



AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS INOCUOS PRODUCTORES DE SIDERÓFOROS PARA SISTEMAS DE FITORREMEDIACIÓN

[ISOLATION OF INOCUOUS MICROORGANISMS ABLE TO PRODUCE SIDEROPHORES USEFUL IN PHYTOREMEDIATION SYSTEMS]

Guillermo Carrillo-Castañeda^{1*}, Juana Juárez-Muñoz² y Guillermo D. Tijerina-Castro¹

¹Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. Km. 36.5 Carretera México- Texcoco. Montecillo, Estado de México. C. P. 56230. México.

²Centro de Investigaciones Forestales, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 43600 Rancho Universitario, Ex-Hda Aquetzalpa, Tulancingo, Hidalgo. juanijm2002@yahoo.mx

*Autor para correspondencia: carrillo@colpos.mx

RESUMEN

La contaminación del suelo reduce la producción y calidad de los alimentos. Para la recuperación de suelos contaminados la fitorremediación compite favorablemente con costosos métodos físicos y químicos. En este trabajo fueron colectadas muestras de suelo y de raíz de plantas silvestres en nueve sitios en el predio del Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo. Después de determinar el pH de las muestras de suelo, del sobrenadante se estriaron muestras en medio sólido B de King. Del ápice de raíces se obtuvieron muestras para estriarlas en el mismo medio y las cajas fueron incubadas a 26-28 °C. De 223 aislamientos bacterianos obtenidos, 23 fueron seleccionados por producir pigmentos fluorescentes y ser inocuos. Dos aislamientos de suelo (2S-10, 2S-9) y uno de raíz (2R-2) fueron los de mayor producción de pigmentos fluorescentes. La semilla de alfalfa inoculada con células de los aislamientos 2S-10, 2R-2, y 2S-9 germinó en 78, 56, y 88 %, respectivamente mientras que la semilla sin inocular germinó en 88 %. En una prueba preliminar, resaltó el mayor desarrollo de las plántulas inoculadas con el aislamiento 2S10. Mediante la interacción planta-microorganismo se logra acrecentar la potencialidad de las plantas para acumular metales y hacer más eficiente el proceso de fitorremediación.

Palabras clave: *Pseudomonas fluorescens*; sideróforos; factor de translocación; biomasa.

INTRODUCCIÓN

El deterioro de los recursos naturales es causado, en gran medida, por la diversidad de compuestos

SUMMARY

Soil pollution reduces yields and food quality. Fitorremediation is a process used to recuperate polluted soils which competes favorably with more expensive physical and chemical methods. Samples of soil and roots of wild plants were collected at nine sites of Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. After determining the pH of soil samples, the supernatant was streaked on solid King's B medium. Root apex samples were macerated and the liquid collected was streaked on the same medium and all the dishes were incubated at 26 to 28 °C. Of 223 bacterial isolates obtained, 23 were selected for producing fluorescent pigments and being safe for plants. Two soil (2S-10, 2S-9) and one root (2R-2) isolates had the most fluorescent pigment production. Alfalfa seeds inoculated with cells of the isolates 2S-10, 2R-2, and 2S-9 germinated 78, 56, and 88 %, respectively, while uninoculated seeds germinated 88 %. A preliminary test highlighted the best development of the inoculated seedlings with the isolate 2S10. Therefore, using plant-microbe interaction is possible to enhance the potential of plants to accumulate metals, making phytoremediation a more efficient process.

Key words: *Pseudomonas fluorescens*; siderophores; translocation factor; biomass.

orgánicos e inorgánicos que contaminan la atmósfera, agua y suelo debido a fenómenos naturales, así como a diversas actividades antropogénicas (Jensen *et al.*, 2000). Entre los contaminantes inorgánicos más nocivos para los seres vivos están los metales pesados,

derivados principalmente de las actividades mineras. Es imprescindible disminuir los niveles de contaminación, independientemente de los costos de la rehabilitación de los suelos, lo que representa un enorme reto para la humanidad. La fitorremediación es un proceso biológico mediado por plantas y microorganismos para la absorción, degradación y metabolización de los contaminantes, ya sea por la planta misma o por los microorganismos que se desarrollan en la rizósfera (Kabat-Pendias y Pendias, 2000). Es una alternativa para recuperar los suelos contaminados por metales pesados (Chaney *et al.*, 2001). Peralta-Videa *et al.* (2002a) demostraron que el cultivo de *Medicago sativa* L. (alfalfa) tiene uso potencial para reducir el cadmio (II), cromo (VI), cobre (II), níquel (II) y zinc (II) de los suelos contaminados. Estudios realizados han demostrado que microorganismos capaces de sintetizar sideróforos como *Pseudomonas fluorescens*, facilitan a los cultivos la asimilación de nutrientes como el hierro, cuando las células se encuentran asociados a las raíces de las plantas, promoviendo así su desarrollo (Carrillo-Castañeda y Juárez, 1988; Bar-Ness *et al.*, 1992; Carrillo-Castañeda *et al.*, 2000; Carrillo-Castañeda *et al.*, 2002). Ciertos microorganismos promueven en las plantas la asimilación de metales pesados (Peralta-Videa *et al.*, 2002b) y modulan el transporte de cobre y hierro de la raíz a la parte aérea (Carrillo-Castañeda *et al.*, 2003; Carrillo-Castañeda *et al.*, 2005a).

Debido a la importancia que tienen los sideróforos fluorescentes en la asimilación y transporte de metales, ha sido importante desarrollar métodos prácticos para determinar la capacidad de producción de estos compuestos por los microorganismos (Manninen y

Mattila-Sandholm, 1994; Carrillo-Castañeda *et al.*, 2005b). Son pocos los científicos que investigan los beneficios de la asociación de ciertos microorganismos con las raíces para hacer más eficientes las funciones de las plantas para retirar metales pesados de los suelos contaminados.

Los objetivos de esta investigación fueron: 1. Identificar aislamientos bacterianos fluorescentes e inoocuos del género *Pseudomonas* de alta producción de pigmentos fluorescentes. 2. Determinar el efecto de los pigmentos fluorescentes en la germinación. 3. Determinar el desarrollo de plántulas de alfalfa generadas a partir de semillas inoculadas con suspensiones bacterianas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento fue realizado en el predio de 175 ha del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, ubicado en el Km 36.5 de la carretera federal Los Reyes-Texcoco (19°27'30" LN, 98°54'14" LO, altitud 2241 m). Se utilizaron semillas desnudas de *M. sativa* var. Cuf 101 Caloro®. Las muestras de suelo y de raíz de plantas silvestres de apariencia sana y vigorosa fueron colectadas en nueve sitios que fueron seleccionados para hacer un estudio taxonómico de suelos para el Museo de Suelos del Colegio de Postgraduados (<http://www.colpos.mx/museocp/Soil-Museum1.pps>) 25 de enero de 2007. Las muestras se tomaron de estos sitios porque existe un estudio previo muy preciso sobre las características de los suelos. Esta información es complementaria y permite conocer el ambiente físico en el que se desarrollan los microorganismos (Figura 1).



Figura 1. Predio del Colegio de Postgraduados e identificación de los sitios donde fueron obtenidas las muestras de suelo y de raíces. (Tomado de: <http://www.colpos.mx/museocp/Soil-Museum1.pps>).

En cada sitio seleccionado se hicieron dos hoyos (separados 3 m uno del otro) de 30 cm de profundidad y del centro del hoyo se tomaron de cada uno una muestra de suelo de aproximadamente 100 g. En el mismo perímetro fueron colectadas dos muestras de raíz de plantas silvestres de apariencia sana.

Preparación de muestras de suelo

Inmediatamente después de hacer las colectas de las muestras de suelo, 100 g de cada muestra de suelo se depositaron en vasos de precipitados de 100 mL, se agregaron 50 mL de agua destilada esterilizada y se mezclaron con un agitador de vidrio durante 5 min. Las preparaciones se dejaron reposar entre 26 y 28 °C durante 40 min para posteriormente determinar el pH del sobrenadante con un potenciómetro Sargent-Welch modelo LS. De cada sobrenadante se tomaron dos muestras alícuotas de 10 µL para hacer estrías sobre el medio sólido B de King en cajas Petri de vidrio (100 mm de diámetro por 20 mm de alto). Las cajas fueron colocadas en una incubadora Blue M ajustada a la temperatura de 28 °C. Las colonias desarrolladas fueron aisladas en tubos de vidrio pyrex con tapón de rosca de 12 cm de longitud por 1.5 cm de diámetro que contenían agar inclinado de medio B de King.

Preparación de extractos de raíz

Cada muestra de raíz fue colocada en una caja Petri estéril para lavarla con 40 mL de agua destilada estéril. Después de retirar el agua, a partir del ápice de una raíz se obtuvo un segmento de aproximadamente 1 cm de longitud para macerarlo con un bisturí estéril. El líquido obtenido fue estriado sobre medio B de King sólido en cajas Petri de vidrio (100 mm de diámetro por 20 mm de alto) y conservado en una incubadora Blue M entre 26 y 28 °C durante 24 h.

Caracterización de los aislamientos bacterianos

Los aislamientos fueron identificados de acuerdo a: 1). Localidad de la colecta. 2). Muestra (suelo o raíz). 3). Capacidad de fluorescencia al ser expuestos a luz ultravioleta (Desaga Uvvis 366 nm). 4). Respuesta de hipersensibilidad en hojas de *Nicotiana xanthi* (tabaco) con la metodología propuesta por Schaad *et al.* (2001) y 5). Capacidad de generar pudrición en rodajas de papa según metodología propuesta por Dhingra *et al.* (1985).

Determinación de la capacidad de producción de pigmentos fluorescentes por los aislamientos bacterianos

En cajas Petri con medio sólido B de King fueron estriadas células de cada aislamiento y se incubaron hasta por 48 h, entre 26 y 28 °C. Posteriormente, con un asa microbiológica se tomó una muestra de células de cada una de las colonias para inocular 3 mL de medio B de King líquido en tubos de vidrio pyrex con tapón de rosca de 12 cm de longitud por 1.5 cm de diámetro. Los cultivos se dejaron desarrollar durante 24 h en un agitador American Optical ajustado a 60 oscilaciones por minuto, mantenidos entre 26 y 28 °C. A continuación, 600 µL de cada uno de los cultivos se depositaron en tubos Ependorf de 2 mL, las muestras se centrifugaron en una centrífuga clínica (Damon / IEC Division), durante 6 min a 2,400 veces la gravedad y el sobrenadante se transfirió a otro tubo Ependorf de 2 mL. Se depositaron 100 µL del sobrenadante en tubos de ensayo que contenían 2 mL de agua destilada y se agitaron. Posteriormente se determinó la absorbencia a 400 y 405 nm en un espectrofotómetro de doble haz de luz (Baush & Lomb Spectronic, 2000) y la lectura obtenida es proporcional a la concentración de pigmentos fluorescentes lo que permite de manera práctica comparar el contenido de pigmento que se acumula en cada cultivo (Carrillo y Peralta, 1988). En espectroscopia, la absorbencia o absorbancia se define como la cantidad de luz de una longitud de onda específica que es retenida por una sustancia en solución al pasar la luz a través de la muestra. La determinación de la absorbencia es frecuentemente usada en química analítica porque es proporcional al grosor de una muestra y a la concentración de la sustancia en ésta.

Preparación de las suspensiones bacterianas

En cajas Petri de vidrio con medio sólido B de King se estriaron células de cada aislamiento. Los cultivos fueron incubados 48 h, entre 26 y 28 °C. Una muestra de células fue transferida con un asa a tubos de vidrio pyrex con tapón de rosca de 12 cm de longitud por 1.5 cm de diámetro con 5 mL de agua destilada estéril. Las suspensiones bacterianas generadas así se ajustaron a una turbidez de 0.1 de absorbencia a 660 nm que equivale aproximadamente 1×10^8 unidades formadoras de colonias (ufc).

Desinfección de la semilla de alfalfa

En cajas Petri de vidrio estériles se colocaron muestras de 0.5 g de semillas de alfalfa, se agregaron 10 mL de la solución desinfectante Cloralex® (1.2 % de cloro libre) y 0.2 mL de la solución antibacterial Lysol® (Reckitt Colman), en 100 mL de agua destilada. Las semillas permanecieron sumergidas durante 5 min y

posteriormente se lavaron 10 veces con muestras de 10 mL de agua destilada estéril.

Inoculación de la semilla de alfalfa

En cajas Petri de vidrio estériles se colocaron 0.5 g de semillas de alfalfa, 400 μ L de la suspensión bacteriana. Con la ayuda de pinzas de disección, previamente flameadas, las semillas se mezclaron con la suspensión bacteriana y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Desarrollo de plántulas en presencia de sulfato de cobre

Muestras de 0.5 g de semillas de alfalfa, previamente inoculadas y secadas, fueron colocadas sobre dos capas de papel (toalla interdoblada, MARQUIS® Georgia Pacific) en cajas Petri de vidrio estériles. Las semillas se dispersaron sobre la superficie del papel el cual se humedeció con 5 mL de agua destilada estéril y se mantuvieron en oscuridad entre 26 y 28 °C en una cámara germinadora Blue M durante 3 días. Bajo condiciones de asepsia, todas las semillas germinadas (más de 400 por caja) fueron transferidas a cajas Petri estériles, se agregaron 5 mL de la solución de Steiner (Steiner, 1961) al 25 % de la concentración original y 0.2 mg mL⁻¹ de Cu₂SO₄·5H₂O y se colocaron en condiciones de fotoperíodo de 16 h luz y temperatura entre 28 y 30 °C durante 5 días. Diariamente se realizaron cambios de la solución (Steiner-Cu®) bajo condiciones asépticas. Después de 5 días las plántulas desarrolladas fueron lavadas cinco veces con agua desionizada abundante, el vástago fue separado de la raíz con un bisturí y pinzas de disección flameadas. Tanto los lotes de muestras de tallo como de raíz previamente identificados fueron colocados en una estufa y secados hasta peso constante (72 h a 65 °C).

Prueba de hipersensibilidad (Schaad *et al.*, 2001)

La prueba de hipersensibilidad se realizó utilizando plantas de *Nicotiana xanthi* (tabaco) en invernadero. De cada una de las suspensiones bacterianas de los aislamientos fue inyectada, con una jeringa hipodérmica estéril de 5 mL, por el envés de la hoja viendo que el líquido se distribuyera en un área de 1 cm² aproximadamente y, después de 8 y 16 h la respuesta fue observada.

Prueba de pudrición de tubérculos de papa

(Dhingra *et al.*, 1985). Esta prueba se realizó utilizando tubérculos *Solanum tuberosum* (papa) variedad Alpha en una campana de flujo laminar Veco frente a un mechero. Después de lavar con jabón y

enjuagar con agua abundante los tubérculos, se cortan rodajas de aproximadamente 1 cm de espesor para colocar una por caja Petri de 100 mm de diámetro por 15 mm de alto sobre dos hojas de toalla de papel (toalla interdoblada Marquis, Georgia Pacific) humedecida con 3 mL de agua destilada estéril. Con una aguja de disección estéril se toma una muestra de la suspensión bacteriana para hacer una estría en la parte central de la superficie de la rodaja de papa y, se incuban en una incubadora Blue M ajustada a 26 °C para observar la respuesta 24 y 48 h después.

Diseño experimental y análisis de resultados

El diseño experimental utilizado para evaluar el porcentaje de germinación fue un diseño completamente al azar con 24 tratamientos, un testigo y dos repeticiones. Con los resultados se hizo análisis de varianza con un nivel de significancia de 5 % y comparación múltiple de medias con el método de Tukey con el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System version 8, 1990).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Abundancia de poblaciones bacterianas por localidad de colecta

El pH del sobrenadante de las muestras de suelo varió de 6.7 (localidad 8) hasta 9.65 (localidad 5), condiciones bajo las cuales estos microorganismos se desarrollan normalmente (Figura 2). El valor del pH puede variar de acuerdo a la época del año en que sea determinado, lo que pudiera afectar la dinámica de las poblaciones de microorganismos existentes. Se conoce que en las nueve localidades muestreadas se presentan diferencias significativas en tipo de suelo, materia orgánica y pH (<http://www.colpos.mx/museocp/Soil-Museum1.pps>).

Se obtuvieron un total de 223 aislamientos bacterianos, 24 de ellos fueron seleccionados por su capacidad de producir pigmentos fluorescentes. El mayor número de estos aislamientos fue obtenido de muestras de raíz y del suelo de pH menor a 7.9. En la localidad seis se obtuvieron cuatro aislamientos a pesar de que el pH del suelo fue mayor de 9. Como los aislamientos fueron obtenidos de muestras de raíz, se presume que las células se encuentran protegidas de este ambiente, al no encontrarse expuestas directamente a esa condición de pH. Los datos que se presentan aquí son el inicio de una investigación que tiene como objetivo la selección de plantas y microorganismos que en asociación (plantas con sus raíces colonizadas con microorganismos bacterianos),

puedan llevar a cabo eficientemente la fitoextracción de metales de suelos contaminados con metales. Esto puede darse en todo tipo de suelo, por lo que se requieren colecciones de cultivos bacterianos que puedan desarrollarse favorablemente en suelos salinos, ácidos o alcalinos.

La mayor cantidad de aislamientos de las raíces correspondió a las muestras de suelo con pH cercano a 6.0, condición edáfica para el crecimiento de los cultivos y también para estos microorganismos que de manera natural se asocian a las raíces de las plantas.

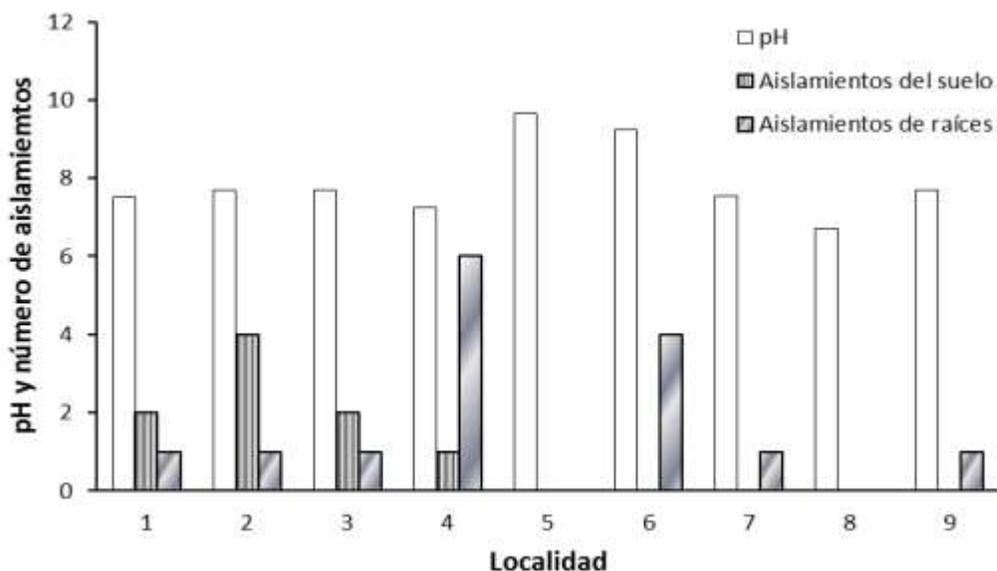


Figura 2. Número de aislamientos bacterianos fluorescentes de muestras de suelo y raíz aislados de localidades indicadas.

Germinación de semilla de alfalfa inoculada con suspensiones bacterianas

Es importante determinar en qué medida la presencia de este tipo de bacterias afecta la germinación de la semilla, así como el desarrollo de las plántulas. Para que las raíces sean colonizadas, la forma más práctica y económica consiste en inocular la semilla con suspensiones bacterianas. Así, la semilla inoculada es manipulada normalmente para la siembra. Nuestros resultados contrastan con lo indicado por Carrillo *et al.* (2003), quienes demostraron que la semilla de alfalfa inoculada con suspensiones bacterianas de *Pseudomonas* sp. de cultivos desarrollados en el medio RM-Fe tuvo mayor porcentaje de germinación. *P. fluorescens* pertenece al grupo de bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (Lemanceau, 1992) conocidas como PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). Los resultados muestran que el porcentaje de germinación de la semilla de alfalfa inoculada fue variado; fue igual al de la semilla sin inocular (88 %) o inhibido 100 % (aislamiento 2S-2). En la semilla inoculada con células de los tres aislamientos que tienen la mayor

producción de pigmentos fluorescentes, el porcentaje de inhibición de la germinación varió de 0% (aislamiento 2S-9, que está en tercer lugar en la producción de pigmento fluorescente) a 34% (aislamiento 2R-2, que está en segundo lugar en la producción de pigmento fluorescente) y únicamente 11% de inhibición de la germinación causaron las células del cultivo 2S-10, de mayor producción de pigmento fluorescente. El aislamiento 1R-19, que prácticamente no produce pigmento fluorescente, causó 30 % de inhibición de la germinación (Tabla 1). Se infiere por tanto, que no existe relación entre la capacidad de producción de pigmentos fluorescentes y la germinación de la semilla de alfalfa. Probanza *et al.* (1996) indican que existen bacterias DRB (*Deleterius rhizobacteria*) que reducen, pero no inhiben la germinación. Es posible que la respuesta en la germinación de la semilla dependa del medio de cultivo en que los cultivos bacterianos se desarrollen, aspecto que se debe estudiar para cada caso en particular. El medio de cultivo RM-Fe se utiliza para inducir la producción de sideróforos, moléculas orgánicas producidas por las células bacterianas cuando se desarrollan en medios carentes de hierro.

Tabla 1. Producción de pigmento fluorescente en los cultivos de las cepas bacterianas (absorbancia) y porcentaje de germinación de semillas de alfalfa inoculadas con suspensiones celulares. El primer número indica el sitio donde se colectó el aislamiento, la letra si fue aislado de suelo (S) o raíz (R) y finalmente se indica el número de aislamiento de ese sitio.

Cepa	Absorbancia	Germinación (%)	Cepa	Absorbancia	Germinación (%)
1S-28	0.102 ^{cd}	65 ^{abc}	4R-2	0.035 ^{ef}	86 ^{ab}
1S-37	0.020 ^{ef}	66 ^{abc}	4R-3	0.037 ^{ef}	81 ^{abc}
1R-19	0.016^f	62^{bc}	4R-4	0.033 ^{ef}	75 ^{abc}
2S-6	0.095 ^{de}	78 ^{abc}	4R-5	0.033 ^{ef}	74 ^{abc}
2S-7	0.118 ^{bc}	73 ^{abc}	4R-6	0.106 ^{ef}	76 ^{abc}
2S-9	0.144^{ab}	88^a	6R-1	0.033 ^{ef}	83 ^{ab}
2S-10	0.180^a	78^{abc}	6R-2	0.020 ^{ef}	86 ^{ab}
2R-2	0.157^{ab}	56 ^c	6R-8	0.018 ^{ef}	8 ^a
3S-2	0.040 ^{def}	0 ^d	6R-9	0.018 ^{ef}	76 ^{abc}
3R-4	0.059 ^{def}	2 ^d	7R-8	0.036 ^{ef}	79 ^{abc}
4S-4	0.060 ^{ef}	69 ^{abc}	9R-6	0.040 ^{ef}	77 ^{abc}
4R-1	0.067 ^{ef}	80 ^{abc}	Sin inocular	0	88 ^a

a,b,c,d,e,f[†] Letras diferentes indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

Desarrollo de las plántulas de alfalfa a partir de semilla inoculada con suspensiones bacterianas

A pesar de que los resultados del desarrollo de las plántulas inoculadas son preliminares (Tabla 2), se observan ciertas tendencias: El desarrollo de la parte aérea como el de la raíz de las plántulas fue afectado positiva y negativamente en relación al testigo, por la presencia de las bacterias. Tanto la longitud del vástago como la de la raíz se incrementaron en relación con la capacidad de acumulación de pigmento de los tres aislamientos de mayor producción. En cuanto a la producción de biomasa del vástago, se observa la misma tendencia pero en el caso de la raíz, los tres aislamientos de mayor producción promovieron la mayor producción de biomasa. Se ha determinado en qué medida estas células afectan tanto el proceso de germinación como el desarrollo de las plantas utilizando como modelo la semilla de alfalfa. Tal y como se esperaba, el efecto de la presencia de estas células no necesariamente debe afectar por igual el proceso de la germinación y el desarrollo de la planta, pues en cierta medida, cada uno de estos estadios es fisiológicamente diferente. Para iniciar un proceso de biorremediación se habrá de seleccionar el tipo de planta hiperacumuladora

idónea y se tendrá que determinar la pertinencia del uso de estos aislamientos para incrementar la capacidad de asimilación de metales por la raíz de dicha planta. La prueba para determinar en qué medida estas células afectan a la semilla en el proceso de germinación, así como en el desarrollo de las plantas deberá llevarse a cabo para seleccionar al mejor microorganismo como complemento de la planta, a fin de obtener la máxima eficiencia del proceso de fitorremediación. En las plantas hiperacumuladoras es importante identificar además, dos tipos de respuesta: Las plantas que acumulan el metal en la parte aérea y cuya concentración rebasa los niveles de metal en el suelo; así como las plantas excluyentes, que tienen la capacidad de desarrollarse en suelos contaminados por metales, pero en éstas el metal es acumulado particularmente en las raíces. La proporción de metal acumulado en tallo/raíz es < 1 (Sêkara *et al.*, 2005). Adicionalmente, es importante conocer el papel que juegan los microorganismos para amortiguar el efecto inhibitorio de soluciones de cobre (Cu) en el desarrollo de las plantas. Para tal fin, las semillas son inoculadas con suspensiones bacterianas para que las raíces sean colonizadas y, en estas condiciones, las plántulas se desarrollan en presencia de soluciones de cobre.

Tabla 2. Longitud y peso de biomasa seca de vástago y raíz de plántulas de alfalfa inoculadas y desarrolladas en la solución de Steiner-Cu.

Inóculo	Longitud (cm) (%)		Biomasa (mg) (%)	
	Vástago	Raíz	Vástago	Raíz
2S-10	1.92 (99)	1.08 (112)	1.8 (112)	0.6 (120)
2R-2	1.79 (93)	1.01 (105)	1.7 (106)	0.6 (120)
2S-9	1.69 (87)	0.91 (95)	1.7 (106)	0.6 (120)
1R-19	1.86 (96)	0.92 (96)	1.6 (100)	0.5 (100)
Sin inocular	1.93 (100)	0.96 (100)	1.6 (100)	0.5 (100)

(%) = Porcentaje respecto al testigo sin inocular.

Estos resultados resaltan la complejidad de este tipo de interacciones, lo que demuestra que es recomendable estudiar la biología de la interacción planta-bacteria antes de utilizar a estos microorganismos para acrecentar la potencialidad de las plantas para acumular metales. Sêkara *et al.* (2005) determinaron la acumulación y distribución de cobre y zinc en la planta en cinco cultivos importantes en relación con el uso de estas plantas para la fitorremediación de los suelos contaminados. Es factible que existan plantas que se desarrollen en suelos contaminados, en las que el metal sea preferentemente concentrado en ciertos órganos de la planta y, que la semilla pudiera ser útil como alimento.

Condición fitopatogénica de los aislamientos fluorescentes

Uno de los 24 aislamientos fluorescentes resultó ser del género *Serratia*; como es conocido, *Serratia marcescens* es un bacilo gram negativo de la familia Enterobacteriaceae que puede ser peligroso para el hombre, razón por la que fue desechado.

Para que los aislamientos seleccionados puedan eventualmente ser liberados de manera segura al ambiente, es importante determinar su inocuidad, tanto para las plantas como para los animales. Al ser sometidos a la prueba de hipersensibilidad, en el área de la hoja de tabaco donde la suspensión bacteriana fue inyectada después de 8 y 16 h, en ningún caso se apreció cambio alguno en la coloración verde o aparición de áreas necróticas de la hoja. Al observar los resultados de la prueba de pudrición de tubérculos de papa (después de 24 y 48 h de incubación de la suspensión bacteriana en la parte central de la superficie de la rodaja de papa) ningún signo de pudrición o ablandamiento de los tejidos fue

observado. Estos aislamientos de microorganismos fluorescentes fueron obtenidos de muestras de raíz de plantas de aspecto sano y vigoroso y del suelo. En consecuencia y de acuerdo a los criterios establecidos en este trabajo, ninguno de los aislamientos probados puede ser considerado como microorganismo fitopatogénico.

CONCLUSIONES

Únicamente 10% de las cepas aisladas produce pigmentos fluorescentes. Más de la mitad de los aislamientos fluorescentes fue obtenido en raíces, lo que las protege del pH alcalino del suelo. No existe relación entre la capacidad de producción de pigmentos fluorescentes y la germinación de la semilla de alfalfa. La longitud del vástago como la de la raíz se incrementa en relación con la capacidad de acumulación de pigmento de los tres aislamientos de mayor producción. En cuanto a la producción de biomasa del vástago, se observa la misma tendencia y, en el caso de la raíz, los tres aislamientos de mayor producción presentaron la mayor producción de biomasa. Los tres aislamientos de mayor producción de pigmentos tienen potencialidad para mejorar el proceso de fitoextracción en suelos contaminados y con pH mayores de 7.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico que hizo posible el desarrollo de los estudios de Maestría de G. D. T. C.

REFERENCIAS

Bar-Ness, E., Hadar, Y., Chen, Y., Shanzer, A., Libman, J. 1992. Iron uptake by plants from

- microbial siderophores. *Plant Physiology*. 99: 1329-1335.
- Carrillo-Castañeda, G, Juárez, J. 1988. Caracterización de microorganismos promotores del desarrollo vegetal y evaluación de su impacto en sistemas de producción. Seminario Mesoamericano sobre Agrodiversidad en la Agricultura Campesina. Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias Agrícolas. Toluca, Méx. 29/abril/1988. pp: 180-188.
- Carrillo-Castañeda, G, Juárez-Muñoz, J., Ruiz, L. D., Muller, G R. 2000. Aumento del rendimiento de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) cuando la raíz se desarrolla colonizada por microorganismos. *Biotecnología Aplicada*. 17: 171-176.
- Carrillo-Castañeda, G, Juárez-Muñoz, J., Peralta-Videa, J., Gomez, E., Tieman, K. J., Gardea-Torresdey, J. L. 2002. Alfalfa growth promotion by bacteria grown under iron limiting conditions. *Advances in Environmental Research*. 6: 391-399.
- Carrillo-Castañeda, G, Juárez-Muñoz, J., Peralta-Videa, J., Gomez, E., Gardea-Torresdey J.L. 2003. Plant growth-promoting bacteria promote copper and iron translocation from root to shoot in alfalfa seedlings. *Journal Plant Nutrition*. 26(9): 1801-1814.
- Carrillo-Castañeda, G, Juárez-Muñoz, J., Peralta-Videa, J., Gomez, E., Gardea-Torresdey, J. L. 2005a. Modulation of uptake and translocation of iron and copper from root to shoot in common bean by siderophore-producing microorganisms. *Journal of Plant Nutrition*. 28: 1853-1865.
- Carrillo-Castañeda, G, Juárez-Muñoz, J., Peralta-Videa, J. 2005b. A spectrophotometric method to determine the siderophore production by strains of fluorescent *Pseudomonas* in the presence of copper and iron. *Microchemical Journal*. 81: 35-40.
- Carrillo-Castañeda, G, Peralta-Videa, J. 1988. Siderophore-like activities in *Rhizobium phaseoli*. *Journal of Plant Nutrition*. 11(6-11): 935-944.
- Chaney, R. L., Angle, S. J., Baker, J. M. A. 2001. The phytomining of certain elements. *Cooperative Research and Development Agreement*. 58: 7-570.
- Dhingra, D. O., Sinclair, B. J. 1985. *Basic Plant Pathology Methods*. CRC Press, Florida, USA. 120 p.
- Jensen, D. L., Holm, P. E., Christensen, T. H. 2000. Soil and ground water contamination with heavy metals at two scrap iron and metal recycling facilities. *Waste Management and Research*. 18: 52-63.
- Kabatas-Pendias, A. S., Pendias, H. 2000. *Trace elements in soils and plants*. CRC Press, Ann Arbor, Michigan, USA. 432 p.
- Lemanceau, P. 1992. Effects bénéfiques de Rhizobactéries sur plantes: exemple des *Pseudomonas* spp. *fluorescens*. *Agronomie*. 12: 413-434.
- Manninen, M., Mattila-Sandholm, T. 1994. Methods for the detection of *Pseudomonas* siderophores. *Journal of Microbiological Methods*. 19(3): 223-234.
- Peralta-Videa, J., Gardea-Torresdey, J. L., Gomez, E., Tieman, K. J., Parsons, J. G., Carrillo-Castañeda, G 2002a. Effect of mixed cadmium, copper, nickel and zinc at different pHs upon alfalfa and heavy metal uptake. *Environmental Pollution*. 119(3): 291-301.
- Peralta-Videa J., Gardea-Torresdey, J. L., Gomez, E., Tieman, K. J., Parsons, J. G., de la Rosa, G., Carrillo-Castañeda, G 2002b. Potential of alfalfa plant to phytoremediated individually contaminated montmorillonite-soils with cadmium (II), chromium (VI), copper (II), nickel (II), and zinc (II). *The Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 69: 74-81.
- Probanza, A., Lucas, J. A., Acero, N., Gutiérrez, F. J. M. 1996. The influence of native rhizobacteria on European alder [*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn] growth. I. Characterization of growth promoting and growth inhibiting strains. *Plant Soil*. 182: 59-66.

SAS Institute Inc. 1990. Statistical Analysis System (Software). Release Ver. 6.12. TS020. Copyright©. 1989-1996, USA.

Schaad, N. W., Bones, J. B., Chun, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd Ed. APS Press. St. Paul, USA.

Sêkara, A., Poniedzialek, M., Ciura, J. Jêdrszczyk, E. 2005. Zinc and copper accumulation and distribution in the tissues of nine crops: Implications for phytoremediation. Polish Journal of Environmental Studies. 14 (6): 829-835.

Steiner, A. A. 1961. A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. Plant Soil. 15: 134-154.

Submitted February 16, 2011 – Accepted June 07, 2011
Revised received October 10, 2011