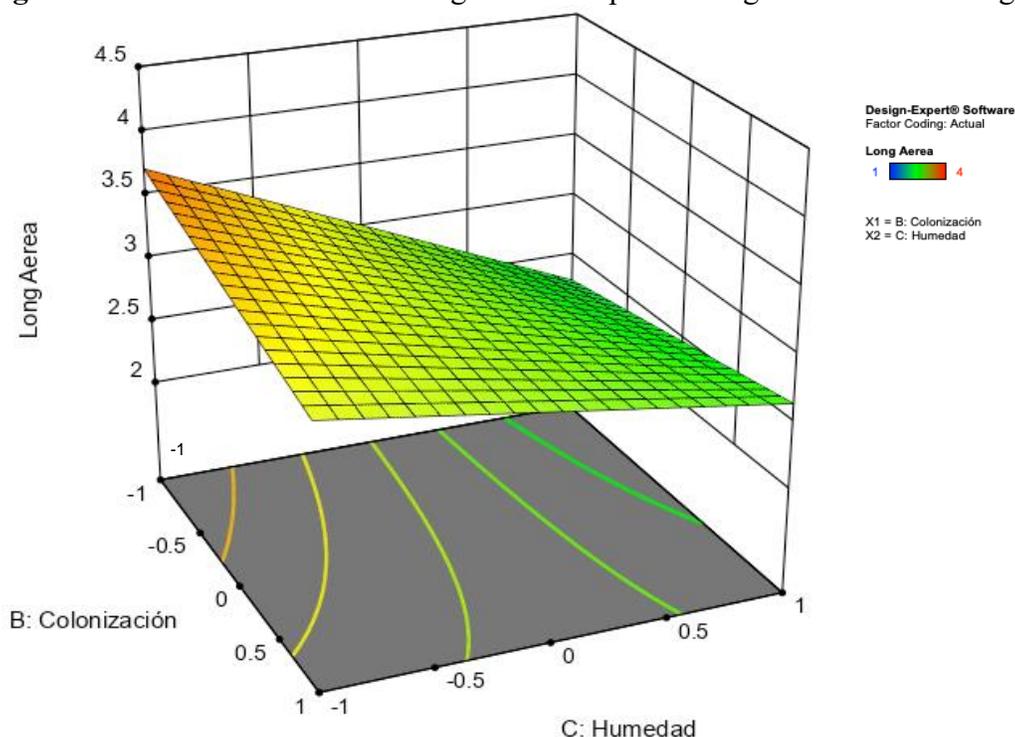
Por lo anteriormente explicado es posible inferir que los tratamientos de suelo que fueron tratados con inóculo fúngico de cáscara de naranja y a los que posteriormente se les acondicionó con plántulas de lechuga, dieron una menor longitud de planta en cm, contrario así a los tratamientos que tuvieron aplicaciones únicamente de cáscara de naranja (sin inóculo fúngico).

**Tabla 21** Longitud de planta en suelo biorremediado

Tratamiento	Longitud total
1	4.60± 0.5 c
2	3.50± 0.4 d
3	5.70± 1.3 b
4	5.74± 0.9 b
5	7.42± 0.3 a
6	5.54± 0.4 cb
7	7.26± 1.3 a
8	4.84± 0.4 cb
<b>Control</b>	7.74 ± 0.5 a

La longitud aérea de las plantas de lechuga fue mayor en los tratamientos que previamente sometieron al suelo a humedad al 65% con una contribución en el sistema de 61%, así como del tamaño de cáscara de naranja de 0.5 cm, sin inóculo fúngico, lo anteriormente explicado se observa en la parte superior izquierda de la Figura 23, donde se muestra el comportamiento bajo condiciones (-) de colonización y humedad.

**Figura 23.** Interacción de factores significativos para la longitud aerea de lechuga



Los tratamientos 5 y 7 modificaron positivamente la longitud aérea de la planta al arrojar 3.92 cm (a) y 3.52 cm (ab), tal como lo indicó el análisis factorial fraccionado, estos tratamientos habían sido sometidos a naranja sin inóculo fúngico y con una menor humedad en el suelo, lo cual de alguna forma logró darle las condiciones posteriores para dar tal efecto en la longitud aérea de la lechuga.

**Tabla 22** Longitud aerea de planta en suelo biorremediado

Tratamiento	Longitud aerea
1	2.42 ± 0.17 d
2	2.16 ± 0.23 d
3	2.68 ± 0.29 dc
4	3.30 ± 0.32 b
5	3.92 ± 0.37 a
6	3.02 ± 0.47 bc
7	3.52 ± 0.04 ba
8	2.62 ± 0.16 dc
<b>Control</b>	3.08 ± 0.97 bc

La longitud de las raíces de las plantas tuvieron una correlación alta con algunos de los factores a los que el suelo fue sometido, previo a la adición de las semillas de lechuga, entre ellos los principales fueron el factor humedad, que por si solo y con su interacción con la colonización del suelo, ambos en sus niveles menores (Figura 24).

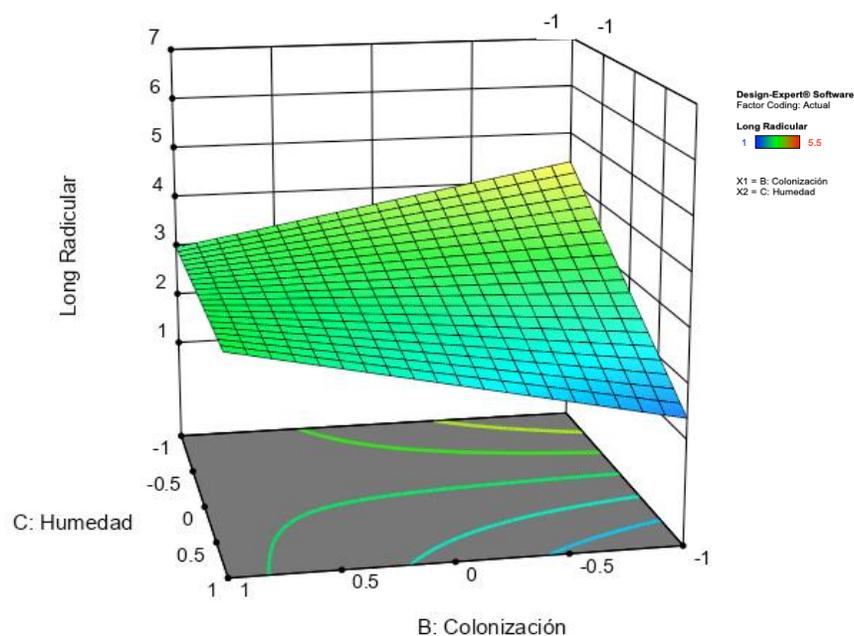
Esto es tratado previamente con una humedad del 65% y naranja sin colonización del inóculo fúngico, ambos con una contribución al sistema en un 33% en el caso de la humedad y 36% con su interacción con la colonización (H-C).

Con respecto a la prueba de medias (Tabla 23) la mayor producción de raíces de lechuga crecida en suelo biorremediado previamente, se dio en el tratamiento 7 con 5.30 cm de longitud, este tratamiento coincide con lo que indica el análisis factorial fraccionado y previamente no fue inoculado con el cultivo de *Penicillium* crecido en la cáscara de naranja aplicada. Los tratamientos 3 al 6 tuvieron el mismo comportamiento que el control negativo.

**Tabla 23** Longitud radicular de planta en suelo biorremediado

Tratamiento	Longitud radicular
1	1.66 ± 0.23 c
2	1.12 ± 0.17 c
3	3.28 ± 1.04 b
4	2.88 ± 0.32 b
5	3.58 ± 0.53 b
6	3.10 ± 0.14 b
7	5.30 ± 0.90 a
8	2.84 ± 0.56 b
<b>Control</b>	2.92 ± 0.54 b

**Figura 24.** Interacción de factores estadísticamente significativos para la longitud de raíz de lechuga



Por otro lado, para el análisis del resto de las variables posterior a la remediación, no se correlacionaron entre sí, aunque se realizó una prueba de medias (Tukey a 0.05), donde se observó que todas las variables de peso, fresco y seco de las plantas medidas mostraron diferencia estadística significativa entre tratamientos y a su vez entre el control negativo.

En la Tabla 24 se presentan los pesos frescos aéreos y totales de las plantas de lechuga, del peso correspondiente a sus hojas y el que incluye a las raíces. Para ambos casos los tratamientos 3 y 4 fueron de mayor peso en las plantas, siendo de 0.40 a 0.35 g, tales pesos fueron diferentes al control negativo que peso 0.21 g y 0.26 g, respectivamente, lo cual indica que los tratamientos de cáscara de naranja favorecieron el peso fresco de las plántulas de lechuga,

Cabe mencionar que el tratamiento 3 fue el que disminuyó en mayor medida la CE del suelo, así como aquel que se mantuvo neutro en el pH, por su parte el tratamiento 4 fue el que dispuso mayor concentración de P en el suelo, ambos casos podrían estar relacionados al aumento en el peso de las hojas de lechuga observado en el presente bioensayo.

**Tabla 24.** Peso fresco en suelo biorremediado

<b>Tratamiento</b>	<b>Peso fresco total</b>	<b>Peso fresco aereo</b>
1	0.18 ± 0.07 c	0.10±0.07 e
2	0.20± 0.02 bc	0.17± 0.01 dce
3	0.40± 0.09 a	0.36±0.08 a
4	0.43± 0.08 a	0.35±0.09 a
5	0.32± 0.17 ba	0.32±0.06 ba
6	0.31± 0.07 ba	0.26±0.03 bc
7	0.38± 0.08 a	0.20±0.02 dc
8	0.13± 0.02 c	0.14±0.03 de
Control	0.21± 0.10 bc	0.26±0.11 bc

La biomasa o el peso seco producido por las plántulas de lechuga para cada tratamiento mostraron diferencias estadísticas significativas entre ellos y el control negativo, siendo este último el de menor peso acumulado. Lo cual indica que la aplicación de cáscara de naranja mostró diferencias estadísticamente significativas en el peso seco de las plantas, donde los tratamientos con menor CE y mayor disposición de P en el suelo corresponden al aumento de peso en las hojas de lechuga (tratamiento 3 y 4 con 0.3 g).

Por su parte el peso seco radicular fue estadísticamente mayor en el tratamiento 7 (grupo a) con respecto al resto de los tratamientos y al control negativo, tal tratamiento fue sometido a aplicación de CN sin inóculo fúngico que tal como se observó en la Figura 23 este tratamiento está relacionado a la mayor longitud de la raíz en plántulas de lechuga, lo cual indica que existe una inhibición del crecimiento de raíz y peso seco de la misma cuando se realizan aplicaciones del inóculo fúngico.

**Tabla 25.** Peso seco en suelo biorremediado

<b>Tratamiento</b>	<b>Peso seco total</b>	<b>Peso seco aereo</b>
1	0.044± 0.01 <b>ced</b>	0.10±0.07 <b>e</b>
2	0.031±0.00 <b>e</b>	0.17± 0.01 <b>dce</b>
3	0.063±0.01 <b>cb</b>	0.36±0.08 <b>a</b>
4	0.048±0.01 <b>bc</b>	0.35±0.09 <b>a</b>
5	0.068±0.01 <b>b</b>	0.32±0.06 <b>ba</b>
6	0.034±0.00 <b>ed</b>	0.26±0.03 <b>bc</b>
7	0.094±0.02 <b>a</b>	0.20±0.02 <b>dc</b>
8	0.052±0.00 <b>bcd</b>	0.14±0.03 <b>de</b>
Control	0.052±0.01 <b>bcd</b>	0.26±0.11 <b>bc</b>

#### **4.6.2 Bioensayo de Fitotoxicidad: Límite máximo permisible**

Con el fin de conocer la dosis máxima de aplicación de cáscara de naranja inoculada (CNI) y cáscara de naranja sin inóculo (CN) en el suelo, se realizó el análisis estadístico para conocer el porcentaje de aplicación más favorable para el crecimiento de lechuga y con ello evaluar su capacidad como biofertilizante además de observar en su caso, la dosis que provoca un efecto inverso o fitotóxico en el desarrollo de las plantas.

Se evaluaron los tratamientos con naranja colonizada y sin colonizar a varios porcentajes de aplicación de, 0.5%, 2%, 3%, 4% y un control negativo. El comportamiento de las variables medidas en las plantas de lechuga, fue diferente para el caso de aplicaciones con inóculo y sin él, por lo cual a continuación se presenta el análisis para cada uno de ellos.

##### **Aplicación de cáscara de naranja con inóculo fúngico**

La aplicación de cáscara de naranja con inóculo de especies de *Penicillium*, influyó de forma distinta en las diferentes variables de respuesta medidas en plántulas de lechuga de acuerdo con las diferentes dosis aplicadas.

Es importante señalar que en las variables relacionadas a la parte aérea de la planta, esto es relacionadas a las hojas de las plántulas de lechuga, como la cantidad de hojas, la longitud, peso fresco y seco de las mismas, presentaron un patrón en su comportamiento, donde se observa que el control negativo y el tratamiento con dosis de aplicación de CNI más alta, al 4%, fueron similares estadísticamente originando los valores más altos en cada una de las variables de respuesta mostradas (Tabla 26), con excepción de la longitud aérea de las hojas donde nuevamente el control presentó los valores más altos, pero esta vez su comportamiento fue similar al tratamiento con el 3% de aplicación de CNI. En los dos casos mencionados anteriormente, se trata de las dosis más altas de CNI y su similitud con el control negativo (suelo sin aplicación alguna), donde las plantas tuvieron un mayor desarrollo aéreo; contrario a los tratamientos de menor dosis aplicada al suelo que a su vez mostró los menores índices de crecimiento en las hojas de lechuga, es decir que a los porcentajes de aplicación más bajos como el 0.5, 2 y 3% tienen una relación inversamente proporcional al crecimiento aéreo; siendo por ende la dosis más baja (0.5%) la de menor desarrollo de hojas, longitud aérea, peso fresco y peso seco con 6, 2.40, 0.163 y 0.035 respectivamente.

**Tabla 26.** Variables fitométricas de lechuga a partir de diferentes dosis de CNI

Tratamiento Dosis	Hojas	Longitud aerea	Peso fresco aereo	Biomasa aerea
0.5%	6.00±0.0 <b>b</b>	2.40±0.1 <b>b</b>	0.163±0.03 <b>b</b>	0.035±0.00 <b>b</b>
2%	7.00±0.0 <b>ba</b>	2.60±0.2 <b>b</b>	0.220±0.06 <b>ba</b>	0.043±0.00 <b>ba</b>
3%	6.33±0.5 <b>ba</b>	3.10±0.3 <b>a</b>	0.177±0.01 <b>b</b>	0.051±0.02 <b>ba</b>
4%	7.33±0.5 <b>a</b>	2.40±0.1 <b>b</b>	0.263±0.03 <b>a</b>	0.061±0.00 <b>a</b>
Control	6.66±1.1 <b>ba</b>	3.10±0.3 <b>a</b>	0.297±0.05 <b>a</b>	0.064±0.01 <b>a</b>

El fenómeno anteriormente descrito, puede ser atribuido a la competencia de los nutrientes disponibles en el suelo entre el inóculo fúngico aplicado y la planta en crecimiento, tal como lo indica Scervino y colaboradores (2011), los microorganismos pueden considerarse competidores de nutrientes para las plantas. Por ello es posible deducir que en las dosis más bajas de aplicación de CNI con la fuente de carbono aplicada y la misma naranja como soporte sólido, no fueron una fuente nutrimental suficiente para el mismo inóculo, por lo cual los hongos pudieron comenzar a absorber nutrientes del suelo para incrementar su población o sobrevivir a las condiciones del suelo y pudieron así comenzar a competir por los nutrientes que serían disponibles para las plantas. Por ello, la dosis más alta de CNI al 4%, resultó suficiente para abastecer las necesidades de las especies de *Penicillium* inoculadas y con ello no interferir en la nutrición de las plantas y permitir el máximo crecimiento de las plántulas de lechuga, al igual que sucedió en los suelos del control negativo, el cual no se le adicionó inóculo y tuvo comportamiento estadísticamente similar a la CNI al 4%.

Con lo anteriormente mencionado, se plantea la hipótesis de que el hongo compite con la planta por los nutrientes del suelo, sin embargo, sería interesante analizar los mismos aspectos en plantas de lechuga con mayor tiempo de monitoreo a lo largo de su crecimiento, para analizar si la competencia mencionada es únicamente al inicio del periodo adaptativo del hongo y si a largo plazo *Penicillium* es capaz de establecer una relación simbiótica con las plantas de lechuga y si en ésta relación, la planta puede beneficiarse a partir de tal relación.

Por otro lado, en la Tabla 26, es posible apreciar el comportamiento de la longitud de toda la planta, así como de su raíz y el peso seco y fresco de la misma, en estos parámetros no se apreció el mismo fenómeno que en la Tabla 27. Dado que, en las variables de biomasa total

y peso fresco el control negativo (a) presentó un mayor peso en gramos con 0.348 y 0.077 respectivamente, con un comportamiento similar con los tratamientos al 2, 3 y 4% (ba).

**Tabla 27.** Variables fitométricas de lechuga a partir de diferentes dosis de CNI

Tratamiento Dosis	Longitud de planta	Longitud radicular	Peso fresco total	Biomasa total
0.5%	7.53±0.15 <b>ba</b>	5.13±0.11 <b>ba</b>	0.199±0.01 <b>b</b>	0.045±0.00 <b>b</b>
2%	8.46±0.83 <b>a</b>	5.86±0.68 <b>a</b>	0.262±0.07 <b>ba</b>	0.052±0.00 <b>ba</b>
3%	8.06±0.70 <b>a</b>	4.96±0.35 <b>b</b>	0.287±0.12 <b>ba</b>	0.065±0.02 <b>ba</b>
4%	6.46±0.30 <b>c</b>	4.06±0.35 <b>c</b>	0.309±0.03 <b>ba</b>	0.072±0.00 <b>ba</b>
Control	6.96±0.05 <b>bc</b>	3.86±0.32 <b>c</b>	0.348±0.06 <b>a</b>	0.077±0.01 <b>a</b>

Con respecto a la longitud radicular observada la mayor producción de raíces se presentó en la aplicación de CNI al 2% con 5.86 cm (a) no presentando diferencias significativas con el tratamiento al 0.5% y 5.13 cm (ba), lo cual indica que las dosis más bajas de aplicación de CNI favorecen o estimulan el crecimiento de la raíz comparado con el control negativo que mostró una longitud de 3.86 cm (c). La longitud de la raíz influyó en los valores de la longitud total de la planta, variable en la cual los tratamientos con aplicación de CNI al 2%, conjuntamente con el de 3% y 0.05% presentaron una mayor longitud total con respecto al control, lo cual podría indicar cierta estimulación en el crecimiento de las plantas a partir de la integración del inóculo fúngico. Por su parte la aplicación de mayor dosis (4%) mostró un comportamiento similar al del control negativo, por lo cual la aplicación en esta cantidad podría no ser recomendada si se desea más altura de las plantas, sin embargo, en el caso de las plantas de lechuga, al parecer este no es un parámetro comercial de interés.

Cabe mencionar que los tratamientos a dosis altas favorecieron el crecimiento aéreo y las dosis bajas de inóculo aumentaron el crecimiento radicular, por lo cual sería interesante realizar estudios con más especies de plantas para validar el mismo comportamiento y tomar decisiones de aplicación con base en el órgano de la planta (raíz u hojas), que tenga un mayor valor comercial; en este caso las dosis más altas de CNI son las óptimas para el desarrollo de hojas de lechuga.

### Aplicación de cáscara de naranja sin inóculo fúngico

Las dosis aplicadas de cáscara de naranja sin inóculo (CN), mostraron comportamientos distintos a los de la cáscara de naranja con inóculo fúngico (CNI), en este caso las características de las plántulas de lechuga que tuvieron un comportamiento similar entre ellas se presentan en la Tabla 28, donde en todas las variables mostradas la dosis al 0.5% dieron los mayores valores con 3.73 cm de longitud de hojas, 0.56 g de peso fresco de hojas, 0.69 g de peso fresco total de la planta y 0.139 g de peso seco, lo anterior con respecto al resto de los tratamientos y al control negativo evaluado.

En el caso de la biomasa total o peso seco de toda la planta todas las dosis aplicadas fueron superiores y estadísticamente distintas al testigo, el peso fresco aéreo o peso de las hojas fue mayor en los tratamientos a dosis de 0.5% y 4% de CN, comparado con el resto de los tratamientos y el control negativo.

**Tabla 28.** Variables fitométricas de lechuga a partir de diferentes dosis de CN

Tratamiento Dosis	Longitud Aerea	Peso fresco aereo	Peso fresco total	Biomasa total
0.5%	3.73±0.37 a	0.569±0.06 a	0.695±0.01 a	0.139±0.01 a
2%	2.93±0.30 b	0.351±0.04 bc	0.480±0.07 bc	0.106±0.01 ba
3%	2.73±0.40 b	0.301±0.08 bc	0.397±0.12 bc	0.100±0.00 ba
4%	3.13±0.15 b	0.452±0.19 ba	0.557±0.03 ba	0.136±0.07 a
Control	3.10±0.17 b	0.258±0.01 c	0.288±0.06 c	0.067±0.00 b

La mayor producción de hojas se presentó a partir de las dosis de aplicación de 2% y 4%, los tratamientos a 0.5%, 3% y el control fueron similares estadísticamente entre sí, con 6 hojas producidas en promedio. La longitud de la planta desde la raíz hasta la punta de las hojas sucedió en los tratamientos de menores dosis, los cuales fueron estadísticamente diferentes al testigo y a los tratamientos de mayor aplicación de CN; lo anterior fue contrario al comportamiento de la longitud de la raíz, que fue mayor conforme la dosis de aplicación de CN incrementó. El peso seco, se comportó igual en todos los tratamientos, por lo cual no existió diferencia estadística significativa entre ellos y por tanto no influyó la concentración de CN aplicada al suelo sembrado con lechuga.

**Tabla 29.** Variables fitométricas de lechuga a partir de diferentes dosis de CN

Tratamiento Dosis	Hojas	Longitud de planta	Longitud radicular	Biomasa aerea
0.5%	6.33±0.57 <b>b</b>	8.56±0.30 <b>ba</b>	4.83±0.40 <b>b</b>	0.114±0.01 <b>a</b>
2%	7.00±0.00 <b>ba</b>	8.90±0.52 <b>a</b>	5.96±0.61 <b>a</b>	0.080±0.01 <b>a</b>
3%	6.00±1.00 <b>b</b>	7.86±0.35 <b>bc</b>	5.13±0.51 <b>ba</b>	0.079±0.01 <b>a</b>
4%	7.66±0.57 <b>a</b>	8.23±0.76 <b>ba</b>	5.10±0.70 <b>ba</b>	0.114±0.07 <b>a</b>
Control	6.00±0.00 <b>b</b>	7.26±0.40 <b>c</b>	4.16±0.35 <b>b</b>	0.057±0.00 <b>a</b>

Es importante retomar los resultados de CNI contra los de CN, y tomar en cuenta que las variables de longitud y de peso de lechuga tuvieron un desarrollo considerablemente mayor sin la presencia del inóculo fúngico, comparado con el desarrollo obtenido con el inóculo, el cual fue menor incluso que el control negativo.

#### 4.6.3 Fitotoxicidad: Tiempo mínimo de siembra

Como estrategia para conocer si las plantas de lechuga pueden llevar a cabo su crecimiento sin sufrir daños por la aplicación de cáscara de naranja, se evaluaron diferentes tiempos de aplicación después de la siembra de lechuga, con el fin de establecer el momento ideal para la aplicación de CNI y CN al suelo después de la siembra. Al final del experimento se midieron los parámetros fitométricos de las plantas cuyas medias y su comparación se presentan en la Tabla 30 y 31.

La comparación de medias realizada en tratamientos colonizados y no colonizados, indica que la producción de biomasa total, biomasa aérea, peso fresco aéreo y peso fresco total fue favorecida en el tratamiento 2CN, el cual fue aplicado a los siete días después de la siembra, los resultados pertenecieron al grupo estadístico **a** con una media de 0.198, 0.158, 0.731 y 0.897 g respectivamente, tal como se observa en la tabla 30.

En todas las variables mostradas el tratamiento aplicado a los 7 DDS fue el mejor con respecto al resto de los tratamientos, incluso aquellos inoculados con especies de *Penicillium*, lo cual quiere decir que el inóculo fúngico no favorece o estimula el crecimiento de las plántulas de lechuga y que en ninguno de los tiempos de aplicación evaluados la CNI funciona como biofertilizante.

**Tabla 30.** Parámetros fisiológicos a diferentes tiempos de aplicación.

DADS	Tratamiento	Biomasa total (g)	Biomasa aérea (g)	Peso fresco Aéreo (g)	Peso fresco total (g)
0	1 CN	0.091±0.01 <b>cb</b>	0.076±0.01 <b>cb</b>	0.363±0.03 <b>b</b>	0.440±0.04 <b>bc</b>
7	2 CN	0.198±0.02 <b>a</b>	0.158±0.02 <b>a</b>	0.731±0.09 <b>a</b>	0.897±0.13 <b>a</b>
14	3 CN	0.088±0.04 <b>cb</b>	0.077±0.03 <b>cb</b>	0.342±0.15 <b>b</b>	0.379±0.17 <b>bcd</b>
21	4 CN	0.070±0.01 <b>cd</b>	0.060±0.01 <b>cd</b>	0.302±0.04 <b>b</b>	0.334±0.05 <b>bcde</b>
34	5 CN	0.094±0.02 <b>cb</b>	0.074±0.01 <b>cb</b>	0.310±0.01 <b>b</b>	0.322±0.07 <b>cdef</b>
Control	6C	0.091±0.00 <b>cb</b>	0.057±0.00 <b>cde</b>	0.258±0.01 <b>b</b>	0.288±0.01 <b>def</b>
0	1 CNI	0.046±0.01 <b>de</b>	0.036±0.01 <b>de</b>	0.171±0.09 <b>b</b>	0.214±0.10 <b>def</b>
7	2 CNI	0.038±0.01 <b>de</b>	0.030±0.01 <b>de</b>	0.153±0.05 <b>b</b>	0.180±0.05 <b>fg</b>
14	3 CNI	0.085±0.02 <b>c</b>	0.074±0.01 <b>cb</b>	0.352±0.08 <b>b</b>	0.307±0.07 <b>cdef</b>
21	4 CNI	0.034±0.02 <b>e</b>	0.029±0.02 <b>e</b>	0.405±0.52 <b>b</b>	0.123±0.00 <b>g</b>
34	5 CNI	0.122±0.00 <b>b</b>	0.101±0.01 <b>b</b>	0.371±0.04 <b>b</b>	0.470±0.07 <b>b</b>
Control	6 C	0.067±0.03 <b>cde</b>	0.073±0.03 <b>cb</b>	0.336±0.10 <b>b</b>	0.412±0.12 <b>bcd</b>

Prueba de Medias LSD. CN= Cáscara de naranja sin inóculo  
CNI = Cáscara de naranja inoculada. DADS: Día de aplicación después de la siembra

Por su parte las plantas pertenecientes al control negativo, las cuales no se sometieron a ninguna aplicación, fueron considerablemente inferiores al tratamiento de mejor comportamiento el cual fue a 7 DDS con cáscara de naranja no inoculada, lo cual podría indicar que este tratamiento está influenciando el incremento de la biomasa de la planta, así como del peso fresco de las hojas y peso del total de la planta, siendo así como este tratamiento está funcionando como un estimulante del crecimiento y con ello actuando bajo una acción de biofertilizante. Por otro lado, los tratamientos de cáscara de naranja con inóculo fúngico mostraron los valores más bajos en el desarrollo de biomasa total y aérea y peso fresco total y aéreo, los cuales pertenecieron a grupos estadísticos e, de, b y fg respectivamente, los cuales son diferentes al tratamiento de mejor comportamiento y a los controles negativos utilizados, estando muy por debajo a tales tratamientos.

En la Tabla 31, se observa que, los tratamientos con aplicación al momento de la siembra y a los 7 DDS (1 CN y 2 CN) favorecen y estimulan el crecimiento de mayor número de hojas ambos pertenecen al mismo grupo estadístico con 9 hojas, y estos tratamientos son diferentes al resto, incluyendo al control negativo, que conjuntamente con la aplicación de CNI a los 0, 7, 21 y 34 DDS fueron los tratamientos con menor número de hojas, nuevamente el inóculo fúngico influyó negativamente en la producción de hojas de lechuga.

**Tabla 31.** Parámetros fisiológicos a diferentes tiempos de aplicación

DADS	Tratamiento	Longitud de planta Cm	Longitud radicular cm	Número de hojas
0	1 CN	8.16±0.15 <b>bcd</b>	4.80±0.34 <b>bcd</b>	9.33±0.57 <b>a</b>
7	2 CN	11.63±0.70 <b>A</b>	7.83±1.00 <b>a</b>	9.00±1.00 <b>a</b>
14	3 CN	7.66±0.76 <b>cde</b>	4.56±1.22 <b>cd</b>	7.00±1.00 <b>bcd</b>
21	4 CN	6.26±0.25 <b>Fg</b>	3.23±0.25 <b>ef</b>	6.66±0.57 <b>cd</b>
34	5 CN	5.83±0.28 <b>G</b>	2.86±0.25 <b>f</b>	6.66±0.57 <b>dc</b>
Control	6C	7.26±0.40 <b>def</b>	4.16±0.35 <b>de</b>	6.00±0.00 <b>d</b>
0	1 CNI	7.96±0.05 <b>bcde</b>	4.46±0.30 <b>cd</b>	6.00±0.57 <b>d</b>
7	2 CNI	6.86±0.55 <b>efg</b>	3.76±0.20 <b>def</b>	6.66±1.00 <b>cd</b>
14	3 CNI	8.80±0.60 <b>B</b>	5.70±0.52 <b>b</b>	7.66±1.00 <b>abc</b>
21	4 CNI	6.50±0.50 <b>gf</b>	4.36±0.32 <b>d</b>	6.00±0.57 <b>d</b>
34	5 CNI	8.40±1.21 <b>bc</b>	5.56±0.97 <b>bc</b>	6.33±0.57 <b>cd</b>
Control	6 C	7.66± 1.00 <b>cde</b>	4.33±1.01 <b>de</b>	6.66±0.00 <b>cd</b>

Prueba de Medias LSD. CN= Cáscara de naranja sin inoculo  
CNI = Cáscara de naranja inoculada. DADS: Día de aplicación después de la siembra

La longitud de la raíz, así como la longitud de las plantas completas, se comportaron de forma similar pues en ambos casos el tratamiento con mayor longitud fue el de aplicación a los 7 DDS de CN, con longitudes de 8.16 cm de planta y 4.80 cm de raíz, perteneciendo ambas al grupo estadístico a, lo cual las diferenció del resto de los tratamientos incluyendo al control negativo el cual dio la menor longitud en todos los casos. El tratamiento de aplicación de CNI a los 14 DDS perteneció al grupo b y fue el segundo tratamiento que mejoró la longitud de raíz y de planta en relación con el resto de los tratamientos, con 5.7 cm y 8.8 cm respectivamente; cabe mencionar que para los tratamientos de CNI este fue el único que no inhibió el crecimiento de las raíces, puesto los tiempos de aplicación a los 0, 7 y 21 DDS disminuyeron la longitud de las raíces.

Xiao y Wu en 2014 señalaron que los ácidos orgánicos pueden acumularse bajo ciertos ambientes, dando como resultado el envenenamiento y la disminución del crecimiento de las plantas, los autores observaron que una gran cantidad de ácidos orgánicos como los ácidos fenólicos inhibieron el crecimiento normal de las plantas actuando como aleloquímicos para cambiar la microflora. Lo anteriormente mencionado podría explicar la inhibición en el desarrollo de las plantas de lechuga existente a partir de la aplicación de diferentes dosis y a diferentes tiempos de aplicación, dado que en el presente trabajo se comprobó que la cáscara

de naranja inoculada es capaz de producir los ácidos fórmico y acético. Los cuales al igual que el ácido fenólico podrían estar causando efectos alelopáticos en las plantas de lechuga. Ello puede sostenerse a partir de recordar que las aplicaciones de cáscara de naranja sin inóculo no provocaron tal efecto de inhibición del crecimiento y que en la naranja sin inóculo no cuenta con la presencia de los ácidos acético y fórmico.

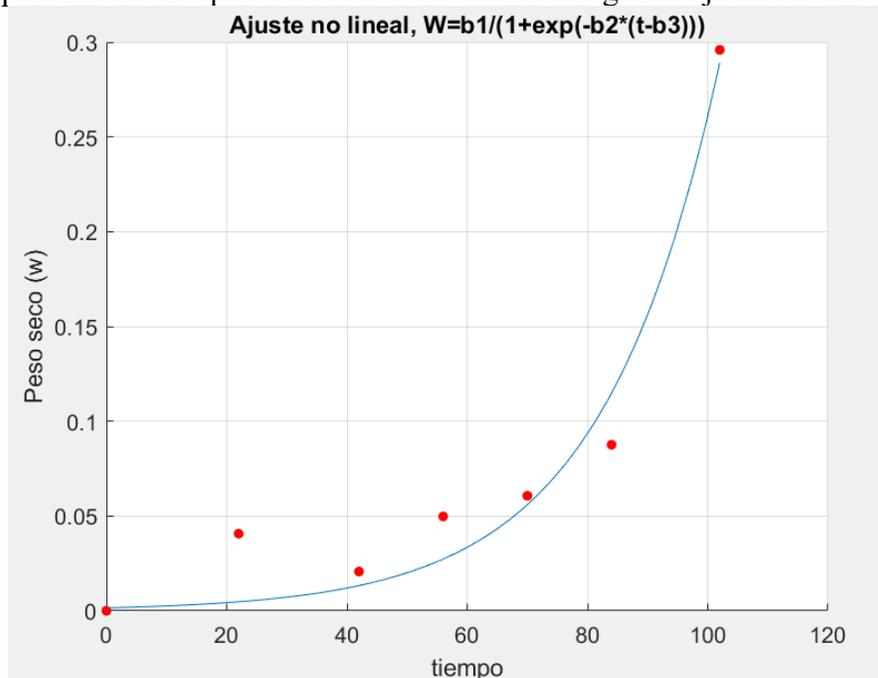
Estudios más a fondo sobre las concentraciones de los ácidos orgánicos en la cáscara de naranja podrían comprobar la hipótesis anteriormente planteada, atribuyendo el efecto inhibitorio de las plantas a la presencia de los ácidos fórmico y acético, o al incremento observado de los ácidos naturalmente determinados en la cáscara de naranja, pero visiblemente incrementados en su concentración ante la presencia de *Penicillium* inoculadas, como el ácido glucónico y succínico.

#### 4.6.4 Eficiencia fisiológica y dinámica de crecimiento

La eficiencia fisiológica de la producción de biomasa o peso seco producido en las plantas de cada tratamiento fue analizada a través del modelo matemático propuesto por los autores Carranza y colaboradores (2009), en el cual se describe el comportamiento de lechuga en un suelo salino sódico, donde ya se contempla una reducción en los parámetros de crecimiento, debido a dicha salinidad del suelo.

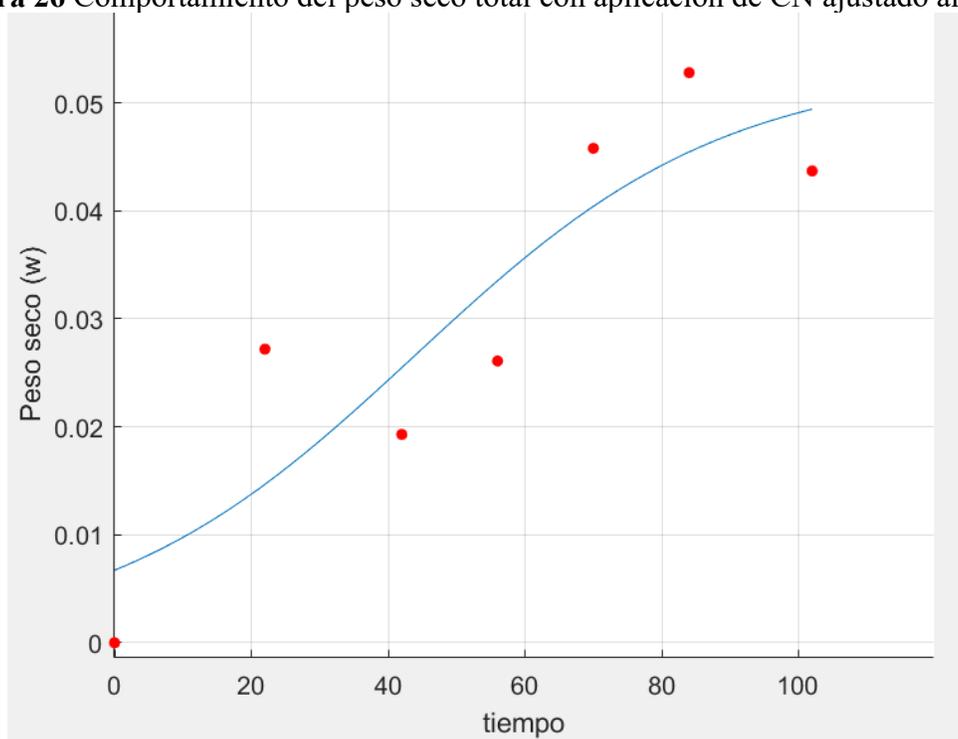
Los resultados mostraron que el control negativo o suelo sin tratar tiene un coeficiente de determinación de 0.71, cabe mencionar que es el tratamiento de menor ajuste con respecto a los suelos tratados, lo cual quiere decir que la biomasa de las plantas de lechuga se ajusta al modelo propuesto, pero en menor medida que los suelos con CN y CNC. Lo anteriormente descrito podría deberse a que el suelo control no sufrió los efectos de remediación a partir de los tratamientos de cáscara de naranja y este continuaba con salinidad; a pesar de lo anterior, el peso seco a través del tiempo creció de manera progresiva y ajustado al modelo se observa en la Figura 25.

**Figura 25** Comportamiento del peso seco total en el control negativo ajustado al modelo



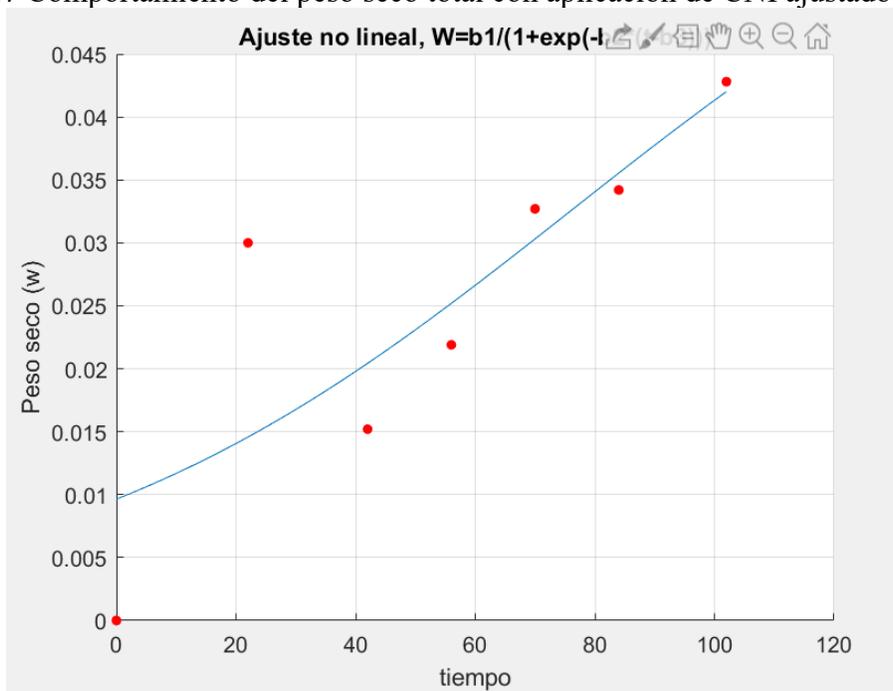
El comportamiento de las plantas de lechuga fue progresivo a lo largo del tiempo a partir de la aplicación de cáscara de naranja sin inóculo (CN), éste se ajustó mejor que el suelo control en el modelo matemático propuesto, dado que el coeficiente de determinación mostró un valor de 0.91. El comportamiento del peso seco o biomasa ajustado al modelo, se observa en la Figura 26, donde los puntos corresponden a los promedios de cada muestreo y el ajuste al modelo matemático se señala de color azul.

**Figura 26** Comportamiento del peso seco total con aplicación de CN ajustado al modelo



Con respecto al tratamiento correspondiente a las plantas de lechuga crecidas en suelo previamente sometido a la aplicación de cáscara de naranja inoculada (CNI), se obtuvo el coeficiente de correlación más alto entre los tratamientos evaluados, con un valor de 0.9436 por lo cual se observa que el modelo matemático propuesto se ajusta de igual en mayor medida que lo hace el control negativo y la cáscara de naranja sin inóculo (Figura 27). Este fenómeno podría deberse a diversos factores que no se estudiaron en el presente trabajo, sin embargo, la información sobre el incremento de la biomasa a través del tiempo permitió evaluar el resto de los parámetros de crecimiento de la lechuga, mismos que se presentan a continuación.

**Figura 27** Comportamiento del peso seco total con aplicación de CNI ajustado al modelo



El monitoreo a lo largo del tiempo, de índices de crecimiento de plántulas de lechuga *var. italiana* bajo tratamientos de aplicación de CNI, CN y un control negativo. Permitieron obtener parámetros de eficiencia fisiológica como la tasa relativa de crecimiento (TRC), el índice de área foliar (IAF), la tasa de asimilación neta (TAN), el área foliar específica (AFE) y la relación de área foliar (RAF). Los indicadores de crecimiento anteriores están estrechamente relacionados con su método de obtención, que involucra el cambio en la biomasa a través del tiempo ( $dw/dt$ ), por lo tanto, el comportamiento de cada uno de los siguientes factores indica la eficiencia fisiológica de crecimiento a partir de la aplicación de los diferentes tratamientos.

Es destacable mencionar que para los tres tratamientos (CN, CNI y control) el crecimiento a lo largo de los 102 días de evaluación fue muy limitada en su valor a pesar de ser analizados durante un intervalo mayor de tiempo, con respecto a estudios de otros autores (Archila, 1998; Carranza et. al., 2009) en el cultivo de lechuga donde fueron descritos con valores máximos de TRC de 0.1164, IAF de 12.7, AFE con 497.55 y RAF de 483.38, en la presente investigación los índices obtenidos muestran un comportamiento muy por debajo a los

mencionados anteriormente, al ser un fenómeno generalizado en los tres tratamientos podría atribuirse a algún factor experimental o ambiental al que las plantas fueron sometidas.

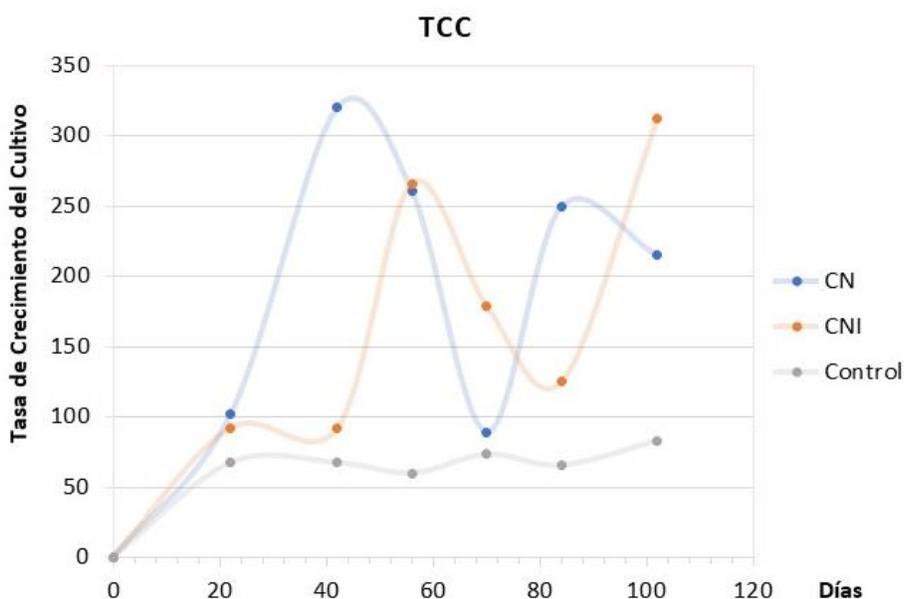
De acuerdo con Archila et al. (1998), la Tasa Relativa de Crecimiento (TRC) expresa el incremento de masa seca de la planta de lechuga en un intervalo de tiempo, tomando como referencia el valor inicial de la masa seca producida y la acumulada, ello lo convierte en un índice de eficiencia que expresa el crecimiento en términos de una tasa de incremento en el tamaño por unidad de tamaño y tiempo ( $\text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$ ).

En términos generales la TCR indica la eficiencia de la planta como productor de nuevo material y depende de la fotosíntesis total y de la respiración, además se propone como una medida que integra el comportamiento fisiológico de las plantas a partir de la medida del balance entre la capacidad potencial de fotosíntesis y el costo respiratorio de la planta.

En la Figura 28, se observa el comportamiento de la TRC en los y tratamientos que se aplicó CN, CNI y el control negativo a lo largo del tiempo, la TRC máxima alcanzada a lo largo del ensayo fue de 0.0962 y 0.0916  $\text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$  en el caso del control y la CNI, respectivamente, en ambos casos este fenómeno de mayor potencial de crecimiento de material vegetativo nuevo sucedió al día 40 DS. El CN arrojó su mayor TRC en el día 20 DDS, con un valor de 0.05  $\text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$ , valor que fue menor con respecto al resto de los tratamientos.

En todos los tratamientos, a partir del día 60 DS los valores del TRC decrecieron de manera que se mantuvieron dentro de valores similares culminando al día 102 de muestreo en los valores de 0.01 y 0.095  $\text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$  para la CN y CNI, respectivamente. Por su parte el control término con el menor TCR con 0.0054  $\text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$ . De acuerdo con Carranza y colaboradores (2009), los valores altos iniciales de la RAF pueden ser debido a que las plantas utilizan sus fotoasimilados en mayor cantidad para el desarrollo y crecimiento de las áreas fotosintéticamente activas, generando gastos energéticos, lo que conlleva a menor peso.

**Figura 28** Tasa Relativa de Crecimiento en plántulas de lechuga ( $\text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$ )

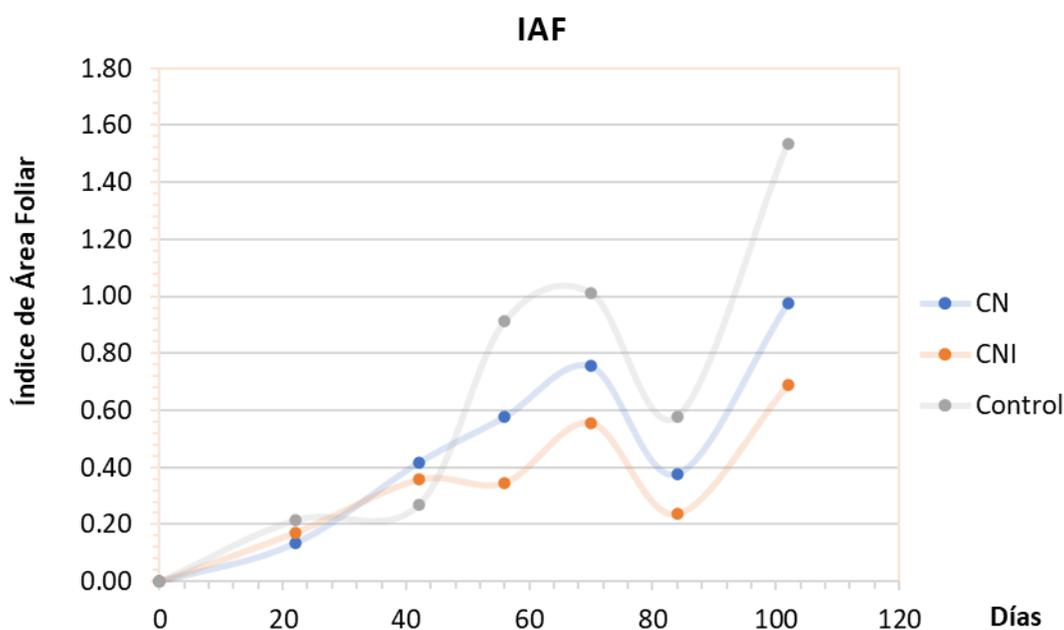


El índice de área foliar en plantas de lechuga señala la superficie de la hoja por unidad de área de superficie ocupada por la planta, y normalmente aumenta con el crecimiento del cultivo hasta alcanzar un valor máximo en el cual se alcanza la máxima capacidad para interceptar la energía solar (Hunt, 1982). En el presente ensayo, el índice mayormente alcanzado entre los tratamientos fue por el control, seguido de la cáscara de naranja sin inocular y el mínimo valor en la capacidad de captar la energía solar fue en las plantas sometidas al tratamiento de inóculo fúngico, con un valor de 1.53, 0.97 y 0.68 respectivamente (Figura 29).

Es importante observar que el índice de área foliar se comportó de forma muy similar en los tres tratamientos probados, y en los tres casos su valor máximo está muy por debajo de estudios antes realizados, ejemplo de ello es el IAF registrado en plantas de lechuga bajo crecimiento en un suelo salino sódico que en este caso fue de 6.78 a los 61 días después del trasplante. Este índice aun es considerado bajo con respecto a otros estudios y esto es debido a que existe por si mismo un decremento por el estrés osmótico atribuido al sodio del suelo, afectando a la fotosíntesis de las plantas (Carranza et. al., 2009).

De acuerdo con Curtis y Läuchli (1986), la reducción del IAF es causada por una disminución en el incremento de biomasa por unidad de área foliar y por la disminución en la proporción de masa seca acumulada en los tejidos foliares, ambas relacionadas a la disminución de peso seco de las plantas, es interesante retomar que con respecto a otros estudios el IAF fue menor que en otros estudios y su valor máximo llevó 102 días, lo cual supera el ciclo productivo de la lechuga, sin embargo, dado que en los tres tratamientos el comportamiento de la IAF tuvo tendencias similares entre ellos, se puede adjudicar tal decremento a las condiciones experimentales del suelo o del ambiente al cual los tratamientos fueron sometidos. No obstante, es factible deducir que los tratamientos con cáscara de naranja no resultaron en un mejorador de suelo, como podría esperarse.

**Figura 29** Índice de Área Foliar en plántulas de lechuga

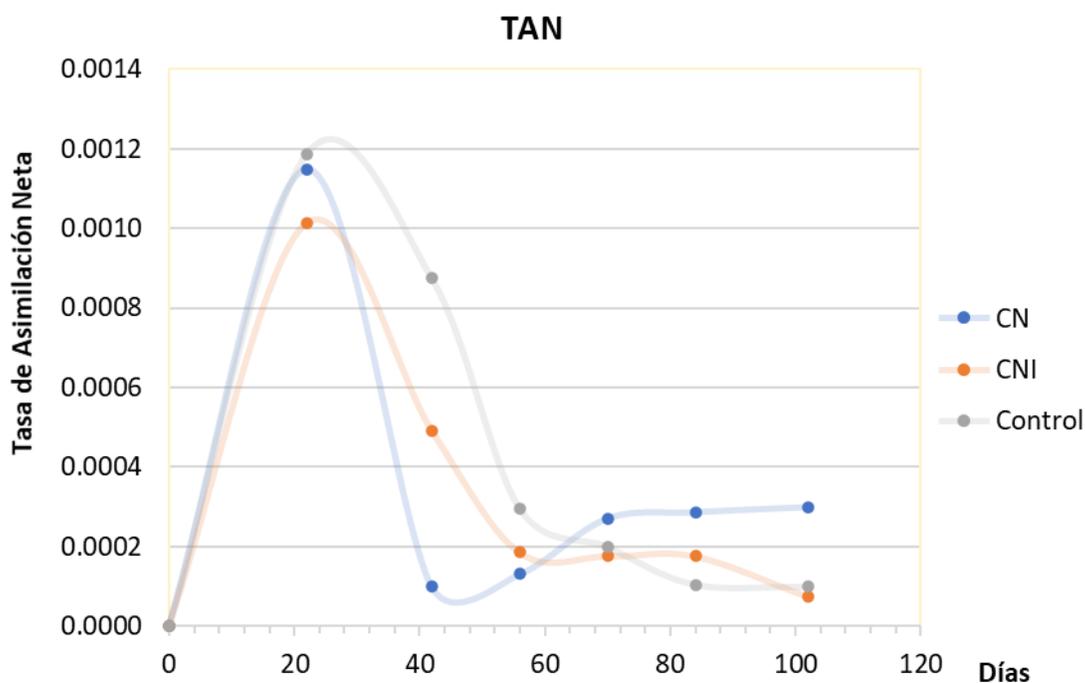


La Tasa de Asimilación Neta, indica la eficiencia fotosintética promedio, individual o en una comunidad de plantas. La capacidad de la planta para incrementar su masa seca en función del área asimilatoria en periodos cortos a lo largo del ciclo de crecimiento depende del área foliar, de la disposición y edad de las hojas y de los procesos de regulación interna relacionados con la demanda de los asimilados (Hunt, 1982). La TAN es una medida de la eficiencia promedio de las hojas de la planta o de un cultivo (Brown, 1984), lo que indica

una medida indirecta de la ganancia neta de asimilados por unidad de área foliar en una unidad de tiempo; esta no es constante y decrece con la edad de la planta o población.

En el presente ensayo la TAN en los tres tratamientos mostró el mejor comportamiento a los 22 días, con 0.0011, 0.0010 y 0.0012 g cm<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> en CN, CNI y el control respectivamente. Posterior a tal muestreo el comportamiento de la TAN fue decreciendo a lo largo del tiempo, estabilizándose a partir del día 60 donde la CN presentó un mayor TAN con respecto al resto de los tratamientos.

**Figura 30** Tasa de Asimilación Neta en plántulas de lechuga (g cm<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>)



Por su parte el área foliar específica (AFE) es una medida de la superficie foliar de la planta en términos de densidad o grosor relativo de la hoja. Se define como la relación entre el área total de la hoja y la masa del área foliar de la planta (Flórez et al., 2006).

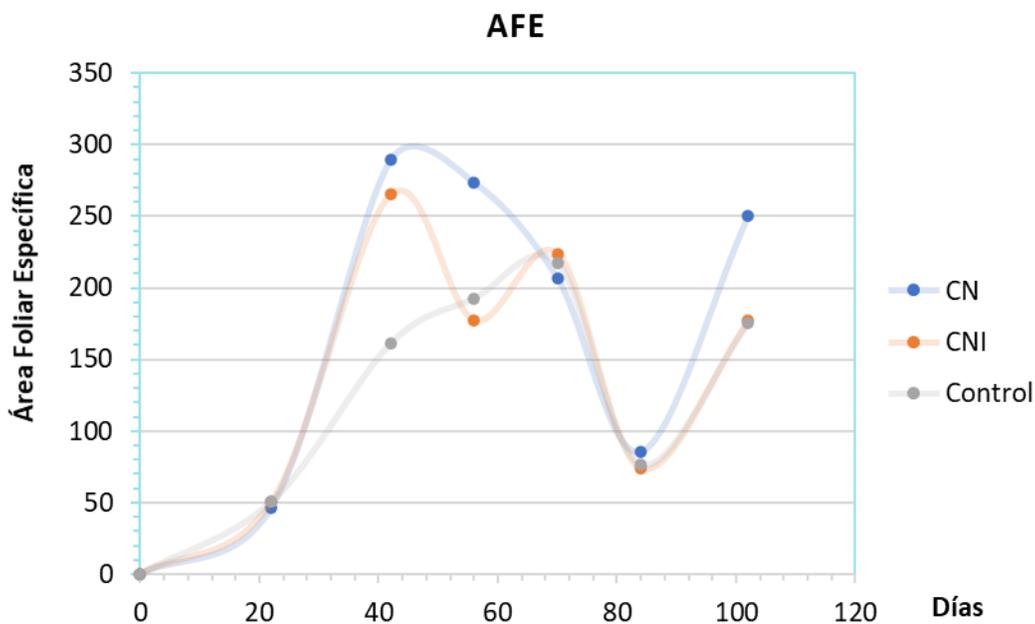
Las oscilaciones de AFE en los tratamientos fueron muy similares entre ellos, puesto que, en los tres casos, la acumulación de AFE fue incrementando gradualmente hasta el día 42, tiempo en donde comenzó su decrecimiento, que únicamente en el caso de la CN fue menos

brusco con respecto a CNI y el control. Igualmente, al día 84 DDS existió un decrecimiento en el AFE para concluir con un incremento a los 102 DDS en todos los tratamientos evaluados, que en el caso de la CN éste incremento fue mayor que la CNI y el control.

El máximo AFE de lechuga sucedió en los tratamientos de CN y CNI, con 289.55 y 265  $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$  a los 42 DDS; esta área foliar incrementó más rápido que el control negativo que alcanzó su punto máximo hasta el cuarto muestreo que correspondió al día 70 DDS con 217.15  $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ .

Con lo anterior es posible apreciar que el tratamiento de cáscara de naranja sin inocular obtuvo una mayor área foliar específica a lo largo del ensayo, con respecto al control y a la cáscara de naranja inoculada, lo cual puede deberse, a lo que Carranza y colaboradores (2009) mencionan sobre una menor expansión celular y transporte de fotoasimilados a los puntos de crecimiento.

**Figura 31** Área Foliar Especifica en plántulas de lechuga ( $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ )



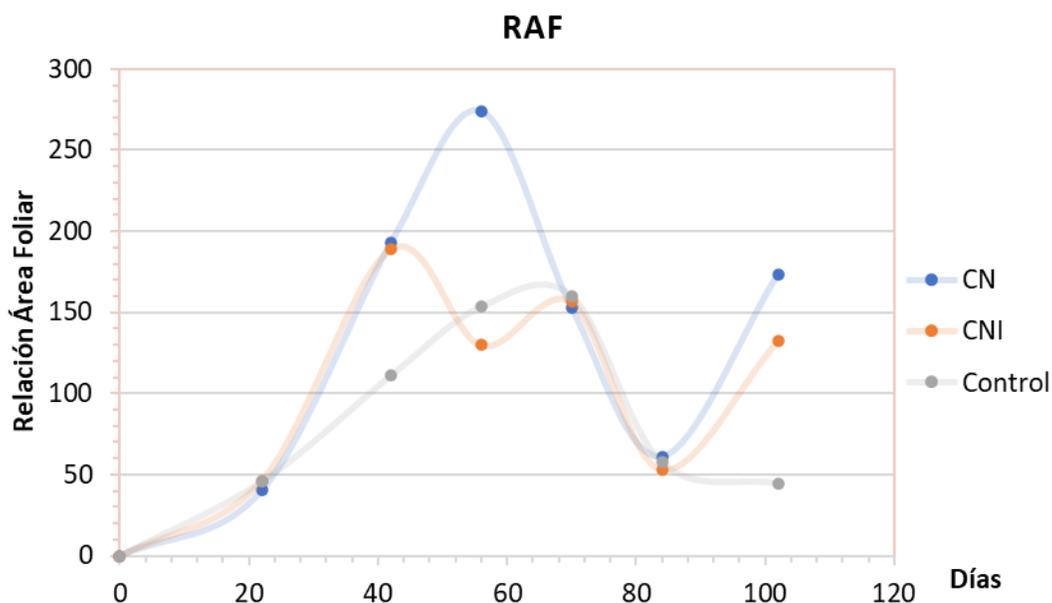
Relación de área foliar es un indicador de la superficie foliar de la planta con base en la masa seca y es definida como la fracción de masa seca total que corresponde a las hojas. La RAF máxima entre los tratamientos la obtuvo la CN con 273.76  $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$  a los 56 DDS hasta este momento de muestreo la CNI obtuvo una menor RAF de entre los tratamientos. Las plantas

sometidas a CNI obtuvieron su nivel máximo en el día 42 DDS, después de este tiempo la RAF fue decreciendo gradualmente con un pico de descenso en el día 84, sin embargo, este pico sucedió en todos los tratamientos, terminando el ensayo con  $132.44 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$  al día 102. Por su parte el control tuvo una RAF inferior durante la mayoría de los muestreos con respecto a las plantas en suelo tratado, su pico máximo fue a los 70 DDS con  $160 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$  decreciendo a partir de este momento hasta el final del ensayo.

Durante este estado del desarrollo, algunas hojas cesan su expansión mientras que otras entran en senescencia, y así se tienen plantas que acumulan mayor materia seca y disminuyen su área fotosintéticamente activa, y esto lleva a menores valores de la RAF (Archila et al., 1998).

En este indicador, nuevamente la CN sin inóculo respondió de manera más favorable que la CNI y el control negativo, lo cual para este caso representa la mayor producción de biomasa en plantas tratadas con CN.

**Figura 32** Relación de Área Foliar en plántulas de lechuga ( $\text{cm}^2 \text{ g}^{-1}$ )



## V. CONCLUSIONES

El análisis molecular mostró dominancia de *Penicillium crustosum*, *Penicillium steckii* y *Penicillium citrinum* en el inóculo fúngico de cáscara de naranja.

Los ácidos orgánicos determinados en la cáscara de naranja son; el ácido glucónico, cítrico, málico y succínico. Los ácidos orgánicos producidos por el inóculo fúngico son el ácido acético, fórmico, glucónico y succínico.

La disminución del pH en la cáscara de naranja a lo largo de la inoculación fúngica fluctúa de 4.3 en el día uno a 3.55 en el día seis. Sin embargo, en la incorporación de CNI al suelo, no disminuyó su pH por el contrario, aumentó de 5.52 con acidez moderada al inicio del experimento a rangos de neutros a medianamente alcalinos con valores de 7.34 a 7.82. Es posible que la cáscara de naranja funcione como regulador del pH, llevando al suelo a la neutralidad.

La remediación del suelo bajo factores de humedad al 65%, tamaño de CN a 0.5 cm y la interacción del inóculo fúngico con la fuente de carbono de maíz, contribuyeron a la disminución de 4 dS m<sup>-1</sup> de CE pasando de un suelo salino a moderadamente salino después de 30 días de tratamiento.

La disposición de P en el suelo mejoró con factores de remediación relación de naranja paja 1:2, humedad del suelo al 65% y tamaño de cáscara de naranja a 0.5 cm, estos dos últimos también influenciaron la disminución en la CE. El P disponible inicial del suelo fue 0.32 mg kg<sup>-1</sup> s y posterior a la remediación, dos de los tratamientos presentaron concentraciones 7 veces más altas, de 2.18 a 2.30 mg kg<sup>-1</sup> s de P.

Las plántulas de lechuga sembradas 30 días después del tratamiento de suelos mostraron una mayor producción de hojas, mayor longitud aérea y total de plantas, mayor peso fresco y seco. El aumento en el desarrollo de tales variables de respuesta coincide con los tratamientos de menor conductividad eléctrica y mayor disposición de P después de ser remediados.

En aplicaciones de diferentes dosis de cáscara de naranja al momento de la siembra, el mejor desarrollo en plántulas de lechuga se presentó en el control y en la mayor dosis de aplicación de CNI (4%), por su parte las dosis menores (0.5, 2 y 3%) inhibieron el desarrollo de las variables hojas y peso aéreo sin embargo favorecieron el crecimiento en la longitud de raíz.

La CN en dosis de 0.5% aplicada a la hora de la siembra favorece el desarrollo de la longitud, peso fresco y seco de la planta, por tanto, funcionó como biofertilizante.

El mayor desarrollo en plántulas de lechuga se obtuvo con la aplicación de CN a 7 días después de la siembra, contrario así en los tratamientos con inóculo fúngico que en ninguno de los tiempos aplicados funciona como biofertilizante y por el contrario puede inhibir el crecimiento de plántulas de lechuga.

El modelo matemático por el cual se analizó la acumulación de biomasa de las plantas permitió obtener la eficiencia fisiológica de las plántulas de lechuga a lo largo de 102 días, obteniendo que: la IAF y la TCR máximas se dieron por el control a los 40 DDS; la RAF y la TAN máximas se obtuvieron a los 22 DDS en el tratamiento de CN; el máximo AFE de lechuga sucedió en los tratamientos de CN y CNI a los 42 DDS, fue el único indicador en el cual, el inóculo mostró un mejor resultado.

La disminución de la CE y el aumento en la disposición de P, tuvieron una relación inversamente proporcional a partir de la aplicación de los tratamientos de cáscara e naranja, independientemente de la presencia o ausencia del inóculo fúngico, es decir, que la influencia de los ácidos orgánicos del inóculo fúngico no jugaron un papel diferencial para la remediación de los suelos, lo cual puede indicar que los ácidos de la cáscara de naranja por si misma, glucónico, cítrico, málico y succínico son los responsables del efecto de remediación de sales.

La CN provoca un efecto favorable en el crecimiento de las plantas de lechuga, comparado con el efecto negativo bajo la presencia del inóculo fúngico CNI, por ello la CN por si misma podría funcionar como biofertilizante, y de ser así debe aplicarse 30 días antes de la siembra, o al menos 7 días después de la misma.

## VI. RECOMENDACIONES

Es importante continuar analizando el comportamiento del inóculo fúngico en el suelo, con parámetros como esporulación y comprobar su persistencia a lo largo del tiempo y a diferentes condiciones ambientales que pudieran comprometer su sobrevivencia y con ello su funcionamiento, pues se autores (Grageda et. al., 2012) han señalado que el uso de plaguicidas es tóxico para los inoculantes o biofertilizantes y se ha observado que en suelos salinos y/o sódicos el porcentaje de infección radical es muy bajo, por ello comprobar la eficiencia del inóculo fúngico ante diversos fenómenos *in situ*, aseguraría la calidad para su óptima utilización en la remediación de suelos.

El conocimiento de patrones de comportamiento entre especies de *Penicillium*, tales como las que se estudiaron en el presente trabajo y de las cuales se demostró su capacidad solubilizadora, podrían aprovecharse en muchas otras áreas de estudio con respecto a ellas, en la relación con las raíces de las plantas por ejemplo, en un nivel mas amplio al analizar su capacidad endofítica; dado que en estudios pasados Scervino y colaboradores (2011), aislaron *Penicillium purpurogenum* de la corteza interna de las raíces de diversas especies, lo que sugiere una estrecha relación con la planta y una posible naturaleza endofítica de la cepa, característica que podría estudiarse en las especies de *Penicillium* tratadas en la presente investigación.

Para la realización del presente trabajo se estudiaron las investigaciones de diferentes autores con trabajos en *Penicillium sp* como solubilizadora de P, y muchos de ellos comprobaron que de forma *in vitro* las concentraciones carbono, nitrógeno, fuente de calcio y aspectos como el pH de los medios, regulan la eficiencia de solubilización de fósforo, a través de la producción de ácidos orgánicos que puede ser distinta en cada caso de acuerdo con las condiciones del medio. Lo anterior nos permite entender que no existe un único factor para la solubilización de P, pues hay un complejo de factores que interactúan entre sí en la solubilización de P y la producción de ácidos orgánicos, por lo cual es interesante conocer la dinámica en la producción de ácidos orgánicos *in situ*, así como sus variaciones de acuerdo con las fuentes de carbono (paja de maíz o avena) utilizadas directamente en el suelo, lo cual podría permitir eficientar tal solubilización.

El presente trabajo marca la pauta para profundizar en futuras investigaciones y proponer nuevas teorías que expliquen a fondo el mecanismo de disminución en la salinidad de diferentes condiciones de suelos, así como conocer aquellas que permitan entender el mecanismo por el cual las cepas *Penicillium steckii*, *Penicillium crustosum* y *Penicillium citrinum* solubilizan P, de tal forma que sea posible conocer la participación de cada una de ellas o si es un efecto conseguido a través de la sinergia de las tres especies.

## VII. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Aceves, N. E. 2011. *El ensalitramiento de los suelos bajo riego*. Fundación Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas A.C. México, D. F.
- Aguado, S.G.A. 2012. *Uso de Microorganismos como Biofertilizantes*. Capítulo 3. En: Introducción al uso y manejo de biofertilizantes en la agricultura. Aguado, S.G.A. (ed). INIFP/SAGARPA. México. 34-69 p.
- Aguirre, M.F., Durán, P.A., Peña, R.A., Grageda, C.O., Martha B.G., Garza, I. 2012. *Micorriza INIFAP: Biofertilizante para el Campo Mexicano*. Capítulo 9. En: Introducción al uso y manejo de los biofertilizantes en la agricultura. Aguado Santacruz G.A. (ed). México. 236-251 p.
- Archila, J., U. Contreras, H. Pinzón, H. Laverde y G. Corchuelo. 1998. Análisis de crecimiento de cuatro materiales de lechuga (*Lactuca sativa*). *Agron. Colomb.* 16(1), 68-75.
- Arias, C. E. L., y Piñeros, E. P.A. 2008. *Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los Paramos de Guasca y Cruz Verde*. (Tesis Pregrado). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia.
- Bidwell, R. G. S. 1993. El suelo y la nutrición vegetal. *Fisiología vegetal*. A. G. T. Editor. D.F. México.
- Brown, R.H. 1984. Growth of the green plant. *Physiological basis of crop growth and development*. American Society of Agronomy, Madison. pp. 153-174.
- Cabildo, M. M. P., Cornago, R. M.P., Escolástico, L. C., Esteban, S. S., López G. C. y Sanz, C. D. 2013. *Bases Químicas del Medio Ambiente*. Universidad Nacional de Educación a Distancia. Madrid, España.
- Campbell, A. N. y Reece, B. J. 2007. *Biología*. Madrid, España. Editorial Médica Panamericana.
- Cano, E. A., Vélez, D. D. y Morgado, H. C. A. 2017. The role of biotechnology in agricultural production and food supply. *International Journal of Agriculture and Natural Resources*, 44(1), 1-11.
- Costa, J. H., Bazioli, J. M., de Moraes Pontes, J. G., & Fill, T. P. 2019. *Penicillium digitatum* infection mechanisms in citrus: What do we know so far?. *Fungal Biology*, 123(8), 584-593. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.05.00>

- Cota, G. E. 1986. Metodología Química para la Determinación de Fósforo en Suelos del Estado de Tamaulipas. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias. Mexico.
- Coutinho, F. P., Felix, W. P., & Yano-Melo, A. M. 2012. Solubilization of phosphates in vitro by *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. *Ecological engineering*, 42, 85-89.
- Curtis, P.S. y A. Läuchli. 1986. The role of leaf area development and photosynthetic capacity in determining growth of kenat under moderate salt stress. *Aust. J. Plant Physiol.* 18, 553-565.
- Da Costa, S., Liparini, P. O, Teixeira, F. A., Hemmi, V. R., Guo, W., Zhao, M., Chen, Q., Huang, L., Mao, Y., Xia, N. y Wei, B. 2019. Citrinin produced using strains of *Penicillium citrinum* from Liupao tea. *Food Bioscience*, 28, 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.01.015>
- Delgadillo P. V. M. 2009. Patrimonio urbano y turismo cultural en la Ciudad de México: las chinampas de Xochimilco y el Centro Histórico. *Andamios*, 6(12), 69-94.
- FAO. 2015. Portal de Suelos de la FAO. En <http://www.fao.org/soils-portal/soil-biodiversity/research-in-soil-biodiversity/en/> Fecha de consulta el 15 de febrero de 2020.
- Frisvard, J. C. y Samson, R. A. 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology*, 49(1), 174.
- Flores, C., Veana, F. Y Rodriguez, R. 2014. *Penicillium* como solubilizador de fosfato. A partir de <https://www.researchgate.net/publication/274638201>
- Gaïnd, S. 2017. Exploitation of Orange Peel for Fungal Solubilization of Rock Phosphate by Solid State Fermentation. *Waste Biomass Valor.* 8:1351-1360. DOI 10.1007/s12649-016-9682-2
- González, P.A., Chiapa, S. F. R., Castro, G. G. J., Ángeles, E. B., Toledo, E. M. 2016. *Las Chinampas: Patrimonio Mundial de la Ciudad de México*. Universidad Autónoma Metropolitana, Autoridad de la Zona Patrimonio Mundial Natural y Cultural de la Humanidad en Xochimilco, Tláhuac y Milpa Alta. Gobierno de la Ciudad de México. México. 20-110 pp.

- Grageda, C. O. A., Díaz F. A., Peña. C. J. J., & Vera N. J. A. 2012. Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(6), 1261-1274.
- Houbraken, J. A., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. 2010. Taxonomy of *Penicillium citrinum* and related species. *Fungal Diversity*, 44(1), 117-133.
- Hunt, R. 1982. Plant growth curves. The functional approach to plant growth analysis. *Edward Arnold Publishers*, London.
- Jacoby, R., Peukert, M., Succurro, A., Koprivova, A., & Kopriva, S. 2017. The role of soil microorganisms in plant mineral nutrition current knowledge and future directions. *Frontiers in plant science*, 8, 1617. doi: 10.3389/fpls.2017.01617
- Krasilnikov, P., Ramos, B. R., Calderón, G. N. E., & Escobar, O. H. M. 2011. Artificial chinampas soils of Mexico City: their properties and salinization hazards. *Spanish Journal of Soil Science*, 1(1), 70-85. DOI: 10.3232/SJSS.2011.V1.N1.05
- Li Z., Bai T., Dai, L., Wang, F., Tao, J., Meng, Y. H., Wang, S. & Shuijin, Hu. 2016. A study of organic acid production in contrasts between two phosphate solubilizing fungi: *Penicillium oxalicum* and *Aspergillus niger*. *Scientific Reports*. 6, 25313; doi: 10.1038/srep25313
- Liao, J., Jiang, J., Xue, S., Qingyu, C., Wu, H., Manikandan, R., Hartley & Huang, L. 2018. A novel acid-producing fungus isolated from bauxite residue: the potential to reduce the alkalinity. *Geomicrobiology Journal*, 35(10), 840-847. <https://doi.org/10.1080/01490451.2018.1479807>
- Maldonado, J. M. 2012. *Tolerancia a la Salinidad de Especies dominantes en suelos salinos de Maguey blanco, Hidalgo*. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Manzano B. J. I., Rivera O. P., Briones E. F., & Zamora T. C. 2014. *Rehabilitation of saline-sodic soils: a case study in irrigation district 086, Jimenez, Tamaulipas, Mexico*. *Terra Latinoamericana*, 32(3), 211-219. Retrieved May 17, 2020, from [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-57792014000300211&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792014000300211&lng=en&tlng=en).

- Martínez, B.E. 2003. *Estudio de especies micotoxígenas del genero Penicillium: Penicillium verrucosum Dierckx*. Departament de Saintat i d'Anatomia Animals, Universidad de Barcelona (Tesis doctoral). Barcelona, España.
- Mesa, D. 2003. Obtención de plantas resistentes a la salinidad para los suelos salinos cubanos. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 37(3),217-226. [Fecha de Consulta 17 de mayo de 2020]. ISSN: 0034-7485. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=1930/193018048001>
- Mert, H. H. & Ekmekci, S. 1987. The effect of salinity and osmotic pressure of the medium on the growth, sporulation and changes in the total organic acid content of *Aspergillus flavus* and *Penicillium chrysogenum*. *Mycopathologia*, 100(2), 85-89.
- Moncada M. J. O. 1982. Evolución y problemas actuales de la zona de chinampas del Distrito Federal. *Investigaciones geográficas*, (12), 211-225.
- Morehart, T. C. 2012. Mapping ancient chinampa landscapes in the Basin of Mexico: a remote sensing and GIS approach. *Journal of Archaeological Science* 39 (2012) 2541- 2551. doi:10.1016/j.jas.2012.03.001
- Navarro, B. S. y Navarro, G. G. 2003. *Química Agrícola. El suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal*. Madrid, España. Ediciones Mundi-Prensa.
- NOM-021-RECNAT-2000. 2002. Norma Oficial Mexicana Fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. Diario Oficial de la Federación.
- Ñústez, C. E., y Acevedo J. C. 2005. Evaluación del uso de *Penicillium janthinellum* Biourge sobre la eficiencia de la fertilización fosfórica en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L. var. *Diacol Capiro*). *Agronomía Colombiana* 23(2): 290-298, 2005
- Otero, L., Francisco, A., Gálvez, V., Morales, R., Sánchez, I., Labaut, M., Vento, M., Cintra, M. y Rivero, L. 2007. *Caracterización y Evaluación de Salinidad*. Instituto de Suelos, Ministerio de Agricultura. Boyeros, Cuba.
- Pradhan, N. & Sukla, L. B. 2005. Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. *Afr J Biotechnol* 5:850–854
- Ramos, B. R., Cajuste, L. J., Flores R. D. & García, C. N. E. 2001. Metales pesados, sales y sodio en los suelos de Chinampa en México. *Agrociencia*, 35(4),385-395. [Fecha de Consulta 28 de junio de 2020]. ISSN: 1405-3195. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=302/30235402>

- Ramos, B. R. 2006. *Contaminación por metales pesados salinidad y sodicidad en suelos de chinampa de Xochimilco, San Luis Tlaxialtemalco, Tlahuac y Míxquic, D.F.* (Tesis doctoral). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Restrepo, C. S. P., Pineda, M. E. C., & Ríos-O. L. A. 2017. Mecanismos de acción de hongos y bacterias empleados como biofertilizantes en suelos agrícolas: una revisión sistemática. *Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 18(2), 335-351.
- Salcedo, F. M. G. 2002. *Determinación del grado de salinidad y/o sodicidad en suelos de San Juan Zitlaltepec, Municipio de Zumpango, Estado de México.* (Tesis pregrado). Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Autónoma de México, México.
- Serna, P, E. J., Sánchez, P. M., & Cisneros, R. C.A. 2017. Organic acids production by rhizosphere microorganisms isolated from a *Typic Melanudands* and its effects on the inorganic phosphates solubilization. *Acta Agronómica*, 66(2), 241-247. <https://dx.doi.org/10.15446/acag.v66n2.56148>
- SIAP. 2018. *Infografía Agroalimentaria 2018*. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 94 pp. Primera Edición. CDMX, México.
- Scervino, J. M., Prieto, M. M., Della, M. I., Recchi, M., Sarmiento, M. N., Godeas, A. 2010. Soil fungal isolates produce different organic acid patterns involved in phosphate salts solubilization. *Biol Fertil Soils*. 46, 755-763. DOI 10.1007/s00374-010-0482-8.
- Scervino, J. M., Papinutti, V. L., Godoy, M. S., Rodriguez, M. A., Della M., I., Recchi, M., PETTINARI, M. J. & Godeas, A. M. 2011. Medium pH, carbon and nitrogen concentrations modulate the phosphate solubilization efficiency of *Penicillium purpurogenum* through organic acid production. *Journal of Applied Microbiology*, 110(5), 1215-1223.
- Sweeney, M.J. y Dobson A.D.W. 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology*, 43 (3), pp. 141-158
- Taiz, L. y Zeiger, E. 2006. *Fisiología Vegetal*. Vol II. Universitat Jaume. Castellon de la Plana, España.
- Tahir, M., Mirza, M. S., Zaheer, A., Dimitrov, M. R., Smidt, H., & Hameed, S. 2013. Isolation and identification of phosphate solubilizer *Azospirillum*, *Bacillus* and

- Enterobacter* strains by 16SrRNA sequence analysis and their effect on growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Australian Journal of Crop Science*, 7(9), 1284-1292.
- Valencia I. C. E., 2013. Edafología para ingenieros Agrícolas. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. UNAM. México.
- Veljović, S. P., Boonsiri, K., Maina, M. K., Semavor, E. M., & Surajit, M. 2017. Infection capacity of the pathogens *Penicillium italicum* and *P. expansum* in orange during storage. *Food and Feed research*, 44(1), 31-38. DOI: 10.5937/FFR1701031V
- Vilanova, L., Viñas, I., Usall, J. Buron, M. G., Teixido. 2014. Acidification of apple and orange hosts by *Penicillium digitatum* and *Penicillium expansum*. *International Journal of Food Microbiology*. Vol 178 Page: 39-49.
- Wang, L., Li C., Yu, G., Sun, Z., Zhang G., Gu, Q., Zhu, T., Che, Q., Guan H., Li, D. 2019. Dicitrinones E and F, citrinin dimers from the marine derived fungus *Penicillium citrinum* HDN-152-088. *tetrahedron Letters*, ISSN: 0040-4039, Vol: 60, Issue: 44, Page: 151182
- Whitelaw, M.A., T.J. Hardena y K.R. Helyar. 1999. Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. *Soil Biol. Biochem.* 31, 655-665.)
- Xiao, M. y Wu, F. 2014. A review of environmental characteristics and effects of low-molecular weight organic acids in the surface ecosystem. *Journal of Environmental Sciences*. 26: 935–954. DOI: 10.1016/S1001-0742(13)60570-7
- Yin, Z., Shi, F., Jiang, H., Roberts, D. P., Chen, S., & Fan, B. 2015. Phosphate solubilization and promotion of maize growth by *Penicillium oxalicum* P4 and *Aspergillus niger* P85 in a calcareous soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 61(12), 913-923.
- Zhang, T., Sun, X., Xu, Q., Candelas, L. G., & Li, H. 2013. The pH signaling transcription factor PacC is required for full virulence in *Penicillium digitatum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(20), 9087-9098.

## VIII. ANEXOS

### ANEXO 1

Elementos esenciales para las plantas (Campbell y Reece, 2007).

Elemento	Forma disponible para las plantas	Funciones principales
<b>MACRONUTRIENTES</b>		
<b>Carbono</b>	CO <sub>2</sub>	Componentes principales de compuestos orgánicos vegetales
<b>Oxígeno</b>	CO <sub>2</sub>	
<b>Hidrógeno</b>	H <sub>2</sub> O	
<b>Nitrógeno</b>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Componente de ácidos nucleicos, proteínas, clorofila, coenzimas.
<b>Potasio</b>	K <sup>+</sup>	Cofactor para síntesis de proteínas; principal soluto para el equilibrio de agua (funcionamiento de estromas)
<b>Calcio</b>	Ca <sup>2+</sup>	Formación y estabilidad de paredes celulares. Activa algunas enzimas y regula respuestas de células a estímulos
<b>Magnesio</b>	Mg <sup>2+</sup>	Componente de la clorofila
<b>Fósforo</b>	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> HPO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	Componente de ácidos nucleicos, fosfolípidos, ATP, coenzimas
<b>Azufre</b>	SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	Componente de proteínas, coenzimas.
<b>MICRONUTRIENTES</b>		
<b>Cloro</b>	Cl <sup>-</sup>	Fotólisis del agua en la fotosíntesis, regula el equilibrio del agua
<b>Hierro</b>	Fe <sup>3+</sup> Fe <sup>2+</sup>	Para la fotólisis del agua en la fotosíntesis
<b>Manganeso</b>	Mn <sup>2+</sup>	Componente de los citocromos
<b>Boro</b>	H <sub>2</sub> BO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Activa la formación de aminoácidos, activa enzimas
<b>Zinc</b>	Zn <sup>2+</sup>	Activa la formación de la clorofila, activa enzimas
<b>Cobre</b>	Cu <sup>+</sup> , Cu <sup>2+</sup>	Componente de enzimas de reacción redox y síntesis de lignina
<b>Niquel</b>	Ni <sup>2+</sup>	Cofactor de una enzima para el metabolismo del nitrógeno
<b>Molibdeno</b>	MoO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	Participa en la simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno

## ANEXO 2

### Condiciones ambientales promedio

Temperatura max °C	Temperatura min °C	Humedad max %	Humedad min %
37.231	19.077	65.615	27.923

### Condiciones ambientales a lo largo de los bioensayos

Día	Temperatura max °C	Temperatura min °C	Humedad max %	Humedad min %
01/10/19	44	12	90	16
03/10/19	32	20	58	33
04/10/19	21	17	66	55
07/10/19	43	22	58	30
08/10/19	40	13	68	16
09/10/19	28	13	80	36
10/10/19	33	25	56	35
11/10/19	28	11	47	48
12/10/19	46	15	84	16
13/10/19	44	25	73	16
14/10/19	46	25	55	16
19/10/19	45	25	58	16
24/10/19	34	25	60	30
20/11/20	29	18	63	33
22/11/19	39	19	65	16
25/11/19	27	18	66	40
26/11/19	38	18	66	16
29/11/19	40	18	65	16
03/12/19	35	7	84	16
05/12/19	39	5	79	16
06/12/19	37	4	78	16
09/12/19	38	3	76	16
11/12/19	39	7	84	16
13/12/19	34	6	83	16
18/12/19	35	7	80	16
09/01/20	36	4	77	16
10/01/20	40	4	70	16

<b>Día</b>	<b>Temperatura max °C</b>	<b>Temperatura min °C</b>	<b>Humedad max %</b>	<b>Humedad min %</b>
<b>20/01/20</b>	22	10	81	45
<b>21/01/20</b>	23	7	88	40
<b>22/01/20</b>	34	4	83	16
<b>23/01/20</b>	23	6	84	34
<b>24/01/20</b>	17	10	75	30
<b>28/01/20</b>	20	2	69	16
<b>29/01/20</b>	21	4	68	16
<b>30/01/20</b>	36	7	58	16
<b>31/01/20</b>	20	9	53	20
<b>04/02/20</b>	37	9	75	16
<b>05/02/20</b>	24	9	79	39
<b>06/02/20</b>	28	8	67	16
<b>07/02/20</b>	30	7	77	16
<b>10/02/20</b>	33	7	77	21
<b>11/02/20</b>	39	8	77	16
<b>12/02/20</b>	34	9	74	16
<b>13/02/20</b>	42	7	77	21
<b>14/02/20</b>	35	8	80	16
<b>17/02/20</b>	42	6	69	16
<b>18/02/20</b>	47	6	69	16
<b>19/02/20</b>	43	5	59	16
<b>20/02/20</b>	42	7	77	16
<b>21/02/20</b>	38	10	70	16
<b>24/02/20</b>	44	9	74	16
<b>25/02/20</b>	46	8	67	16
<b>26/02/20</b>	42	8	62	16
<b>27/02/20</b>	40	6	73	16
<b>02/03/20</b>	43	11	73	16
<b>03/03/20</b>	41	10	79	16
<b>04/03/20</b>	40	8	68	16
<b>05/03/20</b>	42	9	64	16
<b>09/03/20</b>	34	8	75	16
<b>13/02/20</b>	37	9	73	16
<b>14/02/20</b>	37	11	65	16
<b>17/02/20</b>	28	9	79	16
<b>18/02/20</b>	31	10	77	16

### ANEXO 3

**Secuencia del fragmento 16S-ITS1-5.8S-ITS2-26S de la cepa *Penicillium crustosum* con un total 518 nucleótidos.**

AAGGATCTTTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTGTTTATTTTACCT  
TGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACTGGCCGCCGGGGGGCTTACGCCCCGGGCCCGCGC  
CCGCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTGAAAATATAAATTAT  
TTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG  
ATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCC  
CTGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGT  
GTTGGGCCCCGTCCCCCGATCTCCGGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTC  
CGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCCGCTCCGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGAT  
CAACCCAAATTTTATCCAGGTTGACCTCG

**Secuencia del fragmento 16S-ITS1-5.8S-ITS2-26S de la cepa *Penicillium citrinum* con un total 555 nucleótidos.**

TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCGACCTCC  
CACCCGTGTTGCACGAACCTGTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGCCAGGCCCGCGGGGGCA  
TCCGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGCCCCCTCTGAACGCTGTCTGAAGTTGCAGTCT  
GAGACAAGTAGCTAAATTAGTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGAT  
GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTC  
TTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCGGAGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCT  
GCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCCCCGCTCCGGGGGGGACGGGCCCCG  
AAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTACCCCGCTCTTG  
TAGGCCCGGCCGGCGCCAGCCGACCCCAACCTTTTATTTTTTCTCAGGTTGACCTCGGAT  
CAGGTA

**Secuencia del fragmento 16S-ITS1-5.8S-ITS2-26S de la cepa *Penicillium steckii* con un total 339 nucleótidos.**

GCGGGCCCCGCGCGCGCCGACGGCCCCCTGAACGCTGTCTGAAGTTGCAGTCTGAGACCT  
ATAACGAAATTAGTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAAC  
GCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAAC  
GCACATTGCGCCCTCTGGTATTCGGAGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCA  
AGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCCCCGCGGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGC  
GGCGGCACCGGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGG

## ANEXO 4

### IMÁGENES DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS ORGANICOS



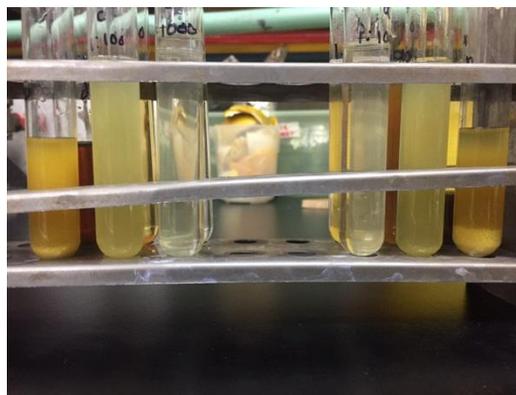
**Naranja en cartucho de celulosa soxhlet**



**Extracción por soxhlet**



**Extracción de rotovapor**



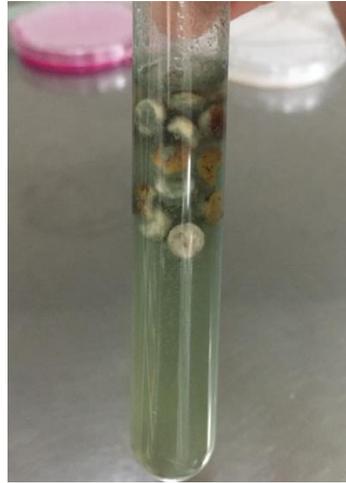
**Diluciones de la muestra**

**ANEXO 5**

**IMÁGENES DE AISLAMIENTO DE CEPAS**



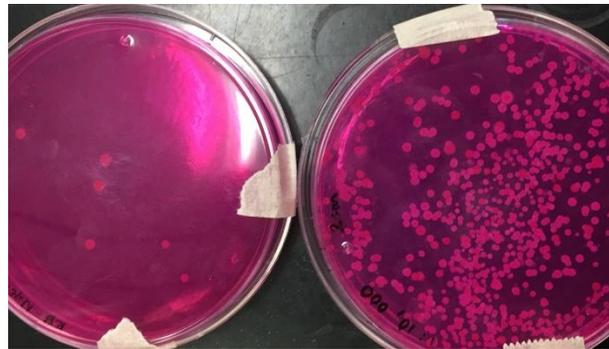
**Inoculo fungico**



**Obtención de esporas**



**Crecimiento en medio rosa de bengala**



**Crecimiento en medio rosa de bengala**



**Crecimiento en PDA**



**Crecimiento en PDA**

**ANEXO 6**

**IMÁGENES TRATAMIENTOS DE OPTIMIZACIÓN DE REMEDIACIÓN**



**Colonización de soporte a 0 días**



**Colonización de soporte a 6 días**



**Distribución de unidades experimentales en invernadero**



**Ajuste de niveles de humedad**



**Instalación de tratamientos no colonizados**



**Instalación de tratamientos colonizados**



**Bioaumentación del suelo por cultivo fúngico**

**ANEXO 7**  
**IMÁGENES DE BIOENSAYOS**



**Suelo Remediado**



**Crecimiento de lechuga en suelo  
remediado**



**Instalación de bioensayos a diferentes  
dosis de CN y CNI**



**Instalación de bioensayos a diferentes  
dosis de CN y CNI**



**Bioensayo de aplicación a diferentes tiempos de aplicación**



**Bioensayo de aplicación a diferentes tiempos de aplicación**



**Instalación de bioensayos de dinámica de crecimiento de lechuga CN y CNI al mismo tiempo**



**Instalación de bioensayos de dinámica de crecimiento de lechuga**