



The World's Largest Open Access Agricultural & Applied Economics Digital Library

This document is discoverable and free to researchers across the globe due to the work of AgEcon Search.

Help ensure our sustainability.

Give to AgEcon Search

AgEcon Search

<http://ageconsearch.umn.edu>

aesearch@umn.edu

*Papers downloaded from **AgEcon Search** may be used for non-commercial purposes and personal study only. No other use, including posting to another Internet site, is permitted without permission from the copyright owner (not AgEcon Search), or as allowed under the provisions of Fair Use, U.S. Copyright Act, Title 17 U.S.C.*

No endorsement of AgEcon Search or its fundraising activities by the author(s) of the following work or their employer(s) is intended or implied.

CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO DE PLANTAS Y SU TOLERANCIA A ELEMENTOS POTENCIALMENTE TÓXICOS

CHARACTERIZATION OF PLANT GROWTH-PROMOTING BACTERIA AND THEIR TOLERANCE TO POTENTIALLY TOXIC ELEMENTS

Noguez-Iniesta J.A.¹; González-Chávez M.C.A.^{1*}; Carrillo-González R.¹; Martínez-Gómez, M.A.¹; Mendoza-Hernández J.C.²

¹Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, km 36.5. Carretera México-Texcoco, Texcoco Edo. de México 56230. ²Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 4 sur 104. Puebla, México.

*Autor de correspondencia: carmeng@colpos.mx

RESUMEN

Trece cepas bacterianas se aislaron y caracterizaron bioquímicamente; se estudió su tolerancia a elementos potencialmente tóxicos (EPT). Siete se aislaron de nódulos de huizache (*Acacia farnesiana*), una de trébol (*Trifolium repens*) y cinco de suelo rizosférico procedente de sitios contaminados con residuos de mina de Zimapán, Hidalgo, México. Todas las cepas mostraron tolerancia a NaCl al 2%; sin embargo, solo ocho fueron altamente tolerantes a NaCl al 5%. Todas las cepas de bacterias fueron tolerantes a As, Pb, Cd, Zn, Cu y Cd. Con base en la producción de ácido indolacético (AIA), actividad de la enzima ACC-desaminasa, solubilización de fósforo y producción de sideróforos, cinco cepas (*Mesorhizobium loti* Af1, *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*) Af6, *Enterobacter cancerogenus* K131, *Escherichia vulneris*. K123 y *Enterobacter* sp. K162), tienen potencial como bacterias promotoras de crecimiento de plantas (BPCP). *Alcaligenes faecalis* T2, tolerante a 168 mg Cd L⁻¹, formó una placa que recubrió la superficie colonial y representó 54% de Cd asociado a P, mientras que dentro de la colonia bacteriana se observó 41% de Cd acumulado, lo cual podría representar detoxificación, biosorción, precipitación o transformación enzimática de este elemento. Los resultados muestran que las bacterias poseen características relevantes pero, con excepción de *Mesorhizobium loti* Af1 y *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*) Af6, debe descartarse si las otras cepas bacterianas son patógenas para humanos y plantas, y evitar su uso en fitorremediación.

Palabras clave: ácido indol acético, ACC-deaminasa, solubilización de fósforo, sideróforos.

ABSTRACT

Thirteen bacteria strains were isolated and characterized biochemically, their tolerance to potentially toxic elements (PTE) was studied. Seven were isolated from acacia nodules (*Acacia farnesiana*), one from clover (*Trifolium repens*) and five from rhizosphere soil from contaminated sites with mine residues from Zimapán, Hidalgo, México. All the strains showed tolerance to NaCl at 2%; however, only eight were highly tolerant to NaCl at 5%. All the bacteria strains were tolerant to As, Pb, Cd, Zn, Cu and Cd. Based on the production of indole-acetic acid (IAA), the activity of the ACCdeaminase enzyme, solubilization of phosphorus and production of siderophores. Five strains (*Mesorhizobium loti* Af1, *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*) Af6, *Enterobacter cancerogenus* K131, *Escherichia vulneris*. K123 and *Enterobacter* sp. K162) have potential as plant growth-promoting bacteria (PGPB). The strain *Alcaligenes faecalis* T2, tolerant to 168 mg Cd L⁻¹, formed a plaque that coated the bacterial colony surface and represented 54% of the Cd associated to P. Meanwhile, 41% of accumulated Cd was observed within the bacterial colony, this could represent

detoxification, biosorption, enzymatic precipitation or transformation of this element. The results showed that bacteria have relevant characteristics for phytoremediation purpose. However, with the exception of *Mesorhizobium loti* Af1 and *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*) Af6, it should be ruled out whether other bacterial strains are pathogenic for humans and plants, and in this case avoid their use in phytoremediation.

Keywords: indole-acetic acid, ACC-deaminase, phosphorus solubilization, siderophores.

INTRODUCCIÓN

El aislamiento, la caracterización morfológica y bioquímica de bacterias promotoras de crecimiento de plantas (BPCP) constituyen el primer paso para seleccionar microorganismos nativos que ayuden a las plantas que se utilizan en la fitorremediación de sitios contaminados (Valls y de Lorenzo, 2002). La selección se basa en aplicar microorganismos que posean propiedades bioquímicas que auxilien el establecimiento y crecimiento de plantas en estos sitios (Glick *et al.*, 2007), mediante el incremento en la disponibilidad de nutrientes esenciales en el suelo a través de diversos mecanismos como fijación biológica de N₂, solubilización de fosfatos y producción de sideróforos (Vessey, 2003). Se seleccionan microorganismos que producen sustancias que mejoran las condiciones de crecimiento y el desarrollo de la planta (Valls y de Lorenzo, 2002), como por ejemplo, la producción de ácido indolacético AIA (Ahemad *et al.*, 2014) y la enzima ACC-desaminasa. El primero es un promotor del crecimiento y la segunda degrada 1-aminociclopropano-1-carboxilato, precursor del etileno (Glick *et al.*, 2007), de tal forma que la reducción en los niveles de etileno por acción de BPCP puede favorecer el crecimiento de las plantas (Ghosh *et al.*, 2003). En particular, las bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Mesorhizobium* con frecuencia se reportan como BPCP y establecen simbiosis benéfica con ciertas especies de la familia Fabaceae (antes leguminosas) (Koo y Cho, 2009). Además de ser BPCP, las bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Azomonas* (Ahemad *et al.*, 2014) son precursoras para la colonización de sitios afectados por contaminantes (Gueffrachi *et al.*, 2013). Sin embargo, para su uso en la fitorremediación de ambientes conta-

minados con elementos potencialmente tóxicos (EPT), las BPCP deben tolerar la presencia de estos elementos. Los objetivos de este trabajo fueron: 1) aislar cepas tolerantes a altas concentraciones de EPT, a partir de nódulos del huizache (*Acacia farnesiana*), trébol blanco (*Trifolium repens*), y de suelo rizosférico procedente de sitios contaminados con residuos de mina provenientes de Zimapán, Hidalgo, México. 2) caracterizar las bacterias seleccionadas mediante pruebas de tolerancia a sales y EPT, producción de ácido indolacético (AIA), actividad de la enzima ACC-desaminasa, solubilización de fósforo y producción de sideróforos para identificar su potencial como BPCP y posible aplicación en la fitoestabilización de EPT en sitios altamente contaminados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Se recolectaron raíces noduladas de huizache (*Acacia farnesiana*) del municipio de Tepeji del Río, Hidalgo, muestras de suelo rizosférico de huizache establecidas en residuos de mina de Zimapán, Hidalgo, así como raíces noduladas de trébol blanco (*Trifolium repens*) procedentes del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Las raíces recolectadas se lavaron con agua corriente (doméstica) hasta eliminar los residuos de suelo y se dejaron secar. Los nódulos más grandes y con mejor apariencia se separaron cuidadosamente, procurando dejar un fragmento de raíz. Estos se desinfestaron superficialmente y luego se maceraron e inocularon en cajas Petri con agar Extracto de Levadura Manitol Rojo Congo. Las cajas se incubaron a 28 °C durante 72 h (Vincent, 1975). Para el aislamiento de bacterias de suelo rizosférico, se usó 1 g de suelo, se añadió a tubos de ensayo con 5 mL de caldo nutritivo. Estos se incubaron a 28 °C durante 24 h. Posteriormente, este inóculo se sembró por estría cruzada en medios selectivos King y MConkey con resiembra consecutivas hasta obtener cepas puras. La identificación molecular se realizó mediante la extracción de ADN con el Kit Wisard Genomic DNA Purification®. El análisis de secuenciación se realizó en el laboratorio de Microbiología Ambiental de la Facultad de Ingeniería Química (Benemérita Universidad Autónoma de Puebla). La secuencia de 16S rDNA se comparó con la base de datos GenBank mediante el programa BLAST del NCBI (NCBI, 2014). Las bacterias se caracterizaron por su capacidad para tolerar NaCl (condición adversa que también se observa algunas veces en sitios contaminados con EPT), Cd, Cu, Zn y Pb. Además, se caracterizaron en su producción de ácido indolacético (AIA; Ehman, 1977), actividad de la enzima ACC-desaminasa (Saleh y

Glick, 2001), producción de sideróforos (Schwyn y Neilands 1987) y solubilización de fósforo (Watanabe y Olsen, 1965).

Microscopia electrónica de barrido y análisis de rayos X

Las bacterias creciendo en los medios de cultivo suplementados con EPT se observaron por microscopia electrónica. Fragmentos de agar con crecimiento bacteriano se fijaron por 12 h en glutaraldehído al 2.5% en solución tampón de fosfatos Sorensen 0.1 M (pH 7.2). Después de un enjuague con solución tampón Sorensen se procedió a la deshidratación en una serie de concentraciones crecientes de etanol por 2 h de incubación. Las muestras se cubrieron con oro y paladio. Las observaciones se realizaron en la unidad de Microscopia Electrónica del Colegio de Postgraduados, utilizando un equipo JEOL JSM 6390. Se utilizó un voltaje de aceleración de 10 Kv. Para determinar la composición de EPT en las muestras se empleó un microanalizador de rayos X de dispersión de energía (EDX-OXFORD Instruments INCA X-act). El tiempo de conteo para la obtención de los espectros de rayos X fue de 60 s. Los datos obtenidos se analizaron mediante varianza y comparación de medias usando la prueba de diferencia significativa honesta de Tukey con nivel de significancia de 0.05 mediante el programa estadístico R.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento e identificación molecular de bacterias

Se aislaron siete bacterias a partir de nódulos de huizache (Af1, Af3, Af4, Af5, Af6, Af7 y Af8), una cepa procedente de trébol (T2) y cinco de suelo rizosférico de residuo de mina (MC119, K120, K123, K131 y K162). Las bacterias Af3, Af4, Af5, Af6, Af7, Af8, MC119, K120, K123, K131, K162 se caracterizaron como de rápido crecimiento y las cepas Af1 y T2 de lento crecimiento (Figura 1). Estas secuencias mostraron coincidencias más cercanas a los géneros *Alcaligenes*, *Mesorhizobium*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Serratia* y *Enterobacter*. Los géneros *Enterobacter*, *Agrobacterium*, *Mesorhizobium* y *Serratia* se relacionan frecuentemente con promoción de crecimiento vegetal (Hao et al., 2012; Kumar et al., 2008), y con la respuesta favorable que tienen a la presencia de EPT, lo cual sugiere ventajas para su aplicación en ambientes perturbados con estos conta-

minantes. Aunque las bacterias (Af3, Af4, Af5 y Af6) se aislaron de nódulos de *A. farnesiana*, los géneros identificados molecularmente correspondieron a cepas de *Agrobacterium*. En la literatura se percibe que existe controversia en nomenclatura y clasificación taxonómica en las especies de *Agrobacterium*. Young et al. (2001) mencionan que *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Sinorhizobium* y *Allorhizobium* son géneros incluidos dentro de la familia Rhizobiaceae; y el análisis comparativo de 16S rDNA mostró que algunas especies de *Agrobacterium* forman un grupo monofilético con todas las especies de *Rhizobium*. Koivunen et al. (2011) mencionan que Young et al. (2001) propusieron cambio en la nomenclatura y clasificación taxonómica de *Agrobacterium tumefaciens* por *Rhizobium radiobacter*. Sin embargo, el nuevo nombre no se ha aceptado. Aunque Koivunen et al. (2011) reportan que *A. tumefaciens* (*R. radiobacter*) es un microorganismo patógeno de plantas, Sawada et al. (1993) establecieron que, de todos los miembros del género *Agrobacterium*, *A. radiobacter* es el único que no forma tumores o crecimiento anormal de la raíz, por lo que la característica de patogenicidad debería eliminarse de las especies de *Agrobacterium*. Otro aspecto

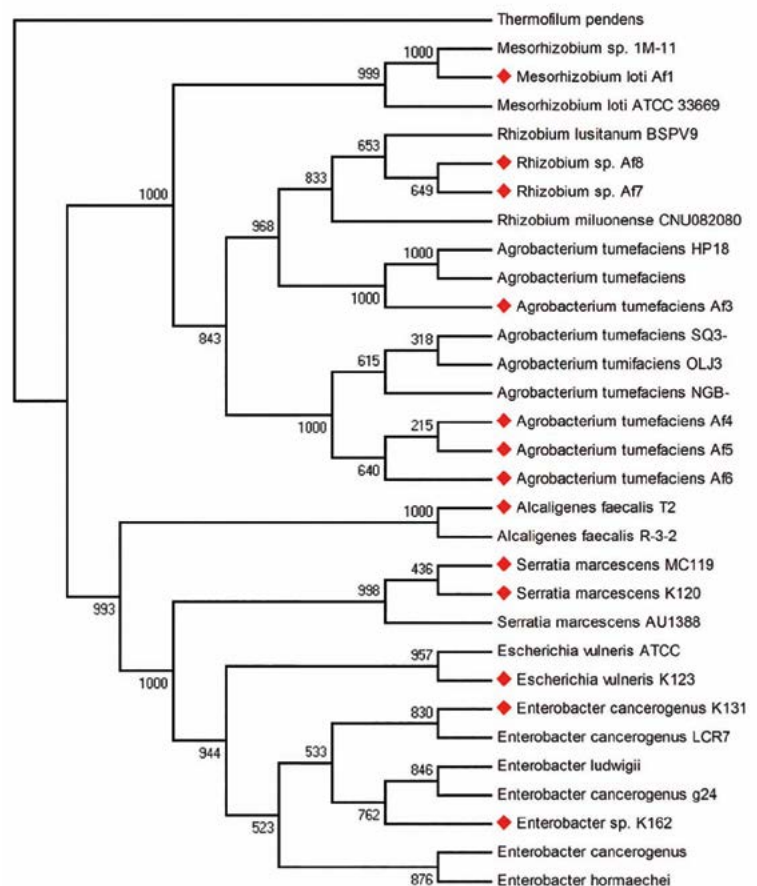


Figura 1. Filogenia de las bacterias aisladas. En rombos de nódulos radicales y suelo rizosférico de la zona minera de Zimapán, Hidalgo.

de interés fue que la cepa T2, aislada de nódulos de trébol y que bioquímicamente se ubicó como rizobia, la prueba molecular la identifica como *A. faecalis*. No se ha reportado que esta bacteria forme nódulos ni se le ha relacionado con el género *Rhizobium* o la familia Rhizobiaceae, por lo que su identificación, así como su capacidad de nodular trébol, deberían corroborarse. Esta cepa bacteriana mostró secretar AIA y ser tolerante a NaCl. Los reportes de Barazani y Friedman (1999) muestran que *A. faecalis* se comportó como promotora del crecimiento de plántulas de lechuga (*Lactuca sativa*). Otros autores han mostrado que puede clasificarse como cepa tolerante a sales y ser patógena potencial de humanos (Egamberdieva *et al.*, 2008). Por tanto, resulta relevante verificar la patogenicidad de estas cepas antes de utilizarlas para fitorremediación.

Caracterización bacteriana

Las 13 cepas bacterianas aisladas toleraron NaCl a 2% de NaCl, lo que implica una fuerza iónica (I) de 0.34 mM. Sin embargo, las bacterias T2, Af4 y Af6 procedentes de nódulos y la MC119, K120, K123, K131 y K162 de suelo rizosférico resultaron tolerantes a 5% de NaCl (I=0.85 M), efecto similar a los que reporta Ghittoni y Bueno (1996) con cepas BPCP. Yelton *et al.* (1983) aislaron cepas de *Rhizobium meliloti* (*Sinorhizobium meliloti*), las cuales propusieron como altamente tolerantes a NaCl porque crecieron en 1.8% y hasta 4.2% (300-700 mM) de este

compuesto. Lo anterior sugiere una ventaja biológica para el uso biotecnológico de estos microorganismos, debido a que se ha sugerido que concentraciones superiores a 100 mM (0.6%) de NaCl inhiben el desarrollo de ciertas especies bacterianas (Gueffrachi *et al.*, 2013). En cuanto a la producción de AIA, las cepas Af3 y Af7 mostraron concentración menor a $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Cuadro 1). Asimismo, las bacterias T2, Af4, Af5, Af8, MC119, K120, K123 y K162 tuvieron concentración menor a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Estos valores son parecidos a los observados por Zhang *et al.*, (2011) en cepas de *Enterobacter* sp. Sin embargo, Af1 y Af6 produjeron la mayor concentración de AIA (19.1 y $13.1 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente).

Estos valores son bajos en comparación con los reportes de Belimov *et al.* (2005) en cepas de *Variovorax* (superior a $30 \mu\text{g mL}^{-1}$) o de Yu *et al.* (2014) con cepas de *Bacillus* sp., *Rhizobium* sp. y *Ochrobactrum* sp., éstas procedentes de residuos de mina (entre $2.2 \mu\text{g mL}^{-1}$, hasta $83 \mu\text{g mL}^{-1}$). Únicamente cinco cepas MC119, K120, K123, K132 y K162 mostraron la capacidad de solubilizar fósforo en medio sólido. En medio líquido, la concentración de P soluble se estimó entre 0.10 a 0.46 mg L^{-1} . No hubo diferencia en la solubilización de P de las cepas MC119, K120, K123, K131 y K162. Sin embargo, estos valores fueron menores a los reportados por Tejera-Hernández *et al.*, (2013) en cepas de *Bacillus* sp. (0.23 hasta 11.58 mg L^{-1}). La producción de sideróforos se

Cuadro 1. Caracterización bioquímica de bacterias como promotoras del crecimiento vegetal realizadas a 13 bacterias aisladas de nódulos y suelo rizosférico.

Cepa	Producción de Indol $\mu\text{g IAA mL}^{-1}$	Solubilización de fosfatos		Producción de sideróforos	Actividad enzimática ACC-desaminasa $\mu\text{M } \alpha\text{KB mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$
		Cualitativa	Cuantitativa mg L^{-1}		
Af1	19.10 ± 0.71 a	-	-	-	2.55 ± 0.12 abc
T2	7.62 ± 0.58 def	-	-	-	1.85 ± 0.14 cdef
Af3	4.91 ± 0.62 g	-	-	+	3.16 ± 0.14 a
Af4	8.66 ± 0.36 d	-	-	+	2.82 ± 0.11 a
Af5	6.96 ± 0.61 ef	-	-	+	2.08 ± 0.11 bcde
Af6	13.14 ± 0.64 b	-	-	+	2.34 ± 0.10 abcd
Af7	4.89 ± 0.75 g	-	-	+	2.50 ± 0.10 abcd
Af8	6.61 ± 0.40 f	-	-	+	2.99 ± 0.11 a
MC119	8.73 ± 0.02 d	+	0.36 ± 0.16 ab	-	1.05 ± 0.13 f
K120	8.73 ± 0.03 d	+	0.42 ± 0.04 a	-	2.66 ± 0.46 abc
K123	8.28 ± 0.07 de	+	0.18 ± 0.08 bcd	+	1.41 ± 0.42 ef
K131	10.52 ± 0.06 c	+	0.23 ± 0.18 abc	+	0.09 ± 0.02 g
K162	8.40 ± 0.06 d	+	0.10 ± 0.00 cd	+	1.68 ± 0.31 def

Se muestran promedios y desviación estándar, $n=3$.

*Letras iguales indica medias estadísticamente similares, Tukey ($\alpha=0.05$).

identificó en ocho cepas Af3, Af4, Af5, Af6, Af7, Af8, K123, K131 y K162. Estos metabolitos reducen la concentración de EPT libre (Gaonkar y Bhosle, 2013), lo cual limita su difusión a través de diversas matrices, tal como el suelo. Las 13 bacterias presentaron actividad enzimática ACC de hasta $3 \mu\text{M } \alpha\text{KB mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$; y K131 fue la de mayor actividad. Valores similares fueron reportados por Zhang *et al.* (2011) en *Enterobacter* sp. ($1.6 \mu\text{M } \alpha\text{KB mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y por Shahzad *et al.* (2013) en cepas de *Serratia* sp. ($3.46 \times 10^{-4} \mu\text{M } \alpha\text{KB mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$), aunque no todas fueron solubilizadoras de fosfatos ni produjeron sideróforos. Los resultados de las pruebas de AIA y actividad ACC-desaminasa sugieren que las 13 cepas pueden ser aptas para participar como inóculos microbianos. No obstante, es necesario tomar en cuenta las características metabólicas y la patogenicidad de cada cepa para efectos de aplicación en procesos de fitoremediación. En el Cuadro 2 se muestra la tolerancia de las 13 bacterias a diferentes concentraciones de Cd, Cu, Zn, Pb y As en medio sólido. Todas crecieron entre 0.01 hasta 10 mg L^{-1} de Cd; sin embargo, solo seis cepas crecieron hasta 100 mg L^{-1} de Cd. Autores como Sheng y Xia (2006) reportaron que bacterias procedentes de suelo contaminado con EPT toleraron una concentración similar (117 mg L^{-1}). Sin embargo, Jin *et al.* (2013) observaron crecimiento de cepas de *Burkholderia cepacia* a 200 mg L^{-1} de Cd. Las 13 cepas del presente estudio toleraron hasta 95 mg L^{-1} de Cu. No obstante, concentraciones mayores a 159 mg L^{-1} de dicho elemento inhibieron el crecimiento microbiano de todas las cepas. Carrasco *et al.* (2005) reportaron tolerancia de *Rhizobium* spp., a 100 mg Cu L^{-1} , y Altimira *et al.* (2012) observaron que *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas* y *Arthrobacter* toleran hasta 241 mg L^{-1} de Cu, mientras que Wani y Khan (2013) reportaron la resistencia de *Rhizobium* RL9 a 300 mg L^{-1} de Cu. Las 13 cepas crecieron en concentraciones de 6 hasta 2000 mg L^{-1} de As y 11 crecieron entre 207 a $1,040 \text{ Pb mg L}^{-1}$. Carrasco *et al.* (2005) reportaron que *Rhizobium* sp., toleró 300 mg

de As L^{-1} . Wani y Khan (2013) observaron que *Bradyrhizobium* sp., creció en concentraciones cercanas a $1,400 \text{ mg L}^{-1}$. Respecto a Zn, once cepas crecieron en medio con 33 mg L^{-1} y hasta 196 mg L^{-1} de dicho elemento, aunque *Rhizobium* RL9 mostró tolerancia a 1000 mg L^{-1} (Wani y Khan, 2013). No obstante, no se especifican las condiciones de pH del medio en que probaron esta concentración. Esto es importante porque en el presente trabajo no se pudo probar la tolerancia en concentración superior a 200 mg L^{-1} debido a que el medio se hidrolizó a pH 5.

Observaciones en microscopia electrónica

No se detectaron diferencias en modificación del crecimiento o algún rasgo específico entre tratamientos en los EPT estudiados, excepto en la cepa T2 expuesta a 168 mg L^{-1} de Cd, en la que se observó la presencia de una capa sobre la superficie del cultivo bacteriano (Figura 2b).

Cuadro 2. Tolerancia de 13 bacterias a la presencia de diferentes concentraciones de Cd, Cu, Zn, Pb y As.

Bacteria	Concentración del metal (mg L ⁻¹)																															
	Cd								Cu						Zn				Pb					As								
	0.01	0.1	1	10	100	168	225	337	0	32	95	159	318	636	0	33	98	196	0	207	414	622	829	1036	0	6	60	100	300	500	1000	2000
Af1	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
T2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Af3	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Af4	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Af5	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Af6	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Af7	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Af8	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MC119	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K120	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K123	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K131	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K162	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ con crecimiento, – sin crecimiento.

No obstante, este recubrimiento no se presentó en el cultivo de la misma cepa sin Cd (Figura 2a), resaltando que T2 fue tolerante a la concentración de Cd.

Los resultados indicaron presencia de 54% de Cd en la superficie de la cubierta y 41% de Cd en la parte interna del cultivo bacteriano (Figura 2c). El registro de altos picos de fósforo probablemente indica precipitación de Cd del entorno bacteriano en forma de $\text{Cd}_3(\text{PO}_4)_2$. Lo anterior sugiere respuesta de la bacteria a la presencia de Cd (Sayyed *et al.*, 2015). Valls y de Lorenzo (2002) y Carrasco *et al.* (2005) propusieron que ciertas bacterias en estas condiciones efectúan procesos de detoxificación, biosorción, precipitación y transformación enzimática de metales, y tales mecanismos permiten su aplicación con fines de remediación ambiental.

CONCLUSIONES

Las 13 cepas aisladas de nódulos de huizache o de trébol y de suelo rizosférico procedente de sitios con residuos de mina mostraron características con potencial, como BPCP, en particular las bacterias *Mesorhizobium loti* Af1, *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*) Af6, *Enterobacter cancerogenus* K131, *Escherichia vulneris* K123, *Enterobacter* sp. K162. Los ensayos de tolerancia a NaCl revelaron que ocho cepas fueron altamente tolerantes a 5% a ésta, seis fueron tolerantes a concentraciones superiores a 168 mg L^{-1} de Cd, 95 mg L^{-1} de Cu; once crecieron en concentración de 207 hasta $1,036 \text{ mg L}^{-1}$ de Pb y de 6 hasta $2,000 \text{ mg L}^{-1}$ de As, valores superiores a los que reportan otros autores con los mismos EPT. Asimismo, once toleraron de 33 hasta 196 mg L^{-1} de Zn, lo cual sugiere el potencial biotecnológico para su aplicación en la promoción del crecimiento y desarrollo de plantas en sitios con alto grado de con-

taminación por EPT. Dicho potencial debe verificarse al inocular las bacterias en plantas que se establezcan en suelos contaminados para comprobar su efecto; sin embargo, primero debe descartarse que sean patógenos de humanos o plantas.

Agradecimientos

Noguez-Iniesta J.A. agradece al CONACYT por la beca de maestría otorgada para sus estudios.

LITERATURA CITADA

- Ahemad M., Kibret M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University-Science* 26: 1-20.
- Altamira F., Yáñez C., Bravo G., González M., Rojas L., Seeger M. 2012. Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile. *BioMed Central Microbiology* 12: 193.
- Barazani O.Z., Friedman J. 1999. Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth mediating bacteria? *Journal of Chemical Ecology* 10: 2397-2406.
- Belimov A., Hontzeas N., Safronova V., Demchinskaya S., Piluzza G., Bullitta S., Glick B. 2005. Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biology and Biochemistry* 37: 241-250.
- Carrasco J.A., Armario P., Pajuelo E., Burgos A., Caviedes A., López R., Chamber M.A., Palomares A.J. 2005. Isolation and characterization of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcóllar pyrite mine. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 1131-1140.
- Egamberdieva D., Kamilova F., Validov S., Gafurova L., Kucharova Z. 2008. High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan. *Environmental Microbiology* 10: 1-9.

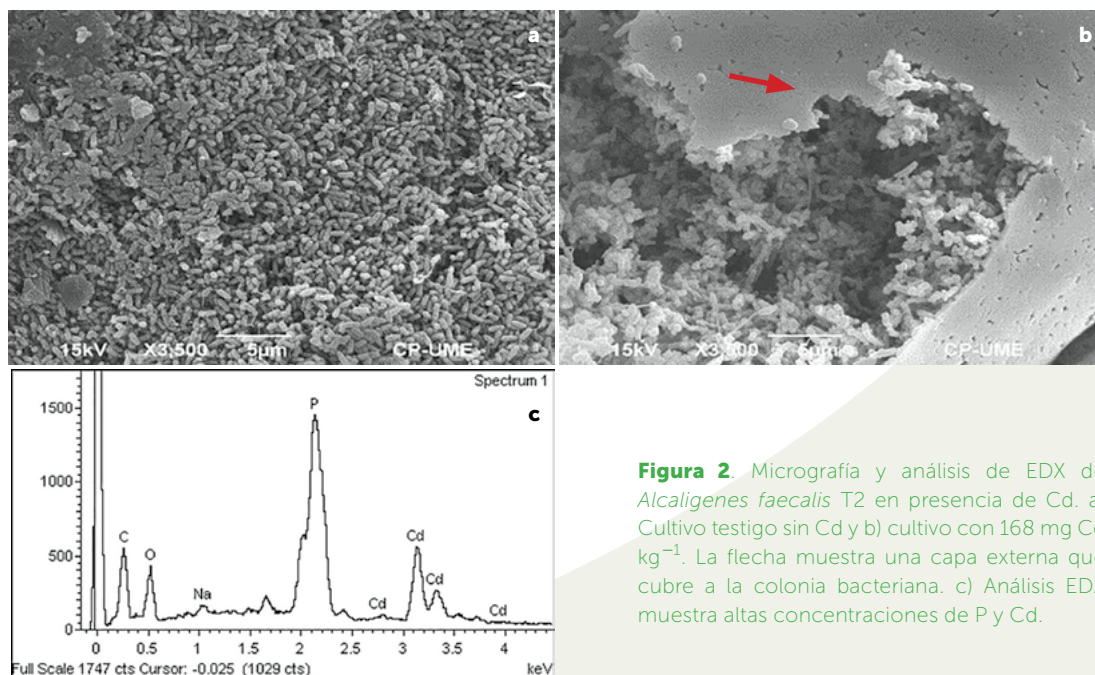


Figura 2. Micrografía y análisis de EDX de *Alcaligenes faecalis* T2 en presencia de Cd. a) Cultivo testigo sin Cd y b) cultivo con 168 mg kg^{-1} Cd. La flecha muestra una capa externa que cubre a la colonia bacteriana. c) Análisis EDX muestra altas concentraciones de P y Cd.

- Ehmann A. 1977. The Van Urk-Salkowski reagent-a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives. *Journal of Chromatography* 132: 267-276.
- Gaonkar T., Bhosle S. 2013. Effect of metals on a siderophore producing bacterial isolate and its implications on microbial assisted bioremediation of metal contaminated soils. *Chemosphere* 93: 1835-1843.
- Ghittoni N., Bueno M. 1996. Changes in the cellular content of trehalose in four peanut rhizobia strains cultured under hypersalinity. *Symbiosis* 20: 117-127.
- Glick B., Cheng Z., Czarny J., Duan J. 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *European Journal of Plant Pathology* 119:329-339.
- Ghosh S., Penterman J., Little R., Chavez R., Glick B. 2003. Three newly isolated plant growth-promoting bacilli facilitate the seedling growth of canola, *Brassica campestris*. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 277-281.
- Gueffrachi I., Rejili M., Mahdhi M., Mars M. 2013. Assessing genotypic diversity and symbiotic efficiency of five rhizobial legume interactions under cadmium stress of soil phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation* 15: 938-951.
- Hao X., Xie P., Johnstone L., Miller S.J., Rensing C., Wei G. 2012. Genome sequence and mutational analysis of plant growth promoting bacterium *Agrobacterium tumefaciens* CCNWG0286 isolated from a zinc-lead mine tailing. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 5384-5394.
- Jin Z., Sha W., Zhang Y., Zhao J., Ji H. 2013. Isolation of *Burkholderia cepacia* JB12 from lead and cadmium-contaminated soil and its potential in promoting phytoremediation with tall fescue and red clover. *Canadian Journal of Microbiology* 59: 449-455.
- Koivunen ME, Morisseau C., Horwath W.R., Hammock BD. 2011. Isolation of a strain of *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*) tilizing methylene urea (ureaformaldehyde) as nitrogen source. *Canadian Journal Microbiology* 50: 167-174.
- Kumar K.V., Singh N., Behl H.M., Srivastava S. 2008. Influence of plant growth promoting bacteria and its mutant on heavy metal toxicity in *Brassica juncea* grown in fly ash amended soil. *Chemosphere* 72: 678-83.
- Koo S., Cho K. 2009. Isolation and characterization of a plant growth-promoting rhizobacterium, *Serratia* sp. SY5. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19: 1431-1438.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information). 2014. U.S. National Library of Medicine. Sitio web: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Fecha de acceso: 20/01/2015
- Saleh S.S., Glick B.R. 2001. Involvement of *gacS* and *rpoS* in enhancement of the plant growth-promoting capabilities of *Enterobacter cloacae* CAL2 and *Pseudomonas putida* UW4. *Canadian Journal of Microbiology* 47: 698-705.
- Sawada H., Leki H., Oyaizu H., Matsumoto S. 1993. Proposal for rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised descriptions for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43:694-702.
- Sayyed R., Patel P., Shaikh S. 2015. Plant growth promotion and root colonization by EPS producing *Enterobacter* sp. RZS5 under heavy metal contaminated soil. *India Journal of Experimental Biology* 53: 116-123.
- Schwyn B., Neilands J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160: 47-56.
- Shahzad S., Arif M., Riaz M., Iqbal Z., Ashraf M. 2013. PGPR with varied ACC-deaminase activity induced different growth and yield response in maize (*Zea mays* L.) under fertilized conditions. *European Journal of Soil Biology* 57: 27-34
- Sheng X., Xia J. 2006. Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium-resistant bacteria. *Chemosphere* 64: 1036-1042.
- Tejera-Hernández B., Heydrich-Pérez M., Rojas-Badía M. 2013. Aislamiento de *Bacillus* solubilizadores de fosfatos asociados al cultivo del arroz. *Agronomía Mesoamericana* 24: 357-364.
- Valls M., de Lorenzo V. 2002. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiology Reviews* 26: 327-338.
- Vessey K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255: 571-586.
- Vincent, J. 1975. Manual práctico de Rizobiología. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. 200 p.
- Wani P.A., Khan M.S. 2013. Nickel detoxification and plant growth promotion by multi metal resistant plant growth promoting *Rhizobium* species RL9. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 91:117-124.
- Watanabe F.S., Olsen S.R. 1965. Test of an ascorbic acid method for determining phosphorous in water and NaHCO₃ extracts from soil. *Soil Science Society of America Journal* 29: 677-678.
- Young J.M., Kuykendall L.D., Martínez-Romero E., Kerr A., Sawada H. 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 89-103.
- Yelton M., Yang S., Edie S., Lim S. 1983. Characterization of an effective salt-tolerant, fast growing strain of *Rhizobium japonicum*. *Journal of General Microbiology* 129:1537-1547.
- Yu X., Li Y., Zhang C., Liu H., Liu J., Zheng W., Kang X. 2014. Culturable heavy metal-resistant and plant growth promoting bacteria in V-Ti magnetite mine tailing soil from Panzhihua, China. *PLoS ONE* 9: e106618.
- Zhang Y., He L., Chen Z., Wang Q., Qian M., Sheng X. 2011. Characterization of ACC deaminase-producing endophytic bacteria isolated from copper-tolerant plants and their potential in promoting the growth and copper accumulation of *Brassica napus*. *Chemosphere* 83: 57-62.