

CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS RIZOSFÉRICAS DE SUELO CIRCUNDANTE A UNA PLANTA RECICLADORA DE PLOMO (Pb)

(Characterization of rhizospheric bacteria of the surrounding soil of a lead [Pb] recycling plant)

Milton Senen BARCOS-ARIAS^{1,2*}, María MALDONADO-VEGA³,
José Antonio VERA-NÚÑEZ² y Juan José PEÑA-CABRIALES²

¹ Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), Facultad de Ciencias de la Vida, Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, Campus Gustavo Galindo, km. 30.5 Vía Perimetral, P.O. Box 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador

² Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato, km. 9.6 libramiento norte carretera Irapuato-León, 36821 Irapuato, Guanajuato, México

³ Dirección de Planeación, Enseñanza e Investigación del Hospital Regional de Alta Especialidad del Bajío, 37660 León, Guanajuato, México

*Autor para correspondencia: mbarcos@espol.edu.ec

(Recibido mayo 2017; aceptado julio 2018)

Palabras clave: escoria, tolerancia a Pb, ácido indolacético, sideróforos, fitorremediación

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue aislar y caracterizar bacterias rizosféricas de huizache (*Acacia farneciana*) y mezquite (*Prosopis glandulosa*), vegetación predominante en torno a una empresa recicladora de plomo (Pb). Se evaluaron la tolerancia de las bacterias a $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y su capacidad de producción de ácido indol-3-acético (AIA) y de sideróforos por medio de las técnicas de Salkowski y el medio cromo azurol S (CAS)-agar, respectivamente. Los aislados bacterianos se identificaron a través del gen 16S ARNr. Diez cepas bacterianas toleraron concentraciones de 0.6 a 1.8 mM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, de las cuales siete cepas presentaron producción de AIA de hasta 60.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y cinco cepas presentaron producción de sideróforos. Cualitativamente, las cepas L2, L48 y L67 presentaron un halo de color naranja más intenso que las cepas L138 y L23, indicador de reacción positiva de producción de sideróforos. La producción de sideróforos del tipo hidroxamato por las cepas L2, L48, L67, L138 y L23 varió de 0.02 a 0.054 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados permiten concluir que existen cepas bacterianas en torno a la empresa recicladora de Pb con un alto potencial para utilizarse en procesos de fitorremediación.

Key words: slag, tolerance to Pb, indoleacetic acid, siderophores, phytoremediation

ABSTRACT

The aim of this research was to isolate and characterize rhizosphere bacteria of huizache (*Acacia farneciana*) and mesquite (*Prosopis glandulosa*), predominant vegetation surrounding a lead (Pb) recycling company. Bacteria were evaluated on their tolerance to $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, and their capacity to produce indole-acetic acid (IAA) and siderophores using Salkowski and chrome azurol S (CAS) agar medium techniques, respectively.

The bacterial isolates were identified through the 16S rRNA gene. Ten bacterial strains tolerated concentrations between 0.6 and 1.8 mM of $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, of which seven strains had IAA production of up to 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and five strains showed siderophore production. Qualitatively, the bacterial strains L2, L48 and L67 presented a more intense orange halo than the bacterial strains L138 and L23, which indicates a positive reaction of siderophores production. Additionally, the siderophores production of the hydroxamate type produced by the bacterial strains L2, L48, L67, L138 and L23 was variable, between 0.02 and 0.054 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The results of this research allow concluding that there are bacterial strains around the lead (Pb) recycling company with a high potential for phytoremediation processes.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, se ha considerado a México como uno de los principales países productores de plomo (Pb) (Flores y Albert 2004, Flores et al. 2012), con un 75 % de su producción destinada a la fabricación de baterías. Aunque en el país se dispone de pocos datos sobre la producción secundaria de Pb, se conoce que ésta supera la producción primaria. Así, el país ha autorizado 21 plantas para reciclar 864 003 t/año de baterías de Pb (OK-FC 2011). Estas empresas generan problemas de contaminación por Pb en los suelos circundantes (Flores y Albert 2004). En el proceso de fundido de las placas de Pb se genera un residuo sólido llamado “escoria” que contiene principalmente PbO , FeO , Na_2O , C, CaO , SiO_2 , ZnO , MgO y SO_3 , los cuales representan un riesgo para la salud humana y el ambiente (Coya et al. 2000, Penpolcharoen 2005, de Andrade-Lima y Bernárdez 2011). La búsqueda de plantas hiperacumuladoras y de bacterias resistentes a metales pesados que promuevan el crecimiento vegetal y productoras de sideróforos ha generado grandes expectativas para la remoción de metales pesados a partir de suelos contaminados (Rajkumar et al. 2010, Covarrubias et al. 2015). Existen reportes de bacterias que presentan resistencia a Pb, como *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas marginalis*, *Citrobacter freundii*, *Ralstonia metallidurans*, *Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas putida* (Levinson y Mahler 1998, Roane 1999, Borremans et al. 2001, Pérez et al. 2015). Algunas bacterias pueden sintetizar metabolitos secundarios como ácido indol-3-acético (AIA), ácido giberélico (GA_3), zeatina, y ácido abscísico, entre otros, los cuales tienen un efecto positivo sobre el desarrollo de las plantas (Karadeniz et al. 2006, Vega et al. 2016). Las rizobacterias productoras de sideróforos proporcionan nutrimentos, especialmente hierro, a las plantas; además, los sideróforos producidos por estas bacterias en la rizósfera se unen a iones de metales pesados, mejorando la disponibilidad para las plantas

(Nair et al. 2007, Rajkumar et al. 2010, Velásquez et al. 2011, Sessitsch et al. 2013). Los sideróforos forman complejos estables con cationes divalentes metálicos ambientalmente importantes como el Cd, Cu, Ni, Pb y Zn (Ahmed y Holmström 2014). Los sideróforos producidos por *Pseudomonas azotoformans* pueden remover hasta el 92.8 % del arsénico (As) presente en un suelo contaminado (Nair et al. 2007).

El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar in vitro bacterias rizosféricas del suelo que circunda a una empresa recicladora de plomo (Pb) con tolerancia a $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y con capacidad de producir ácido indol-3-acético (AIA) y sideróforos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo de suelo

El aislamiento de bacterias rizosféricas alrededor de la empresa recicladora de Pb se realizó mediante el muestreo de 14 sitios en dirección de los cuatro puntos cardinales y en función del viento dominante de la zona (noreste-suroeste), a distancias de 50, 150 y 300 m de la planta recicladora de Pb, con excepción del sur y del este, donde sólo se muestreo a 50 m por tener colindancia con otras empresas. Se tomó 1 kg de suelo rizosférico de las especies de plantas predominantes en el sitio, huizache (*Acacia farneciana*) y mezquite (*Prosopis glandulosa*). Las 14 muestras se etiquetaron y colocaron en bolsas de polietileno y se mantuvieron a 4 °C hasta su respectivo análisis.

Determinación de Pb total en suelo

El contenido de Pb total se cuantificó por triplicado en las 14 muestras de suelos homogeneizadas y secadas a 70 °C hasta alcanzar peso contante (Díaz et al. 1996). Una muestra de 500 mg se colocó en tubos de digestión de 50 mL (TECATORTM), con 15 mL de ácido nítrico al 98 % y ácido perclórico (5:1 v/v). Las muestras se digirieron a 120 °C (1016 Digester

40TM, TECATORTM) durante 3 h hasta alcanzar 1 mL. La solución obtenida se llevó a un volumen de 50 mL con agua desionizada y el contenido de Pb se determinó por espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) (IRIS Interpid II Model XDL, Thermo Electron Corporation, Franklin, MA, USA) siguiendo las instrucciones del método EPA-6010 (USEPA 2007).

Aislamiento bacteriano

El conteo de la población bacteriana se realizó por triplicado en las 14 muestras de suelos homogeneizadas. Una muestra de 10 g de suelo se agregó a 90 mL de una solución de fosfatos (g/L): 0.2 KH₂PO₄, y 0.8 K₂HPO₄, a pH 7.0, la cual se mantuvo en agitación a 100 revoluciones por minuto (rpm)/30 min (Mauricio et al. 2010). Posteriormente se realizaron diluciones seriadas hasta 10⁻³ y se procedió a la siembra en placas con medio mineral M9 modificado con la composición siguiente (g/L): 6.0 Na₂HPO₄, 3.0 KH₂PO₄, 1.0 NH₄Cl, 0.5 NaCl, 0.5 extracto de levadura y 10 glucosa; además se incluyeron (mL/L): 2.0 MgSO₄·7H₂O 1 M, 0.1 CaCl₂ 0.1 M, y 0.1 tiamina a una concentración de 1 mg/mL (esterilizado por filtración 0.2 µm), pH 7 (Sambrook y Green 2012). El medio mineral M9 sin la adición de Na₂HPO₄ y con la adición de Pb(NO₃)₂ 0.3 mM (Massadeh et al. 2005) se utilizó para estimar la población bacteriana tolerante a Pb(NO₃)₂. Las placas se incubaron a 28 °C por 48 h. El total de bacterias aeróbicas cultivables se determinó como unidades formadoras de colonia (UFC)/g de suelo como lo describen Brim et al. (1999). Colonias que crecieron en medio mineral M9 con Pb(NO₃)₂ y presentaron morfología macroscópica diferente fueron aisladas y purificadas por estría hasta obtener cepas puras. Éstas se almacenaron a -70 °C en medio Luria-Bertani (LB) (g/L): 10 bactotripton, 5 extracto de levadura, 10 NaCl (Atlas 2010) con glicerol 50 % y 0.3 mM de Pb(NO₃)₂.

Selección de aislados bacterianos

De los aislados obtenidos se seleccionaron aquellos que presentaron tolerancia a Pb(NO₃)₂ 0.3 mM, positivos a la prueba de Salkowski y para el medio cromo azurol S (CAS) agar, que sirven para determinar la producción de AIA y de sideróforos, respectivamente.

Identificación de aislados bacterianos

Para la identificación de los géneros bacterianos seleccionados se procedió a cultivar los aislados en medio LB por 48 h de incubación. Se tomó una alícuota de 3 mL que fue centrifugada a 7000 rpm/5 min.

La pastilla obtenida se utilizó para la extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) usando el kit ZR fungal/bacterial DNA kitTM (Zymo research) de acuerdo con las condiciones establecidas por el fabricante. El ADN genómico purificado se almacenó a -20 °C. Los aislados bacterianos rizosféricos se identificaron amplificando el gen 16S ARN ribosomal mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los oligos fd1 (5'-CCGA-ATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCT-CAG-3') y rd1 (5'-CCC GGGATCCAAGCTTAA-GGAGGTGATCCAGCC-3'), los cuales amplifican aproximadamente 1600 pb de la región ribosomal (Mauricio et al. 2010). La PCR se llevó a cabo en un volumen de 51 µL en las siguientes condiciones: 48 µL Platinum PCR Supermix (Invitrogen), 1 µL de cada primer (fd1 y rd1) (50 ng/µL) y 1 µL de ADN purificado. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Eppendorf, Mastercycler Gradient). Las condiciones para la PCR fueron las siguientes: 94 °C (5 min), 35 ciclos a 94 °C (50 s), 58 °C (50 s), y 72 °C (60 s) y finalmente a 72 °C durante 5 min.

Los productos amplificados se corrieron en un gel de agarosa 1.5 % cargándose 3 µL del producto de la PCR y 0.5 µL del amortiguador de carga 6x (Invitrogen). Se utilizó un marcador de peso molecular de 1 kb ADN Ladder (Fermentas). El gel se corrió a 85 voltios (V) durante 45 min y posteriormente se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta (UV). Los productos amplificados de los diferentes aislados se removieron del gel y se purificaron usando el kit Illustratm GFXTM PCR DNA, Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto purificado y concentrado (30 ng/µL) se envió al laboratorio de secuenciación del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Unidad Irapuato. Para el análisis de las muestras se utilizó el método de la cadena dideoxi terminal (Sanger et al. 1977), en un secuenciador automático de ADN (ABI 37300xl DNA, PE Applied Biosystems, INC.). Los resultados de las secuencias se analizaron en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank a través del programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), buscando identidad (≥ 99 %) con cepas tipo reportadas. Las secuencias obtenidas con mayor similitud se alinearon con el método de alineación múltiple Muscle del programa MEGA versión 5.05 (Tamura et al. 2011). Para la construcción del árbol filogenético, se utilizó el método de Neighbor-Joining (NJ) (Saitou y Nei 1987), con valores de bootstrap de 1000 unidades y un máximo de

parsimonia. Una cepa de *Pseudomonas* sp. se utilizó como grupo externo.

Cuantificación de AIA

Los aislados bacterianos tolerantes a Pb se cultivaron por 24 h en 3 mL de medio líquido Czapek. De cada preinóculo (1×10^6 UFC/mL) se inocularon 100 μ L en tubos de ensayo con 15 mL del mismo medio, suplementado con 200 μ g L-triptófano/mL (Sigma, USP). Los cultivos se incubaron en oscuridad con agitación (120 rpm) a 28 °C durante 3 días. Posteriormente, 1 mL de cada cultivo se centrifugó a 7000 rpm/5 min. Al sobrenadante se le adicionaron 2 mL de reactivo de Salkowski (50 mL HClO₄ 35 % + 1 mL FeCl₃ 0.5 M). La reacción se incubó en oscuridad por 30 min a temperatura ambiente. La cuantificación de AIA se determinó a una longitud de onda de 530 nm en un espectrofotómetro de microplaca μ Quant. Este ensayo se realizó con tres réplicas independientes. La absorbancia del cromógeno de indol se transformó a través de una curva patrón con diferentes concentraciones de AIA (0, 10, 20, 30, 40 y 50 μ g AIA/mL) (Sigma) (Tsavkelova et al. 2007).

Medición de sideróforos

La producción de sideróforos en las cepas se realizó en un medio gelificado específico CAS-agar propuesto por Schwyn y Neilands (1987). El medio CAS-agar es la combinación de cuatro soluciones preparadas independientemente: *a*) solución indicadora de Fe-CAS (solución 1): 10 mL FeCl₃ 1 mM disuelto en HCl 10 mM, 50 mL de una solución CAS (1.21 mg/mL), esta última se añadió lentamente a 40 mL de una solución (1.82 mg/mL) de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMA por sus siglas en inglés); *b*) solución amortiguadora (solución 2): disolución de 30.24 g PIPES (ácido piperazina-N,N'-bis[2-etanosulfónico]) en 750 mL de una solución salina: 0.3 g KH₂PO₄, 0.5 g NaCl y 1.0 g NH₄Cl a pH 6.8, aforada a 800 mL, adicionando 15 g agar; *c*) solución 3: 2 g glucosa, 2 g manitol, 493 mg MgSO₄, 11 mg CaCl₂, 1.17 mg MnSO₄, 1.4 mg H₃BO₃, 0.04 mg CuSO₄, 1.2 mg ZnSO₄ y 1.0 mg Na₂MoO₄ en 70 mL de agua destilada; *d*) las soluciones se esterilizaron a 15 psi, después se mezclaron y al final se adicionaron 30 mL de una solución de casaminoácidos 10 % (p/v) esterilizada por filtración (solución 4) (Alexander and Zuberer 1991).

Identificación de sideróforos

Para identificar la naturaleza química de los sideróforos de cada cepa bacteriana seleccionada, una

concentración aproximada de 1×10^6 UFC/mL se inoculó en tubos de ensayo con 15 mL de medio succinato (g/L): 6.0 K₂HPO₄, 3.0 KH₂PO₄, 1.0 (NH₄)₂SO₄, 0.2 MgSO₄·7H₂O, 4.0 C₄H₄Na₂O₄·6H₂O, a pH 7.0. Después se incubaron con agitación (120 rpm) a 28 °C por 3 días (Nair et al. 2007). Posteriormente los tubos se centrifugaron a 7000 rpm/5 min, recuperándose el sobrenadante en el cual se identificó la naturaleza química de los sideróforos (hidroxamato, catecolato y carboxilato) producidos por los aislados bacterianos de acuerdo con Baakza et al. (2004).

Hidroxamato

Ensayo con cloruro férrico (FeCl₃)

A 1 mL del sobrenadante filtrado se le agregó 1 mL de FeCl₃ 2 % p/v. La formación de una coloración rojo púrpura indicó presencia de sideróforos; asimismo, una señal de 420 nm a 450 nm indicó sideróforos del tipo hidroxamato. Las muestras se analizaron en un espectrofotómetro de radiación ultravioleta (UV) visible VARIAN modelo CARY 3E (Baakza et al. 2004).

Prueba con tetrazolium

En un tubo eppendorf de 1.5 mL se colocó aproximadamente 1 μ g de sales de tetrazolio y 1-2 gotas de NaOH 2 M. Después se añadió 1 mL del sobrenadante filtrado. La presencia de sideróforos del tipo hidroxamato generó un viraje instantáneo a rojo oscuro (Baakza et al. 2004).

Posteriormente, la producción de hidroxamato se cuantificó en una alícuota de 100 μ L de un inóculo de 1×10^6 UFC/mL de cada cepa bacteriana, la cual se colocó en tubos de ensayo con 15 mL del medio de cultivo BAZ a pH 5.7 durante 3 días a 28 °C y 120 rpm. Los tubos de ensayo se centrifugaron a 7000 rpm/5 min, recuperándose el sobrenadante. El hidroxamato se cuantificó utilizando una curva de calibración con concentraciones (0, 0.1, 1.0 y 10 μ g/mL) de sideróforo del tipo hidroxamato de ferroxamina mesilato (SIGMA ALDRICH). Estas soluciones se sometieron a la prueba del FeCl₃, y su absorbancia se leyó a 420 nm en un espectrofotómetro de radiación UV visible (VARIAN, CARY 3E) (Baakza et al. 2004, de los Santos et al. 2012).

Catecolato

Ensayo con cloruro férrico (FeCl₃)

Se agregó 1 mL de FeCl₃ 2 % a 1 mL de sobrenadante. La señal indicó, en un espectrofotómetro de radiación UV visible VARIAN modelo CARY 3E (Baakza et al. 2004) a 495 nm, la existencia de sideróforos del tipo catecolato.

Prueba de Arnow

A 1 mL del sobrenadante se le agregaron 0.1 mL de HCl 5 M, 0.5 mL de un reactivo que contenía 10 g de NaNO₂ y 10 g de Na₂MoO₄ disueltos en 50 mL de agua destilada. Después del vire a color amarillo se le agregaron 0.1 mL de NaOH 10 M, con lo cual se obtuvo una coloración roja. Finalmente se adicionó agua destilada hasta obtener un volumen de 5 mL, y se procedió a medir la absorbancia a 515 nm en un espectrofotómetro de radiación UV visible VARIAN modelo CARY 3E (Baakza et al. 2004).

Carboxilato

Ensayo espectrofotométrico

A 1 mL de sobrenadante se le agregaron 1 mL de CuSO₄ 250 µM y 2 mL de amortiguador de acetato a pH 4. La solución se leyó en una longitud de onda de 190 nm a 280 nm en un espectrofotómetro de radiación UV visible VARIAN modelo CARY 3E (Baakza et al. 2004).

Concentración mínima inhibitoria (CMI) a Pb(NO₃)₂

La tolerancia de cada aislado bacteriano al Pb(NO₃)₂, estimada como concentración mínima inhibitoria (CMI), se determinó por el crecimiento celular bacteriano (densidad óptica, DO 595 nm) en medio LB modificado (g/L): 2.5 bactotripton y 1.2 extracto de levadura a pH 6 (Levinson y Mahler 1998), suplementado con diferentes concentraciones de Pb(NO₃)₂: 0, 0.1, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5 y 1.8 mM (Roane 1999). Cada tubo con 10 mL de medio LB modificado se inoculó con 100 µL de un preinóculo bacteriano con 1 × 10⁶ UFC/mL y se incubó por triplicado durante 3 días a 28 °C y 120 rpm.

Análisis estadístico

Los datos de las variables de interés se analizaron mediante el procedimiento estándar de análisis de varianza (ANDEVA) con el paquete estadístico SPSS v. 22. Asimismo, la diferencia significativa para la separación de medias de los tratamientos se realizó por la prueba de Duncan al 5 % de probabilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Distribución de Pb total en suelo

Los resultados de Pb total en los diferentes puntos de muestreo se presentan en el **cuadro I**. En general, las concentraciones más altas de Pb se registraron en muestras ubicadas a los 50 y 150 m

al suroeste de la empresa recicladora de Pb, en tanto que a los 300 m la concentración de Pb baja en los diferentes puntos muestreados. Esto indica que el contaminante disminuye en función de la distancia a la empresa. Resultados similares se han reportado en otros trabajos (Farago et al. 1999, Cala y Kunimine 2003).

CUADRO I. CONCENTRACIÓN DE Pb TOTAL EN LOS DIFERENTES PUNTOS DE MUESTREO EN TORNO A LA EMPRESA RECICLADORA DE Pb

Ubicación	Distancia (m)	Pb total (mg/kg)
Norte	50	42.6
	150	45.5
	300	15.2
Sur	50	29.1
Este	50	81.4
Oeste	50	44.8
	150	42.2
	300	33.3
Noreste	50	60.0
	150	110.3
	300	29.4
Suroeste	50	447.3
	150	149.0
	300	35.9

Población bacteriana rizosférica

Los resultados de la población bacteriana en torno a la empresa recicladora de Pb se presentan en la **figura 1**. La población bacteriana total fue de aproximadamente 7.0 log₁₀ UFC/g de suelo, mientras que la población tolerante a Pb(NO₃)₂ 0.3 mM fue de 6.0 log₁₀ UFC/g de suelo, lo cual equivale a una tolerancia de la población del 86 % (**Fig. 1**). Cabe resaltar que el punto a 50 m al suroeste de la empresa recicladora de Pb presentó mayor contenido de Pb total (447 mg/kg), a partir del cual la población bacteriana disminuyó en comparación con los otros puntos de muestreo (**Figs. 1 y 2**). Al respecto, se ha reportado que en suelos contaminados con Pb se reduce la biomasa microbiana (Konopka et al. 1999, Akmal et al. 2005); además, se modifica la composición de las comunidades microbianas (Frey et al. 2006), lo cual favorece a las especies tolerantes a metales, mientras que las especies sensibles decrecen (Roane 1999).

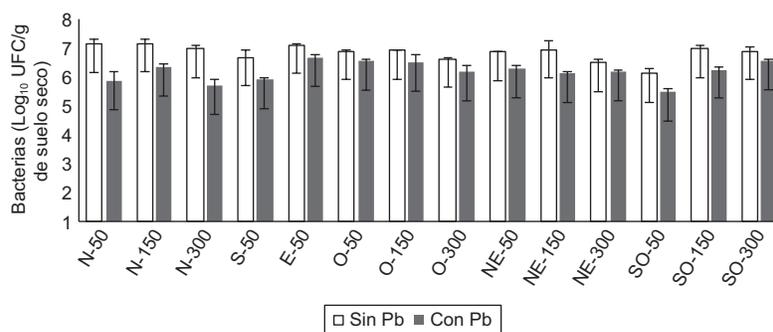


Fig. 1. Barras de color negro población bacteriana tolerante a 0.3 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ en los diferentes puntos de muestreo (N = norte, S = sur, O = oeste, E = este, NE = noreste, SO = suroeste) en torno a la empresa recicladora de Pb. Valores promedio de tres réplicas \pm desviación estándar. UFC = unidades formadoras de colonias

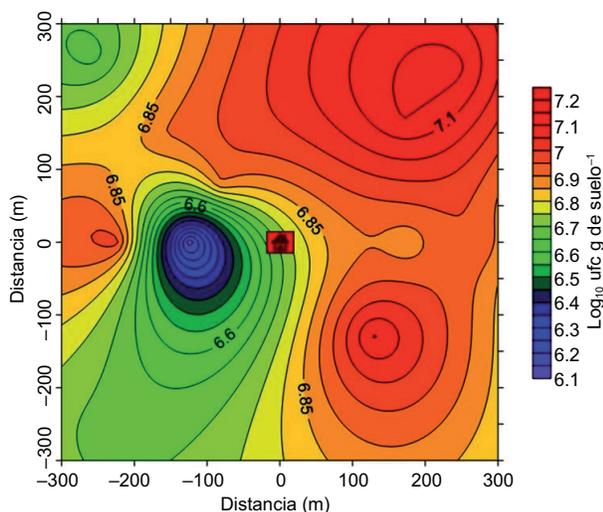


Fig. 2. Isocurvas de la población bacteriana con base en los diferentes puntos de muestreo en torno a la empresa recicladora de Pb. Las coordenadas (0,0) indican la localización del almacén de escoria de Pb de la empresa recicladora. UFC = unidades formadoras de colonias

Selección de aislados bacterianos rizosféricos

Los resultados de los aislados bacterianos seleccionados por su capacidad metabólica de interés se presentan en el **cuadro II**. En total se obtuvieron 150 aislados con tolerancia a $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 0.3 mM. Se seleccionaron cinco cepas del suelo rizosférico circundante a la empresa recicladora de Pb y dos aislados provenientes de la escoria de Pb estabilizada con mediana y alta producción de AIA; asimismo, se seleccionaron cinco aislados con producción de sideróforos (**Cuadro II**).

Identificación de bacterias seleccionadas

La identificación de los aislados bacterianos seleccionados se presenta en las **figuras 3 y 4**. Los aislados mostraron identidad alta con los géneros *Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Curtobacterium*, *Bacillus* y *Agrobacterium*. Los aislados L2, L48 y L67 se agruparon dentro del género *Streptomyces* (100 % identidad), mientras que los aislados L23 y L138 mostraron 100 % de identidad con los géneros *Arthrobacter* y *Curtobacterium*, respectivamente. Los aislados EE50, EE35, L14 y L121 presentaron identidad del 100 % con el género *Bacillus* y el aislado L139 mostró identidad del 100 % con *Agrobacterium* (**Fig. 4**).

Producción de AIA y sideróforos por las cepas bacterianas seleccionadas

Los resultados de la producción de AIA y sideróforos de las cepas bacterianas seleccionadas se presentan en los **cuadros III y IV**, así como en la **figura 5**. La producción de AIA fue variable; así, la cepa L23 *Arthrobacter* sp. produjo 8.1 μg AIA/mL mientras que la cepa L121 *Bacillus* sp. produjo 60.6 μg AIA/mL. En este sentido, Tsavkelova et al. (2007) reportaron cepas de *Burkholderia* sp. y *Bacillus* sp. con producción de AIA en el orden de 3.0 y 58.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en medio de cultivo Czapek, respectivamente. Así mismo, Gómez et al. (2012) obtuvieron dos cepas *Halomonas* sp. y *Xanthomonas* sp. que producían AIA de 64 y 37.7 ppm, respectivamente. Al respecto, con base en la producción de AIA in vitro, las rizobacterias se agrupan en: a) bajas productoras (1 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$); b) medianas productoras (11 a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y c) altamente productoras (21 a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

CUADRO II. CEPAS BACTERIANAS SELECCIONADAS EN LOS DIFERENTES PUNTOS DE MUESTREO ALREDEDOR DE LA EMPRESA RECICLADORA DE Pb, ASÍ COMO DE LA ESCORIA ESTABILIZADA DE Pb

Aislado	Género bacteriano con 100% de identidad	Reacción positiva a la prueba de Salkowski	Reacción positiva en el medio CAS-agar	Tolerantes [Pb(NO ₃) ₂ 0.3 mM]
L121	<i>Bacillus</i>	+	-	+
EE50*	<i>Bacillus</i>	+	-	+
EE35*	<i>Bacillus</i>	+	-	+
L139	<i>Agrobacterium</i>	+	-	+
L14	<i>Bacillus</i>	+	-	+
L138	<i>Curtobacterium</i>	+	+	+
L23	<i>Arthrobacter</i>	+	+	+
L2	<i>Streptomyces</i>	-	+	+
L48	<i>Streptomyces</i>	-	+	+
L67	<i>Streptomyces</i>	-	+	+

*Proveniente de la escoria de Pb estabilizada, CAS: cromo azurol S.

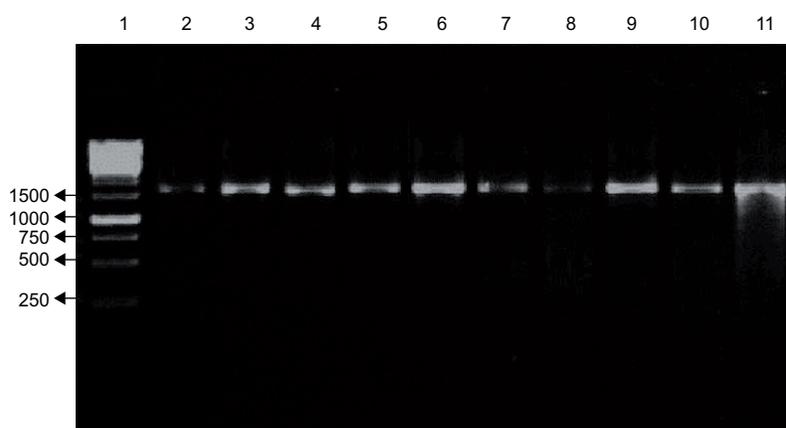


Fig. 3. Amplificación del gene 16S ARNr (aproximadamente 1600 pb) de los aislados bacterianos seleccionados en los diferentes puntos de muestreo en torno a la planta recicladora de Pb. De izquierda a derecha, columna 1: patrón de peso molecular; columna 2: aislado 2; columna 3: aislado 48; columna 4: aislado 139; columna 5: aislado 35; columna 6: aislado 121; columna 7: aislado 50; columna 8: aislado 23; columna 9: aislado 14; columna 10: aislado 67; columna 11: aislado 138

(Khalid et al. 2004). Considerando dicha clasificación, cinco de las cepas seleccionadas en este trabajo presentaron alta producción de AIA (**Cuadro III**).

En relación con la producción de sideróforos, las cepas L2, L48 y L67, que corresponden al género *Streptomyces* spp., presentaron cualitativamente un halo de color naranja mayor que las cepas L138 *Curtobacterium* sp. y L23 *Arthrobacter* sp., como indicador de reacción positiva de producción de sideróforos. Al respecto, Schwyn y Neilands (1987) mencionan que cuando un quelante fuerte remueve el Fe del colorante indicador, su color cambia de azul a

naranja; por lo tanto, un halo de color naranja alrededor de las colonias bacterianas en medio CAS-Agar indica excreción de sideróforos (**Fig. 5**).

Con relación a la naturaleza química de los sideróforos producidos por las cepas bacterianas, indican que son del tipo hidroxamato (**Cuadro V**), uno de los sideróforos más comunes producidos por bacterias (Suárez y Reyes 2002, Lacava et al. 2008). En contraste, se observaron resultados negativos para los tipos catecolato y carboxilato (**Cuadro V**). La producción de hidroxamato por las cepas L2, L48, L67 del género *Streptomyces* spp., L138

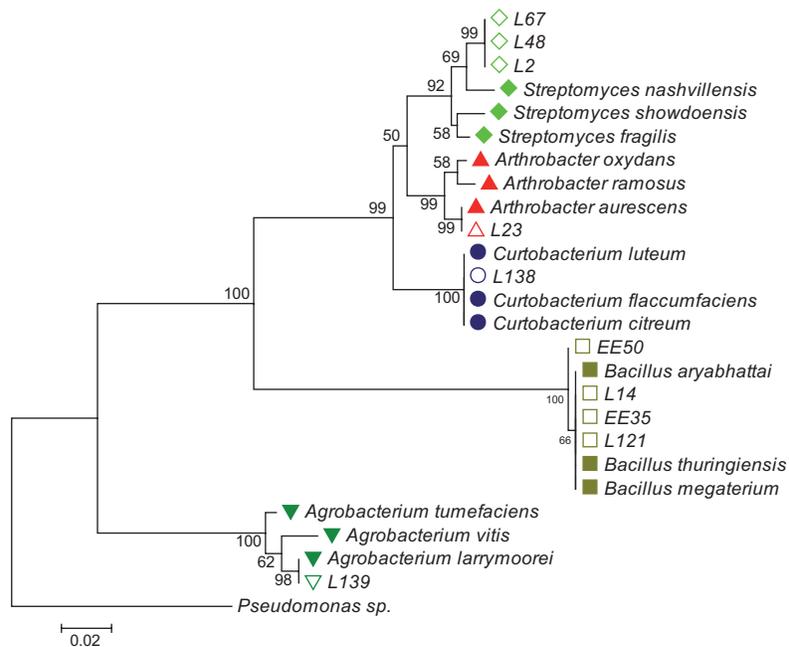


Fig. 4. Árbol filogenético de las secuencias parciales del gen 16S ARNr de los aislados bacterianos seleccionados en los diferentes puntos de muestreo en torno a la empresa recicladora de Pb. Rombos verdes, cepas L67, L48 y L2 correspondientes al género *Streptomyces*; triángulos rojos, cepa L23 correspondiente al género *Arthrobacter*; círculos azules, cepa L138 correspondiente al género *Curtobacterium*; cuadros cafés, cepas EE50, L14 y L121 correspondientes al género *Bacillus*; triángulos verdes, cepa L139 correspondiente al género *Agrobacterium*

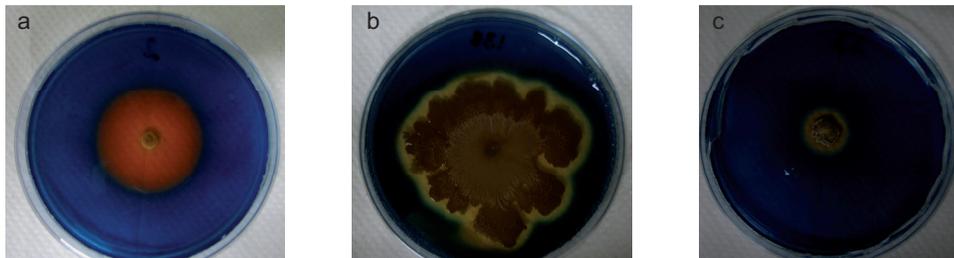


Fig. 5. Prueba cualitativa de producción de sideróforos de los géneros bacterianos seleccionados en los diferentes puntos de muestreo en torno a la empresa recicladora de Pb, en medio CAS-Agar. (a) L2, *Streptomyces* sp., (b) L138, *Curtobacterium* sp., (c) L23, *Arthrobacter* sp.

Curtobacterium sp. y L23 *Arthrobacter* sp. fue entre (0.02-0.054 $\mu\text{g/mL}$) (**Cuadro IV**). Ensayos sobre la cinética de producción de sideróforos realizados al tercer día de crecimiento, indican que *Pseudomonas azotoformans* produce 1.46 $\mu\text{g/mL}$ de sideróforos del tipo hidroxamato (Nair et al. 2007), mientras que *Burkholderia cepacea* produce 0.2 $\mu\text{g/mL}$ de hidroxamato (de los Santos et al. 2012).

En relación con la capacidad de las cepas bacterianas seleccionadas para tolerar Pb (CMI) (**Cuadros III y IV**) se observó una amplia variabilidad. La cepa L14 *Bacillus* sp. presentó la menor tolerancia (0.6 mM) mientras que la cepa EE50 *Bacillus* sp. presentó la mayor tolerancia a $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (1.8 mM). Existen reportes de cepas bacterianas aisladas de suelo contaminado con metales pesados que presentan

CUADRO III. PRODUCCIÓN DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO (AIA) Y TOLERANCIA A Pb POR LAS CEPAS BACTERIANAS SELECCIONADAS DE LOS DIFERENTES PUNTOS DE MUESTREO EN TORNO A LA EMPRESA RECICLADORA DE Pb

Cepas	Ácido indol-3-acético ^a (µg/mL)	Tolerante ^b [Pb(NO ₃) ₂]
<i>Bacillus</i> sp. L121	60.6 ± 16.42 a	1.3
<i>Bacillus</i> sp. EE50	44.6 ± 5.56 b	1.8
<i>Bacillus</i> sp. EE35	43.0 ± 2.98 bc	1.5
<i>Agrobacterium</i> sp. L139	36.6 ± 0.85 c	1.5
<i>Bacillus</i> sp. L14	33.9 ± 0.69 c	0.6
<i>Curtobacterium</i> sp. L138	12.5 ± 0.46 d	1.0
<i>Arthrobacter</i> sp. L23	8.1 ± 0.27 d	1.4

^aProducción de AIA al tercer día del crecimiento bacteriano en medio Czapeck; ^bconcentración mínima inhibitoria de Pb en medio Luria-Bertani (LB) modificado. Diferentes letras en cada fila indican diferencia estadística significativa (Duncan, α = 0.05). Valores promedio de tres réplicas ± desviación estándar

CUADRO IV. PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS TIPO HIDROXAMATO Y TOLERANCIA A Pb POR LAS CEPAS BACTERIANAS SELECCIONADAS

Cepa	Hidroxamato ^a (µg/mL)	Tolerante ^b [Pb(NO ₃) ₂]
<i>Streptomyces</i> sp. L2	0.052 ± 0.01 a	1.5
<i>Streptomyces</i> sp. L48	0.034 ± 0.03 ab	1.5
<i>Streptomyces</i> sp. L67	0.050 ± 0.02 a	1.5
<i>Curtobacterium</i> sp. L138	0.049 ± 0.00 a	1.0
<i>Arthrobacter</i> sp. L23	0.020 ± 0.00 b	1.4

^aProducción de hidroxamato en las diferentes cepas; ^bconcentración mínima inhibitoria a Pb en medio LB modificado. Diferentes letras en cada fila indican diferencia estadística significativa (Duncan, α = 0.05). Valores promedio de tres réplicas ± desviación estándar

CUADRO V. PRUEBAS CUALITATIVAS PARA IDENTIFICAR LA NATURALEZA QUÍMICA DEL TIPO DE SIDERÓFOROS PRODUCIDOS POR LAS CEPAS BACTERIANAS SELECCIONADAS

Cepas	Sideróforo				
	CAS ^a	FeCl ₃ ^b	Hidroxamato ^b	Catecolato ^b	Carboxilato ^b
<i>Streptomyces</i> sp. L2	+	+	+	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. L48	+	+	+	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. L67	+	+	+	-	-
<i>Curtobacterium</i> sp. L138	+	+	+	-	-
<i>Arthrobacter</i> sp. L23	+	+	+	-	-

Escala arbitraria correspondiente a cambios colorimétricos, donde (+) cambio colorimétrico positivo y (-) sin cambio colorimétrico, provenientes de tres réplicas en medios de cultivo específicos en incubación a 28 °C por 3 días. ^aProducción de sideróforos en medio cromo azurol S (CAS-agar); ^bcultivos en medio succinato

diferentes niveles de resistencia a Pb en medio líquido, como *Bacillus megaterium* y *Pseudomonas marginalis*, las cuales resisten 0.6 y 2.5 mM Pb(NO₃)₂, respectivamente (Roane 1999). Asimismo, *Citrobacter freundii* resiste una concentración de 7 mM Pb(NO₃)₂ en medio LB-agar (Levinson y Mahler 1998). Comparativamente, las cepas bacterianas seleccionadas en el presente trabajo presentaron mediana y alta tolerancia a Pb.

CONCLUSIONES

El suelo que circunda a la empresa recicladora de plomo estudiada presenta concentraciones de Pb total catalogadas como medianas a altas, y la concentración de este metal disminuye conforme se aleja del núcleo de contaminación. Existen bacterias rizosféricas en torno a la empresa tolerantes a Pb, con capacidades metabólicas para producir ácido indol-3-acético de hasta 60 µg/mL, así como sideróforos. Estos resultados indican que existe un potencial bacteriano proveniente del suelo rizosférico circundante a la empresa recicladora de Pb, para aprovecharse en futuros trabajos de fitorremediación de estos suelos contaminados, los cuales presentan un riesgo latente para la población residente al interior de la empresa y cerca de este foco de contaminación por la dispersión de los polvos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la SENESCYT de Ecuador y al CONACyT de México por el soporte económico brindado para el desarrollo de este trabajo.

REFERENCIAS

- Ahmed E. y Holmström S.J. (2014). Siderophores in environmental research: Roles and applications. *Microb. Biotechnol.* 7 (3), 196-208.
DOI: 10.1111/1751-7915.12117
- Akmal M., Janming X., Zhaojun L., Haizhen W. y Huaiying Y. (2005). Effects of lead and cadmium nitrate on biomass and substrate utilization pattern of soil microbial communities. *Chemosphere* 60 (4), 508-14.
DOI: 10.1016/j.chemosphere.2005.01.001
- Alexander D.B. y Zuberer D.A. (1991). Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol. Fertil. Soils* 45 (1), 12-39. DOI: 10.1007/BF00369386
- Atlas R.M. (2010). *Handbook of microbiology media*. 4^a ed. Taylor and Francis, Florida, EUA, 2036 pp.
- Baakza A., Vala A.K., Dave B.P. y Dube H.C. (2004). A comparative study of siderophore production by fungi from marine and terrestrial habitats. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 311 (1), 1-9.
DOI: 10.1016/j.jembe.2003.12.028
- Borremans B., Hobman J.L., Provoost A., Brown N.L. y van der Lelie D. (2001). Cloning and functional analysis of the pbr lead resistance determinant of *Ralstonia metallidurans* CH34. *J. Bacteriol.* 183 (19), 5651-5658.
DOI: 10.1128/JB.183.19.5651-5658.2001
- Brim H., Heuer H., Krogerreckelenfort E., Mergeay M. y Smalla K. (1999). Characterization of the bacterial community of a zinc-polluted soil. *Can. J. Microbiol.* 45 (4), 326-338. DOI: 10.1139/w99-012
- Cala V. y Kunimine Y. (2003). Distribución de plomo en suelos contaminados en el entorno de una planta de reciclaje de baterías ácidas. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 19 (3), 109-115.
- Covarrubias S.A., García J.A. y Peña-Cabriales J.J. (2015). El papel de los microorganismos en la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados. *Acta Universitaria* 25 (3), 40-45.
DOI: 10.15174/au.2015.907
- Coya B., Marañón E. y Sastre H. (2000). Ecotoxicity assessment of slag generated in the process of recycling lead from waste batteries. *Resour. Conserv. Recy.* 29 (4), 291-300. DOI: 10.1016/S0921-3449(00)00054-9
- De Andrade Lima L.R.P. y Bernardes L.A. (2011). Characterization of the lead smelter slag in Santo Amaro, Bahia, Brazil. *J. Hazard. Mater.* 189 (3), 692-699.
DOI: 10.1016/j.jhazmat.2011.02.091
- De los Santos S., Barrera G.C., Miranda M.A. y Peña-Cabriales J.J. (2012). *Burkholderia cepacia* XXVI siderophore with biocontrol capacity against *Colletotrichum gloeosporioides*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28 (8), 2615-2623. DOI: 10.1007/s11274-012-1071-9
- Díaz G., Azcón C. y Honrubia M. (1996). Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metal (Zn and Pb) uptake and growth of *Lygeum spartum* and *Anthyllis cytisoides*. *Plant Soil* 180 (2), 241-249.
DOI: 10.1007/BF00015307
- Farago M.E., Thornton I., White N.D., Tell I. y Martensson M.B. (1999). Environmental impacts of a secondary lead smelter in Landskrona, Southern Sweden. *Environ. Geochem. Health.* 21 (1), 67-82.
DOI: 10.1023/A:1006556111092
- Flores J. y Albert L.A. (2004). Environmental lead in Mexico, 1990-2002. *Rev. Environ. Contam. T.* 181, 37-109. DOI: 10.1007/0-387-21733-9_2
- Flores R., Rico E., Núñez J.E., García E., Carrizales L., Llizaliturri C. y Díaz F. (2012). Exposición infantil al plomo en sitios contaminados. *Salud Pública México* 54 (4), 383-392.
DOI: 10.1590/S0036-36342012000400008
- Frey B., Stemmer M., Widmer F., Luster J. y Sperisen C. (2006). Microbial activity and community structure of a soil after heavy metal contamination in a model forest ecosystem. *Soil Biol. Biochem.* 38 (7), 1745-1756.
DOI: 10.1016/j.soilbio.2005.11.032
- Gómez L.C., Valero N. y Morales E. (2012). Bacterias halotolerantes/alcalofilas productoras de ácido indolacético (AIA) asociadas a *Arthrosira platensis* (Cyanophyceae). *Rev. Colomb. Biotecnol.* 14 (2), 81-88.
- Karadeniz A., Topcuoglu S.F. e Inan S. (2006). Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22 (10), 1061-1064.
DOI: 10.1007/s11274-005-4561-1
- Khalid A., Arshad M. y Zahir Z.A. (2004). Screening plant growth promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J. Appl. Microbiol.* 96 (3), 473-480.
DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.02161.x
- Konopka A., Zakharova T., Bischoff M., Oliver L., Nakatsu C. y Turco R.F. (1999). Microbial biomass and activity in lead-contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (5), 2256-2259.
- Lacava P.T., Silva-Stenico M.E., Araújo W., Colnaghi A.V., Carrilho E., Tsai S.M. y Azevedo J.L. (2008). Detection of siderophores in endophytic bacteria *Methylobacterium* spp. associated with *Xylella fastidiosa* subsp. *Pauca*. *Pesq. Agropec. Bras.* 43 (4), 521-528.
DOI: 10.1590/S0100-204X2008000400011
- Levinson H.S. y Mahler I. (1998). Phosphatase activity and lead resistance in *Citrobacter freundii* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 161 (1), 135-138.
DOI: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb12939.x

- Massadeh A.M., Al-Momani F.A. y Haddad H.I. (2005). Removal of lead and cadmium by halophilic bacteria isolated from the Dead Sea Shore, Jordan. *Biol. Trace Elem. Res.* 108 (1-3), 259-269.
DOI: 10.1385/BTER:108:1-3:259
- Mauricio A., Peña-Cabriaes J.J. y Maldonado M. (2010). Isolation and characterization of hexavalent chromium-reducing rhizospheric bacteria from a wetland. *Int. J. Phytoremediat.* 12 (4), 317-34.
DOI: 10.1080/15226510902968118
- Nair A., Juwarkar A.A. y Singh S.K. (2007). Production and characterization of siderophores and its application in arsenic removal from contaminated soil. *Water Air Soil Pollut.* 180 (1-4), 199-212.
DOI: 10.1007/s11270-006-9263-2
- OK-FC (2011). Exporting hazards. *OK Interntational-Fronteras Comunes*, 1ª ed. Occupational Knowledge International, San Francisco, EUA, 37 pp.
- Penpolcharoen M. (2005). Utilization of secondary lead slag as construction material. *Cem. Concr. Res.* 35 (6), 1050-1055. DOI: 10.1016/j.cemconres.2004.11.001
- Pérez A., Barraza Z. y Martínez D. (2015). Identificación de bacterias endófitas resistentes a plomo, aisladas de plantas de arroz. *Agron. Mesoam.* 26 (2), 267-276.
DOI: 10.15517/am.v26i2.19281
- Rajkumar M., Ae N., Vara M. y Freitas H. (2010). Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends Biotechnol.* 28 (3), 142-149. DOI: 10.1016/j.tibtech.2009.12.002
- Roane T.M. (1999). Lead resistance in two bacterial isolates from heavy metal contaminated soils. *Microb. Ecol.* 37 (3), 218-224. DOI: 10.1007/s002489900145
- Saitou N. y Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4 (4), 406-425. DOI: 10.1093/oxford-journals.molbev.a040454
- Sambrook J. y Green M.R. (2012). *Molecular cloning: A laboratory manual*. 4a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EUA, 34 pp.
- Sanger F., Nicklen S. y Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74 (12), 5463-5467.
DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463
- Schwyn B. y Neilands J. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160 (1), 47-56.
DOI: 10.1016/0003-2697(87)90612-9
- Sessitsch A., Kuffner M., Kidd P., Vangronsveld J., Wenzel W.W., Fallmann K. y Puschenreiter M. (2013). The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. *Soil Biol. Biochem.* 60 (2013), 182-194.
DOI: 10.1016/j.soilbio.2013.01.012
- Suárez P. y Reyes R. (2002). La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia para el Ambiente. *Interciencia* 27 (4), 160-164.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. y Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28 (10), 2731-2739.
DOI: 10.1093/molbev/msr121
- Tsavkelova E.A., Cherdyntseva T.A., Botina S.G. y Netrusov A.I. (2007). Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiol. Res.* 162 (1), 69-76. DOI: 10.1016/j.micres.2006.07.014
- USEPA (2007). *Method 6010C. Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry*. United States Environmental Protection Agency. Manual. Washington, DC, EUA, 34 pp.
- Vega P., Canchignia H., González M. y Seeger M. (2016). Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales* 37 (1), 33-39. DOI: 10.13140/RG.2.1.5158.3609
- Velásquez I., Nunn B.L., Ibanami E., Goodlett D.R., Hunter K.A. y Sander S.G. (2011). Detection of hydroxamate siderophores in coastal and sub-antarctic waters off the south eastern coast of New Zealand. *Mar. Chem.* 126 (1-4), 97-107.
DOI: 10.1016/j.marchem.2011.04.003