



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN
EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GENÉTICA

**PROMOCIÓN DE LA TRANSLOCACIÓN DE COBRE DE LA RAÍZ AL TALLO
MEDIADO POR MICROORGANISMOS PARA LA APLICACIÓN EN PROCESOS
DE FITORREMEDIACIÓN**

GUILLERMO DANIEL TIJERINA CASTRO

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO
2008

La presente tesis titulada **PROMOCIÓN DE LA TRANSLOCACIÓN DE COBRE DE LA RAÍZ AL TALLO MEDIADO POR MICROORGANISMOS PARA LA APLICACIÓN EN PROCESOS DE FITORREMEDIACIÓN**, realizada por el alumno: **GUILLERMO DANIEL TIJERINA CASTRO** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD-GENÉTICA**

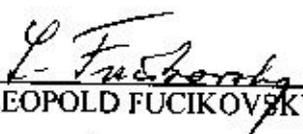
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



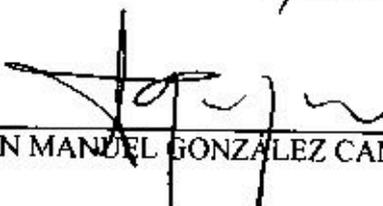
DR. GUILLERMO CARRILLO CASTAÑEDA

ASESOR



DR. LEOPOLD FUCIKOVSKY ZAC

ASESOR



DR. JUAN MANUEL GONZÁLEZ CAMACHO

NOVIEMBRE DEL 2008

PROMOCIÓN DE LA TRANSLOCACIÓN DE COBRE DE LA RAÍZ AL TALLO MEDIADO POR MICROORGANISMOS PARA LA APLICACIÓN EN PROCESOS DE FITORREMEDIACIÓN

Guillermo Daniel Tijerina Castro, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2008

La degradación del suelo causada por la gran diversidad de contaminantes tóxicos orgánicos e inorgánicos está causando un deterioro que reduce la producción y calidad de alimentos; la fitorremediación es una tecnología para revertir estos daños. Al caracterizar 223 aislamientos bacterianos (velocidad de crecimiento, tamaño, producción de pigmentos, patogenicidad y efecto en la germinación), colectados en muestras de suelo y de raíz en nueve sitios del predio del Colegio de Postgraduados, Montecillo México, se encontró que 51.6% de los aislamientos fueron de muestras de suelo y 41.8% de raíz, en cuanto a velocidad de crecimiento se encontró que 31.8% fueron de crecimiento rápido, 37.6% intermedio y el 30.5% de crecimiento lento, por tamaño de la colonia se encontró que el 4.48% fueron de tamaño grande, 59.64% mediano y 35.9% de tamaño pequeño, por coloración 41.25% fueron de coloración ámbar, 45.3% de coloración blanca y 13.45% de coloración verde. En pruebas de hipersensibilidad y pudrición de papa, se encontró que ningún aislamiento es fitopatógeno. En germinación de semillas de alfalfa inoculadas con aislamientos fluorescentes y del género *Bacillus*, ningún aislamiento promovió la germinación. Por otra parte, se encontró que 23 aislamientos produjeron pigmentos fluorescentes, de los cuales el 2S-10, el 2R-2 y el 2S-9 fueron seleccionados por tener mayor capacidad de producción de pigmentos fluorescentes así como el 1R-19 por ser el de menor capacidad de producción. Éstos se utilizaron para evaluar el impacto en la acumulación de Cu por las plántulas de alfalfa. La raíz acumuló la mayor cantidad de Cu. Las plántulas generadas a partir de las semillas inoculadas con la suspensión de células del aislamiento 2S-10, acumularon la mayor cantidad de biomasa seca superando en 12.5% al testigo; el factor de translocación de Cu fue mayor de 50% y acumularon 32% (1247 mg de Cu/ kg de biomasa seca) más que las plántulas libres de bacterias (945.6 mg de Cu/ kg de biomasa).

Palabras clave: Fitorremediación, patogenicidad, *Bacillus*, fluorescentes, acumulación.

TRANSLOCATION PROMOTION OF COPPER FROM THE ROOT TO THE STEAM BY MICROORGANISMS FOR THE APPLICATION IN PHYTOREMEDIATION PROCESSES

Guillermo Daniel Tijerina Castro, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2008

Soil degradation caused by the wide variety of organic and inorganic toxic pollutants is causing a deterioration reduces production and quality of food; the phytoremediation is a technology to reverse this damage. In characterizing 223 bacterial isolates (growth speed, size, production of pigments, and pathogenic effect on the germination), collected samples of soil and roots at nine sites in campus of the College of Postgraduates, Montecillo Mexico, found that 51.6% of the isolates were from soil samples and 41.8% of the roots, in terms of growth speed was found that 31.8% were fast growing 37.6% 30.5% intermediate and slow growth, by size of the colony was found that the 4.48% were large, 59.64% and 35.9% of medium-sized, color by 41.25% were amber color, 45.3% of white coloring and 13.45% of green color. As evidence of hypersensitivity and rot of potato, it was found that isolation is no pathogens. In the germination of seeds of alfalfa inoculated with fluorescent and isolates of the genus *Bacillus*, no isolation promoted germination. On the other hand, it was found that 23 isolates produced fluorescent pigments, of which 2S-10, the 2R-2 and 2S-9 were selected as having greater capacity to produce fluorescent pigments as well as the 1R-19 as the lower production capacity. They were used to assess the impact on the accumulation of Cu by alfalfa sprouts. The root accumulated the largest amount of Cu. The seedlings generated from the seeds inoculated with the suspension of the isolation cells 2S-10, amassed the largest amount of dry biomass surpassing 12.5% to witness; factor translocation of Cu was higher than 50% and accumulated 32% (1247 mg Cu / kg dry biomass) more than the seedlings free of bacteria (945.6 mg Cu / kg of biomass).

Keywords: Phytoremediation, pathogenic effect, *Bacillus*, fluorescent, accumulation.

DEDICATORIA

A mis padres, Leonardo y Guadalupe María por su apoyo, amor, comprensión, cariño y por el esfuerzo de verme realizado en una etapa mas de mi vida.

A mis hermanos Leonardo Carlos y Francisco por ser mis mejores amigos y compañeros durante toda mi vida, gracias por todas las cosas que hemos compartido y vivido juntos.

A mi cuñada Myrna.

A Karla por apoyarme incondicionalmente y darme momentos de felicidad.

A toda mi familia.

A todos mis compañeros que de alguna forma hicieron posible la culminación de mis estudios de Maestría.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) , por el apoyo económico, que hizo posible el desarrollo de mis estudios de Maestría.

Al Colegio de Postgraduados, en especial al Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad por contribuir en mi formación como profesionista.

Al Dr. Guillermo Carrillo Castañeda por su dirección y dedicarme parte de su tiempo para la culminación de mi trabajo de tesis, muchas gracias.

Al Dr. Leopold Fucikovsky Zac por su asesoría, revisión y aportaciones brindadas para enriquecer este trabajo.

Al Dr. Juan Manuel González Camacho por su apoyo comentarios acertados y disposición mostrada en todo momento.

A todos los maestros del Programa de Recursos Genéticos y Productividad quienes comparten día a día los conocimientos de su cátedra, gracias.

A los M.C. Alejandrina Ruíz y Jaime Cruz Díaz por su apoyo, gracias.

A las Doctoras Alejandrina, Juana Juárez e Ing. Angélica por su ayuda.

Al Señor Ismael por su colaboración en el laboratorio de Genética Molecular.

A todo el personal del Programa de Recursos Genéticos y Productividad y compañeros que participaron directa e indirectamente para la realización de este trabajo.

A todos gracias.

Índice general

	Páginas
Índice de Cuadros	xi
Índice de figuras	xiii
Resumen	iii
Abstract	iv
I. Introducción	1
1.1 Objetivo general.....	3
1.2 Objetivos particulares.....	3
1.3 Hipótesis.....	3
II. Revisión de literatura	4
2.1 Metales pesados	4
2.1.1 Efecto de la bioacumulación por algunos metales pesados.....	6
2.1.2 Efecto de los metales pesados en el suelo.....	8
2.2 Estrategias de remediación de suelos por métodos químicos y físicos	12
2.2.1 Remediación de suelos por extracción.....	13
2.2.2 Remediación de suelo por sellado.....	13
2.2.3 Remediación de suelo por incineración.....	14
2.2.4 Tratamiento químico.....	15
2.2.5. Remediación de suelo por tratamiento electroquímico.....	15
2.3 Remediación de suelos por métodos biológicos	15
2.3.1 Biorremediación.....	15
2.3.2 Fitorremediación.....	16
2.4 Plantas hiperacumuladoras de metales pesados	19
2.5 Microorganismos en la remediación de suelos	24
2.6 Bacterias	27
2.6.1 Historia.....	27
2.6.2 Estructura.....	27
2.6.3 Nutrición y crecimiento microbiano.....	28
2.7 Clasificación de las bacterias	28
2.7.1 Características generales de bacterias <i>Pseudomonas</i>	29

2.7.2	Importancia de <i>Pseudomonas</i> en la agricultura.....	30
2.7.3	<i>Pseudomonas</i> como biocontrol de la rizosfera.....	31
2.7.4	Utilización de las <i>Pseudomonas</i>	32
2.8	Alfalfa	33
2.8.1	Origen.....	33
2.8.2	Botánica.....	33
2.8.3	Importancia Económica.....	34
2.9	Requerimientos Edafoclimáticos	34
2.9.1	Radiación solar.....	34
2.9.2	Temperatura.....	34
2.9.3	pH.....	35
2.9.4	Salinidad.....	35
2.9.5	Tipo de suelos.....	35
2.10	Descripción del tipo de suelo del predio del Colegio de Posgraduados Campus Montecillo	35
2.11	Conclusión de la revisión bibliográfica	39
III.	Materiales y métodos	40
3.1	Recolección de muestras de suelo y raíces	40
3.1.1	Preparación de muestras del suelo.....	40
3.1.2	Preparación de muestras de raíz.....	41
3.2	Caracterización de los aislamientos bacterianos	41
3.2.1	Prueba de pudrición de papa.....	42
3.2.2	Determinación de la capacidad de producción de pigmentos fluorescentes por los aislamientos bacterianos.....	42
3.2.3	Determinación de las cinéticas de crecimiento de los aislamientos fluorescentes.....	43
3.2.4	Preparación de suspensiones bacterianas de aislamientos fluorescentes y del género <i>Bacillus sp</i>	44
3.3	Material Biológico	44
3.3.1	Desinfección de la semilla de alfalfa.....	44
3.3.2	Determinación del efecto de los aislamientos bacterianos fluorescentes en la germinación de semilla de alfalfa.....	45

3.3.3 Determinación del efecto de la presencia de cobre en la semilla de alfalfa.....	45
3.3.4 Inoculación de semillas de alfalfa con suspensiones bacterianas fluorescentes y del género <i>Bacillus sp.</i>	45
3.4 Determinación del contenido de cobre en plántulas de alfalfa previamente inoculadas con aislamientos fluorescentes.....	46
3.4.1 Obtención de biomasa para la determinación de Cu en plántulas de alfalfa con frascos Gerber.....	47
3.5 Preparación de la muestra para la determinación del contenido de Cu en tallo y raíz.....	47
3.6 Diseño experimental y análisis de resultados.....	47
IV. Resultados.....	49
4.1 Características de los aislamientos bacterianos por localidad de colecta.....	49
4.1.1 Selección de aislamientos bacterianos fluorescentes.....	68
4.1.2 Selección de aislamientos bacterianos del género <i>Bacillus sp.</i>	69
4.1.3 Germinación de semilla de alfalfa inoculada con aislamientos bacterianos fluorescentes.....	70
4.1.4 Germinación de semilla de alfalfa inoculada con aislamientos del género <i>Bacillus sp.</i>	71
4.1.5 Clasificación de los aislamientos bacterianos por la producción de pigmentos fluorescentes.....	74
4.2 Acumulación de cobre en plántulas desarrolladas en solución de Steiner con CuSO₄.....	76
4.2.1 Determinación de longitud de plántulas de alfalfa desarrolladas en solución nutritiva Steiner y Steiner-Cu.....	77
4.2.2 Determinación del peso seco en miligramos del total de plántulas desarrolladas en solución nutritiva Steiner y Steiner-Cu.....	78
4.3 Determinación de Cu absorbido por plántulas de alfalfa.....	78
4.3.1 Factor de translocación.....	79
4.3.2 Coeficiente de enriquecimiento.....	80
4.3.3 Factor de acumulación.....	81
V. Discusión.....	82

Índice de Cuadros	xi
Índice de figuras	xiii
Resumen	iii
Abstract	iv
I. Introducción	1
1.1 Objetivo general.....	3
1.2 Objetivos particulares.....	3
1.3 Hipótesis.....	3
II. Revisión de literatura	4
2.1 Metales pesados	4
2.1.1 Efecto de la bioacumulación por algunos metales pesados.....	6
2.1.2 Efecto de los metales pesados en el suelo.....	8
2.2 Estrategias de remediación de suelos por métodos químicos y físicos	12
2.2.1 Remediación de suelos por extracción.....	13
2.2.2 Remediación de suelo por sellado.....	13
2.2.3 Remediación de suelo por incineración.....	14
2.2.4 Tratamiento químico.....	15
2.2.5. Remediación de suelo por tratamiento electroquímico.....	15
2.3 Remediación de suelos por métodos biológicos	15
2.3.1 Biorremediación.....	15
2.3.2 Fitorremediación.....	16
2.4 Plantas hiperacumuladoras de metales pesados	19
2.5 Microorganismos en la remediación de suelos	24
2.6 Bacterias	27
2.6.1 Historia.....	27
2.6.2 Estructura.....	27
2.6.3 Nutrición y crecimiento microbiano.....	28
2.7 Clasificación de las bacterias	28
2.7.1 Características generales de bacterias <i>Pseudomonas</i>	29

Índice de cuadros

Cuadro		Página
1	Intervalos de contenido de los límites normal y máximo permitidos de los metales pesados en los suelos (Kloke 1980).....	8
2	Características de las cepas colectadas del suelo de la localidad 1, pH 7.55.....	51
2A	Características de las cepas colectadas de raíz de la localidad 1.....	52
3	Características de las cepas colectadas del suelo de la localidad 2, pH 7.7.....	53
3A	Características de las cepas colectadas de raíz de la localidad 2.....	54
4	Características de las cepas colectadas del suelo de la localidad 3, pH 7.7.....	55
4A	Características de las cepas colectadas de raíz de la localidad 3.....	56
5	Características de las cepas colectadas del suelo de la localidad 4, pH 7.25.....	57
5A	Características de las cepas colectadas de raíz de la localidad 4.....	58
6	Características de las cepas colectadas del suelo de la localidad 5, pH 9.65.....	59
6A	Características de las cepas colectadas de raíz de la localidad 5.....	60
7	Características de las cepas colectadas del suelo de la localidad 6, pH 9.25.....	61
7A	Características de las cepas colectadas de raíz de la localidad 6.....	62
8	Características de las cepas colectadas del suelo de la localidad 7, pH 7.55.....	63
8A	Características de las cepas colectadas de raíz de la localidad 7.....	63
9	Características de las cepas colectadas del suelo de la localidad 8, pH 6.7.....	64
9A	Características de las cepas colectadas de raíz de la localidad 8.....	65
10	Características de las cepas colectadas del suelo de la localidad 9, pH 7.7.....	66
10A	Características de las cepas colectadas de raíz de la localidad 9.....	67

11	Germinación de semilla de alfalfa inoculada con cultivos bacterianos crecidos en medio B de King líquido de los aislamientos fluorescentes y velocidad media de germinación (T ₅₀).....	71
12	Germinación de semilla de alfalfa inoculada con suspensiones bacterianas de los aislamientos género <i>Bacillus sp</i> y velocidad media de germinación (T ₅₀).....	73
13	Lecturas de Absorbencia en medio mínimo carente de hierro (RM-Fe) a 400 y 405 nm., de los 23 aislamientos bacterianos productores de pigmentos fluorescentes.....	74
14	Lectura de absorbencia de tres experimentos a 400 nm en medio mínimo carente de hierro (RM-Fe), de los 23 aislamientos bacterianos fluorescentes.....	75
15	Número de plántulas de alfalfa sin inocular e inoculadas con suspensiones de células de los aislamientos bacterianos fluorescentes, crecidas en solución nutritiva de Steiner, Steiner-Cu	77
16	Promedio de longitud (cm) y relación raíz/tallo de 10 plántulas de alfalfa	77
17	Promedio de peso seco en mg de tallo y raíz de plántulas de alfalfa.....	78
18	Determinación de Cu acumulado en tallo y raíz de plántulas de alfalfa....	79
19	Determinación del factor de translocación de las plántulas de alfalfa.....	80
20	Determinación del coeficiente de enriquecimiento.....	80
21	Determinación del factor de acumulación de Cu en tallo y en raíz, así como su relación	81

Índice de Figuras

Figura		Página
1	Ruta de incorporación de contaminantes del suelo a la cadena alimenticia (Martín 2000).	5
2	Sitios de colecta de muestras de suelo de en el predio del Colegio de Posgraduados, campus Montecillo.	38
3	Prueba de pudrición de papa positiva a la derecha, testigo a la izquierda	50
4	Prueba de hipersensibilidad en planta de tabaco (<i>Nicotiana</i>) negativa que resulto negativa	55
5	Prueba de pudrición de papa positiva a la derecha, testigo a la izquierda	60

Cuadro	ANEXOS	Página
1	Comparación de medias de germinación de semillas de alfalfa inoculadas con aislamientos fluorescentes.....	111
2	Comparación de medias de germinación de semillas de alfalfa inoculadas con aislamientos género <i>Bacillus sp.</i>	112
3	Comparación de medias de lecturas de absorbencia a 400 nm de aislamientos bacterianos fluorescentes.....	114
4	Medio de Cultivo B. de King.....	115

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, uno de los problemas más señalados por la sociedad a nivel mundial es la progresiva degradación de los recursos naturales causada por la gran diversidad de contaminantes tóxicos orgánicos e inorgánicos presentes en la atmósfera, agua y suelo, procedentes de diversas actividades naturales y antropogénicas, generando un irremediable deterioro en el ambiente (Jensen *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 1997; Adriano, 1992; McNeill y Waring, 1992; Adriano, 1986).

Entre los contaminantes inorgánicos más nocivos para los seres vivos están los metales pesados derivados principalmente de las actividades mineras que por no ser biodegradables (Khan *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1993; Alloway, 1990) dan lugar a la pérdida irreversible de los recursos naturales. Reducir los niveles de contaminación y minimizar los elevados costos de rehabilitación de suelos y cuerpos de agua contaminados representan un enorme reto para la humanidad (McEldowney *et al.*, 1993).

Nuevas alternativas han sido propuestas para recuperar los suelos altamente contaminados por metales pesados (Chaney *et al.*, 2001; Comis, 1996; Cunningham y Lee, 1995; Chaney, 1993). Actualmente existen estudios en curso para reducir la contaminación originada por metales pesados en suelos, mediante estrategias basadas en el uso de plantas que tienen la propiedad de acumular metales pesados. Este proceso denominado “fitorremediación” consiste en la remoción, transferencia, estabilización y/o degradación y neutralización de compuestos orgánicos, inorgánicos y radioactivos que resultan tóxicos en suelos y agua. Esta definición incluye cualquier proceso biológico, químico o físico, inducido por las plantas, que ayude en la absorción, degradación y metabolización de los contaminantes, ya sea por las plantas mismas o por los microorganismos que se desarrollan en la rizósfera (Kabataspendas y Pendas, 2000; González, 1999; Kumar *et al.*, 1995; Salt *et al.*, 1995; Anderson y Cotas, 1994; Baker *et al.*, 1994; Raskin *et al.*, 1994; Adriano, 1990).

Las limitantes que dichas plantas pueden encontrar en la recuperación de suelos contaminados es la dificultad para establecerse y prosperar en situaciones adversas por la contaminación; así como también su lento crecimiento y poco volumen radical. Por lo cual, la importancia y beneficios de la simbiosis con los hongos micorrízicos en este sentido es

ampliamente reconocida (Khan *et al.*, 2000; Leyval *et al.*, 1997; Pawloswska, 1996; Weissenhorn *et al.*, 1995; Weissenhorn *et al.*, 1993).

La capacidad de ciertos microorganismos para degradar contaminantes orgánicos tales como hidrocarburos originó el término “biorremediación”, aplicado genéricamente a un grupo de técnicas que utilizan procesos biológicos para la remediación de suelos y aguas, que representan una de las técnicas más efectivas y de bajo costo en la recuperación de suelos y aguas contaminadas (Besthelin *et al.*, 1995; Lovley *et al.* 1995)

Los procesos biológicos involucran organismos como bacterias, hongos, algas, productos como enzimas, así como plantas superiores incluyendo árboles. Además de metabolizar y degradar compuestos orgánicos, estos organismos son capaces de absorber compuestos inorgánicos tóxicos, inmovilizándolos, y pueden inhibir y/o catalizar diversas reacciones, ampliándose por lo tanto su campo de aplicación (Meagher, 2000; Salt *et al.*, 1999; Chaudhry *et al.*, 1998; Raskin *et al.*, 1997; Berthelin *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1995; Chaney, 1993). En cuanto a los antecedentes y lo presentado cabe señalar que un factor importante a considerar son los efectos benéficos que se pueden obtener mediante la utilización de bacterias en asociación con plantas, las cuales nos permiten establecer un modelo para contrarrestar los efectos tóxicos de los metales pesados como el cobre en suelos de uso agrícola.

1.1 Objetivo General

- Evaluar la contribución de bacterias en asociación con la raíz de la planta de alfalfa en la absorción y translocación de cobre a la parte aérea.

1.2 Objetivos particulares

- Caracterizar aislamientos bacterianos de colectas de muestras de suelo y de raíz en predios del Campus Montecillo del Colegio de Posgraduados.
- Determinar la riqueza de aislamientos de microorganismos fluorescentes.
- Determinar la concentración de cobre en la raíz y la parte aérea en plántulas de alfalfa, cultivadas en solución Steiner en presencia de Cu_2SO_4 .
- Determinación de los patrones de germinación de las semillas de alfalfa en presencia de los aislamientos bacterianos fluorescentes y del género *Bacillus sp.*

1.3 Hipótesis

- La alfalfa es una planta hiperacumuladora de Cu.
- Las bacterias fluorescentes promueven la absorción de Cu en plántulas de alfalfa.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Metales Pesados

En el suelo existen elementos que se encuentran en muy bajas concentraciones; a través del tiempo, los microorganismos se han adaptado a estas disponibilidades; aunque a concentraciones altas, estos elementos son tóxicos para algunos organismos. Dentro de este grupo de elementos son muy abundantes los metales pesados. Se considera metal pesado a aquel elemento que tiene una densidad igual o superior a 5 g/cm^3 cuando está en forma elemental, o cuyo número atómico es superior a 20. Dentro de los metales pesados hay dos grupos: Oligoelementos o micronutrientes, que son los requeridos en pequeñas cantidades, o cantidades traza por plantas y animales, y son necesarios para que los organismos completen su ciclo vital. A altas concentraciones se vuelven tóxicos. Dentro de este grupo están: boro, cadmio, cromo, mercurio, zinc, molibdeno, cobalto, cobre, plata y arsénico. (Spain *et al.*, 2003; Liao *et al.*, 2003).

En las últimas décadas, debido al acelerado desarrollo industrial y crecimiento poblacional se han generado serios problemas de contaminación por metales pesados, provocando un incremento de su concentración en el ambiente y su migración a suelos no contaminados, que deterioran su calidad así como también la del aire y del agua. La exposición de los humanos a estos metales, causa una amplia gama de enfermedades entre las que destacan: enfermedad de Minamata, Itai-Itai, cáncer, anemia, daños hepáticos, renales, pulmonares y en vías respiratorias (Hasler, 1998; Adriano, 1986).

Las principales fuentes de metales pesados son las actividades naturales, como la erosión de suelos, erupción volcánica, que constituyen una fuente relevante de los metales pesados en el suelo, así como también actividades antropogénicas como la industria minera que está catalogada como una de las actividades industriales generadora de problemas con metales pesados. Además de refinerías, aguas residuales, procesos nucleares y de la manufactura de una gran variedad productos como de baterías, componentes eléctricos, aleaciones de metales, plaguicidas y fertilizantes (Roane *et al.*, 1996; Chaney, 1994; Chaney, 1993 Alloway, 1990).

En la atmósfera, los metales originados por las fuentes de emisión como la combustión con plomo, se encuentran como material suspendido en el aire que respiramos. Por otro lado, las

aguas residuales no tratadas y las provenientes de minas y fábricas, contaminan a los ríos y las aguas subterráneas, y los desechos que contienen metales tóxicos simplemente abandonados en el ambiente contaminando el suelo y se acumulan en las plantas y los tejidos orgánicos (Licsko *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1992). (Figura 1)

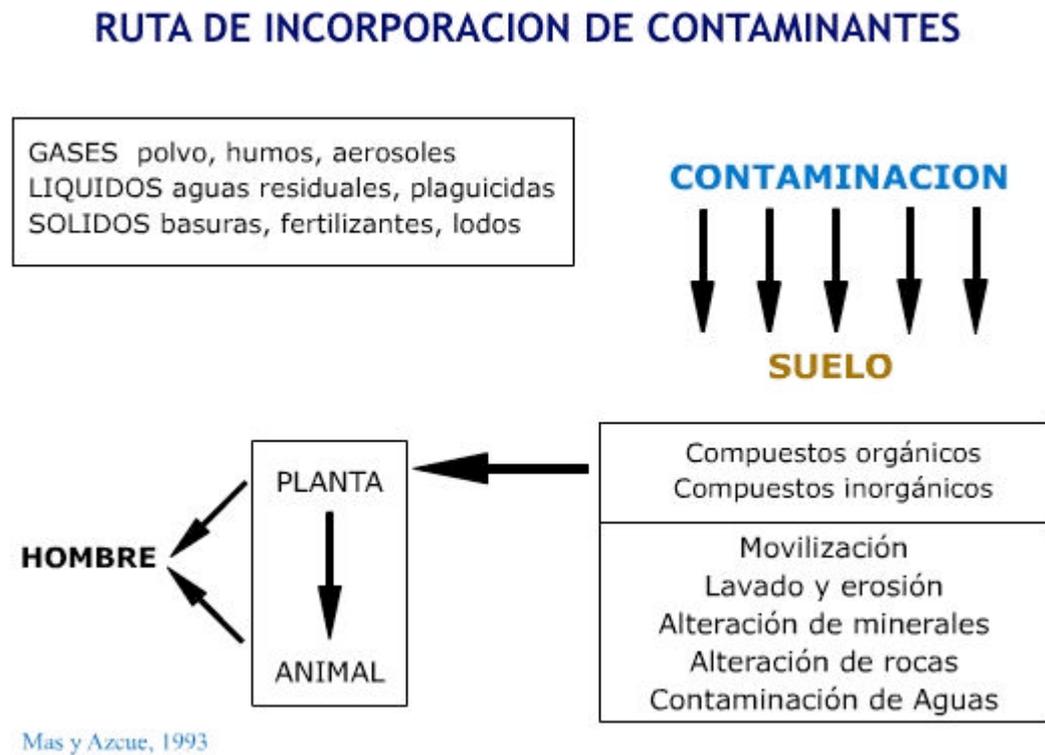


Figura 1. Ruta de incorporación de contaminantes del suelo a la cadena alimenticia (Martín 2000).

Debido a que los metales pesados no son química ni biológicamente degradables una vez emitidos pueden permanecer en el ambiente durante cientos de años. Además, su concentración en los seres vivos aumenta a medida que son ingeridos por otros, por lo que la ingesta de plantas o animales contaminados puede provocar síntomas de intoxicación (Chaney *et al.*, 2001; Licsko *et al.*, 1999; McEldowney *et al.*, 1993).

De acuerdo con Cabrera (1999); Tunnell *et al.* (1996); Alloway (1990); Sopper (1988) la actividad minera genera el desprendimiento de sustancias tóxicas, algunas de ellas asociadas con la roca, otras utilizadas para la separación de los minerales que se extraen y son difundidos en el ambiente los cuales se acumulan en el organismo humano ocasionando envenenamiento y una amplia variedad de enfermedades al trabajador así como también a los

habitantes de las comunidades próximas a una mina y en concentraciones elevadas ocasionan la muerte.

Por ejemplo los polvos de plomo provocan alteraciones al sistema nervioso central, desestabilizando el carácter, irritabilidad, insomnio, afecta las células reproductivas derivándose de esto malformaciones congénitas, abortos, partos prematuros, insuficiencias renales. En las familias mineras los niños son principalmente afectados, ocasionándoles pérdidas de la capacidad de aprendizaje, y lento crecimiento. El plomo se acumula en los huesos impidiendo la producción de sangre.

2.1.1 Efecto de la bioacumulación por algunos metales pesados en humanos.

El **cobre** es un elemento químico con símbolo Cu y número atómico 29; uno de los metales de transición e importante metal no ferroso. Su utilidad se debe a la combinación de sus propiedades químicas, físicas y mecánicas, así como a sus propiedades eléctricas y su abundancia. El cobre fue uno de los primeros metales usados por los humanos.

El cobre metálico se encuentra en mezclas (llamadas aleaciones) con otros metales tales como latón y bronce, se encuentra como parte de otros compuestos formando sales. Las sales de cobre ocurren naturalmente, pero también son manufacturadas, la más común es el sulfato de cobre. La mayoría de sus compuestos son de color azul-verde, son usados comúnmente en la agricultura para tratar enfermedades de las plantas, como el moho, para tratar agua, y como preservativos para alimentos, cueros y telas.

De acuerdo con Kabata-Pendias y Pendias (2000) el cobre puede entrar al ambiente desde minas y desde fábricas que manufacturan o usan cobre metálico o compuestos de cobre, a través de aguas residuales domésticas, la combustión de materiales combustibles fósiles y desechos, la producción de madera, la producción de abonos de fosfato y de fuentes naturales (por ejemplo, por polvo del suelo esparcido por el viento, volcanes, vegetación en descomposición, incendios forestales y del rocío de agua de mar).

El cobre en el suelo se adhiere firmemente a la materia orgánica y a los minerales, se disuelve en agua y se une rápidamente a partículas suspendidas en el agua, generalmente no entra al

agua subterránea. El cobre que es transportado por partículas emitidas por fundiciones y plantas que procesan minerales, regresa al suelo por la gravedad o por la lluvia o la nieve. El cobre no se degrada en el ambiente y por eso se puede acumular en plantas y animales cuando se encuentra en suelos. En suelos ricos en cobre sólo un número pequeño de plantas pueden vivir. Por esta razón existe poca diversidad de plantas cerca de las fábricas o minas de cobre, debido a su efecto sobre las plantas, por lo que representa una seria amenaza para la cadena alimenticia. El cobre puede influir seriamente en ciertos suelos agrícolas, dependiendo de la acidez del suelo y la presencia de materia orgánica, puede interrumpir la actividad en el suelo, su influencia negativa en la actividad de microorganismos y lombrices de tierra. Cuando el suelo está contaminado con cobre, los animales pueden absorber concentraciones que dañan su salud. Principalmente las ovejas sufren un gran efecto por envenenamiento con cobre, debido a que los efectos se manifiestan a bajas concentraciones.

La acumulación de cobre en el hígado ocasiona un daño progresivo de este órgano cuya expresión más severa es la cirrosis hepática. El depósito de cobre en el sistema nervioso central produce un daño neurológico, que en algunos aspectos se parece a la enfermedad de Parkinson, y que puede acompañarse de manifestaciones psiquiátricas. A nivel de la córnea la acumulación de cobre se aprecia como un anillo parduzco pericórneo (anillo de Kayser-Fleisher). El daño a los tejidos puede disminuirse sometiendo en forma temprana a los pacientes a una dieta con bajo contenido de cobre, junto con una terapia con compuestos que disminuyan su absorción (el más usado es el zinc) y medicamentos que favorezcan la eliminación del exceso utilizando agentes quelantes como el EDTA.

El **hierro** es un elemento químico con símbolo Fe, es un elemento esencial para la gran parte de eucariontes ya que este juega un rol crítico en muchos procesos bioquímicos. Sin embargo el Fe esta presente en alta cantidad en los suelos. Siendo el 4º elemento contenido en la tierra (5%). El hierro puede ser encontrado en carne, productos integrales, tubérculos y vegetales. El cuerpo humano absorbe hierro de animales más rápido que el hierro de las plantas. El hierro es una parte esencial de la hemoglobina: el agente colorante rojo de la sangre que transporta el oxígeno a través de nuestros cuerpos.

Un exceso de hierro puede provocar conjuntivitis, coriorretinitis, y retinitis si contacta con los tejidos y permanece en ellos. La inhalación crónica de concentraciones excesivas de vapores o polvos de óxido de hierro puede resultar en el desarrollo de una neumoconiosis benigna,

llamada siderosis, que es observable como un cambio en los rayos X. Ningún daño físico de la función pulmonar se ha asociado con la siderosis. La inhalación de concentraciones excesivas de óxido de fierro puede incrementar el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón en trabajadores expuestos a carcinógenos pulmonares.

2.1.2 Efecto de los metales pesados en el suelo

Los metales pesados son elementos químicos, presentes en todo tipo de suelos y sus niveles de abundancia se reporta en porcentajes y partes por millón. Cuando el nivel de su contenido en el suelo es por abajo de los límites permitidos como se muestra en el (Cuadro 1) presenta un efecto inocuo en la vegetación y en las poblaciones microbianas, además también desempeña un papel biológico en diversas funciones de las células, lo que les ha permitido estar agrupados bajo el nombre general de “micro-elementos”.

Cuadro 1. Intervalos de contenido de los límites normal y máximo permitidos de los metales pesados en los suelos en partes por millón p.p.m. (Kloke, 1980).

Elementos químicos	Intervalo de contenido normal p.p.m.	Límites máximos permitidos p.p.m.
Cadmio	0.1 - 1.0	3.0
Cobalto	1 - 10	50
Cromo	2 - 50	100
Cobre	1 - 20	100
Níquel	2- 5	50
Plomo	0.1 - 20	100
Zinc	3 - 50	300

Cuando el suelo tiene un nivel alto dentro de los límites permitidos de estos elementos, el término que se usa es el de “metal pesado”, provocando contaminación de suelos, en este caso se afecta a largo plazo, a las plantas y a los microorganismos. Cuando el contenido de metales pesados en el suelo alcanzan niveles que rebasan los máximos permitidos causando efectos inmediatos como inhibición del crecimiento normal y el desarrollo de las plantas, y

causa un disturbio funcional en otros componentes del ambiente así como la disminución de las poblaciones microbianas del suelo, el término que se usa o se emplea es “contaminación de suelos” (Martín, 2000; Kabata-Pendias, 1995).

En el suelo, los metales pesados están presentes como iones libres, compuestos metálicos solubles, compuestos insolubles como óxidos, carbonatos e hidróxidos. Su acción directa sobre los seres vivos ocurre a través del bloqueo de las actividades biológicas, es decir, la inactivación enzimática por la formación de enlaces entre el metal y los grupos –SH (sulfhidrilos) de las proteínas, causando daños irreversibles en los diferentes organismos.

Para que los metales pesados puedan ejercer su toxicidad sobre un ser vivo, éstos deben encontrarse disponibles para ser captados por éste, es decir que el metal debe estar biodisponible. El concepto de biodisponibilidad se encuentra íntimamente relacionado con las condiciones fisicoquímicas del ambiente, que determinan la especiación y por lo tanto la concentración de metal libre y lábil. Por ello, al determinar el grado de contaminación por metales pesados de un ambiente, es fundamental conocer su biodisponibilidad, es decir, la concentración de metal libre presente en la muestra (Lovley, 2000).

Aproximadamente 10% de los metales se encuentran como contenido nativo pertenecientes a materiales de algunos suelos, pero más de 90% llega al suelo por deposiciones atmosféricas secas y húmedas y como resultado de algunas prácticas agronómicas (Adriano, 1990). Algunos de estos metales como Cr, Cu, Co y Mo, son elementos traza esenciales para animales, microorganismos y plantas, mientras otros no lo son como Pb, Cd, Zn; sin embargo en altas concentraciones todos ellos son considerados tóxicos. Su biodisponibilidad y toxicidad a microorganismos incluyendo hongos micorrízicos, plantas y animales son influidos por diversos factores particularmente pH, temperatura, potencial redox, capacidad de intercambio catiónico de la fase sólida y competencia entre iones (Leyval *et al.*, 1994; Schmit y Sticher, 1991).

La contaminación en suelos por metales pesados ocurre cuando estos son irrigados con aguas procedentes de desechos de minas, aguas residuales contaminadas de parques industriales y municipales, filtraciones de presas de jales (Zier *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1992). Estos contaminantes pueden alcanzar niveles de concentración que provocan efectos negativos en las propiedades físicas, químicas y biológicas como: reducción del contenido de materia

orgánica, disminución de nutrientes, variación del pH generando suelos ácidos, amplias fluctuaciones en la temperatura, efectos adversos en el número, diversidad y actividad en los microorganismos de la rizósfera. También dificultan el crecimiento de una cubierta vegetal protectora favoreciendo la aridez, erosión del suelo, y la dispersión de los contaminantes hacia zonas y acuíferos adyacentes y como consecuencia aumenta la vulnerabilidad de la planta al ataque por insectos, plagas y enfermedades, afectando su desarrollo (Zhang *et al.*, 2000; Cabrera *et al.*, 1999).

El pH es un factor esencial, para que la mayoría de los metales tiendan a estar más disponibles en un pH ácido, excepto As, Mo, Se y Cr, los cuales tienden a estar más disponibles a pH alcalino es una variable importante para definir la movilidad del catión, debido a que en medios con pH moderadamente alto se produce la precipitación como hidróxidos. En medios muy alcalinos, pueden nuevamente pasar a la solución como hidrox complejos. La adsorción de los metales pesados está fuertemente condicionada por el pH del suelo y por tanto, también su biodisponibilidad de sus compuestos (Alloway, 1993).

La textura favorece la entrada e infiltración de la contaminación de metales pesados en el suelo, por ejemplo la arcilla tiende a adsorber a los metales pesados, que quedan retenidos en sus posiciones de intercambio; por el contrario los suelos arenosos carecen de capacidad de fijación de los metales pesados, los cuales pasan rápidamente al subsuelo y pueden contaminar los mantos freáticos.

La materia orgánica, reacciona con los metales formando complejos de intercambio y quelatos. Los metales, una vez que forman quelatos o complejos, pueden migrar con mayor facilidad a lo largo del perfil del suelo. La materia orgánica puede adsorber tan fuertemente a algunos metales, como es el Cu, que pueden quedar en forma no disponible para las plantas, motivo por el cual, algunas plantas crecidas en suelos ricos en materia orgánica, presentan carencia de elementos como el Cu, Pb y el Zn, eso no significa que los suelos no estén contaminados ya que las poblaciones microbianas se reducen notablemente.

La complejación por la materia orgánica del suelo es una de los procesos que gobiernan la solubilidad y la bioasimilación de metales pesados. La toxicidad de los metales pesados se potencia en gran medida por su fuerte tendencia a formar complejos organometálicos, lo que facilita su solubilidad, disponibilidad y dispersión. La estabilidad de muchos de estos

complejos frente a la degradación por los organismos del suelo es una causa muy importante de la persistencia de la toxicidad. Pero también la presencia de abundantes quelatos puede reducir la concentración de otros iones tóxicos en la solución del suelo (Licsko *et al.*, 1999, Jackson y Alloway, 1993, Alloway, 1990 y Adriano, 1986)

Los metales pueden acumularse en tejidos vivos (bioacumularse) y luego ser transmitidos de una especie animal a otra a través de la cadena alimenticia. Por ejemplo, un árbol puede alimentarse de aguas subterráneas contaminadas con metales, acumular algunos de estos metales en sus hojas, y luego los pájaros al alimentarse con estas hojas pueden afectarse por la toxicidad de estos metales (Cobb *et al.*, 2000; Cabrera *et al.*, 1987). La toxicidad de los metales en la plantas pueden causar reducción de las raíces, quemaduras en las hojas, deficiencia en los nutrimentos e incremento en su vulnerabilidad al ataque de enfermedades e insectos (Angle *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 1995; Roane *et al.*, 1994).

La utilización del lodo de aguas residuales en las regiones agrícolas aumenta la concentración de metales pesados en suelo. Los estudios sugieren que las cosechas de leguminosas, que dependen de la fijación simbiótica del N₂, puedan ser sensibles a los efectos tóxicos de los metales pesados presentes en dichos lodos. Así, se ha observado la reducción en la nodulación, tamaño de la planta y actividad de la nitrogenasa en las plantas del trébol blanco crecidas en un suelo altamente contaminado con Cd, Pb, y Zn (Rother *et al.*, 1993). Otros estudios han demostrado los efectos tóxicos de metales pesados en la nodulación y actividad de la nitrogenasa (Vigue *et al.*, 1991).

Con el propósito de interpretar el nivel de los metales pesados en el suelo, solo han sido considerados los valores iniciales de su contenido: valores analíticamente determinados tanto en suelos normales no afectados por el impacto antropogénico como en suelos afectados. Los valores que representan los límites máximos permitidos de concentración de metales pesados en suelos fueron establecidos, principalmente aplicables al crecimiento y desarrollo de plantas. Los límites máximos permitidos fueron establecidos en Alemania, de acuerdo con los resultados obtenidos de laboratorio, invernadero y experimentos de campo (Kloke, 1980).

De acuerdo con Kloke (1980) y Chumbley (1991) los límites máximos permitidos siguen siendo utilizados en muchos países, como Holanda, Austria, Canadá, Japón y Estados Unidos de América.

Los metales pesados incorporados al suelo pueden seguir cuatro diferentes vías:

- Pueden quedar retenidos en el suelo, ya sea disueltos en la solución del suelo o bien fijados por procesos de adsorción, complejación y precipitación.
- Pueden ser absorbidos por las plantas y así incorporarse a las cadenas tróficas.
- Pueden pasar a la atmósfera por volatilización.
- Pueden movilizarse a las aguas superficiales o subterráneas.

2.2 Estrategias de remediación de suelos por métodos químicos y físicos.

La contaminación del suelo por metales pesados representa un grave problema a nivel mundial, debido a ello se han desarrollado tecnologías para reducir y/o enmendar el riesgo de la contaminación de agua y suelos contaminados con metales pesados. La contaminación de suelos por metales puede ser remediada por técnicas químicas, físicas y biológicas y son agrupadas en dos categorías: a) *in situ*, este método remedia el suelo contaminado sin la remoción del mismo y b) técnicas *ex situ*, las cuales por el tratamiento los suelos contaminados requieren ser removidos del sitio. Las técnicas *in situ* tienen mayores ventajas que las de *ex situ* debido a su bajo costo y a su reducido impacto en el ecosistema (Chen *et al.*, 1997).

La remediación del suelo es necesaria para eliminar o disminuir los riesgos a los humanos y al ambiente de la toxicidad de los metales. Las enfermedades en el hombre son el resultado de la alta concentración de Cd, Se, Zn, Cu, Cr, y Pb en suelo (Chaney *et al.*, 1999). El ganado y la fauna son dañados por estos metales (Raskin *et al.*, 1994). La contaminación del suelo con Zn, Ni y Cu causada por desechos de minas y fundidoras es conocida por la sensibilidad de las plantas (Chaney *et al.*, 1999).

Las estrategias físicas y químicas de remediación más utilizadas para eliminar y/o reducir los contaminantes del suelo son: extracción, sellado, incineración, excavación, tratamiento químico y tratamiento electroquímico. No obstante, muchas de estas tecnologías son costosas ya que el precio estimado para la recuperación de suelos en el mercado de Estados Unidos de América fue de aproximadamente de 1 a 2 millones de dólares en 1997 incrementándose de

15 a 25 millones en el 2000 y probablemente 70 a 100 millones en 2005 (Glass, 2000, McGrath *et al.*, 1997; Cunningham, 1996).

Ciertas técnicas especializadas pueden exceder costos de 1000 dólares por tonelada, la excavación de contaminantes, tiene un costo promedio de 1000 000 dólares por acre y su eficacia es moderada, destruyendo la estructura del suelo así como su fertilidad, o la más lamentable esparciendo la contaminación a sitios no contaminados (Chaney *et al.*, 2001; McGrath *et al.*, 1997; Raskin, 1997; Adriano, 1996; Alloway, 1993). El problema es más severo particularmente cuando grandes áreas están contaminadas con radionucleótidos, como por ejemplo las áreas alrededor del reactor nuclear de Chernobyl.

2.2.1 Remediación de suelo por extracción

La extracción más conocida es el lavado de suelos, se realiza habitualmente en depósito. Se basa en una separación o una reducción del volumen. El rendimiento depende de la solubilidad de los compuestos contaminantes en la solución de lavado que se utilice. Otra técnica, es conocida como “Soil Vacuum” se produce una extracción de los contaminantes y se utiliza para eliminar compuestos orgánicos volátiles y mercurio. Para potenciar la eficacia se puede utilizar además vapor de agua, una modificación es la técnica de “Soil Venting”, donde se combina el efecto de extracción con la inyección de aire. En este tipo de técnicas las características físicas y químicas del suelo pueden alterar la eficacia de la técnica (Burns *et al.*, 1996).

2.2.2 Remediación de suelo por sellado

La técnica del sellado trata al suelo con un agente que lo encapsula y lo aísla. El suelo es excavado, la zona se sella con un impermeabilizante y se redeposita el suelo. Para desarrollar las barreras de aislamiento se ha utilizado diversas sustancias, como el cemento, cal, plásticos, arcilla, etc. El procedimiento tiene el inconveniente que se pueden producir grietas por las que los contaminantes pueden fugarse. Sometiendo al suelo a altas temperaturas (1600-2300°C) se consigue su vitrificación con lo que se llegan a fundir los materiales del suelo, produciéndose una masa vítrea similar a la obsidiana. Durante el proceso hay que controlar la volatilización de numerosos compuestos. La propia filosofía de estas técnicas (persigue la eliminación del suelo) las hace sólo recomendable en situaciones extremas. En otras ocasiones se realiza el aislamiento directamente sobre los niveles de aguas freáticas y

mediante bombeos exhaustivos se consigue deprimir los niveles freáticos para alejarlos del suelo y subsuelo contaminados (Huang *et al.*, 1998).

2.2.3 Remediación de suelo por incineración

La incineración es una técnica apropiada para el tratamiento de residuos principalmente para la fracción orgánica y combustible. Esta técnica reduce considerablemente el volumen y la peligrosidad de los residuos. Sin embargo, debe considerar el tratamiento de las emisiones atmosféricas, de los residuos líquidos; así como mismo la disposición apropiada de las cenizas y escorias que se generan en el proceso. La incineración de residuos no sólo se utiliza como una alternativa de tratamiento sino que también para el aprovechamiento del poder calorífico contenido en los residuos. Algunos procesos productivos, especialmente los de producción de cemento y de cal, presentan a nivel mundial una experiencia importante en coincineración de residuos como combustibles alternativos, en forma complementaria al combustible tradicional. En nuestro país, algunas instalaciones ya realizan operaciones de coincineración de residuos y en el futuro se espera que otras empresas productoras de cemento, cal y de productos forestales comiencen a utilizar residuos como combustible, debido al menor costo que implica la utilización de estos compuestos en la generación de calor (Adriano, 1992).

La incineración genera emisiones atmosféricas de contaminantes orgánicos e inorgánicos, en forma de gases y partículas presentando un riesgo a la salud de la población expuesta. Su dispersión puede darse a escala local y regional y su posterior deposición puede significar un riesgo al patrimonio ambiental o a otras actividades productivas. Dependiendo de los residuos utilizados, las emisiones a la atmósfera corresponderán a partículas totales en suspensión cuya composición química puede estar formada por metales pesados y sus compuestos u otras sustancias orgánicas e inorgánicas. Asimismo, las emisiones pueden corresponder a sustancias en forma de gases, entre ellos los compuestos clorados y fluorados (Cunningham *et al.*, 1996).

2.2.4 Tratamiento químico

De acuerdo con Adriano (1986) el tratamiento químico es un método útil para: hidrocarburos, aldehídos, ácidos orgánicos, fenoles, cianuros y plaguicidas organoclorados. Éste trata de depurar el suelo mediante la degradación de los contaminantes por reacciones químicas. Frecuentemente se trata de reacciones de oxidación de los compuestos orgánicos. Como agente oxidante se emplea el oxígeno y el agua oxigenada. Este tratamiento se utiliza preferentemente *in situ*, inyectando el agente depurador a zonas profundas mediante barrenas huecas, o a veces, simplemente mediante un laboreo apropiado del terreno.

Otro procedimiento químico es la descloración. Esta técnica se utilizó, en un principio, para la estabilización de productos del petróleo. En suelos se ha empleado para la desfluoración de PBC. Consiste en la inyección de CaO, Ca(OH)₂ o NaOH. El suelo al reaccionar se calienta y al aumentar el pH hasta valores de 9 a 11 se produce la descloración de los PBC (Adriano 1986).

2.2.5 Remediación de suelo por tratamientos electroquímicos

El tratamiento electroquímico es un procedimiento a realizar *in situ*, el desplazamiento de los contaminantes se logra mediante la creación de campos eléctricos. Consiste en introducir, a suficiente profundidad electrodos en el suelo. Los contaminantes fluyen desde un electrodo a otro siguiendo las líneas del campo eléctrico. En el tratamiento de desechos peligrosos, la electrólisis se usa ampliamente para los metales como cadmio, cobre, oro, plomo, plata y zinc. La recuperación de metales por electrolisis por electro-deposición directa, reduciendo particularmente metales. Un ejemplo específico es la remoción electrolítica de cadmio y níquel en agua contaminada por desechos de baterías usando electrodos fibrosos de carbono (Abda y Oren, 1993).

2.3 Remediación de suelos por métodos biológicos

2.3.1 Biorremediación

Los métodos tradicionales para la remediación de sitios contaminados además de ser costosos a menudo no son eficaces. La biorremediación aparece como una técnica alternativa efectiva y de bajo costo en el intento de mitigar y reducir la contaminación de compuestos orgánicos e inorgánicos, recurriendo a sistemas biológicos, tales como plantas, hongos, enzimas y

bacterias que sustituyan a las actuales estrategias de enmienda de suelo y agua (Chaney *et al.*, 1999; Garbisu y Alkorta, 1997; Rao *et al.*, 1996). La biorremediación aprovecha la diversidad y versatilidades genéticas de los microorganismos para producir rupturas o cambios moleculares en los contaminantes generando compuestos de menor o ningún impacto ambiental (Khan, 2000; Saxena *et al.*, 1999; Wenzel *et al.*, 1999; Brown, 1998; Cunningham, 1996; Meeussen *et al.*, 1994; Alloway, 1993; Adriano, 1992; Adriano, 1986).

Estos cambios ocurren usualmente en la naturaleza, sin embargo su velocidad es baja, mediante una adecuada manipulación estos sistemas biológicos pueden ser optimizados para aumentar la velocidad de cambio o degradación y así usarlos en sitios con una elevada concentración de contaminantes de importancia ambiental en suelos, aguas y aire (McGrath, 2001; Khan, 2000; De Oliveira y Narasimha, 1999). Una gran cantidad de contaminantes como plaguicidas, herbicidas, petróleo, gasolina y metales pesados pueden ser eliminados por biorremediación (Lasat, 2002; McGrath *et al.*, 2001; Reed, 1992). Al incremento del uso de la biorremediación como una estrategia sostenible y económica, se le está prestando una particular atención, principalmente en Europa y Estados Unidos de América (Khan y Kuek *et al.*, 2000).

2.3.2 Fitorremediación

El concepto de usar plantas para limpiar suelos contaminados no es nuevo, desde hace 300 años las plantas fueron propuestas para el uso en el tratamiento de aguas residuales (Hartman, 1975). En Rusia en los años 60 se realizaron investigaciones utilizando plantas para recuperar suelos contaminados con radionucleótidos. Existen reportes sobre el empleo de plantas acuáticas en aguas contaminadas con plomo, cobre, cadmio, hierro y mercurio. La remediación de la acumulación de metales pesados en suelos utilizando plantas es también ampliamente reconocida (Ernst, 2000).

La fitorremediación (el prefijo fito- significa planta) es una estrategia que se utiliza en la remediación de suelos contaminados (Chaney, 1997), es un proceso de descontaminación que involucra el empleo de plantas que pueden remover, transferir, estabilizar, descomponer y/o degradar contaminantes de suelo, sedimentos y agua, como solventes, plaguicidas, hidrocarburos poliaromáticos, metales pesados, explosivos, elementos radiactivos,

fertilizantes, para hacerlos más biodisponibles para la planta (McGrath *et al.*, 2001; Macek *et al.*, 2000; Mench *et al.*, 1999; Raskin *et al.*, 1994; Chen, *et al.*, 1990).

Esta técnica se encuentra todavía en su etapa inicial de investigación y de desarrollo, el número de pruebas de campo realizadas hasta la fecha es no obstante pequeña (Brown *et al.*, 2003; Chaney *et al.*, 1999; Chen, 1992;), está surgiendo como un método terapéutico atractivo debido a su simplicidad y al costo relativamente bajo. Además de la remoción de contaminantes, la limitación de ofrecimientos de técnicas de lixiviación del suelo, facilitando su mejora o el mantenimiento de estructura y propiedades, así como su fertilidad, hay también la posibilidad de bio-recuperación de ciertos contaminantes como por ejemplo metales pesados (Chaney *et al.*, 2000; Watanabe, 1997). Aunque el conocimiento básico de que las plantas pueden ser usadas para remediación del ambiente ha sido desde décadas pasadas, solo recientemente ha sido reconocido completamente el valor de las plantas acumuladoras de metales en la recuperación de suelos contaminados (Salt *et al.*, 1997).

Después de una minuciosa investigación, la fitorremediación se está convirtiendo en una tecnología alternativa de remediación de suelos contaminados realmente útil, económica y efectiva (Watanabe, 1997). Esta nueva técnica de enmienda está basada en prácticas agronómicas, es rápida y eficiente, y consiste en cultivar plantas en un lugar contaminado, después cosecharlas y estas plantas llenas de metales pesados, éstas podrían venderse a compañías de energía eléctrica como fuente de biomasa para generar energía, la que a su vez podría generar una ganancia. Las cenizas resultantes de la incineración también se podrían ser llevadas a una fundición para recobrar el metal y nuevamente crear un flujo de ingresos (Raskin *et al.*, 1997; Salt *et al.*, 1995; Crowley *et al.*, 1991).

Según Jentschke (2000), los árboles pueden realizar una acción de bombeo orgánico cuando sus raíces se extienden hacia la capa freática, formando una masa densa de raíces que absorbe una gran cantidad de agua. Los álamos, por ejemplo, absorben 113 litros de agua por día, y hay una variedad de álamo (*Populus deltoides*) que absorbe hasta 1325 litros por día. La acción de bombeo de las raíces disminuye la tendencia de los contaminantes superficiales al descender hacia el agua subterránea y el agua potable. En zonas agrícolas, los álamos plantados a lo largo de cursos de agua reducen el excedente de fertilizantes y herbicidas que contienen dichas aguas. Asimismo, los árboles plantados en vertederos como sustitutos orgánicos de la tradicional capa de arcilla o de plástico absorben agua de lluvia que, de lo

contrario, se filtraría por el vertedero y llegaría al fondo en forma de "lixiviado" contaminado (Drake *et al.*, 1999; El-Dermerdash *et al.*, 1994).

Esta novedosa tecnología, tiene muchas ventajas con respecto a los métodos convencionales de tratamientos de lugares contaminados; en primer lugar es una tecnología de bajo costo económico, en segundo lugar posee un impacto regenerativo en lugares en donde se aplica y en tercer lugar su capacidad extractiva se mantiene debido al crecimiento vegetal. Además es capaz de ser modificada para aumentar su capacidad y selectividad extractiva, un caso bien conocido es la modificación genética de *Arabidopsis thaliana* para reducir el ion mercurioso (Pawlowska *et al.*, 2000; De Olivera, 1999; Salt *et al.*, 1998; Kumar *et al.*, 1995; Baker *et al.*, 1994).

Los beneficios derivados de esta estrategia de fitoenmienda abarcan los sectores del ambiente, la salud, industria y energía. Las pruebas científicas han confirmado la validez de esta estrategia y se han emprendido gestiones para obtener financiamiento para los crecientes esfuerzos puestos en marcha en varios países (Chaney, 1997). Es importante reconocer que la fitorremediación ofrece ventajas adicionales a la limpieza de suelos y mantos freáticos al emplear alguno de los siguientes mecanismos: Incremento de la actividad y población microbiana en el subsuelo, que eleva la cantidad de carbón orgánico. Mejoras en la aeración del suelo por la liberación de oxígeno por las raíces. El retraso del movimiento e intercepción de compuestos orgánicos y algunos metales. Estimulación de las transformaciones de compuestos tóxicos a compuestos de menor toxicidad. Captación de hidrocarburos volátiles por las hojas, que sirven de "tapadera" a los lugares contaminados. Los suelos contaminados por metales son notoriamente difíciles de remediar, debido al alto costo, no saben que hacer con el suelo contaminado, por lo que la fitorremediación es una alternativa con un costo efectivo; varios análisis han demostrado que el costo de fitoextracción de metales es sólo una fracción de aquellos asociados con técnicas de ingeniería convencionales. Además, debido a que remedia el suelo *in situ*, la fitorremediación evita una ruptura dramática del terreno y preserva el ecosistema (Lasat, 2002).

La fitorremediación no es un remedio para todos los suelos contaminados, antes de que esta tecnología pueda volverse técnicamente eficiente y costo-eficaz, hay algunas limitaciones que necesitan ser superadas como por ejemplo, sus mecanismos tanto moleculares, bioquímicos y fisiológicos son pocos conocidos e insuficientemente entendidos, un gran número de plantas

hiperacumuladoras todavía pueden descubrirse e identificarse (Freitas *et al.*, 2004; Prasad y Freitas, 2003; Raskin *et al.*, 1994).

El proceso de fitorremediación es lento porque el índice de acumulación es directamente proporcional al de crecimiento de la planta, porque no hay planta con todas las características adecuadas con los criterios ideales de una hiperacumuladora eficaz (crecimiento rápido y raíces extensas de biomasa alta, fáciles de cosechar, plantas acumuladoras de una amplia gama de metales tóxicos), por lo que es necesario introducir sistemas biológicos como la simbiosis entre hongos micorrízicos y las plantas para coadyuvar en la recuperación de suelos contaminados, o más aun modificarlas genéticamente para mejorarlas y sean empleadas satisfactoriamente como agentes en el proceso de fitorremediación (Clemens *et al.*, 2002; Maagher *et al.*, 2000; Lovley y Coates, 1997).

2.4 Plantas hiperacumuladoras de metales pesados

Todas las plantas poseen un potencial para absorber una amplia variedad de metales del suelo pero la mayor parte de las plantas tienden solamente a absorber los que son esenciales para su supervivencia y desarrollo. Existe una notable excepción de esta regla de un pequeño grupo de plantas que pueden tolerar, absorber, y translocar altos niveles de ciertos metales, estas plantas reciben el nombre de hiperacumuladoras (Chen *et al.*, 2001).

El concepto de "planta hiperacumuladora" fue establecido por R.R. Brooks y sus colaboradores en 1977, quienes fueron los pioneros en el estudio de plantas que pueden acumular metales. Una definición propone que si una planta contiene más de 0.1% de Ni, Co, Cu, Cr y Pb o 1% del Zn en sus hojas sobre una base del peso seco, ésta puede ser llamada una "hiperacumuladora", independientemente de la concentración del metal en el suelo (Robinson *et al.*, 2003; Chaney *et al.*, 2000; Chaney *et al.*, 1997; Peters y Shem, 1994; Baker y Brooks, 1989; Baker *et al.*, 1988; Chaney, 1983; Brooks *et al.*, 1979).

Las primeras plantas hiperacumuladoras caracterizadas son miembros de las familias *Brassicaceae* y *Fabaceae*. La idea de usar plantas para extraer metales de suelos contaminados fue reintroducida y desarrollada por Chaney (1983) y el primer ensayo en el campo de la fitoextracción fue conducido en 1991. La especie *Thlaspi caerulescens* (carrespique) y *Viola calaminaria* son especies de plantas documentadas por acumular

elevados niveles de metales en sus hojas (Baumann, 1985). De acuerdo con Salt *et al.* (1998), se establece que el botánico A. Baumann, trabajando en los límites entre Bélgica y Alemania observó las hojas de ciertas especies de plantas que crecían en suelos enriquecidos naturalmente con zinc y conteniendo altas concentraciones de este elemento. Las especies que particularmente registró fueron la violeta (*Viola aclamaria*) y la mostaza (*Thlaspi calaminare*) recientemente clasificada como *Thlaspi caerulescens*. Las cuales contenían cerca de 1 y 1.7% de zinc en el peso seco de las hojas.

Estas fueron comparadas con los niveles de zinc entre 0.001 y 0.02% del peso seco de hojas de otras plantas. Los estudios realizados en Estados Unidos de América reportaron al selenio como un componente de la planta responsable de trastornos en ciertos animales en Dakota del Sur. Esta investigación indujo al descubrimiento de plantas capaces de acumular selenio arriba de 0.6% en la biomasa seca de los brotes. Una década más tarde dos botánicos italianos, Minguzzi y Vergnano (1948) descubrieron plantas que acumulaban níquel, ellos observaron que las hojas secas de *Alyssum bertolonii* que crecían en suelos serpentinos ricos en níquel, cerca de Florencia Italia contenían alrededor de 1% de níquel, por arriba de 100 a 1000 veces más alto que otras plantas que crecían cercanas al sitio.

El Dr. Rufus L. Chaney encabeza en los Estados Unidos de Norteamérica los estudios para evaluar plantas llamadas “hiperacumuladoras” que absorben grandes cantidades de metal de los suelos. En esas investigaciones se encontró una especie conocida como *Thlaspi caerulencens*, que acumula hasta 30 000 ppm de zinc y hasta 6000 ppm de cadmio en sus hojas, sin reducir el rendimiento de la planta (Brown *et al.*, 1995).

También se ha demostrado la tolerancia al cadmio en el diente de león (*Taraxacum officinale*) (Kabir y Koide, 2000; Kuleff y Djingova, 1991). Otras especies como *Chichorium intybus*, *Erigeron canadensis* y *Eupatorium capillifolium* han sido investigadas como especies indicadoras de cadmio, cromo, níquel o vanadio, es decir como especies que indican la biodisponibilidad de estos metales contaminantes, por incorporarlos sin mostrar síntomas de toxicidad. El *Amaranthus reflexus* ha demostrado ser efectivo en absorber el amenazador cesio-137 radiactivo, también resulta muy prometedor como hiperacumulador de plomo, por su parte el helecho originario de Florida, *Pteris vittata* es capaz de absorber el peligroso arsénico, lo más curioso es que el helecho crece mejor en suelos que contienen elevadas cantidades de arsénico que en los que carecen de él (Martín *et al.*, 1996).

El cadmio se puede acumular en girasol (*Helianthus annuus*) (Davies *et al.*, 2001; Simón, 1998). El girasol es una rizofiltradora potencial de cadmio, níquel, cobre, zinc, cromo y plomo; así como de radioisótopos (Brooks, 1998). Existen plantas que al mismo tiempo que son hiperacumuladoras de cobre, lo son del cobalto, entre ellas algunas especies de la familia *Asteraceae* (Brooks, 1998). El girasol (*H. annuus* L.) es la especie que absorbe los metales pesados en mayor cantidad en sus raíces que en sus brotes si se cosecha la biomasa entera de la planta, por lo que se considera una planta hiperacumuladora favorable en la fitoextracción de Cd, Zn, Pb y elementos radiactivos (Christie *et al.*, 2004; Reeves, 2003; Davies, 2002; Cabrera *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 1995).

Desde el punto de vista ecológico el papel de las plantas hiperacumuladoras no está aun completamente claro, pero se ha sugerido que éstas suministran protección contra el ataque de hongos patógenos e insectos. Las recientes evidencias han confirmado la función de protección de la planta acumuladora de níquel contra hongos y bacterias patógenos en *Stephanthus polygaloides* e insectos herbívoros en *S. polygaloides* y *T. montanum* (Li *et al.*, 2003). El efecto contra los insectos herbívoros está bien demostrado en *Thlaspi caerulescens*, que es una planta hiperacumuladora de zinc.

Con esta extraordinaria habilidad las plantas hiperacumuladoras de metales pueden ser usadas en actividades de remediación en el ambiente, además que constituyen un importante recurso biológico en las futuras revegetaciones y fitorremediaciones de áreas contaminadas con metales pesados. Sin embargo las aplicaciones máximas todavía no se han logrado, una razón importante es la falta de conocimientos de los mecanismos moleculares y procesos biológicos involucrados que permiten tolerar, la adquisición, el transporte y acumulación de los metales en las planta, incluso que se puedan alimentar de los metales (Lovley, 1997).

En las últimas décadas, la intensa búsqueda se ha conducido a investigar la biología de fitoextracción de metal, pero a pesar de los sucesos significativos, la comprensión del mecanismo de las plantas que permiten la extracción del metal emergen lentamente. El suceso natural de especies de plantas capaces de acumular extraordinariamente altos niveles de concentraciones hace de la investigación un proceso particularmente interesante.

Como resultado, se están obteniendo los primeros avances para la comprensión de los mecanismos a nivel molecular por los cuales las plantas son capaces de tolerar los excesos y absorber metales pesados, que serían venenos peligrosos para otras especies, mientras que las plantas hiperacumuladoras los incorporan como nutrientes (Huang *et al.*, 1997). Hasta el momento, se ha descubierto que algunas moléculas facilitan el transporte de los metales pesados al interior de la planta a través de las raíces, por procesos de absorción en las vacuolas que aumentan su biodisponibilidad para las plantas, son conocidas como agentes quelantes como EDTA y DTPA (Chen *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2000; Turnau *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1997; Leyval *et al.*, 1995), que son capaces de formar iones complejos con el metal, facilitando en gran medida la absorción, estas sustancias pueden ser producidas por la propia planta y liberadas al suelo a través de las raíces. De acuerdo con Leyval *et al.* (1997) la absorción de los metales pueden ser ayudadas por microorganismos como hongos micorrízicos.

Los genes responsables de la hiperacumulación de los metales en los tejidos finos de la planta se han identificado y se han reproducido. El metabolismo del glutatión y de los ácidos orgánicos desempeña un papel dominante en plantas en tolerancia de los metales. El glutatión es un componente de bacterias, plantas y animales. En el proceso de fitorremediación de metales en el ambiente, los ácidos orgánicos desempeñan un papel importante en tolerancia del metal (Hall, 2002).

De acuerdo con Pilon-Smits *et al.* (2002), las estrategias genéticas en la producción de las plantas transgénicas y el papel que desempeñan los microorganismos contribuyen a la importancia en el proceso de fitorremediación, así como el desciframiento completo del genoma de *Arabidopsis*, además de los intensos estudios moleculares que se están llevando a cabo en *Thlaspi*, y el conocimientos de algunos genes implicados en las absorción y en la tolerancia a algunos metales específicos, resultan muy prometedores en la obtención de las primeras variedades de plantas transgénicas con capacidades hiperacumuladoras mejoradas (Zhu *et al.*, 1999).

Diversas investigaciones afirman la identificación de plantas acumuladoras, capaces de acumular elevados niveles de cobalto, cobre, manganeso (Baker y Brooks, 1989), sin embargo la existencia de plantas hiperacumuladoras capaces de acumular metales como

níquel, zinc y selenio son cuestionadas continuamente y requieren futuras investigaciones (Salt, 1998).

En fitorremediación se necesitan plantas de rápido crecimiento con una alta capacidad de incorporación de metales y una rápida ganancia de biomasa, para que puedan interferir en la biodisponibilidad de metales tóxicos en suelos y las limitaciones de las plantas hiperacumuladoras son de pequeña biomasa radicular, su restringida selectividad de los elementos, el minúsculo conocimiento acerca de la agronomía, la genética y las enfermedades de éstas plantas. En su gran mayoría las plantas que acumulan metales son especies silvestres pequeñas en tamaño y tienen las tasas de crecimiento lento como ejemplo se tiene a *T. caerulea*, que es una planta no micotrófica y de lento crecimiento son características que limitan el porcentaje de la fitoextracción. (Baker y Walker, 1997).

Actualmente las plantas hiperacumuladoras identificadas son 397, este número puede ser cambiado en el futuro, ya que más plantas que crecen en suelos ricos en metales son investigadas, en la mayoría de los casos, no se trata de especies raras, sino de cultivos comunes que se han ensayado con éxito como posibles especies fitorremediadoras en el futuro como son la alfalfa, la mostaza, el tomate, la calabaza, el esparto, el sauce y el bambú. Las principales familias a las que pertenecen las plantas hiperacumuladoras se mencionan a continuación: *Asteraceae*, *Aceraceae*, *Poaceae*, *Brassicaceae*, *Betulaceae*, *Convolvulaceae*, *Cyperaceae*, *Fabaceae*, *Malvaceae* y *Oleaceae*. (De Oliveira y Vara, 1999).

El gran interés despertado por las plantas hiperacumuladoras, especialmente para destoxificar un ambiente contaminado, obliga también a resolver otros problemas relativos a otras disciplinas, se hace hincapié y se destaca que, cuando se potencie la investigación conjunta de diversos campos como botánica, fisiología vegetal, agronomía, química y genética, probablemente se inicie un brillante futuro para la fitorremediación. El entorno de las plantas hiperacumuladoras revela la necesidad de impulsar mayores conocimientos multidisciplinarios que aumenten la rentabilidad y eficacia de dichas plantas: sus aplicaciones son interesantes en muchas áreas, y particularmente importantes en la protección del ambiente (Lasat, 2002).

Las recientes investigaciones sobre la glomalina que es una glucoproteína que se encuentra en las hifas de los hongos micorrízicos (Wright y Upadhyaya, 1996), han contribuido de

manera considerable en la recuperación de suelos contaminados por metales pesados, ya que acuerdo con (González-Chávez *et al.*, 2002) la glomalina puede atrapar elementos potencialmente tóxicos. El glutatión es un antioxidante constituido por los aminoácidos cisteína, glicina y ácido glutámico que fijan los metales pesados, los ácidos orgánicos forman los complejos con los metales, un proceso de la desintoxicación del metal por lo que la glomalina, el glutatión y los ácidos orgánicos desempeñan un papel dominante en tolerancia del metal por las plantas. Las estrategias genéticas y las plantas transgénicas, las pruebas en la producción y el campo microbiológico traerán la importancia del campo de recuperación de suelos contaminados (Hall, 2002).

2.5 Microorganismos en la Remediación de Suelos

El suelo provee un hábitat para una gran variedad de organismos desde microbios hasta especies superiores como plantas. Las propiedades biológicas del suelo incluyen la actividad y diversidad de microorganismos del suelo. Las bacterias son los organismos más pequeños y numerosos en el suelo con más de 400 géneros y un estimado de 10^4 especies. En un gramo de peso seco de suelo rizosférico existe una gran cantidad de microorganismos de aproximadamente de 10^8 células bacterianas, 10^6 actinomicetos, y 10^5 de otros hongos (Karthikeyan *et al.*, 2003). La biomasa de microorganismos puede exceder 500 mg de carbón por kilogramo de suelo sin embargo, los microorganismos solo comprenden menos del 3% del carbono orgánico del suelo y ocupan sólo 0.001% del volumen total (Zhang *et al.*, 1997).

La densidad de las poblaciones microbianas varía significativamente verticalmente y horizontalmente en el suelo. La dispersión de la biomasa microbiana dentro de una muestra de suelo está relacionada con diversos factores como la distancia de la superficie del suelo debido a la difusión de oxígeno, lugar y disponibilidad de materiales orgánicos como fuentes potenciales de comida (Lovley, 2000).

El término “rizósfera” fue introducido por primera vez en 1904 para descubrir la interacción específica entre las bacterias y las raíces de las leguminosas. El término se ha refinado desde entonces para referirse a la región bajo la influencia inmediata de las raíces de plantas donde haya una abundante población microbiana (Karthikeyan *et al.*, 2003).

Dentro de la amplia diversidad microbiana, existen microorganismos resistentes y microorganismos tolerantes a metales. Los resistentes se caracterizan por poseer mecanismos de destoxificación codificados genéticamente, inducidos por la presencia del metal. En cambio, los tolerantes son indiferentes a la presencia o ausencia de metal. Tanto los microorganismos resistentes como tolerantes son de particular interés como captadores de metales en sitios contaminados, debido a que ambos pueden extraer los contaminantes. La resistencia o tolerancia experimentada por microorganismos es posible gracias a la acción de diferentes mecanismos. Estos fenómenos son: biosorción, bioacumulación, biomineralización, biotransformación y quimiosorción mediada por microorganismos (Lovley, 2000). Por lo mencionado, los microorganismos son considerados como reactores bioquímicos que conducen el proceso de biodegradación de contaminantes del suelo, esto nos da una idea clara de los numerosos estudios que demuestran que procesos bioquímicos se llevan a cabo con la ayuda de microorganismos (Lovley, 2000).

Se conoce muy poco acerca de la enorme diversidad de las poblaciones microbianas del suelo, sus propiedades, su comportamiento en el entorno del suelo, los microorganismos que habitan en la rizósfera interactúan con las raíces de las plantas formando asociaciones simbióticas útiles que hacen posible la supervivencia de las plantas bajo condiciones de estrés como deficiencia de nutrientes, alta concentración de metales pesados, sequedad del suelo, afectan la asociación de las raíces de las plantas por los hongos micorrízicos y *Rhizobium* (Khan, 1997).

Algunos metales pesados son esenciales para el ser humano porque suministran cofactores básicos para diversas funciones de proteínas y enzimas, pero en altas concentraciones los metales pesados pueden actuar en forma nociva bloqueando los grupos funcionales esenciales desplazando los iones modificando la conformación activa de las moléculas biológicas, por otra parte los metales pesados son tóxicos tanto para organismos superiores como para microorganismos. El efecto de los metales pesados a las comunidades microbianas han despertado la atención en la recuperación de suelos contaminados (Simonton *et al.*, 2000).

Los microorganismos como hongos y bacterias consumen y digieren sustancias orgánicas, de las cuales se alimentan y obtienen energía. Algunos microorganismos pueden digerir sustancias orgánicas tales como combustibles o solventes, que son peligrosas para los seres humanos, y descomponerlas en productos inocuos mediante un proceso llamado

biodegradación. Las sustancias naturales liberadas por las raíces de las plantas (azúcar, alcohol y ácidos) contienen carbono orgánico, del cual se alimentan los microorganismos del suelo, y los nutrimentos adicionales intensifican su actividad. Además, las plantas aflojan el suelo y transportan agua al lugar, facilitando así la biodegradación (Karthikeyan *et al.*, 2003).

De acuerdo con Guilder *et al.* (1999); Garbisu y Alkorta (1997) los metales pesados que se encuentran depositados en los suelos no son degradados biológicamente ni ocurren cambios en su estructura molecular, pero si son transformados de un estado de oxidación a otro. Como consecuencia de la alteración del estado de oxidación, los metales pueden convertirse en: más solubles en agua y pueden ser removidos por lixiviación, inherentemente menos tóxicos, menos solubles en agua de tal manera que se precipitan y se convierten en menos biodisponibles y finalmente pueden ser volatizados, esto sucede cuando se cambia el estado de oxidación de los metales pesados.

Los microorganismos del suelo desempeñan un papel importante en la movilización e inmovilización de cationes metálicos, siendo cada vez más aparente la reducción de los metales pesados por los microorganismos, además pueden ser manipulados para ayudar en la remediación de los sitios contaminados por metales pesados. Los microorganismos pueden recuperar suelos contaminados con metales pesados por transformación de valencia, precipitación extracelular química o volatilización (Lovley, 1993).

Los factores fisicoquímicos como pH, superficie o radio de acción, temperatura, salinidad, materia orgánica, disponibilidad de oxígeno, afectan el hábitat microbiano. Es fundamental el rol de los microorganismos en los ciclos biogeoquímicos de los metales y su utilización en los procesos de biorremediación de desechos sólidos y líquidos es esencial para el cuidado del medio ambiente (Karthikeyan *et al.*, 2003; Nies, 1999).

En la interacción suelo-planta destacan los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) esta simbiosis mutualística ejerce gran influencia en la nutrición y tolerancia de las plantas a estrés bióticos y abióticos (Siquiera y Saggin, 1995). Los HMA son los microorganismos del suelo más comunes y constituyen un importante componente funcional del sistema suelo-planta suceso presente en casi todos los hábitats y climas (Barea *et al.*, 1997), incluyendo suelos disturbados. Sin embargo los suelos degradados pueden sufrir cambios en la diversidad y abundancia en las poblaciones de los HMA. En este contexto, cuando las poblaciones de microorganismos degradativos como los hongos micorrízicos arbusculares

son inoculados en sitios contaminados, estos deben poseer enzimas que ayudan a transformar el estado de oxidación de los metales, haciéndolos menos tóxicos (Leyval *et al.*, 2000; Loth, 1996).

2.6 Bacterias

2.6.1 Historia

La primera bacteria fue observada por Anton van Leeuwenhoek en 1683 usando un microscopio de lente simple diseñado por él. El nombre de *bacteria* fue introducido más tarde, por Ehrenberg en 1828, derivado del griego βακτηριον significando *bastón pequeño*. Louis Pasteur (1822-1895) y Robert Koch (1843-1910) describieron el papel de la bacteria como causa de enfermedades.

2.6.2 Estructura

Las bacterias son organismos microscópicos y relativamente sencillos. Carecen de núcleo y de los orgánulos de las células más complejas o eucariotas; sin embargo, al igual que las células de las plantas, la mayoría posee una pared celular a base de carbohidratos. Algunas presentan cápsula y otras son capaces de evolucionar a esporas, formas viables capaces de resistir condiciones extremas. Sus dimensiones son muy reducidas, unas 2 micras de ancho por 7-8 de longitud en la de forma cilíndrica de tamaño medio; aunque son muy frecuentes las especies de 0.5-1.5 micras. Aún careciendo de núcleo, presentan estructuras elementales (un único cromosoma bacteriano) que realizan las funciones propias de este. El cromosoma bacteriano está situado en la zona media o nucleoide, y está formado por una única gran molécula de ADN, sin embargo puede presentarse como pequeñas moléculas de ADN o plásmidos. La pared celular está compuesta generalmente por hidratos de carbono, entre los que destaca la mureína un polisacárido complejo, lípidos y aminoácidos, esta pared se puede teñir de forma selectiva con la tinción de Gram, lo cual da lugar a la división de dos grupos de bacterias, las grampositivas y las gramnegativas, según se tiñan de azul violeta o rosa, respectivamente. En el citoplasma de las bacterias no se aprecian orgánulos ni formaciones protoplasmáticas. La forma de las bacterias no es constante y, a menudo, una misma especie adopta distintos tipos morfológicos, es lo que se conoce como pleomorfismo. Existen tres tipos fundamentales de bacterias: los cocos o formas esféricas, en forma de bastoncillos los

bacilos y formas helicoidales (espiroquetas, espirilos y vibrios). Entre las formaciones propias de las células bacterianas destacan los flagelos y las cápsulas. En condiciones apropiadas una bacterias puede dividirse cada 30 minutos, y en alrededor de 11 horas su número puede ascender a unos 5,000 millones aproximadamente.

2.6.3 Nutrición y crecimiento bacteriano

Las bacterias se pueden alimentar de acuerdo a su fuente de energía utilizada: las bacterias que utilizan la luz son fotótrofas y las que utilizan los procesos de oxirreducción son quimiótrofas. Las bacterias pueden utilizar un sustrato mineral (litótrofas) u orgánico (organótrofas). Las bacterias patógenas que viven a expensas de la materia orgánica son quimioorganótrofas. La energía en un sustrato orgánico es liberada en la oxidación del mismo mediante sucesivas deshidrogenaciones. El aceptor final del hidrógeno puede ser el oxígeno: se trata entonces de una respiración. Cuando el aceptor de hidrógeno es una sustancia orgánica (fermentación) o una sustancia inorgánica, estamos frente a una anaerobiosis. Además de los elementos indispensables para la síntesis de sus constituyentes y de una fuente de energía, ciertas bacterias precisan de unas sustancias específicas: los factores de crecimiento. Son éstos unos elementos indispensables para el crecimiento de un organismo incapaz de llevar a cabo su síntesis. Las bacterias que precisan de factores de crecimiento se llaman "autótrofas". Las que pueden sintetizar todos sus metabolitos se llaman "protótrofas". Ciertos factores son específicos, tal como la nicotinamida (vitamina B, en *Proteus*. Existen unos niveles en la exigencia de las bacterias. Según André Lwoff, se pueden distinguir verdaderos factores de crecimiento, absolutamente indispensables, factores de partida, necesarios al principio del crecimiento y factores estimulantes. El crecimiento bacteriano es proporcional a la concentración de los factores de crecimiento. Así, las vitaminas, que constituyen factores de crecimiento para ciertas bacterias, pueden ser dosificadas por métodos microbiológicos (B12 y *Lactobacillus lactis* Doraren).

2.7 Clasificación de las bacterias

La identificación de las bacterias es tanto más precisa cuanto mayor es el número de criterios utilizados. Esta identificación se realiza a base de modelos, agrupados en familias y especies en la clasificación bacteriológica. Las bacterias se reúnen en 11 órdenes: Las eubacteriales, esféricas o bacilares, que comprenden casi todas las bacterias patógenas y las formas

fotótrofas. Las pseudomonadales, orden dividido en 10 familias entre las que cabe citar las *Pseudomonae* y las *Spirillaceae*. Las espiroquetales (treponemas, leptospiras). Los actinomicetales (micobacterias, actinomicetes). Las rickettsiales. Las micoplasmiales. Las clamidobacteriales. Las hifomicrobiales. Las beggiatoales. Las cariofanales. Las mixobacteriales.

2.7.1 Características generales de bacterias del género *Pseudomonas*

Las bacterias del grupo al que pertenecen *Pseudomonas* están constituido por microorganismos Gram-negativos, siempre móviles con flagelación polar. Se encuentran normalmente en el suelo, aunque pueden ser patógenos oportunistas en animales (*P. aeruginosa*) y patógenos de plantas (*P. syringae*). Su metabolismo es siempre respiratorio, o bien aerobio (la mayoría usa como aceptor de electrones O_2) o anaerobio (algunos usan NO^-). Presentan una versatilidad metabólica muy grande que se traduce en su capacidad de utilizar como fuente de carbono substratos muy variados (hay especies, como *P. cepacia*, que pueden utilizar como nutrientes más de 100 compuestos químicos diferentes). Por otra parte, hay algunos individuos del grupo que son quimiolitotrofos usando H_2 o CO como donadores de electrones. El metabolismo central de azúcares en este grupo se desarrolla por la vía de Etner-Doudoroff, y disponen de un ciclo de Ácidos Tricarboxílicos normal.

Algunas *Pseudomonas* (p.ej. *P. aeruginosa*) son capaces de llevar a cabo procesos de desnitrificación (NO_3^- , NO_2^- , N_2) con lo que se empobrecen los suelos de nitrógeno utilizable desde el punto de vista agrícola. Este proceso de reducción del nitrógeno (que actúa como aceptor de electrones en un proceso de respiración anaerobia) se denomina reducción disimilatoria del nitrógeno. La versatilidad metabólica del grupo se debe a la presencia de un gran número de plásmidos que contienen operones inducibles para la síntesis de enzimas específicas que permitan catabolizar los compuestos presentes en el medio. Esto confiere una importancia grande a las bacterias del género *Pseudomonas* como digestores aerobios de materiales animales y vegetales, lo que contribuye al reciclaje biológico de materia orgánica. Algunas especies bacterianas de este grupo producen pigmentos fluorescentes de colores amarillo-verdosos fácilmente solubles en agua. Estos pigmentos actúan como sideróforos: moléculas cuya función es capturar el hierro del medio necesario para el metabolismo del microorganismo.

El grupo de bacterias relacionadas con el género *Pseudomonas* es muy amplio y comprende especies patógenas para humanos *P. cepacia* (patógeno oportunista que puede causar infecciones muy serias con alta tasa de mortalidad en pacientes comprometidos, especialmente han aumentado los datos de infecciones producidas en los pulmones de pacientes con fibrosis cística) y *P. aeruginosa*. Hay especies patógenas vegetales como *P. solanacearum* que produce marchitamiento, *P. syringae* causante de manchas cloróticas en ciertas plantas y *P. marginalis* causante de pudriciones blandas en las raíces de las plantas.

Por otra parte, existen varios géneros bacterianos estrechamente relacionados con el de *Pseudomonas* que también tienen una importancia especial: el género *Xanthomonas* comprende varias especies patógenas vegetales que producen necrosis del follaje. El género *Zooglea* comprende varias especies capaces de producir agregados celulares de gran tamaño que intervienen de forma importante en la digestión de las aguas orgánicas de ciudades e industrias, y los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*.

2.7.2 Importancia de las *Pseudomonas* en la agricultura

La gran versatilidad metabólica de las bacterias del género *Pseudomonas* las han hecho candidatas para el tratamiento de contaminaciones ambientales producidas por la acumulación de metales pesados o por la acumulación de compuestos xenobióticos. Varias especies de *Pseudomonas* contienen plásmidos en los que se encuentran codificadas enzimas capaces de degradar, al menos parcialmente, compuestos orgánicos derivados del petróleo o compuestos organoclorados u organofosfatados. Estas enzimas suelen ser inducibles y la selección de las cepas adecuadas puede permitir reducir los niveles de contaminación por estos compuestos xenobióticos. La biodegradación de hidrocarburos y de otros compuestos orgánicos es realizada con eficiencia variable dependiendo de la estructura del hidrocarburo (lineal o ramificado, alifático o aromático) y de la presencia de átomos sustituyentes. Algo similar ocurre con la biodegradación de compuestos insecticidas, herbicidas y detergentes y emulgentes. Por otra parte, el tratamiento de la contaminación originada por la acumulación de metales pesados también es posible mediante la utilización de bacterias de este género. El efecto tóxico de los metales pesados suele estar asociado a la presencia de formas ionizadas (cationes) de los metales en cuestión. Ciertas bacterias de este género presentan enzimas capaces de reducir los cationes metálicos a las formas neutras que son mucho menos tóxicas. Los operones que controlan la producción de estos enzimas reductores suelen ser inducibles

por la presencia del metal pesado. Otra forma de intervención en la eliminación de metales pesados por bacterias de este grupo la desarrollan las bacterias del género *Zooglea* que son capaces de acumular los metales pesados y formar agregados de gran tamaño que precipitan mediante floculación.

2.7.3 *Pseudomonas* como biocontrol en la rizosfera

Durante la década de los 60, comenzaron a analizarse las propiedades de distintos suelos que suprimían determinadas enfermedades en plantas. La consecuente reducción de los síntomas de estas enfermedades era debida, entre otras causas, a la presencia de microorganismos con características particulares. Se comenzaron a describir entonces, una gran variedad de microorganismos no patógenos que interferían en la biología de otros microorganismos patógenos de plantas, siendo así susceptibles de ser usados como elementos biológicos de control de la enfermedad en cuestión, denominándose agentes de biocontrol. Durante los últimos 20 años, han sido numerosos los trabajos que han profundizado sobre el efecto de *P. fluorescentes* que pueden promover efectos benéficos sobre el crecimiento de las plantas, independientemente de la presencia del patógeno. De esta manera se han descrito distintas especies de *Pseudomonas* que se han mostrado muy eficaces a la hora de controlar enfermedades radiculares producidas por hongos en el suelo o en cultivo hidropónico, e incluso controlando otras enfermedades producidas por otras bacterias.

Algunas cepas de *Pseudomonas* colonizan de manera efectiva los órganos subterráneos de las plantas y promueven el crecimiento de la planta de manera consistente, reduciendo también la incidencia de enfermedades causadas, sobre todo, por un amplio rango de hongos patógenos del suelo. Está generalmente aceptado que uno de los mecanismos más importantes, por el que las *Pseudomonas* fluorescentes promueven el crecimiento vegetal, es mediante la supresión de microorganismos patógenos más o menos importantes. También se ha sugerido que las *Pseudomonas* pueden manifestar sus efectos promotores del crecimiento indirectamente, estimulando la acción beneficiosa de otros microorganismos asociados a las raíces, como las micorrizas. Cuando la estimulación del crecimiento vegetal se produce en ausencia de otros microorganismos, ésta se ha atribuido al incremento de la disponibilidad de nutrientes minerales, como el fosfato o el nitrógeno, debido a la producción de fitohormonas estimuladoras del crecimiento vegetal o a la degradación de precursores del etileno en la raíz por parte de estas bacterias.

Existen diferentes mecanismos posibles por los que las *Pseudomonas* del suelo suprimen la enfermedad. Los mecanismos propuestos más importantes incluyen la inhibición de los patógenos por compuestos antimicrobianos, la competencia por el hierro, la competencia por sitios de colonización y por los nutrientes exudados por la raíz, así como la inducción de mecanismos de defensa en las plantas. La inhibición del patógeno por la producción de metabolitos antimicrobianos o queladores de hierro son los que están considerados como los principales mecanismos de biocontrol. Otros factores importantes son la degradación de factores de virulencia del patógeno, como toxinas, por parte de las *Pseudomonas*, la inactivación de factores de germinación del patógeno, presentes en los exudados radicales, y la producción de enzimas extracelulares, como quitinasas, laminarasas y glucanasas, que pueden degradar las paredes de las células fúngicas. La colonización de la raíz es un prerrequisito para el funcionamiento de cualquier otro mecanismo de biocontrol exhibidos por las *Pseudomonas*. Una colonización efectiva está ligada directamente con una competencia efectiva con otros microorganismos por la colonización de nichos y por los nutrientes disponibles procedentes de los exudados radicales. Para exhibir efectos supresivos sobre una enfermedad en una planta, un agente biocontrol necesita distribuirse por toda la raíz, multiplicarse y sobrevivir durante varias semanas en competencia con otros microorganismos procedentes de la microbiota nativa. Además de la microbiota nativa, otros factores pueden influir en la colonización de la raíz. i) propiedades de su superficie celular, producción de sideróforos o antibióticos, pilis, flagelos o quimiotaxis por los exudados radicales; ii) la especie, cultivar y fase del crecimiento de la planta hospedadora; y iii) las características físicas y químicas del suelo, como humedad, temperatura, pH, textura y nutrientes minerales. Particularmente interesantes son los trabajos recientes en los que se ha puesto de manifiesto que algunas que están íntimamente asociadas con la raíz pueden inducir los mecanismos de resistencia sistémica contra patógenos fúngicos o bacterianos, provocando la protección de toda la planta frente a la enfermedad, con la consecuente reducción en el uso de productos fitosanitarios. Es evidente que todos estos mecanismos son complementarios. La diversidad de compuestos secretados por las *pseudomonas*. Es la principal razón de que la supresión esté considerada como el producto de varios mecanismos que varían de cepa.

2.7.4 Utilización de *Pseudomonas*

Las *Pseudomonas* se han utilizado en el control biológico de bacterias y hongos causantes de enfermedades de la raíz de plantas de uso agrícola. Un estudio muestra que los sideróforos

producidos por *Pseudomonas* presentan inhibición de otros cultivos microbianos, pero no presentan ningún efecto sobre tejidos dañados de *Phaseolus vulgaris*. (Martinez *et al.*, 1990). Otro experimento mostró que las *Pseudomonas* han sido utilizadas para promover la captación de fierro y cobre vía sideróforos y la translocación de estos metales de raíz a tallo en plantas de alfalfa lo cual puede ser utilizado en prácticas de biorremediación. (Carrillo *et al.*, 2003). Otro estudio fue la inoculación de semillas de tomates con *Pseudomonas* las cuales presentaron mayor altura, mayor producción e iniciaron la floración 6 días antes en comparación con semillas no inoculadas con las bacterias. (Carrillo *et al.*, 2000). Por lo descrito anteriormente las bacterias *P. fluorescens* pueden ser utilizadas en la remediación de suelos contaminados con metales pesados como cobre y fierro y aun más en asociación con alguna planta hiperacumuladora como es el caso de la alfalfa.

2.8 Alfalfa

2.8.1 Origen

La alfalfa tiene su área de origen en Asia menor y sur del Cáucaso, abarcando países como Turquía, Irak, Irán, Siria, Afganistán y Pakistán. Los persas introdujeron la alfalfa en Grecia y de ahí pasó a Italia en el siglo IV a. C. La gran difusión de su cultivo fue llevada a cabo por los árabes a través del norte de África, llegando a España donde se extendió a toda Europa.

2.8.2 Botánica

La alfalfa pertenece a la familia de las leguminosas, cuyo nombre científico es *Medicago sativa*. Se trata de una planta perenne, vivaz y de porte erecto. La raíz principal es pivotante, robusta y muy desarrollada (hasta 5 m. de longitud) con numerosas raíces secundarias. Posee una corona que sale del terreno, de la cual emergen brotes que dan lugar a los tallos. Los tallos son delgados y erectos para soportar el peso de las hojas y de las inflorescencias, además son muy consistentes, por tanto es una planta muy adecuada para la siega. Las hojas son trifoliadas, aunque las primeras hojas verdaderas son unifoliadas. Los márgenes son lisos y con los bordes superiores ligeramente dentados. La flor característica de esta familia es la de la subfamilia *Papilionoidea*. Son de color azul o púrpura, con inflorescencias en racimos que nacen en las axilas de las hojas. El fruto es una legumbre indehisciente sin espinas que contiene entre 2 y 6 semillas amarillentas, arriñonadas y de 1.5 a 2.5 mm. de longitud.

2.8.3 Importancia Económica

Se trata de un cultivo muy extendido en los países de clima templado. La ganadería intensiva es la que ha demandado de forma regular los alimentos que ha tenido que proveer la industria, dando lugar al cultivo de la alfalfa, cuya finalidad es abastecer a la industria. La importancia del cultivo de la alfalfa va desde su interés como fuente natural de proteínas, fibra, vitaminas y minerales; así como su contribución paisajística y su utilidad como cultivo conservacionista de la fauna. Además de la importante reducción energética que supone la fijación simbiótica del nitrógeno para el propio cultivo y para los siguientes en las rotaciones de las que forma parte. Por ser una especie perenne, su cultivo aporta elementos de interés como limitador y reductor de la erosión y de ciertas plagas y enfermedades de los cultivos que le siguen en la rotación.

2.9 Requerimientos edafoclimáticos de la planta de alfalfa.

2.9.1 Radiación solar

Es un factor muy importante que influye positivamente en el cultivo de la alfalfa, pues el número de horas de radiación solar aumenta a medida que disminuye la latitud de la región. La radiación solar favorece la técnica del presecado en campo en las regiones más cercanas al ecuador, y dificulta el secado en las regiones más hacia el norte.

2.9.2 Temperatura

La semilla germina a temperaturas de 2-3° C, siempre que las demás condiciones ambientales lo permitan. A medida que se incrementa la temperatura la germinación es más rápida hasta alcanzar un óptimo a los 28-30° C. Temperaturas superiores a 38° C resultan letales para las plántulas. Al comenzar el invierno detienen su crecimiento hasta la llegada de la primavera cuando comienzan a rebrotar. Existen variedades de alfalfa que toleran temperaturas muy bajas (-10° C). La temperatura media anual para la producción forrajera está en torno a los 15° C. Siendo el rango óptimo de temperaturas, según las variedades de 18-28° C.

2.9.3 pH

El factor limitante en el cultivo de la alfalfa es la acidez, excepto en la germinación, pudiendo germinar hasta en pH de 4. El pH óptimo del cultivo es de 7.2, recurriendo a encalados siempre que el pH baje de 6.8, además los encalados contribuyen a incrementar la cantidad de iones de calcio en el suelo disponibles para la planta y reducir la absorción de aluminio y manganeso que son tóxicos para la alfalfa. Existe una relación directa entre la formación de nódulos y el efecto del pH sobre la alfalfa. La bacteria nodulante de la alfalfa es *Rhizobium meliloti*, esta especie es neutrófila y deja de reproducirse por debajo de pH 5. Por tanto si falla la asimilación de nitrógeno la alfalfa lo acusa.

2.9.4 Salinidad

La alfalfa es muy sensible a la salinidad, cuyos síntomas comienzan con la palidez de algunos tejidos, la disminución del tamaño de las hojas y finalmente la parada vegetativa con el consiguiente achaparrado. El incremento de la salinidad induce desequilibrios entre la raíz y la parte aérea.

2.9.5 Tipo de suelos

La alfalfa requiere suelos profundos y bien drenados, aunque se cultiva en una amplia variabilidad de suelos. Los suelos con menos de 60 cm. de profundidad no son aconsejables para la alfalfa.

2.10. Descripción del tipo de suelo predio del Colegio de Posgraduados Campus Montecillo.

Dado que el estudio se realizó en los campos experimentales del Colegio de Posgraduados a continuación se describen las características de los nueve tipos de suelos presentes. Estos suelos son profundos, de texturas arenosas con contenidos considerables de materiales orgánicos en los horizontes superficiales y estructura favorable para el desarrollo de raíces de árboles. Estos suelos tienen una temperatura media anual de 14.8 °C y reciben precipitación pluvial de 555 mm anuales.

Las localidades donde se tomaron las muestras de raíz y suelo se encuentran distribuidas de la siguiente manera: localidad 1, 2 y 3 se encuentran al noreste, 4 al norte, 5 y 6 oeste, 7 y 8 sureste y 9 al este (Figura 2). El estudio fue realizado en 1999 y a continuación se describen sus características morfológicas de las 9 localidades:

Localidad 1. Son suelos profundos, con contenidos de carbono orgánico de más de 1.0% en los primeros 120 cm, su textura es media, con pH de 8.0 y conductividad eléctrica (CE) menores que 2.0 dSm-1. Presenta estructura granular en el horizonte superficial y de bloques subangulares en los horizontes subyacentes. De acuerdo con la WRB (1998), se clasifican como "*Feozems háplicos*".

Localidad 2. Son suelos profundos, con contenidos de carbono orgánico de más de 0.6% hasta los 70 cm, textura arcilla, pH cercano a 8.5, una CE de 2.7 dSm-1. en la superficie y de menos de 2.0 en el subsuelo. Presenta estructura granular en el horizonte superficial y de bloques angulares en los horizontes subyacentes. De acuerdo con la WRB (1998), se clasifican como "*Vertisoles dístricos*".

Localidad 3. Son suelos profundos, con contenidos de carbono orgánico de más de 1.0% hasta los 100 cm, textura franco, pH de 8.0, una CE de menos de 2 dSm-1. Presenta estructura granular en el horizonte superficial y de bloques subangulares en los horizontes subyacentes, presenta altos contenidos de carbonatos entre los 40 y 100 cm. De acuerdo con la WRB (1998), se clasifican como "*Feozems calcáricos*".

Localidad 4. Son suelos profundos, con contenidos de carbono orgánico de más de 1% hasta los 100 cm, textura media en la capa superficial y fina en el subsuelo, pH de 7.2 a 8.5, una CE de 2.5 dSm-1 en la superficie y de menos de 2.0 en el subsuelo. Presenta estructura granular en el horizonte superficial y de bloques subangulares en los horizontes subyacentes. Presentan acumulación de carbonatos a partir de los 50 cm. De acuerdo con la WRB (1998), se clasifican como "*Fluvisoles mólicos*".

Localidad 5. Estos suelos se formaron a partir de depósitos lacustres y fluviales, su contenido de carbono orgánico (CO) tiene un comportamiento irregular, presentan una capa negra de ceniza volcánica subyaciendo a un hidrogel compuesto en su mayoría por sílice amorfo, tiene un pH de 8 en la superficie y de más que 10 en el subsuelo; su CE es de 2.3 dSm-1 en la

superficie y llega a superar los 20 dSm-1 en los horizontes inferiores. Presenta estructura granular en la superficie y prismas de 20 cm en la parte baja del perfil. De acuerdo con la WRB (1998), se clasifican como “*Solonchacks mólico-sálicos*”.

Localidad 6. Al igual que en sitio anterior (5), estos suelos se formaron a partir de depósitos lacustres y fluviales, su contenido de CO es irregular; presentan una capa negra de ceniza volcánica suprayaciendo a un hidrogel compuesto en su mayoría por sílice amorfo, tienen un pH de 8 en la superficie y más que 10 en el subsuelo; su CE es de 2.8 dSm-1 en la superficie y llega a superar los 24 dSm-1 en los horizontes inferiores. Presenta estructura granular en la superficie y prismas de 20 cm en la parte inferior del perfil. De acuerdo con la WRB (1998), se clasifican como “*Solonchacks mólicos-sálicos*”.

Localidad 7. Estos suelos se formaron a partir de depósitos fluviales, su contenido de CO es de 5% en los primeros 25 cm y disminuye conforme aumenta la profundidad; tienen un pH cercano a 8.0; su CE es menor que 2.0 dSm-1 en todo el perfil. Presenta estructura granular en la superficie y de grano simple en la parte baja del perfil. De acuerdo con la WRB (1998), se clasifican como “*Arenosoles mólico-háplicos*”.

Localidad 8. Son suelos profundos, con contenidos de carbono orgánico superiores a 1% hasta los 50 cm y se comporta de manera irregular; su textura es media hasta los 35 cm y fina en la parte baja del perfil; tienen pH cercano a 8.0, y su CE es inferior a 2 dSm-1. Presenta estructura granular en los primeros 30 cm y de bloques angulares en los horizontes subyacentes. De acuerdo con la WRB (1998), se clasifican como “*Fluvisoles mólicos*”

Localidad 9. Son suelos profundos, con contenidos de carbono orgánico de más de 0.6% hasta los 90 cm, con un comportamiento irregular; su textura es gruesa en la mayor parte del perfil; tienen un pH cercano a 8.0, y una CE menor que 2 dSm-1. Presentan estructura granular en el horizonte superficial y de bloques subangulares en los horizontes subyacentes. De acuerdo con la WRB (1998), se clasifican como “*Fluvisoles mólico-arénicos*” (Ortiz *et al.*2005).

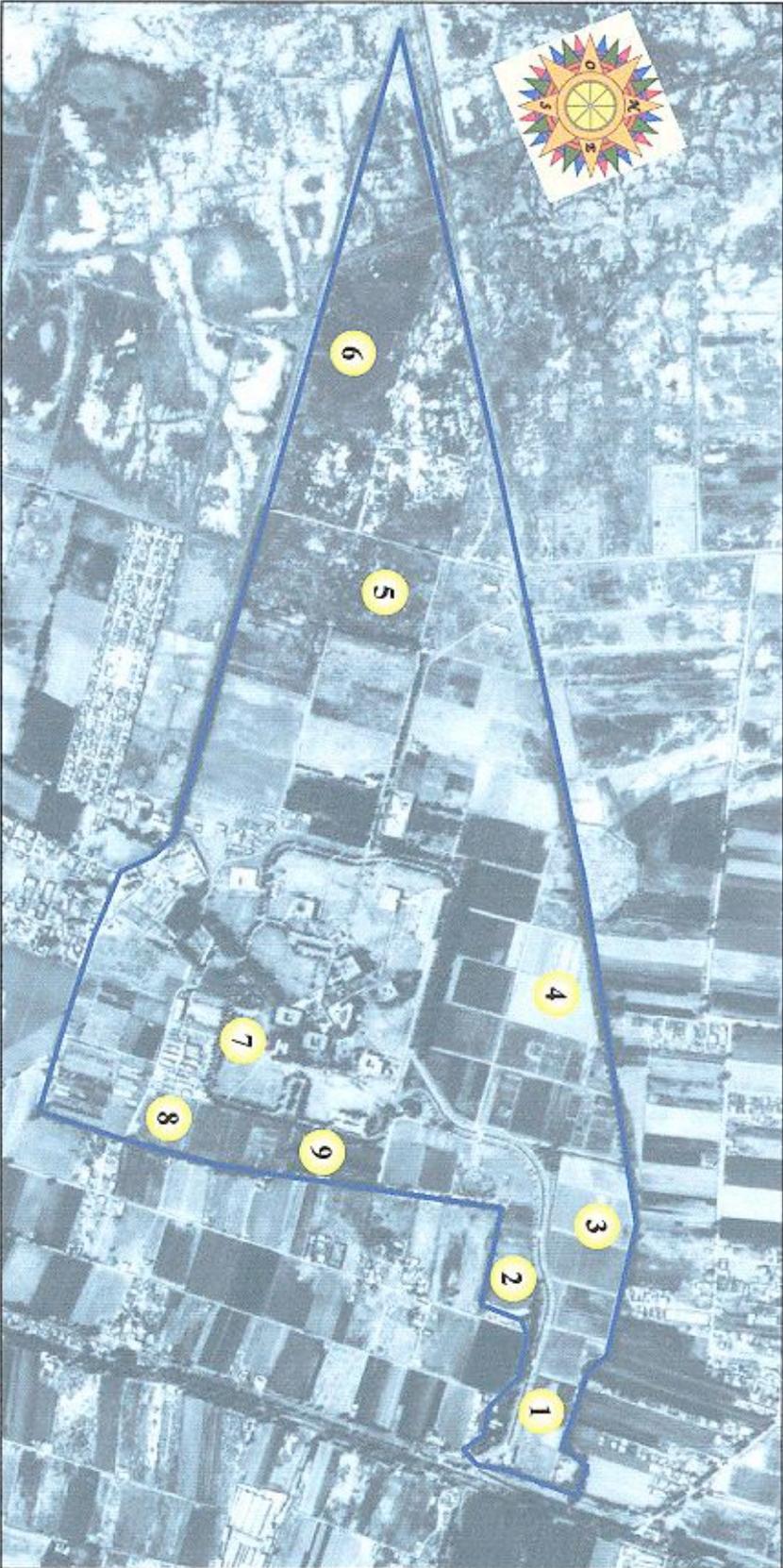


Figura 2. Sitios de colecta de muestras de suelo de en el predio del Colegio de Posgraduados, campus Montecillo, tomada de <http://www.colpos.mx/museocp/Soil-Museum1.pps>.

2.11 Conclusión de la revisión bibliográfica

En resumen se puede decir que el efecto ocasionado por metales pesados derivados de actividades antropogénicas como industrias mineras, aguas residuales, refinerías y manufactura de una gran variedad de productos como baterías, componentes electrónicos, aleaciones de metales, plaguicidas, fertilizantes, en la actualidad representan un gran problema denominado contaminación, el cual con el paso del tiempo ha venido dañando nuestros recursos naturales como: agua, aire, suelo, etc. En lo que respecta a suelo se han dañado zonas que eran utilizadas para la agricultura, el cual representa un grave problema para la alimentación. Con el paso del tiempo se han utilizado diversos métodos tanto físicos como químicos para tratar de recuperar los suelos contaminados, cabe señalar que son costosos y a veces se pierde la funcionalidad de la tierra. Otras alternativas utilizadas son eficaces y a un menor costo, tal es el caso de la biorremediación y fitorremediación. Es por eso que mediante este trabajo se pretende utilizar estas técnicas para proporcionar una herramienta para el tratamiento de contaminación de materiales pesados (Cu).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

La localización geográfica del Colegio de Posgraduados está ubicado en el Km 36.5 de la carretera México-Texcoco a: 19° 27' 30'' LN y 98° 54' 14'' LW, a una elevación de 2241 msnm.

3.1 Recolección de muestras de suelo y de raíces

Muestras de suelo y raíz fueron recolectadas en nueve sitios dentro de los campos experimentales del Colegio de Posgraduados. En cada sitio se tomaron cuatro muestras, de acuerdo con la Figura 2, las cuales consistieron en dos muestras de suelo tomadas a 50 m al norte y 50 m al sur de un punto de referencia. Muestras de aproximadamente 100 g fueron tomados a una profundidad de 30 cm. Las otras dos muestras fueron de las raíces de las plantas presentes en cada sitio. Una tomada del lado oriente y la otra del lado poniente. De cada planta fueron tomadas varias muestras de raíz. Una vez recolectadas las muestras fueron trasladadas de inmediato en bolsas de plástico al laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Recursos Genéticos y Productividad.

3.1.1 Preparación de muestras del suelo

De la muestra de suelo de cada sitio se pesaron 38 g y se depositaron en un vaso de precipitado de 100 mL, posteriormente se agregaron 50 mL, de agua destilada esterilizada, después se agitó durante 5 min, la muestra se dejó reposar durante 40 min. Una vez cumplido el tiempo de reposo se determinó el pH con un potenciómetro Sargent-Welch modelo LS. Posteriormente bajo condiciones asépticas en campana de flujo laminar Veco, del sobrenadante se tomaron muestras alícuotas de 10 μ L las cuales se depositaron en cajas de Petri de cristal (90 mm de diámetro por 20 mm de espesor) que contenían 25 mL de medio sólido B de King. Dos cajas Petri de cristal (90 mm de diámetro por 20 mm) fueron estriadas por cada localidad. Una vez estriadas las células bacterianas las cajas de Petri fueron colocadas en una incubadora Blue M mantenida a la temperatura de 26 °C +/- 1, para el desarrollo de los cultivos. A las 24 h el crecimiento bacteriano fue observado para definir: morfología de las colonias, color, aspecto y pigmentación. A partir de una colonia se llevó a cabo un reaislamiento en el mismo medio de cultivo fresco mediante estriado para obtener los nuevos reaislamientos. Una vez obtenidas las cepas puras, se procedió a

establecer los cultivos en tubos de agar inclinado con medio B de King. Para establecer el banco de aislamientos.

3.1.2 Preparación de muestras de raíz

Bajo condiciones asépticas en la campana de flujo laminar Veco, las muestras de raíz de cada planta, primeramente fueron lavadas con 40 mL de agua destilada estéril, posteriormente a partir del ápice se obtuvo un segmento de aproximadamente un centímetro de raíz. Los segmentos de raíz fueron divididos en dos lotes. Un lote fue colocado en cajas de Petri de cristal (90 mm de diámetro por 20 mm) previamente esterilizadas en autoclave durante 15 min (121 °C, 1.02 kg/cm²). De este lote con la ayuda de un bisturí previamente flameado la muestra de raíz fue macerada del tal forma que del contenido tisular quedara presente para ser estriado en cajas de Petri de cristal (90 mm de diámetro por 20 mm) que contenían medio sólido B de King. El otro lote de segmentos se colocaron intactos sobre la superficie del medio sólido sin sufrir ninguna modificación. Una vez realizados los procedimientos anteriores se procedió a incubarlos en la incubadora Blue M, a 26 °C, durante 24 h o lo necesario para que se desarrollaran los microorganismos. A partir de estos cultivos mediante dos reaislamientos se logró la obtención de cepas puras, las cuales fueron preservadas en tubos de ensayo con rosca con agar inclinado (3 mL) de medio B de King.

3.2 Caracterización de los aislamientos bacterianos

Los aislamientos bacterianos fueron identificados de acuerdo a su origen localidad y suelo o raíz. Cada aislamiento fue caracterizado de acuerdo a: velocidad de crecimiento, tamaño, producción de pigmentos y fluorescencia. En segundo termino mediante las pruebas de hipersensibilidad y pudrición de papa y finalmente por el efecto que causan en la germinación de semillas de alfalfa.

De acuerdo a la velocidad de crecimiento de las colonias y aspecto, se clasificaron en 3 categorías: crecimiento rápido (R), o cultivos que crecían en menos de 24 h, intermedio (I), después de 24 h y lento (L), las que tardaron más de 48 h en crecer. En cuanto a tamaño de colonia se clasificaron en aislamientos que generaban colonias grandes (G), medianas (M) y pequeñas (P). En relación a la clasificación por la coloración de las colonias en el medio

sólido B de King se clasificaron en cultivos que presentaban colonias de color blanco (N), ámbar (A) y verdes (V).

La fluorescencia de los cultivos en el medio sólido B de King se determinó con la ayuda de una lámpara de luz ultravioleta Desaga Uvis (366 nm), observando y determinando la luminiscencia producida por cada uno de los aislamientos bacterianos.

La prueba de hipersensibilidad se realizó en hojas de plantas de tabaco (*Nicotiana*). De cada uno de los aislamientos se preparó una suspensión bacteriana en agua destilada estéril. Las suspensiones bacterianas tenían aproximadamente de 1×10^8 ufc (0.1 absorbencia a 660 nm). Una vez preparada la suspensión bacteriana y, con la ayuda de una jeringa hipodérmica de 5 mL, fue inyectada por el envés de la hoja en el espacio intracelular. Los resultados se evaluaron después de las 8 y 16 h de la infiltración.

3.2.1 Prueba de pudrición de papa.

La caracterización de patogenicidad de cada aislamiento se realizó con tubérculos de papa frescos, en buenas condiciones fitosanitarias. Primero se lava con jabón la superficie de la papa, se cortan rodajas de aproximadamente un centímetro de espesor en forma longitudinal. Posteriormente las rodajas de papa se colocaron en cajas de Petri de plástico sobre papel (toalla interdoblada, MARQUIS Georgia Pacific) humedecido con 3 mL de agua destilada estéril. A continuación, con una aguja de disección estéril se tomó el inóculo bacteriano de cada una de las cultivos para hacer una estría en la parte central de la rodaja de papa, pero sin tocar los bordes. Esta operación se realizó bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar marca Veco. Una vez inoculadas las rodajas de papa se colocaron en la incubadora Blue M mantenida a 26 °C de 24 a 48 h. Al término de este tiempo se determinó si las bacterias pudren la papa o no.

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

En la campana de flujo laminar Veco, bajo condiciones asépticas, se toman los tubos que contienen los aislamientos bacterianos que presentaron fluorescencia, los cuales están en medio B de King inclinado. De cada tubo se toman células con la ayuda de un asa

microbiológica y se estría en cajas de Petri de cristal (90 mm de diámetro por 20 mm) que contienen medio sólido B de King. A continuación las cajas de Petri son incubadas durante 24 – 48 h a 26° C +/-1. Posteriormente con ayuda de un asa microbiológica, de las cajas de Petri previamente sembradas con los aislamientos bacterianos de interés se toman células de una colonia para inocular tubos de vidrio con tapón de rosca que contienen 3 mL de medio B de King líquido. Los tubos con cultivo se dejan crecer durante 24 h en un agitador a 60 oscilaciones por minuto a 26 - 28° C.

Al término de este tiempo en la campana de flujo laminar, bajo condiciones asépticas se toman 50 µL de cada uno de los cultivos de los aislamientos bacterianos seleccionados y se pasan a tubos de ensayo con tapa metálica los cuales contienen 3.5 mL de medio mínimo (RM) y otra serie en 3.5 mL, de medio mínimo carente de hierro (RM-Fe). Una vez inoculados los medios mencionados se dejan en agitación durante 24 a 48 h a la temperatura de 26 a 28 °C, transcurrido el tiempo de incubación de los tubos con los medios correspondientes con la ayuda de una micropipeta se toman 600 µL y se depositan en tubos Ependorf con capacidad de 2 mL. A continuación las muestras se centrifugan en una centrifugadora clínica (Damon / IEC Division), durante 6 min a 2,400 veces la gravedad. Del sobrenadante se toman 100 µL y se depositan en tubos de ensayo que contienen 2 mL, de agua destilada y se agitan. Posteriormente se determina la absorbencia en un espectrofotómetro de doble haz de luz (Baush & Lomb Spectronic 2000) a 400 y 405 nm.

3.2.3 Determinación de las cinéticas de crecimiento de aislamientos fluorescentes.

En la campana de flujo laminar Veco, bajo condiciones asépticas, se toman los tubos que contienen los aislamientos bacterianos que presentaron fluorescencia, los cuales están en medio B de King inclinado. De cada tubo se toman células con la ayuda de un asa microbiológica y se estría en cajas de Petri de cristal (90 mm de diámetro por 20 mm) que contienen medio sólido B de King. A continuación las cajas de Petri son incubadas durante 24 – 48 h a 26° C +/-1. Posteriormente con ayuda de un asa microbiológica, de las cajas de Petri previamente sembradas con los aislamientos bacterianos de interés se toman células de una colonia para inocular tubos de vidrio con tapón de rosca que contienen 3 mL de medio B de King líquido. Los tubos con cultivo se dejan crecer durante 24 h en un agitador a 60 oscilaciones por minuto a 26 - 28° C.

Al término de este tiempo en la campana de flujo laminar, bajo condiciones asépticas se toman 150 μ L con una micropipeta Quick pette (Helena Laboratorios) para inocular 25 mL de medio B de King líquido en matraces erlenmeyer con tubo lateral de 125 mL de capacidad. Los cultivos se incubaron en un agitador a 60 oscilaciones por minuto a 29° C en baño maría Lab-Line Shaker Bath (orbit). Posteriormente se procedió a determinar absorbencia de la turbidez de los cultivos en el espectrofotómetro Coleman (JUNIOR ® II Modelo 6 \ 20) a 650 nm. Las lecturas se realizaron cada hora durante 8 horas, haciendo la última lectura a las 24 h.

3.2.4 Preparación de suspensiones bacterianas de aislamientos fluorescentes y del género *Bacillus* sp.

En la campana de flujo laminar Veco, bajo condiciones asépticas, se toman los tubos que contienen los aislamientos bacterianos los cuales están en medio B de King inclinado. De cada tubo se toman células con la ayuda de un asa microbiológica y se estría en cajas de Petri de cristal (90 mm de diámetro por 20 mm) que contienen medio sólido B de King. A continuación las cajas de Petri son incubadas durante 24 – 48 h a 26° C +/-1.

Posteriormente con ayuda de un asa microbiológica, de las cajas de Petri previamente sembradas con los aislamientos bacterianos de interés se toma de una muestra de varias colonias para inocular tubos de vidrio con tapón de rosca que contienen 5 mL de agua destilada estéril y a continuación los tubos son agitados. Las suspensiones bacterianas deben presentar una concentración aproximada de 1×10^8 ufc (0.1 absorbencia a 660 nm).

3.3 Material Biológico.

La semilla de alfalfa utilizada fue importada por la compañía Caloro, es de la variedad COF101 verificada y producida en Estados Unidos, cosechada en el ciclo primavera-verano con un porcentaje de pureza y germinación de 98% y 85% respectivamente.

3.3.1 Desinfección de la semilla de alfalfa

En cajas de Petri de cristal previamente esterilizadas en autoclave durante 15 min (121 °C, 1.02 kg/ cm²) se colocaron muestras de 0.5 g de semilla de alfalfa, para desinfectarlas agregando 10 mL de la solución desinfectante (1.2% de Cl libre y 0.2 mL de limpiador

líquido Lysol antibacterial Reckitt Colman, en 100 mL de agua destilada). Las semillas permanecieron en dicha solución 5 min y al término de este tiempo la semilla fue lavada 10 veces con 10 mL de agua destilada estéril y se dejó secar a 24-25 ° C.

3.3.2 Determinación del efecto de los aislamientos bacterianos fluorescentes en la germinación de semillas de alfalfa

De los cultivos utilizados para determinar las cinéticas de crecimiento, al término del experimento los cultivos fueron usados para inocular las semillas de alfalfa. Una vez transcurridas las 24 h, de cada cultivo bacteriano se toman 3 mL con la ayuda de una pipeta estéril, se añaden directamente a cajas de Petri de plástico las cuales contienen papel (toalla interdoblada, MARQUIS Georgia Pacific) y 100 semillas de alfalfa. Las semillas se colocan dentro de la cámara de germinación (Humedad relativa 100% Temperatura 28 °C +/-1) y la germinación de la semilla se evalúa diariamente durante 12 días.

3.3.3 Determinación del efecto de la presencia de cobre en la semilla de alfalfa

Para determinar el efecto de cobre en el patrón de respuesta de la semilla de alfalfa en la germinación, lotes de aproximadamente 100 semillas (0.22 gr), fueron colocados sobre dos capas de papel (toalla interdoblada, MARQUIS Georgia Pacific) humedecidas con 3 mL de agua destilada o con las soluciones de $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ que contenían: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 0.6 mg/mL de $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Las semillas se colocaron en una cámara de germinación (humedad relativa 100% y temperatura 28 °C +/-1) para evaluar diariamente durante 12 días la germinación así como las características tanto de desarrollo de las plántulas como aspecto, presencia de pigmentación en la raíz y tamaño.

3.3.4 Inoculación de semilla de alfalfa con suspensiones bacterianas fluorescentes y del género *Bacillus sp.*

En la campana de flujo laminar Veco y bajo condiciones de asepsia se colocaron 0.5 g de semilla de alfalfa previamente desinfectada en cajas de Petri de vidrio (90 mm de diámetro por 20 mm) esterilizadas durante 15 min (121 °C, 1.02 kg/ cm²). A continuación se agregó sobre la semilla 400 µL de la suspensión bacteriana y con la ayuda de unas pinzas previamente flameadas de disección se procedió a mezclar las semillas con el cultivo

bacteriano para que quedaran empapadas. Las semillas se dejaron secar con la ayuda del aire expulsado por la campana de flujo laminar. Posteriormente las cajas de Petri con las semillas son colocadas en la cámara de germinación (humedad relativa 100%, temperatura 28 °C +/- 1) y son evaluadas diariamente durante 12 días.

3.4 Determinación del contenido de cobre en plántulas de alfalfa previamente inoculadas con aislamientos fluorescentes.

Para determinar el contenido de cobre en plántulas de alfalfa se siguieron dos procedimientos.

1. Las muestras de 0.5 g de semillas de alfalfa previamente inoculadas y secadas fueron colocadas en cajas de Petri de vidrio (90 mm de diámetro por 20 mm) previamente esterilizadas en autoclave durante 15 min (121 °C, 1.02 kg/ cm²) sobre dos capas de papel (toalla interdoblada, MARQUIS Georgia Pacific). Las semillas fueron dispersadas sobre la superficie del papel para posteriormente agregar 5 mL de agua destilada estéril y se colocaron en la cámara germinadora (humedad relativa 100% y temperatura 28 °C, +/-1) donde se conservaron durante 3 días.

A continuación en la campana de flujo laminar bajo condiciones de asepsia las semillas germinadas fueron colocadas en cajas de Petri de vidrio previamente esterilizadas durante 15 min (121 °C, 1.02 kg/ cm²), las cuales contenían 5 mL de solución Steiner al 25% de la concentración original o 5 mL de la solución Steiner al 25% más 0.2 mg/ mL de Cu₂SO₄ · 5H₂O (Steiner-Cu) para semillas inoculadas. Las plantulitas desarrolladas en la cámara de germinación (humedad relativa 100% y temperatura 28 °C +/-1) fueron transferidas con la ayuda de las pinzas de disección previamente flameadas. Después de taponar la caja se colocaron bajo condiciones de fotoperiodo 16 h luz y a 28-30 °C y se dejan crecer durante 5 días. Cabe señalar que bajo condiciones asépticas en la campana de flujo laminar diariamente se realizaba cambio de la solución (Steiner y Steiner-Cu) a las cajas de Petri que contenían las plántulas inoculadas con los aislamientos de interés, con pipetas de 10 mL previamente esterilizadas durante 15 min (121 °C, 1.02 kg/ cm²).

Al cumplir los 5 días de crecimiento, en la campana de flujo laminar las plántulas fueron lavadas 5 veces con abundante agua desionizada. Para posteriormente separar el tallo de la raíz con la ayuda de un bisturí y pinzas de disección previamente flameadas. Tanto los lotes de muestras de tallo y de raíz previamente identificados fueron colocados en una estufa para

ser secados hasta peso constante (72 h a 65 °C). Las muestras tanto de tallo como de raíz fueron colocadas en sobres de papel ante (14 x 8 cm).

3.4.1 Obtención de biomasa para la determinación de Cu en plántulas de alfalfa con frascos Gerber

Las semillas previamente inoculadas y secadas, son colocadas en frascos gerber previamente esterilizados en autoclave durante 15 min (121 °C, 1.02 Kg/cm²), con tapadera de aluminio, previamente perforadas a las cuales se les coloca una mecha de algodón de 25 cm de longitud, el cual se encuentra sumergido en la solución Steiner al 25% o con la solución de Steiner a la concentración de 0.2 mg/ mL de Cu₂SO₄ · 5H₂O. Las semillas se colocan en la parte superior del hilo de estambre de tal manera que este se mantenga humedecido con la solución. Una vez colocada la semilla se tapa con otro frasco gerber y se colocan en la cámara de crecimiento por un fotoperiodo de 16 h luz, a una temperatura de 26 a 28 °C.

3.5 Preparación de la muestra para la determinación del contenido de Cu en tallo y raíz.

Para llevar a cabo este análisis, las muestras tanto de raíz como de tallo fueron pulverizadas dentro de sobres de papel ante (14 x 8 cm), para obtener muestras de 0.5 g de biomasa (seca). Estas muestras fueron colocadas en tubos de digestión, a los cuales se les añade 1 mL de H₂O₂ y en una mezcla de ácidos 1:4 de HClO₄ y H₂SO₄ y se colocan en la campana a predigerir sobre la estufa (2200 Barnstead Thermolyne) a 250 °C durante 24 h. Posteriormente los tubos con el material de interés se lavan con 1mL de agua desionizada y se hace pasar por papel filtro y depositado en frascos de 250 mL con tapón de plástico. De las muestras obtenidas se prepara una dilución de 1:10 la cual consiste en 1 mL de muestra a analizar y 9 mL de agua deionizada. Las muestras se depositan en tubos de ensayo, a continuación se lee la absorbencia en el Espectrómetro de Absorción Atómica Perkin-Elmer 3110.

3.16 Diseño experimental y análisis de datos

El diseño experimental utilizado fue un diseño completamente al azar con dos repeticiones según la variable analizada. Las variables de respuesta fueron: porcentaje de germinación, velocidad de germinación (T₅₀), a las cuales, se les práctico el análisis de varianza a un nivel

de significancia de 5% y la comparación múltiple de medias se llevó a cabo por el método de Tukey; la información se analizó con el sistema SAS (Statistical Analysis System versión 8).

Los datos fueron capturados en una computadora portátil, directamente en el laboratorio, las fotografías fueron tomadas con una cámara digital SONY® de 4 megapíxeles. Los resultados se representaron en cuadros utilizando el programa Excel de Microsoft®.

El modelo estadístico utilizado fue

$$\text{Modelo } Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

IV. RESULTADOS

Cada uno de los aislamientos bacterianos provenientes de las nueve localidades del predio del Colegio de Posgraduados se caracterizaron mediante el estudio de (1) la velocidad de desarrollo, (2) tamaño de colonias, (3) coloración de la colonia, (4) fluorescencia y pruebas de patogenicidad mediante (5) la determinación de la respuesta de hipersensibilidad en hojas de planta de tabaco (*Nicotiana*) y (6) prueba de pudrición de papa, (7) efecto de los aislamientos en la germinación de la semilla de alfalfa, (8) por la capacidad de producir pigmentos fluorescentes, (9) por el efecto del cobre sobre la germinación en la semilla de alfalfa. Finalmente (10) por la capacidad de modificar el patrón de acumulación de cobre por la plántula de alfalfa.

4.1 Características de los aislamientos bacterianos por localidad de colecta.

Localidad 1. En esta localidad el total de aislamientos bacterianos obtenidos fue de 72 (32.9%) de un total de 223; de los cuales 49 (68%) aislamientos son de muestras de suelo cuyo pH fue de 7.55 y 23 (32%) aislamientos bacterianos de raíz.

De los aislamientos de muestras de suelo se encontró que 14 (28.5%) aislamientos bacterianos fueron de crecimiento rápido, 20 (40.8%) de crecimiento intermedio y 15 (30.5%) de desarrollo lento. Por tamaño de las colonias de los aislamientos de suelo, 4 (8.2%) aislamientos generaron colonias de tamaño grande, 26 (53%) de tamaño mediano y 19 (38.8%) colonias de tamaño pequeño. De los aislamientos de suelo que presentaban coloración, 17 (34.7%) aislamientos presentaron colonias de color ámbar, 24 (49%) colonias con coloración blanca y 8 (16.3%) colonias con coloración verde. En cuanto a la prueba de fluorescencia producida por los aislamientos bacterianos en suelo se encontraron dos 1S-28, 1S-37, que representan el 4.1%. En prueba de hipersensibilidad en hojas de planta de tabaco no se encontró ningún aislamiento que diera resultado positivo. Para la prueba de pudrición de papa, los aislamientos que dieron resultado positivo en suelo fueron cuatro 1S-21, 1S-33, 1S-34 y 1S-39 que representan el 8.2%. En la figura 2 se muestra un ejemplo de la prueba de pudrición en papa. Los resultados de los aislamientos encontrados en muestras de suelo de la localidad 1 se presentan en el cuadro 2.



Figura 2. Prueba de pudrición de papa positiva a la derecha y negativa a la izquierda

En muestras de raíz, se encontraron 23 aislamientos bacterianos, de los cuales por velocidad de crecimiento 9 (39.1%) aislamientos bacterianos fueron de crecimiento rápido, 10 (43.5%) de crecimiento intermedio y 4 (17.4%) aislamientos de desarrollo lento. Por tamaño de la colonia, 2 (8.6%) aislamientos produjeron colonias de tamaño grande, 16 (69.6%) colonias de tamaño mediano y 5 (21.8%) de tamaño pequeño. Por coloración de las colonias 6 (26.1%) aislamientos fueron de coloración ámbar, 13 (56.5%) de coloración blanca y 4 (17.4%) colonias de coloración verde. En cuanto a prueba de fluorescencia solo se encontró un (1R-19a) aislamiento que representa el 4.3%. En prueba de hipersensibilidad en hojas de planta de tabaco no se encontró ningún aislamiento que diera resultado positivo. Para la prueba de pudrición de papa, los aislamientos que dieron resultado positivo en raíz fueron 4 (1R-5, 1R-17, 1R-17a y 1R-18), que representan el 17.4%. Los resultados de los aislamientos encontrados en muestras de raíz de la localidad 1 se presentan en el cuadro 2A.

Cuadro 2. Características de las cepas colectadas del suelo de la localidad 1, pH 7.55.

Aislamiento*	Velocidad	Tamaño	Coloración de las Colonias	Fluorescencia	Pudrición de papa
1S-1	L	P	N	-	-
1S- 1a	R	P	A	-	-
1S-2	I	M	A	-	-
1S-3	R	G	N	-	-
1S-4	L	P	N	-	-
1S-5	R	P	N	-	-
1S-6	I	M	V	-	-
1S-6a	L	P	V	-	-
1S-7	R	M	N	-	-
1S-8	R	M	A	-	-
1S-8a	L	P	V	-	-
1S-9	I	M	A	-	-
1S-9a	I	M	A	-	-
1S-10	R	M	V	-	-
1S-10a	R	M	N	-	-
1S-11	L	P	V	-	-
1S-12	R	M	N	-	-
1S-13	R	G	N	-	-
1S-14	L	P	N	-	-
1S-15	L	P	N	-	-
1S-16	I	M	V	-	-
1S-17	R	M	A	-	-
1S-18	L	M	N	-	-
1S-18a	I	M	A	-	-
1S-19	I	M	A	-	-
1S-19a	I	M	A	-	-
1S-19b	L	P	N	-	-
1S-20	L	P	N	-	-
1S-21	I	P	N	-	+
1S-22	I	M	N	-	-
1S-22a	R	P	N	-	-
1S-23	L	M	N	-	-
1S-23a	L	M	N	-	-
1S-24	I	P	A	-	-
1S-25	L	P	N	-	-
1S-26	I	P	V	-	-
1S-27	L	P	N	-	-
1S-28	L	M	V	+	-
1S-30	I	P	N	-	-
1S-31	R	P	A	-	-
1S-32	R	G	A	-	-
1S-33	I	M	N	-	+
1S-34	I	G	N	-	+
1S-35	I	M	A	-	-
1S-36	I	M	A	-	-
1S-37	I	M	A	+	-
1S-38	I	M	A	-	-
1S-39	I	M	N	-	+
1S-40	R	M	A	-	-

* La clave de este tipo de muestras tiene dos componentes el primero indica la localidad, S origen es de suelo y después del guión el número de aislamiento. Velocidad: R=rápido, I= Intermedia, L=lento; Tamaño: G=grande, M=mediano, P=pequeñas; Pigmentación: N=blanca, V=verde, A=ámbar, Fluorescencia, Patogenicidad (pudrición de papa).

En el cuadro 2 se observa que cuatro aislamientos dieron resultado positivo a la prueba de patogenicidad de pudrición de papa, se puede decir que la forma y apariencia (levantada y rugosa) de estas colonias encontradas corresponde al género *Bacillus sp.* Por otro lado el número de aislamientos productores de pigmentos fluorescentes encontrados fue de dos.

Cuadro 2A. Características de las cepas colectadas de raíz de la localidad 1.

Aislamiento*	Velocidad	Tamaño	Coloración de las Colonias	Fluorescencia	Pudrición de papa
1R-1	R	G	A	-	-
1R-2	R	M	N	-	-
1R-3	I	P	A	-	-
1R-4	I	M	V	-	-
1R-5	I	M	N	-	+
1R-6	L	P	V	-	-
1R-7	I	M	V	-	-
1R-8	I	M	A	-	-
1R-9	L	M	N	-	-
1R-10	R	P	A	-	-
1R-11	I	M	V	-	-
1R-12	R	M	N	-	-
1R-13	I	M	N	-	-
1R-14	L	P	A	-	-
1R-15	R	G	N	-	-
1R-16	R	M	A	-	-
1R-17	R	M	N	-	+
1R-17a	I	M	N	-	+
1R-18	R	M	N	-	+
1R-19	R	M	N	+	-
1R-19a	L	P	N	-	-
1R-20	I	M	N	-	-
1R-21	I	M	N	-	-

* La clave de este tipo de muestras tiene dos componentes el primero indica la localidad, R origen es de raíz y después del guión el número de aislamiento. Velocidad: R=rápido, I= Intermedia, L=lento; Tamaño: G=grande, M=mediano, P=pequeñas; Pigmentación: N=blanca, V=verde, A=ámbar. Fluorescencia, Patogenicidad (pudrición de papa).

En el cuadro 2A se puede observar que se encontraron cuatro aislamientos con forma y apariencia (levantada y rugosa) del género *Bacillus sp.*, y un solo aislamiento productor de fluorescencia. En esta localidad fue donde se obtuvo un mayor número de aislamientos bacterianos.

Localidad 2. En esta localidad el total de aislamientos bacterianos obtenidos fue de 21, que del total de 223 aislamientos representa el 9.4%, de los cuales 11 (52.4%) aislamientos son de muestras de suelo cuyo pH fue de 7.7 y 10 (47.6%) aislamientos bacterianos de raíz.

De los aislamientos de muestras de suelo 3 (27.3%) aislamientos bacterianos fueron de crecimiento rápido, 2 (18.2%) de crecimiento intermedio y 6 (54.5%) de desarrollo lento. Por tamaño de las colonias de los aislamientos de suelo, 6 (54.5%) aislamientos generaron colonias de tamaño mediano y 5 (45.5%) colonias de tamaño pequeño. De los aislamientos de suelo que presentaban coloración, 3 (27.3%) aislamientos presentaron colonias de color ámbar, 7 (63.7%) colonias con coloración blanca y 1 (9%) colonia con coloración verde. En cuanto a la prueba de fluorescencia producida por los aislamientos bacterianos en suelo se encontraron cuatro aislamientos 2S-6, 2S-7, 2S-9 y 2S-10 que representan el 36.4%. En pruebas de patogenicidad, prueba de hipersensibilidad en hojas de planta de tabaco (*Nicotiana*) y prueba de pudrición de papa de los 11 aislamientos bacterianos de muestras de suelo no se encontró ninguno que diera prueba positiva. Los resultados de los aislamientos encontrados en muestras de suelo de la localidad 2 se presentan en el cuadro 3.

Cuadro 3. Características de las cepas colectadas del suelo de la localidad 2, pH 7.7.

Aislamiento*	Velocidad	Tamaño	Coloración de las Colonias	Fluorescencia	Pudrición de papa
2S-1	R	M	A	-	-
2S-2	L	M	N	-	-
2S-3	I	M	A	-	-
2S-4	R	P	N	-	-
2S-5	R	M	N	-	-
2S-6	L	P	A	+	-
2S-7	L	P	N	+	-
2S-8	L	P	N	-	-
2S-9	L	P	V	+	-
2S-10	I	M	N	+	-
2S-11	L	M	N	-	-

* La clave de este tipo de muestras tiene dos componentes el primero indica la localidad, S origen es de suelo y después del guión el número de aislamiento. Velocidad: R=rápido, I= Intermedia, L=lento; Tamaño: G=grande, M=mediano, P=pequeñas; Pigmentación: N=blanca, V=verde, A=ámbar.. Fluorescencia, Patogenicidad (pudrición de papa).

En el cuadro 3 se puede observar que se encontraron cuatro aislamientos productores de pigmentos fluorescentes.

En muestras de raíz, se obtuvieron 10 aislamientos bacterianos, que por velocidad de crecimiento 3 (30%) aislamientos fueron de crecimiento rápido, 3 (30%) de crecimiento intermedio y 4 (40%) aislamientos de desarrollo lento. Por tamaño de las colonias, 9 (90%) aislamientos produjeron colonias de tamaño mediano y 1 (10%) colonias de tamaño pequeño. Por coloración de las colonias 7 (70%) aislamientos fueron de coloración ámbar,

2 (20%) colonias de coloración blanca y 1 (10%) colonia de coloración verde. En cuanto a prueba de fluorescencia solo se encontró un (2R-2) aislamiento que representa el 10%. En cuanto a pruebas de patogenicidad, prueba de hipersensibilidad en hojas de planta de tabaco (*Nicotiana*) y prueba de pudrición de papa de los 10 aislamientos bacterianos de muestras de raíz no se encontró ninguno que diera prueba positiva. Los resultados de los aislamientos encontrados en muestras de raíz de la localidad 2 se presentan en el cuadro 3A.

Cuadro 3A. Características de las cepas colectadas de raíz de la localidad 2.

Aislamiento*	Velocidad	Tamaño	Coloración de las Colonias	Fluorescencia	Pudrición de papa
2R-1	R	M	A	-	-
2R-2	L	M	V	+	-
2R-3	L	M	V	-	-
2R-4	L	M	A	-	-
2R-5	L	P	A	-	-
2R-6	I	M	A	-	-
2R-7	R	M	A	-	-
2R-8	R	M	A	-	-
2R-9	I	M	A	-	-
2R-10	I	M	N	-	-

* La clave de este tipo de muestras tiene dos componentes el primero indica la localidad, R origen es de raíz y después del guión el número de aislamiento. Velocidad: R=rápido, I= Intermedia, L=lento; Tamaño: G=grande, M=mediano, P=pequeñas; Pigmentación: N=blanca, V=verde, A=ámbar. Fluorescencia, Patogenicidad (pudrición de papa).

En el cuadro 3A se puede observar que sólo se encontró un aislamiento productor de pigmento fluorescente.

Localidad 3. En esta localidad el total de aislamientos bacterianos obtenidos fue de 34, que del total de 223 aislamientos representa el 15.2%, de los cuales 15 (44.1%) aislamientos son de muestras de suelo cuyo pH fue de 7.7 y 19 (55.9%) aislamientos bacterianos de raíz.

De los aislamientos de muestras de suelo 2 (13.3%) aislamientos bacterianos fueron de crecimiento rápido, 7 (46.7.2%) de crecimiento intermedio y 6 (40%) de desarrollo lento. Por tamaño de las colonias de los aislamientos de suelo, 8 (53.3%) aislamientos generaron colonias de tamaño mediano y 7 (46.7%) colonias de tamaño pequeño. De los aislamientos de suelo que presentaban coloración, 6 (40%) aislamientos presentaron colonias de color ámbar y 9 (60%) colonias con coloración blanca. En cuanto a la prueba de fluorescencia producida por los aislamientos bacterianos en suelo se encontraron dos aislamientos 3S-2 y 3S-15 que representan el 13.3%. En cuanto a pruebas de patogenicidad, prueba de hipersensibilidad en hojas de planta de tabaco (figura 3) y prueba de pudrición de papa de los

15 aislamientos bacterianos de muestras de suelo no se encontró ninguno que diera prueba positiva. Los resultados de los aislamientos encontrados en muestras de suelo de la localidad 3 se presentan en el cuadro 4.



Figura 3. Prueba de hipersensibilidad en planta de tabaco (*Nicotiana*) que resultó negativa.

Cuadro 4. Características de las cepas colectadas del suelo de la localidad 3, pH 7.7.

Aislamiento*	Velocidad	Tamaño	Coloración de las Colonias	Fluorescencia	Pudrición de papa
3S-1	I	M	N	-	-
3S-2	I	P	A	+	-
3S-3	L	P	N	-	-
3S-4	L	P	N	-	-
3S-5	R	M	A	-	-
3S-6	L	P	N	-	-
3S-7	I	M	A	-	-
3S-8	L	M	A	-	-
3S-9	L	P	N	-	-
3S-10	I	M	A	-	-
3S-11	L	P	A	-	-
3S-12	I	P	N	-	-
3S-13	I	M	N	-	-
3S-14	I	M	N	-	-
3S-15	R	M	N	+	-

* La clave de este tipo de muestras tiene dos componentes el primero indica la localidad, S origen es de suelo y después del guión el número de aislamiento. Velocidad: R=rápido, I= Intermedia, L=lento; Tamaño: G=grande, M=mediano, P=pequeñas; Pigmentación: N=blanca, V=verde, A=ámbar. Fluorescencia, Patogenicidad (pudrición de papa).

En el cuadro 4 se presentan los dos aislamientos productores de pigmentos fluorescentes encontrados, debe señalarse que el color del aislamiento 3S-15 fue diferente a los demás

siendo de una tonalidad anaranjada y por lo tanto no fue utilizada en los experimentos posteriores.

En muestras de raíz, se encontraron 19 aislamientos bacterianos, de los cuales por velocidad de crecimiento 6 (31.6%) aislamientos bacterianos fueron de crecimiento rápido, 9 (47.3%) de crecimiento intermedio y 4 (21.1%) aislamientos de desarrollo lento. Por tamaño de la colonia, 1 (5.3%) aislamiento fue de tamaño grande, 10 (52.6%) colonias de tamaño mediano y 8 (42.1%) de tamaño pequeño. Por coloración de las colonias 6 (31.6%) aislamientos fueron de coloración ámbar, 6 (31.6%) de coloración blanca y 7 (36.8%) colonias de coloración verde. En prueba de fluorescencia se encontró un solo aislamiento (3R-4) que representa el 10%. En pruebas de patogenicidad, prueba de hipersensibilidad en hojas de planta de tabaco (*Nicotiana*) y prueba de pudrición de papa de los 19 aislamientos bacterianos de muestras de raíz no se encontró ninguno que diera prueba positiva. Los resultados de los aislamientos encontrados en muestras de raíz de la localidad 3 se presentan en el cuadro 4A.

Cuadro 4A. Características de las cepas colectadas de raíz de la localidad 3.

Aislamiento*	Velocidad	Tamaño	Coloración de las Colonias	Fluorescencia	Pudrición de papa
3R-1	R	M	N	-	-
3R-2	L	P	N	-	-
3R-3	I	M	A	-	-
3R-4	L	P	V	+	-
3R-5	I	M	A	-	-
3R-6	L	P	N	-	-
3R-7	I	P	N	-	-
3R-8	I	M	N	-	-
3R-9	I	M	A	-	-
3R-10	I	M	V	-	-
3R-11	R	G	V	-	-
3R-12	I	M	A	-	-
3R-13	R	P	V	-	-
3R-14	I	M	N	-	-
3R-15	I	M	A	-	-
3R-16	R	P	V	-	-
3R-17	R	M	V	-	-
3R-18	L	P	A	-	-
3R-19	R	P	V	-	-

*La clave de este tipo de muestras tiene dos componentes el primero indica la localidad, R origen es de raíz y después del guión el número de aislamiento. Velocidad: R=rápido, I= Intermedia, L=lento; Tamaño: G=grande, M=mediano, P=pequeñas; Pigmentación: N=blanca, V=verde, A=ámbar. Fluorescencia, Patogenicidad (pudrición de papa).

En el cuadro 4A se puede observar que solo se encontró un aislamiento que produjera pigmentos fluorescentes.

Localidad 4. En esta localidad el total de aislamientos bacterianos obtenidos fue de 10, que del total de 223 aislamientos representa el 4.5%, de los cuales 4 (40%) aislamientos son de muestras de suelo cuyo pH fue de 7.25 y 6 (60%) aislamientos bacterianos de raíz.

De los aislamientos de muestras de suelo 1 (25%) aislamiento bacteriano fue de crecimiento rápido, 1 (25%) de crecimiento intermedio y 2 (50%) aislamientos de desarrollo lento. Por tamaño de las colonias de los aislamientos de suelo, 1 (25%) aislamiento generó colonia de tamaño mediano y 3 (75%) colonias de tamaño pequeño. De los aislamientos de suelo que presentaban coloración, 1 (25%) aislamiento presentó colonias de color ámbar, 2 (50%) colonias con coloración blanca y 1 (25%) colonia con coloración verde. En prueba de fluorescencia producida por los aislamientos bacterianos en suelo se encontró un solo aislamiento 4S-4 que representan el 25%. En pruebas de patogenicidad, prueba de hipersensibilidad en hojas de planta de tabaco (*Nicotiana*) y prueba de pudrición de papa de los 4 aislamientos bacterianos de muestras de suelo no se encontró ninguno que diera prueba positiva. Los resultados de los aislamientos encontrados en muestras de suelo de la localidad 4 se presentan en el cuadro 5.

Cuadro 5. Características de las cepas colectadas del suelo de la localidad 4, pH 7.25

Aislamiento*	Velocidad	Tamaño	Coloración de las Colonias	Fluorescencia	Pudrición de papa
4S-1	L	P	N	-	-
4S-2	L	P	N	-	-
4S-3	I	M	A	-	-
4S-4	R	P	V	+	-

* La clave de este tipo de muestras tiene dos componentes el primero indica la localidad, S origen es de suelo y después del guión el número de aislamiento. Velocidad: R=rápido, I= Intermedia, L=lento; Tamaño: G=grande, M=mediano, P=pequeñas; Pigmentación: N=blanca, V=verde, A=ámbar. Fluorescencia, Patogenicidad (pudrición de papa).

En el cuadro 5 se puede observar que solo se encontró un aislamiento que produjera pigmentos fluorescentes.

En muestras de raíz, se encontraron 6 aislamientos bacterianos, de las cuales por velocidad de crecimiento los 6 (100%) aislamientos fueron de crecimiento rápido. Por tamaño de la colonia, los 6 (100%) aislamientos presentaron colonias de tamaño pequeño. Por coloración

1 (16.7%) aislamiento fue de coloración ámbar, 2 (33.3%) de coloración blanca y 3 (50%) colonias de coloración verde. En los aislamientos obtenidos de raíz la totalidad presentó fluorescencia (4R-1, 4R-2, 4R-3, 4R-4, 4R-5 y 4R-6) por lo que corresponde al 100%. En patogenicidad, prueba de hipersensibilidad en hojas de planta de tabaco (*Nicotiana*) y prueba de pudrición de papa de los 6 aislamientos bacterianos de muestras de raíz no se encontró ninguno que diera prueba positiva. Los resultados de los aislamientos encontrados en muestras de raíz de la localidad 4 se presentan en el cuadro 5A.

Cuadro 5A. Características de las cepas colectadas de raíz de la localidad 4.

Aislamiento*	Velocidad	Tamaño	Coloración de las Colonias	Fluorescencia	Pudrición de papa
4R-1	R	P	A	+	-
4R-2	R	P	V	+	-
4R-3	R	P	N	+	-
4R-4	R	P	V	+	-
4R-5	R	P	N	+	-
4R-6	R	P	V	+	-

* La clave de este tipo de muestras tiene dos componentes el primero indica la localidad, R origen es de raíz y después del guión el número de aislamiento. Velocidad: R=rápido, I= Intermedia, L=lento; Tamaño: G=grande, M=mediano, P=pequeñas; Pigmentación: N=blanca, V=verde, A=ámbar. Fluorescencia, Patogenicidad (pudrición de papa).

En el cuadro 5A se puede observar que el total de los aislamientos produjo fluorescencia, debe señalarse que la localidad que presentó mayor número de aislamientos fluorescentes fue la localidad 4 con un total de 7.

Localidad 5. En esta localidad el total de aislamientos bacterianos obtenidos fue de 28, que del total de 223 aislamientos representa el 12.5%, de los cuales 12 (42.8%) aislamientos son de muestras de suelo cuyo pH fue de 9.65 y 16 (57.2%) aislamientos bacterianos de raíz.

De los aislamientos de muestras de suelo 3 (25%) aislamientos fueron de crecimiento rápido, 3 (25%) de crecimiento intermedio y 6 (50%) de desarrollo lento. Por tamaño de las colonias de los aislamientos de suelo, 2 (16.7%) generaron colonias de tamaño grande, 9 (75%) tamaño mediano y 1 (8.3%) colonia de tamaño pequeño. De los aislamientos de suelo que presentaban coloración, 7 (58.3%) aislamientos presentaron colonias de color ámbar y 5 (41.7%) colonias con coloración blanca. De los 12 aislamientos bacterianos no se encontró ninguno que produjera pigmentos fluorescentes, ni tampoco positiva la prueba de hipersensibilidad en hojas de planta de tabaco (*Nicotiana*). Para la prueba de pudrición de

papa, las que se encontraron con resultado positivo en suelo fueron 2 aislamientos 5S-4 y 5S-6 que representan el 16.6%. Los resultados de los aislamientos encontrados en muestras de suelo de la localidad 5 se presentan en el cuadro 6.

Cuadro 6. Características de las cepas colectadas del suelo de la localidad 5, pH 9.65

Aislamiento*	Velocidad	Tamaño	Coloración de las Colonias	Fluorescencia	Pudrición de papa
5S-1	L	M	A	-	-
5S-2	L	M	A	-	-
5S-3	L	P	N	-	-
5S-4	L	M	A	-	+
5S-5	L	M	A	-	-
5S-6	L	M	A	-	+
5S-6a	I	M	A	-	-
5S-7	I	M	N	-	-
5S-8	R	M	A	-	-
5S-9	R	G	N	-	-
5S-10	R	G	N	-	-
5S-11	I	M	N	-	-

* La clave de este tipo de muestras tiene dos componentes el primero indica la localidad, S origen es de suelo y después del guión el número de aislamiento. Velocidad: R=rápido, I= Intermedia, L=lento; Tamaño: G=grande, M=mediano, P=pequeñas; Pigmentación: N=blanca, V=verde, A=ámbar. Fluorescencia, Patogenicidad (pudrición de papa).

En el cuadro 6 se pueden observar que no existe ningún aislamiento que presente fluorescencia. En cuanto a la prueba de pudrición de papa se pueden observar dos aislamientos los cuales presentan la forma y consistencia del género *Bacillus sp.*

En muestras de raíz, se encontraron 16 aislamientos bacterianos, de las cuales por velocidad de crecimiento 4 (25%) aislamientos bacterianos fueron de crecimiento rápido y 12 (75%) de crecimiento intermedio. Por tamaño de la colonia, 1 (8.6%) aislamiento presentó colonia de tamaño grande y 15 (93.7%) colonias de tamaño pequeño. Por coloración de las colonias 4 (25%) aislamientos fueron de coloración ámbar y 12 (75%) colonias de coloración blanca. De los 16 aislamientos bacterianos no se encontró ninguno que produjera pigmentos fluorescentes, ni tampoco prueba positiva de hipersensibilidad en hojas de planta de tabaco (*Nicotiana*). Para la prueba de pudrición de papa, los aislamientos obtenidos en raíz, fueron 12 (5R-1, 5R-1A, 5R-2, 5R-3, 5R-3a, 5R-4, 5R-4a, 5R-5a, 5R-6, 5R-8, 5R-9 y 5R-10) que representan el 75% (figura 4). Los resultados de los aislamientos encontrados en muestras de raíz de la localidad 5 se presentan en el cuadro 6A.



Figura 4. Prueba de pudrición de papa positiva a la derecha, testigo a la izquierda.

Cuadro 6A. Características de las cepas colectadas de raíz de la localidad 5.

Aislamiento*	Velocidad	Tamaño	Coloración de las Colonias	Fluorescencia	Pudrición de papa
5R-1	I	M	N	-	+
5R-1a	R	M	N	-	+
5R-2	I	M	N	-	+
5R-3	I	M	N	-	+
5R-3a	R	M	N	-	+
5R-4	I	M	N	-	+
5R-4a	I	M	A	-	+
5R-5	I	M	N	-	-
5R-5a	R	M	N	-	+
5R-6	R	G	N	-	+
5R-6a	I	M	N	-	-
5R-7	I	M	A	-	-
5R-7a	I	M	N	-	-
5R-8	I	M	A	-	+
5R-9	I	M	N	-	+
5R-10	I	M	A	-	+

* La clave de este tipo de muestras tiene dos componentes el primero indica la localidad, R origen es de raíz y después del guión el número de aislamiento. Velocidad: R=rápido, I= Intermedia, L=lento; Tamaño: G=grande, M=mediano, P=pequeñas; Pigmentación: N=blanca, V=verde, A=ámbar, B=*Bacillus.sp.*, Fluorescencia, Patogenicidad (pudrición de papa).

En el cuadro 6A se pueden observar que no existe ningún aislamiento que presente fluorescencia. En cuanto a la prueba de pudrición de papa se pueden observar doce aislamientos los cuales presentan la forma y consistencia del género *Bacillus sp.* En esta localidad fue donde se encontraron un mayor número de aislamientos que dieron positiva la prueba de pudrición de papa.

Localidad 6. En la localidad seis el total de aislamientos bacterianos fue de 13 del total de 223 aislamientos bacterianos representa el 5.8% de los cuales 3 (23%) son aislamientos del suelo cuyo pH es de 9.25 y 10 (77%) aislamientos fueron de raíz.

De los aislamientos de muestras de suelo los 3 (100%) aislamientos bacterianos fueron de crecimiento intermedio. Por tamaño de las colonias de los aislamientos de suelo, 2 (66.7%) aislamientos generaron colonias de tamaño mediano y 1 (33.3%) aislamiento de tamaño pequeño. De los aislamientos de suelo que presentaban coloración, 2 (66.7%) aislamientos presentaron colonias de color ámbar y 1 (33.3%) colonia con coloración blanca. Por prueba de fluorescencia y en prueba de hipersensibilidad en hojas de planta de tabaco no se encontró ningún aislamiento que diera resultado positivo. Para la prueba de pudrición de papa en suelo se encontraron dos cepas 6S-2 y 6S-3, que representan el 66.7%. Los resultados de los aislamientos encontrados en muestras de suelo de la localidad 6 se presentan en el cuadro 7.

Cuadro 7. Características de las cepas colectadas del suelo de la localidad 6, pH 9.25

Aislamiento*	Velocidad	Tamaño	Coloración de las Colonias	Fluorescencia	Pudrición de papa
6S-1	I	P	N	-	-
6S-2	I	M	A	-	+
6S-3	I	M	A	-	+

* La clave de este tipo de muestras tiene dos componentes el primero indica la localidad, S origen es de suelo y después del guión el número de aislamiento. Velocidad: R=rápido, I= Intermedia, L=lento; Tamaño: G=grande, M=mediano, P=pequeñas; Pigmentación: N=blanca, V=verde, A=ámbar. Fluorescencia, Patogenicidad (pudrición de papa).

En el cuadro 7 se puede observar que no existe ningún aislamiento que presente fluorescencia. En cuanto a la prueba de pudrición de papa se pueden observar dos aislamientos los cuales presentan la forma y consistencia del género *Bacillus sp.*

En muestras de raíz, se encontraron 10 aislamientos bacterianos, de las cuales por velocidad de crecimiento 5 (50%) aislamientos bacterianos fueron de crecimiento rápido, 3 (30%) de crecimiento intermedio y 2 (20%) de desarrollo lento. Por tamaño de la colonia, 7 (70%) aislamientos presentaron colonias de tamaño mediano y 3 (30%) colonias de tamaño pequeño. Por coloración de las colonias 4 (40%) aislamientos presentaron colonias de coloración ámbar y 6 (60%) colonias de coloración blanca. En prueba de fluorescencia en raíz se encontraron 4 aislamientos 6R-1, 6R-2, 6R-8 y 6R-9 que representan el 40%. En cuanto a prueba de hipersensibilidad en tabaco (*Nicotiana*) de los 10 aislamientos bacterianos no se encontró ninguno que diera prueba positiva. Para la prueba de pudrición de papa en raíz se encontraron 3 aislamientos 6R-3, 6R-6 y 6R-7 que representan el 30%. Los resultados de los aislamientos encontrados en muestras de raíz de la localidad 6 se presentan en el cuadro 7A.

Cuadro 7A. Características de las cepas colectadas de raíz de la localidad 6.

Aislamiento*	Velocidad	Tamaño	Coloración de las Colonias	Fluorescencia	Pudrición de papa
6R-1	R	P	A	+	-
6R-2	R	M	A	+	-
6R-3	R	M	N	-	+
6R-4	L	P	N	-	-
6R-5	L	P	A	-	-
6R-6	I	M	N	-	+
6R-7	I	M	N	-	+
6R-8	R	M	N	+	-
6R-9	R	M	A	+	-
6R-10	I	M	N	-	-

* La clave de este tipo de muestras tiene dos componentes el primero indica la localidad, R origen es de raíz y después del guión el número de aislamiento. Velocidad: R=rápido, I= Intermedia, L=lento; Tamaño: G=grande, M=mediano, P=pequeñas; Pigmentación: N=blanca, V=verde, A=ámbar. Fluorescencia, Patogenicidad (pudrición de papa).

En el cuadro 7A se puede observar que 3 aislamientos dieron resultado positivo a la prueba de patogenicidad de pudrición de papa, se puede decir que la forma y consistencia de estas colonias encontradas corresponde al género *Bacillus sp.* Por otro lado el número de aislamientos productores de pigmentos fluorescentes encontrados fue de cuatro.

Localidad 7. En esta localidad el total de aislamientos bacterianos obtenidos fue de 14, que del total de 223 aislamientos representa el 6.28%, de los cuales 6 (42.9%) aislamientos son de muestras de suelo cuyo pH fue de 7.55 y 8 (57.1%) aislamientos bacterianos de raíz.

De los aislamientos de muestras suelo 3 (50%) aislamientos bacterianos fueron de crecimiento rápido, 1 (10%) de crecimiento intermedio y 2 (40%) de desarrollo lento. Por tamaño de las colonias de los aislamientos de suelo, 1 (16.7%) fue de tamaño mediano y 5 (83.3%) colonia de tamaño pequeño. De los aislamientos de suelo que presentaban coloración, 4 (66.7%) aislamientos presentaron colonias de color ámbar y 2 (33.3%) colonias con coloración blanca. De los 6 aislamientos bacterianos no se encontró ninguno que produjera pigmentos fluorescentes, ni tampoco prueba positiva de hipersensibilidad en hojas de planta de tabaco (*Nicotiana*) y prueba de pudrición de papa. Los resultados de los aislamientos encontrados en muestras de suelo de la localidad 7 se presentan en el cuadro 8.

Cuadro 8. Características de las cepas colectadas del suelo de la localidad 7, pH 7.55

Aislamiento*	Velocidad	Tamaño	Coloración de las Colonias	Fluorescencia	Pudrición de papa
7S-1	R	P	N	-	-
7S-2	L	P	A	-	-
7S-3	I	M	A	-	-
7S-4	L	P	N	-	-
7S-5	R	P	A	-	-
7S-6	R	P	A	-	-

* La clave de este tipo de muestras tiene dos componentes el primero indica la localidad, S origen es de suelo y después del guión el número de aislamiento. Velocidad: R=rápido, I= Intermedia, L=lento; Tamaño: G=grande, M=mediano, P=pequeñas; Pigmentación: N=blanca, V=verde, A=ámbar. Fluorescencia, Patogenicidad (pudrición de papa).

Se puede observar en el cuadro 8 que no se encontró ningún aislamiento productor de fluorescencia así como también prueba de pudrición de papa positiva.

En muestras de raíz, se encontraron 8 aislamientos bacterianos, de las cuales por velocidad de crecimiento 1 (12.5%) aislamiento bacteriano fue de crecimiento rápido, 2 (25%) de crecimiento intermedio y 5 (62.5%) de desarrollo lento. Por tamaño de la colonia, se 2 (25%) aislamientos presentaron colonias de tamaño mediano y 6 (75%) colonias de tamaño pequeño. Por coloración de las colonias 5 (62.5%) aislamientos fueron de coloración ámbar y 3 (27.5%) colonias de coloración blanca. En prueba de fluorescencia en raíz se encontró un aislamiento 7R-8 que representan el 12.5%. En cuanto a pruebas de patogenicidad, prueba de hipersensibilidad en planta de tabaco (*Nicotiana*) y prueba de pudrición de papa de los 8 aislamientos bacterianos no se encontró ninguna que diera prueba positiva. Los resultados de los aislamientos encontrados en muestras de raíz de la localidad 7 se presentan en el cuadro 8A.

Cuadro 8A. Características de las cepas colectadas de raíz de la localidad 7.

Aislamiento*	Velocidad	Tamaño	Coloración de las Colonias	Fluorescencia	Pudrición de papa
7R-1	I	M	A	-	-
7R-2	L	P	A	-	-
7R-3	L	P	N	-	-
7R-4	L	P	A	-	-
7R-5	L	P	A	-	-
7R-6	L	P	N	-	-
7R-7	R	M	N	-	-
7R-8	I	P	A	+	-

* La clave de este tipo de muestras tiene dos componentes el primero indica la localidad, R origen es de raíz y después del guión el número de aislamiento. Velocidad: R=rápido, I= Intermedia, L=lento; Tamaño: G=grande, M=mediano, P=pequeñas; Pigmentación: N=blanca, V=verde, A=ámbar. Fluorescencia, Patogenicidad (pudrición de papa)

En el cuadro 8A se puede observar que solo se encontró un aislamiento produjo fluorescencia.

Localidad 8. En esta localidad el total de aislamientos bacterianos obtenidos fue de 16, que del total de 223 aislamientos representa el 7.2%, de los cuales 8 (50%) aislamientos son de muestras de suelo cuyo pH fue de 6.7 y 8 (50%) aislamientos bacterianos de raíz

De los aislamientos de muestras suelo 3 (37.5%) aislamientos bacterianos fueron de crecimiento rápido, 2 (25%) de crecimiento intermedio y 3 (37.5%) de desarrollo lento. Por tamaño de las colonias de los aislamientos de suelo, 4 (50%) aislamientos generaron colonias de tamaño mediano y 4 (50%) colonias de tamaño pequeño. De los aislamientos de suelo que presentaban coloración los 8 (100%) aislamientos presentaron colonias de color ámbar. De los 8 aislamientos bacterianos no se encontró ninguno que produjera pigmentos fluorescentes, ni tampoco prueba positiva de hipersensibilidad en hojas de planta de tabaco (*Nicotiana*) y prueba de pudrición de papa. Los resultados de los aislamientos encontrados en muestras de suelo de la localidad 8 se presentan en el cuadro 9.

Cuadro 9. Características de las cepas colectadas del suelo de la localidad 8, pH 6.7

Aislamiento*	Velocidad	Tamaño	Coloración de las Colonias	Fluorescencia	Pudrición de papa
8S-1	R	M	A	-	-
8S-2	L	P	A	-	-
8S-3	L	P	A	-	-
8S-4	I	M	A	-	-
8S-5	I	M	A	-	-
8S-6	R	M	A	-	-
8S-7	L	P	A	-	-
8S-8	R	P	A	-	-

* La clave de este tipo de muestras tiene dos componentes el primero indica la localidad, S origen es de suelo y después del guión el número de aislamiento Velocidad: R=rápido, I= Intermedia, L=lento; Tamaño: G=grande, M=mediano, P=pequeñas; Pigmentación: N=blanca, V=verde, A=ámbar. Fluorescencia, Patogenicidad (pudrición de papa).

Se puede observar en el cuadro 9 que no se encontró ningún aislamiento productor de fluorescencia así como también prueba de pudrición de papa positiva.

En muestras de raíz, se encontraron 8 aislamientos bacterianos, de las cuales por velocidad de crecimiento 2 (25%) aislamientos bacterianos fueron de crecimiento rápido, 2 (25%) de crecimiento intermedio y 4 (50%) de desarrollo lento. Por tamaño de la colonia, 5 (62.5%)

aislamientos presentaron colonias de tamaño mediano y 3 (37.5%) colonias de tamaño pequeño. Por coloración de las colonias 4 (50%) aislamientos presentaron colonias de coloración ámbar y 4 (50%) colonias de coloración blanca. De los 8 aislamientos bacterianos no se encontró ninguno que produjera pigmentos fluorescentes, ni tampoco prueba positiva de hipersensibilidad en hojas de planta de tabaco (*Nicotiana*). Para la prueba de pudrición de papa se encontró un aislamiento 8R-3 que representa el 12.5%. Los resultados de los aislamientos encontrados en muestras de raíz de la localidad 8 se presentan en el cuadro 9A.

Cuadro 9A. Características de las cepas colectadas de raíz de la localidad 8.

Aislamiento*	Velocidad	Tamaño	Coloración de las Colonias	Fluorescencia	Pudrición de papa
8R-1	I	M	A	-	-
8R-2	L	P	N	-	-
8R-3	R	M	N	-	+
8R-4	R	M	N	-	-
8R-5	L	P	A	-	-
8R-6	L	P	A	-	-
8R-7	I	M	A	-	-
8R-8	L	M	N	-	-

* La clave de este tipo de muestras tiene dos componentes el primero indica la localidad, R origen es de raíz y después del guión el número de aislamiento. Velocidad: R=rápido, I= Intermedia, L=lento; Tamaño: G=grande, M=mediano, P=pequeñas; Pigmentación: N=blanca, V=verde, A=ámbar. Fluorescencia, Patogenicidad (pudrición de papa).

En el cuadro 9A se puede observar que no existe ningún aislamiento que presente fluorescencia. En cuanto a la prueba de pudrición de papa se puede observar un aislamiento el cual presenta la forma y consistencia del género *Bacillus sp.*

Localidad 9. En esta localidad el total de aislamientos bacterianos obtenidos fue de 15, que del total de 223 aislamientos representa el 6.7%, de los cuales 7 (47%) aislamientos son de muestras de suelo cuyo pH fue de 7.7 y 8 (53%) aislamientos bacterianos de raíz.

De los aislamientos de muestras de suelo 4 (57.1%) aislamientos bacterianos fueron de crecimiento rápido, 2 (28.6%) de crecimiento intermedio y 1 (14.3%) aislamiento de desarrollo lento. Por tamaño de las colonias de los aislamientos de suelo, 6 (85.7%) aislamientos generaron colonias de tamaño mediano y 1 (14.3%) colonia de tamaño pequeño. De los aislamientos de suelo que presentaban coloración 2 (28.6%) aislamientos presentaron colonias de coloración ámbar, 2 (28.6%) colonias con coloración blanca y 3 (42.8%) colonias de coloración verde. De los 7 aislamientos bacterianos no se encontró

ninguno que produjera pigmentos fluorescentes, ni tampoco prueba positiva de hipersensibilidad en hojas de planta de tabaco (*Nicotiana*) y prueba de pudrición de papa. Los resultados de los aislamientos encontrados en muestras de suelo de la localidad 9 se presentan en el cuadro 10.

Cuadro 10. Características de las cepas colectadas del suelo de la localidad 9, pH 7.7

Aislamiento*	Velocidad	Tamaño	Coloración de las Colonias	Fluorescencia	Pudrición de papa
9S-1	R	M	V	-	-
9S-2	L	M	A	-	-
9S-3	R	M	V	-	-
9S-4	R	P	A	-	-
9S-5	R	M	N	-	-
9S-6	I	M	V	-	-
9S-7	I	M	N	-	-

* El La clave de este tipo de muestras tiene dos componentes el primero indica la localidad, S origen es de suelo y después del guión el número de aislamiento. Velocidad: R=rápido, I= Intermedia, L=lento; Tamaño: G=grande, M=mediano, P=pequeñas; Pigmentación: N=blanca, V=verde, A=ámbar. Fluorescencia, Patogenicidad (pudrición de papa).

Se puede observar en el cuadro 10 que no se encontró ningún aislamiento productor de fluorescencia así como también prueba de pudrición de papa positiva.

En muestras de raíz, se encontraron 8 aislamientos bacterianos, de las cuales por velocidad de desarrollo 2 (25%) aislamientos bacterianos fueron de crecimiento rápido, 2 (25%) de crecimiento intermedio y 4 (50%) de desarrollo lento. Por tamaño de la colonia, 6 (75%) aislamientos presentaron colonias de tamaño mediano y 2 (25%) aislamientos con colonias de tamaño pequeño. Por coloración de las colonias 6 (75%) aislamientos presentaron colonias de coloración ámbar, 1 (12.5%) aislamiento con colonias de coloración blanca y 1 (12.5%) aislamiento de coloración verde. En prueba de fluorescencia en raíz se encontró un aislamiento 9R-6 que representan el 12.5%. En cuanto a pruebas de patogenicidad, prueba de hipersensibilidad en planta de tabaco (*Nicotiana*) y prueba de pudrición de papa de los 8 aislamientos bacterianos no se encontró ninguna que diera prueba positiva. Los resultados de los aislamientos encontrados en muestras de raíz de la localidad 9 se presentan en el cuadro 10A.

Cuadro 10A. Características de las cepas colectadas de raíz de la localidad 9.

Aislamiento*	Velocidad	Tamaño	Coloración de las Colonias	Fluorescencia	Pudrición de papa
9R-1	L	M	V	-	-
9R-2	I	M	A	-	-
9R-3	R	M	A	-	-
9R-4	L	P	N	-	-
9R-5	I	M	A	-	-
9R-6	L	M	A	+	-
9R-7	L	P	A	-	-
9R-8	R	M	A	-	-

* El La clave de este tipo de muestras tiene dos componentes el primero indica la localidad, R origen es de raíz y después del guión el número de aislamiento. Velocidad: R=rápido, I= Intermedia, L=lento; Tamaño: G=grande, M=mediano, P=pequeñas; Pigmentación: N=blanca, V=verde, A=ámbar. Fluorescencia, Patogenicidad (pudrición de papa).

En el cuadro 10A se puede observar que solo se encontró un aislamiento produjo fluorescencia

El total de los aislamientos bacterianos obtenidos de las nueve localidades del predio del Colegio de Posgraduados fue de 223 aislamientos, de los cuales 115 (51.6%) son aislamientos de suelo y 108 (48.4%) aislamientos bacterianos de raíz. Del total de los aislamientos bacterianos de suelo en cuanto a crecimiento se encontró que 33 (28.8%) aislamientos bacterianos fueron de crecimiento rápido, 41 (35.6%) de crecimiento intermedio y 41 (35.6%) de crecimiento lento. De muestras de raíz se encontró que 38 (35.2%) aislamientos bacterianos fueron de crecimiento rápido, 43 (39.8%) de crecimiento intermedio y 27 (25%) de crecimiento lento. En cuanto a tamaño de colonia en suelo se encontró que 6 (5.2%) aislamientos presentaron colonias de tamaño grande, 63 (54.8%) de tamaño mediano y 46 (40%) colonias de tamaño pequeño. En muestras de raíz en lo que respecta a tamaño de colonia se encontró que 4 (3.7%) aislamientos bacterianos presentaron colonias de tamaño grande, 70 (64.8%) de tamaño mediano y 34 (31.5%) colonias de tamaño pequeño.

Por coloración se encontró que en suelo 50 (43.5%) colonias fueron de coloración ámbar, 52 (45.2%) de coloración blanca y 13 (11.3%) colonias de coloración verde. Con respecto a la

coloración de las colonias obtenidas en raíz se encontró que 42 (38.8%) colonias fueron de coloración ámbar, 49 (45.5%) con coloración blanca y 17 (15.7%) colonias con coloración verde. Por la capacidad de los aislamientos bacterianos de producir fluorescencia, en suelo, se encontró un total de 8 aislamientos bacterianos que representan el 6.9%, mientras que en raíz se encontraron 15 aislamientos bacterianos que dieron positiva a la prueba de fluorescencia y representan 13.9%. En las pruebas de patogenicidad realizadas, en la prueba de hipersensibilidad en plantas de tabaco (*Nicotiana*) de las 223 cepas no se encontró alguna que diera positivo. Con respecto a los aislamientos bacterianos que dieron positiva a la prueba de pudrición de papa en suelo fueron 8 aislamientos bacterianos que representan el 6.9%, mientras que los aislamientos bacterianos obtenidos de raíz que dieron positivo a esta prueba fueron de 20 aislamientos y representa el 18.5%.

4.1.1 Selección de aislamientos bacterianos fluorescentes.

De los 223 aislamientos bacterianos, 23 (10.3%) aislamientos fueron seleccionados por la capacidad de producir fluorescencia, de los cuales 8 (34.8%) (1S-28, 1S-37, 2S-6, 2S-7, 2S-9, 2S-10, 3S-2 y 4S-4) aislamientos bacterianos fluorescentes fueron encontrados en suelo, y 15 (65.2%) (1R-19, 2R-2, 3R-4, 4R-1, 4R-2, 4R-3, 4R-4, 4R-5, 4R-6, 6R-1, 6R-2, 6R-8, 6R-9, 7R-8 y 9R-6) aislamientos bacterianos fluorescentes encontrados en raíz. Dicha fluorescencia se determinó con la ayuda de la lámpara de luz ultravioleta Desaga Uvis a 366nm. Cabe señalar que el mayor número de aislamientos bacterianos fluorescentes fue obtenido en la localidad 4 siendo de 7 aislamientos que corresponde al 30.4%, de los cuales 1 (14.3%) aislamiento fue obtenido de suelo y 6 (85.7%) aislamientos obtenidos de la raíz, seguida de la localidad 2 con 5 aislamientos bacterianos fluorescentes que representa el 21.4% de los cuales 4 (80%) fueron aislados de suelo y 1 (20%) aislamiento bacteriano de

raíz. En la localidad 6 se encontraron 4 aislamientos fluorescentes que representa el 17.4%, de los cuales el 100% fue aislado de raíz. Debe indicarse que no en todas las localidades se encontró presencia de aislamientos fluorescentes. Respecto a la pruebas de patogenicidad ninguno de los aislamientos bacterianos fluorescentes se encontró ningún que diera positiva tanto a las pruebas de hipersensibilidad en plantas de tabaco (*Nicotiana*) como en prueba de pudrición de papa por lo que se concluye que no son fitopatógenas.

4.1.2 Selección de los aislamientos bacterianos del género *Bacillus sp.*

De los 223 aislamientos bacterianos, 28 (12.6%) aislamientos fueron seleccionados primeramente por la caracterización en cuanto al crecimiento característico (forma rugosa en medio B de King), aspecto de las colonias, coloración de las colonias y por dar positivo en la prueba de pudrición de papa. En cuanto al de total de los 28 aislamientos bacterianos del género *Bacillus sp.*, 8 (28.6%) (1S-21, 1S-33, 1S-34, 1S-39, 5S-4, 5S-6, 6S-2 y 6S-3) aislamientos bacterianos fueron encontrados en suelo y 20 (71.4%) (1R-5, 1R-17, 1R-17a, 1R-18, 5R-1, 5R-1a, 5R-2, 5R-3, 5R-3a, 5R-4, 5R-4a, 5R-5a, 5R-6, 5R-8, 5R-9, 5R-10, 6R-3, 6R-6, 6R-7 y 8R-3) aislamientos bacterianos se aislaron de raíz. El mayor número de aislamientos del género *Bacillus sp.*, se encontró en la localidad 5 con un total de 14 aislamientos que representa el 50%, de los cuales 2 (14.3%) aislamientos bacterianos fueron de suelo y 12 (85.7%) aislamientos bacterianos fueron de raíz. Seguida de la localidad 1 con 8 aislamientos del género *Bacillus sp.*, que representa el 28.5%, de los cuales 4 (50%) aislamientos bacterianos fueron de suelo y 4 (50%) aislamientos bacterianos fueron de raíz. Por último en la localidad 6 con un total de 6 aislamientos que representa el 21.4% de los cuales 2 (33.3%) fueron aislamientos bacterianos de suelo y 4 (66.7%) aislamientos bacterianos de raíz. Cabe señalar que no en todas las localidades se obtuvieron aislamientos

del género *Bacillus sp.* Respecto a la prueba de hipersensibilidad en planta de tabaco (*Nicotiana*) ninguno de los aislamientos bacterianos de este género dio prueba positiva por lo que se determina que no son fitopatógenas.

4.1.3 Germinación de semilla de alfalfa inoculada con aislamientos bacterianos fluorescentes.

Una vez seleccionados los 23 aislamientos bacterianos fluorescentes y sabiendo que no presentaban patogenicidad se procedió a realizar pruebas de germinación la cual consistió en germinar lotes de 100 semillas de alfalfa en presencia de la suspensión bacteriana con cada uno de los 23 aislamientos fluorescentes. Cada determinación se llevó a cabo por duplicado, los cultivos fueron previamente crecidos en medio B de King líquido y un testigo (semilla de alfalfa con 3 mL de agua destilada). Las semillas de alfalfa se colocaron en cajas de Petri de plástico con papel (toalla interdoblada, MARQUIS Georgia Pacific) y se les agregó 3 mL de cada uno de los cultivos bacterianos fluorescentes. Posteriormente fueron colocados en la cámara de germinación (humedad relativa 100% temperatura 28 °C +/-1) y la germinación se evaluó diariamente durante 12 días. Los resultados que se presentan a continuación son el promedio de la germinación y la velocidad media de germinación (T_{50}). (Cuadro 11).

Cuadro 11. Germinación de semilla de alfalfa inoculada con cultivos bacterianos crecidos en medio B de King líquido de los aislamientos fluorescentes y velocidad media de germinación (T_{50}).

Aislamiento	Germinación	T_{50}
1S-28	65	59
1S-37	66	59
1R-19	62	58
2S-6	78	49
2S-7	73	34
2S-9	88	60
2S-10	78	37
2R-2	56	58
3S-2	0	0
3R-4	2	0
4S-4	69	46
4R-1	80	73
4R-2	86	42
4R-3	81	50
4R-4	75	63
4R-5	74	44
4R-6	76	68
6R-1	83	59
6R-2	86	43
6R-8	89	58
6R-9	76	41
7R-8	79	43
9R-6	77	60
Testigo	88	17

En el cuadro 11 se puede observar que solo un aislamiento fluorescente (6R-8) presentó mayor germinación que el testigo, pero su T_{50} es mayor al del testigo. También se puede observar que el aislamiento fluorescente 2S-9 (4.3%) que se obtuvo a partir de muestra de suelo, presentó el mismo número de semillas germinadas que el testigo, pero su T_{50} fue mayor. Por otro lado se puede apreciar que existen dos aislamientos que inhiben la germinación como son los aislamientos 3S-2 que se obtuvo de muestras de suelo y 3R-4 que se obtuvo de muestras de raíz. En cuanto a la velocidad media de germinación (T_{50}), se puede apreciar que todas las semillas inoculadas con los aislamientos bacterianos fluorescentes presentaron mayor T_{50} comparados con el testigo.

4.1.4 Germinación de semilla de alfalfa inoculada con aislamientos del género *Bacillus sp.*

Una vez seleccionados los 28 aislamientos bacterianos del género *Bacillus sp* y sabiendo que no presentaban patogenicidad, se procedió a realizar pruebas de germinación la cual consistió en germinar 100 semillas de alfalfa previamente inoculadas con suspensiones bacterianas de cada uno de los 28 aislamientos del género *Bacillus sp* y un testigo el cual solo era la semilla de alfalfa con 3 mL de agua destilada. Una vez desinfectada la semilla de alfalfa se procedió a inocularlas, posteriormente las semillas de alfalfa se colocaron en cajas de Petri de plástico con papel (toalla interdoblada, MARQUIS Georgia Pacific) y se les agregó 3 mL de agua destilada estéril y por último fueron colocadas en la cámara de germinación (humedad relativa 100% temperatura 28 °C +/-1), la germinación se evaluó diariamente durante 12 días. Los resultados que se presentan a continuación son el promedio de la germinación y la velocidad media de crecimiento (T_{50}), (Cuadro 12).

Cuadro 12. Germinación de semilla de alfalfa inoculada con suspensiones bacterianas de los aislamientos género *Bacillus* y velocidad media de germinación (T_{50}).

Aislamiento	Germinación	T_{50}
1S-21	86	16
1S-33	81	14
1S-34	79	21
1S-39	76	16
1R-5	84	13
1R-17a	86	15
1R-17b	85	16
1R-18a	80	16
5S-4	79	20
5S-6	79	17
5R-1	82	16
5R-1a	83	15
5R-2	79	17
5R-3	85	15
5R-3a	79	16
5R-4	86	17
5R-4a	85	17
5R-5a	81	16
5R-6	79	17
5R-8	84	31
5R-9	88	25
5R-10	82	17
6S-2	87	18
6S-3	79	14
6R-3	77	28
6R-6	85	23
6R-7	84	16
8R-3	87	20
Testigo	82	20

En el cuadro 12 se puede observar que 14 (50%) (1S-21, 1R-5, 1R-17a, 1R-17b, 5R-1a, 5R-3, 5R-4, 5R-4a, 5R-8, 5R-9, 6S-2, 6R-6, 6R-7 y 8-R-3) aislamientos bacterianos presentaron mayor germinación que el testigo, de los cuales solo 2 son (14.3%) aislamientos de suelo y 12 (85.7%) se obtuvieron de la raíz. Dos aislamientos presentaron el mismo número de semillas germinadas que el testigo 5R-1 y 5R-10. Por otra parte se encontró que el aislamiento bacteriano 1S-39 fue el que tuvo menor número de semillas germinadas. En cuanto a la velocidad media de germinación se puede observar que 20 (71.4%) aislamientos bacterianos tuvieron menor T_{50} que el testigo.

4.1.5 Clasificación de los aislamientos bacterianos por la producción de pigmentos fluorescentes.

Se procedió a determinar cuantos de los 23 aislamientos bacterianos fluorescentes producían mayor fluorescencia. Se señala que la absorbencia fue leída de 400 a 405 nm (Cuadro 13), en un espectrofotómetro de doble rayo (Baush & Lomb Spectronic 2000). Los aislamientos bacterianos fluorescentes primeramente fueron inoculados en 3 mL de medio B de King líquido para su desarrollo, a las 24 h de cada uno de los cultivos bacterianos se tomaron 50 μ L y se inocularon en 3.5 mL de medio mínimo carente de hierro (RM-Fe) que es un inductor para la producción de pigmentos fluorescentes, y se dejan en agitación durante 24 h. Una vez transcurrido el tiempo de las muestras con el medio inductor, se toman 600 μ L del cultivo bacteriano y se centrifuga durante 6 min; posteriormente del sobrenadante se toman 100 μ L y se depositan en tubos que contienen 2 mL de agua destilada estéril, se agitan y a continuación se procedió a leer absorbencia.

Cuadro 13. Lecturas de absorbencia en medio mínimo carente de hierro (RM-Fe) a 400 y 405 nm., de los 23 aislamientos bacterianos productores de pigmentos fluorescentes.

Aislamiento	400 nm	405 nm	Aislamiento	400 nm	405 nm
1S-28	0.104	0.099	4R-2	0.033	0.034
1S-37	0.037	0.037	4R-3	0.037	0.037
1R-19	0.024	0.024	4R-4	0.027	0.027
2S-6	0.066	0.065	4R-5	0.024	0.024
2S-7	0.127	0.122	4R-6	0.019	0.019
2S-9	0.126	0.122	6R-1	0.015	0.014
2S-10	0.234	0.225	6R-2	0.021	0.021
2R-2	0.156	0.151	6R-8	0.032	0.032
3S-2	0.072	0.071	6R-9	0.023	0.024
3R-4	0.067	0.067	7R-8	0.009	0.008
4S-4	0.056	0.054	9R-6	0.023	0.022
4R-1	0.027	0.027			

En el cuadro 13 se presentan los resultados de una sola evaluación de absorbencia; además, se puede observar que la mayor lectura de absorbencia por parte de los aislamientos bacterianos

fluorescentes fue a los 400 nm. Por otra parte, se puede observar que la mayor lectura de absorbencia fue presentada a los 400 nm por el aislamiento 2S-10 y la menor por el aislamiento 7R-8 a la misma longitud de onda.

Una vez determinada la longitud de onda a utilizar, se procedió a realizar tres experimentos bajo las mismas condiciones del experimento anterior para seleccionar 3 aislamientos bacterianos fluorescentes que presentaran mayor lectura de absorbencia; así como también, el que menor absorbencia presentara a 400 nm para poderlos utilizar en los experimentos siguientes, los resultados se presentan a continuación (Cuadro 14).

Cuadro 14. Lectura de absorbencia de tres experimentos a 400 nm en medio mínimo carente de hierro (RM-Fe), de los 23 aislamientos bacterianos fluorescentes.

Aislamiento	Absorbencia 1	Absorbencia 2	Absorbencia 3	Promedio
1S-28	0.104	0.095	0.107	0.102
1S-37	0.037	0.018	0.024	0.026
1R-19	0.024	0.012	0.011	0.016
2S-6	0.066	0.064	0.062	0.064
2S-7	0.127	0.106	0.145	0.126
2S-9	0.126	0.142	0.148	0.139
2S-10	0.234	0.151	0.154	0.180
2R-2	0.156	0.181	0.134	0.157
3S-2	0.072	0.05	0.05	0.057
3R-4	0.067	0.048	0.063	0.059
4S-4	0.056	0.010	0.005	0.023
4R-1	0.027	0.014	0.018	0.020
4R-2	0.033	0.034	0.038	0.035
4R-3	0.037	0.04	0.035	0.037
4R-4	0.027	0.037	0.031	0.032
4R-5	0.024	0.033	0.032	0.030
4R-6	0.019	0.049	0.035	0.106
6R-1	0.015	0.023	0.025	0.021
6R-2	0.021	0.019	0.022	0.020
6R-8	0.032	0.010	0.02	0.020
6R-9	0.023	0.020	0.019	0.020
7R-8	0.009	0.015	0.036	0.020
9R-6	0.023	0.020	0.019	0.020

En el cuadro 14 se observa que los aislamientos bacterianos fluorescentes que mayor absorbencia presentaron fueron el 2S-10 (0.180), 2R-2 (0.157), 2S-9 (0.139) y el

aislamiento bacteriano que menor absorbencia presentó es 1R-19 (0.016) a la longitud de onda de 400 nm.

Una vez determinados los aislamientos bacterianos fluorescentes, se continuó con la siguiente fase que consistió en inocular las semillas de alfalfa con cada uno de los aislamientos para posteriormente ser evaluados bajo la presencia de cobre y así poder determinar la cantidad de cobre absorbido en tallo y en raíz de la planta de alfalfa.

4.2 Acumulación de cobre en plántulas desarrolladas en la solución Steiner con CuSO₄.

El experimento consistió en pesar 0.5g de semilla de alfalfa, posteriormente esta semilla fue desinfectada bajo las condiciones establecidas, posteriormente se prepararon las suspensiones bacterianas para el desarrollo de cada uno de los cuatro aislamientos bacterianos fluorescentes en medio B de King sólido, una vez desarrollados, se procedió a tomar la cantidad de células necesarias hasta obtener una concentración de aproximada de 1×10^8 ufc (0.1 absorbencia a 660 nm) y depositarlas en tubos de ensayo que contenían 5 mL de agua destilada, una vez listas las suspensiones se procedió a inocular las semillas. A continuación las semillas de alfalfa fueron colocadas en cajas de Petri de vidrio con papel (toalla interdoblada, MARQUIS Georgia Pacific) y humedecidas con 5 mL de agua destilada estéril, y colocadas en una cámara de germinación (humedad relativa 100% y temperatura 28 °C +/-1) durante tres días. Una vez cumplido ese periodo, cada una de las cajas con semillas germinadas no inoculadas o inoculadas con la suspensión bacteriana de los aislamientos bacterianos fluorescentes fueron cambiadas a cajas de Petri de cristal que contenían 5 mL de solución nutritiva Steiner al 25% y solución nutritiva Steiner-Cu, donde permanecieron durante 5 días. Una vez cumplido el tiempo de crecimiento, se evaluó el número total de

plántulas (Cuadro 15). Los datos presentados a continuación son el promedio de tres experimentos.

Cuadro 15. Número de plántulas de alfalfa sin inocular e inoculadas con suspensiones de células de los aislamientos bacterianos fluorescentes, crecidas en solución nutritiva de Steiner, Steiner-Cu.

Medio de desarrollo	Semillas con suspensiones bacterianas	Exp. 1	Exp. 2	Exp.3	Total
Steiner-Cu	2S-10	346	400	380	1126
	2R-2	366	418	397	1181
	2S-9	277	410	385	1072
	1R-19	423	434	370	1227
	Control	457	490	370	1317
Steiner	Testigo	490	495	402	1387

En el cuadro 15 se puede observar que el mayor número de plántulas obtenidas fueron aquellas desarrolladas en el medio de germinación de solución nutritiva Steiner. Por otra parte, de las semillas que fueron tratadas, con la que menor número de plántulas se obtuvieron fue con las semillas inoculadas con el aislamiento bacteriano fluorescente 2S-9.

4.2.1 Determinación de longitud de plántulas de alfalfa desarrolladas en solución nutritiva Steiner y Steiner-Cu.

Otra determinación realizada fue determinar la longitud de las plántulas de alfalfa. La cual consistió en tomar 10 plántulas al azar, cuando tenían ocho días de desarrollo bajo las condiciones establecidas anteriormente. Los resultados se muestran a continuación (Cuadro 16).

Cuadro 16. Promedio de longitud (cm) y relación raíz/tallo de 10 plántulas de alfalfa.

Medio de desarrollo	Semillas con suspensiones bacterianas	Tallo (cm)	Raíz (cm)	Relación
Steiner-Cu	2S-10	1.92	1.08	0.56
	2R-2	1.79	1.01	0.56
	2S-9	1.69	0.91	0.54
	1R-19	1.86	0.92	0.49
	Control	1.93	0.96	0.50
Steiner	Testigo	3.04	2.57	0.85

En el cuadro 16 se puede observar que las plántulas que presentaron mayor tamaño tanto de tallo como de raíz fueron las que estuvieron crecidas en solución Steiner. Por otra parte se observa que las plántulas de las semillas desarrolladas en solución Steiner-Cu e inoculadas presentaron longitud tanto de tallo como de raíz muy similares.

4.2.2 Determinación del peso de biomasa seca en miligramos del total de plántulas desarrolladas en solución nutritiva Steiner y Steiner-Cu.

Una vez obtenidas las plántulas de alfalfa se procedió a seccionar las plántulas separándolas en tallo y raíz para posteriormente ser secadas y pesadas. El promedio de los tres experimentos se presenta a continuación (Cuadro 17).

Cuadro 17. Promedio de peso seco en mg de tallo y raíz de plántulas de alfalfa.

Medio de desarrollo	Semillas con suspensiones bacterianas	Tallo (mg)	Raíz (mg)	Relación
Steiner-Cu	2S-10	1.8	0.6	0.34
	2R-2	1.7	0.6	0.36
	2S-9	1.7	0.6	0.36
	1R-19	1.6	0.5	0.31
	Control	1.6	0.5	0.32
Steiner	Testigo	1.4	0.4	0.29

En el cuadro 17 se puede observar que existe poca diferencia en los pesos tanto en tallo como en raíz, puesto que la finalidad de la obtención de peso seco, fue obtener 0.5g de materia seca que era la cantidad mínima necesaria para hacer la cuantificación de Cu absorbido tanto por el tallo como en la raíz.

4.3 Determinación de Cu absorbido por plántulas de alfalfa.

Una vez determinado el peso y longitud se procedió a determinar la cantidad de Cu absorbido en tallo y en raíz de cada uno de los tratamientos. Lo cual se realizó de la siguiente

manera: primeramente las muestras por separado fueron pulverizadas, posteriormente se pesaron 0.5 g de cada una de las muestras y fueron colocadas en tubos de digestión donde se les añadió H₂O₂ y una mezcla de ácidos HClO₄ y H₂SO₄, posteriormente estas muestras fueron puestas a predigestar durante 24 h. Cumplidas las 24 h los tubos son lavados con 1 mL agua desionizada y posteriormente se hacen pasar por papel filtro y el filtrado se recoge en otro recipiente. Posteriormente se realiza una dilución la cual se menciona anteriormente y por último se procede a leer absorbancia en el Espectrómetro de Absorción Atómica Perkin-Elmer 3110. Los resultados se presentan a continuación (Cuadro 18).

Cuadro 18. Determinación de Cu acumulado en tallo y raíz de plántulas de alfalfa.

Medio de desarrollo	Semillas con suspensiones bacterianas	Absorbencia a 324.8 nm		Acumulado* (mg/kg)		
		Tallo	Raíz	Tallo	Raíz	Relación
Steiner-Cu	2S-10	6.236	15.96	1247.2	3192	2.6
	2R-2	5.115	18.02	1023	3604	3.5
	2S-9	6.046	19.79	1209	3958	3.3
	1R-19	4.755	16.92	951	3384	3.6
	Control	4.728	17.69	945.6	3538	3.7
Steiner	Testigo	0.274	0.483	54.8	97	1.8

*Acumulado= mg de Cu por kg de materia seca.

En el cuadro 18 se puede observar que la mayor acumulación de Cu en lo que respecta a tallo fue encontrada en las plántulas de semillas que fueron inoculadas con el aislamiento 2S-10.

Por otra parte la mayor concentración de Cu acumulada siempre se encontró en la raíz.

Una vez determinado el Cu acumulado tanto en tallo como en raíz se procedió a realizar una serie de cálculos los cuales se muestran a continuación y ayudaron a determinar el factor de translocación, el coeficiente de enriquecimiento y por último el factor de acumulación.

4.3.1 Factor de translocación.

Una vez obtenidos los resultados de acumulación de Cu en tallo y raíz en cada uno de los tratamientos a las plántulas de alfalfa se procedió a determinar el factor de translocación:

$$\text{Factor Translocación} = [\text{Cu en el Tallo}] / [\text{Cu en la raíz}]$$

que es igual a la acumulación de Cu en el tallo entre la acumulación de Cu en la raíz, los resultados se presentan a continuación (Cuadro 19).

Cuadro 19. Determinación del factor de translocación de las plántulas de alfalfa.

Medio de desarrollo	Semillas con suspensiones bacterianas	Tallo mg/kg	Raíz mg/kg	Factor de Translocación
Steiner-Cu	2S-10	1247.2	3192	0.39
	2R-2	1023	3604	0.28
	2S-9	1209	3958	0.30
	1R-19	951	3384	0.28
	Control	945.6	3538	0.26
Steiner	Testigo	54.8	97	0.56

En el cuadro 19 se puede observar que las plántulas de las semillas que fueron inoculadas, la que mayor translocación de Cu presentó, fueron las plántulas de semillas inoculadas con el aislamiento 2S-10.

4.3.2 Coeficiente de Enriquecimiento.

Otra determinación realizada a los datos obtenidos de acumulación de Cu fue el coeficiente de enriquecimiento, el cual consiste en dividir la cantidad de Cu acumulado en el tallo de cada uno de los tratamientos entre la cantidad de Cu presente en la solución de Steiner que en este caso fue de 0.2 mg/mL.

$$\text{Coeficiente de Enriquecimiento} = [\text{Cu en el tallo}] / [\text{Cu en la solución}]$$

Los resultados obtenidos se presentan a continuación (Cuadro 20).

Cuadro 20. Determinación del coeficiente de enriquecimiento.

Medio de desarrollo	Semillas con suspensiones bacterianas	Tallo mg/kg	Coef. de Enriquecimiento mg/kg
Steiner-Cu	2S-10	1247.2	6236
	2R-2	1023	5115
	2S-9	1209	6045
	1R-19	951	4755
	Control	945.6	4728
Steiner	Testigo	54.8	274

En el cuadro 20 se puede observar que el tratamiento que mayor coeficiente de enriquecimiento obtuvo fue donde las plántulas de las semillas que estuvieron inoculadas con el aislamiento 2S-10.

4.3.3 Factor de acumulación.

De la misma forma se calculó el factor de acumulación, el cual consiste en dividir la concentración encontrada de Cu tanto en tallo como en raíz entre la concentración encontrada de Cu encontrado en las plántulas sin tratar, tanto de tallo como de raíz.

$$\text{Factor de Acumulación} = [\text{Cu tratada}] / [\text{Cu sin tratar}]$$

Los resultados se presentan a continuación (Cuadro 21).

Cuadro 21. Determinación del factor de acumulación de Cu en tallo y en raíz, así como su relación.

Medio de desarrollo	Semillas con suspensiones bacterianas	Cu absorbido		Factor de acumulación		
		Tallo mg/kg	Raíz mg/kg	Tallo	Raíz	Relación
Steiner-Cu	2S-10	1247.2	3192	1.32	0.9	0.68
	2R-2	1023	3604	1.09	1.01	0.92
	2S-9	1209	3958	1.28	1.11	0.86
	1R-19	951	3384	1.005	0.95	0.9
	Control	945.6	3538	1	1	1

En el cuadro 21 se observa por parte del tallo la mayor acumulación de Cu se presentó en las plántulas de las semillas que fueron tratadas con el aislamiento 2S-10 seguido del tratamiento 2S-9. Por parte de raíz se encontró que la mayor acumulación de Cu fue observada con el tratamiento inoculado con el aislamiento 2S-9, seguido del aislamiento 2R-2, y la que menor acumulación de Cu presentó fueron las plántulas de las semillas inoculadas con el aislamiento 2S-10.

V. DISCUSIÓN

5.1 Abundancia de poblaciones bacterianas por localidad.

La abundancia de poblaciones bacterianas en el suelo está determinada por las condiciones ambientales físicas y químicas que se presentan en el estrato superior del suelo (Hausenbuiller, 1981).

Durante el día, el mayor cambio de temperatura se presenta en la capa superficial del suelo disminuyendo con la profundidad de tal manera que a 40 cm de profundidad las variaciones de temperatura son menores; del mismo modo la capa superior del suelo está sujeta a las mayores variaciones del contenido de humedad y por lo tanto después de ocurridos los eventos de precipitación el agua continúa moviéndose a través de los estratos inferiores y también está sujeta a ser absorbida por las raíces o bien expuesta a la evaporación directa; como consecuencia, los primeros 15 cm de espesor presentan en lo general mayor aereación por los huecos que dejan las raíces y la fauna del suelo, la cual también contribuye a la aportación de materia orgánica (Baker, 1965).

En lo que respecta a las propiedades químicas del suelo que influyen en la clase y abundancia de microorganismos son el contenido de materia orgánica, pH, la salinidad y sodicidad del suelo.

A continuación para comparar las condiciones químicas del suelo en cuanto a contenido de materia orgánica y pH, en cada uno de los sitios de muestreo, se consideró con el trabajo de los perfiles de suelos de Ortiz et al. (2002). El valor promedio del contenido de materia orgánica de 2.2 % y de pH 7.9 de los nueve sitios se tomaron como referencia para hacer las comparaciones de los sitios muestreados.

Como se indicó con anterioridad, en el presente trabajo los muestreos que se realizaron en las diferentes localidades del predio del Colegio de Postgraduados fueron en diferentes épocas, llevándose a cabo los muestreos de las primeras cuatro localidades en el periodo de primavera y los últimos cinco durante el verano y otoño del año 2006. Las muestras se tomaron a la

profundidad de 0 a 30 cm por lo que las condiciones ambientales físicas pudieron influir en la abundancia de poblaciones bacterianas.

En las localidades 1, 4 y 7 el suelo tiene un contenido de MO mayor de 2.2 % y un pH menor de 7.9. En las localidades 2, 3 y 8, tienen un contenido de MO menor a 2.2 % y pH menor de 7.9 y finalmente los suelos de las localidades 5 y 6 tienen un contenido de materia orgánica mayor de 2.2 % y pH mayor de 7.9. Es importante resaltar que a pH mayor de 7.9 y con contenido de materia orgánica menor a 2.2% no se encontraron aislamientos bacterianos. Del mismo modo se observa que del grado de salinidad del suelo depende el desarrollo bacteriano y así, en este trabajo, en muestras de suelo que tenían una conductividad eléctrica mayor a 4.6 dS/m y contenido de materia orgánica menor a 2.2 % tampoco se encontró desarrollo bacteriano; sin embargo en suelos con valores de pH mayores a 7.9 y valores de conductividad eléctrica mayores a 4.6 dS/m y además con un contenido de materia orgánica mayor a 2.2 % se logró obtener aislamientos. Con este análisis introductorio se resalta la importancia del sustrato orgánico como fuente de energía para las bacterias aquí estudiadas.

Considerando los mismos valores de contenido de materia orgánica y pH promedio del suelo para las localidades del predio del Colegio de Postgraduados, se encontró que el número de aislamientos que para el caso de la raíz fue mayor cuando el contenido de MO en el suelo es menor del 2.2 % y pH menores de 7.9, lo que nos indica que las bacterias proliferan y se alimentan de los exudados producidos por las raíces (azúcares, amino ácidos, ácidos orgánicos, ácidos grasos y esteroides, factores de crecimiento, hormonas, etc.) los cuales también modulan el pH de la rizosfera, (Chiarine L. et al., 1998). Lynch (1990), menciona que la cantidad relativa de bacterias es mucho mayor en raíz que en suelo.

En lo que respecta a los aislamientos de microorganismos fluorescentes se encontró que el mayor número de estos aislamientos bacterianos fluorescentes se obtuvieron en las muestras de suelo cuyo valor de pH era menor a 7.9 y contenido de materia orgánica menor a 2.2%. La mayor cantidad de aislamientos bacterianos fluorescentes encontrados en raíz correspondió a las muestras de suelo que tienen un contenido de MO mayor a 2.2 %, sin embargo, también se encontraron en suelos con valores de pH mayores a 7.9. (Perotti et. al., 2005) reportan resultados similares demostrando que a mayor contenido de MO mayor cantidad de *Pseudomonas fluorescens*.

Los aislamientos bacterianos del género *Bacillus* obtenidos a partir de las muestras de suelo fueron mayores cuando el contenido de materia orgánica fue mayor a 2.2% y tanto a pH cerca de la neutralidad como a pH alcalino. Brock (1978) reporta que bacterias del género *Bacillus* pueden existir en un amplio rango de pH puesto que producen endoesporas las cuales las hacen resistentes tanto a diferentes pH como a altas temperaturas. Es de resaltar en este caso que el contenido de materia orgánica del suelo es muy importante ya que no se logró obtener algún aislamiento en suelos con contenidos de materia orgánica menor a 2.2 % y prácticamente lo mismo se observó para el caso cuando se analizaron los aislamientos encontrados en muestras de raíz.

5.2 Biodiversidad bacteriana en las nueve localidades del predio del Colegio de Posgraduados.

En lo que respecta a los 223 aislamientos bacterianos colectados de los campos experimentales del predio del Colegio de Posgraduados se encontró una gran diversidad. Las cuales fueron clasificadas y diferenciadas de acuerdo a su velocidad de desarrollo, tamaño de la colonia, coloración de la colonia, fluorescencia, ya que como se sabe entre bacterias del mismo género existen grandes diferencias. En esta investigación se encontró que el mayor número de aislamientos fue encontrado en muestras de suelo, de los cuales el 51.6% fueron bacterias de crecimiento intermedio y 35.6% de crecimiento lento, mientras que en raíz el mayor porcentaje bacterias presentaron crecimiento intermedio 39.8%. Con los resultados encontrados y tomando en cuenta las características anteriormente mencionadas se procedió a seleccionar los géneros de interés en esta investigación, que fueron *Pseudomonas* y *Bacillus* a los cuales se les procedió a inocular en semillas de alfalfa para determinar el efecto que tendrían en la germinación.

5.3 Pruebas de germinación de semillas de alfalfa inoculadas con suspensiones bacterianas de los aislamientos del género *Pseudomonas* y *Bacillus*.

En cuanto a la germinación de semillas de alfalfa inoculadas con suspensiones celulares de aislamientos bacterianas fluorescentes se encontró que no tienen ningún efecto significativo en el porcentaje de germinación. Este resultado contrasta con lo reportado por Carrillo et al.,

2003 quienes indican que semillas inoculadas con cepas de *Pseudomonas sp* crecidas en medio RM-Fe incrementaron el porcentaje en la germinación de semilla de alfalfa.

Es importante resaltar que además existieron dos suspensiones celulares de aislamientos bacterianos fluorescentes (3S-2 y 3R-4) que inhibieron la germinación de semillas de alfalfa. Probanza et. al., (1996) menciona que existe un grupo de bacterias DRB (deleteriosos rizobacteria) que reducen la germinación, más no la inhiben. Por otra parte se encontró que al realizar la prueba de patogenicidad (hipersensibilidad en planta de tabaco y pudrición de papa), estos dos aislamientos no dieron resultado positivo. De la misma forma se encontró que estos dos aislamientos bacterianos fluorescentes no presentaron alta producción de sideróforos comparados con los aislamientos seleccionados (2S-10, 2R-2 2S-9 y 1R-19); por lo tanto; es importante estudiar estas dos cepas para investigar la razón del porque son capaces de inhibir la germinación de semilla de alfalfa ya que se sabe que las *Pseudomonas fluorescens* pertenecen al grupo de bacterias PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Lemaneceau, 1992).

Por otra parte, se encontró que los aislamientos fluorescentes seleccionados 2S-10, 2R-2 2S-9 y 1R-19; no inhibieron y ni promovieron tampoco el porcentaje de germinación de la semilla de alfalfa ya que los resultados encontrados muestran que fueron similares al testigo (Cuadro 1 Anexo 1). Con lo que respecta al T_{50} que nos indica la velocidad en la que germina el 50% de las semillas viables, de estos cuatro aislamientos ninguno presentó mayor velocidad de germinación T_{50} comparado con el testigo. Por lo que se dice que al inocular las semillas de alfalfa con estos cuatro aislamientos no existe ningún efecto sobre la velocidad media de germinación, es decir no disminuye el tiempo en el que germina el 50% de las semillas viables.

En lo que respecta a las semillas de alfalfa inoculadas con suspensiones celulares del género *Bacillus* se encontró que no incrementaron el porcentaje de germinación en las semillas de alfalfa; sin embargo, no inhiben ni retardan la germinación (Cuadro 2). Probanza et. al., (1996) mencionan que existen algunas bacterias del género *Bacillus* que estimulan la germinación y el crecimiento vegetal mediante la producción de auxinas (Gutiérrez et. al., 1996). Lo mencionado anteriormente contrasta con los resultados encontrados, puesto que no se encontró algún efecto significativo en el porcentaje de germinación de las semillas de alfalfa inoculadas con los aislamientos del género *Bacillus*. Con lo que respecta al T_{50} los

resultados muestran que no existió aislamiento del género *Bacillus* que presentara menor valor de velocidad media de germinación comparada con el testigo (Cuadro 12).

5.4 Potencialidad de la plántula de alfalfa para acumular Cu por si misma.

El objetivo de evaluar a las plántulas de alfalfa crecidas en solución Steiner (testigo) y Steiner-Cu fue para determinar la capacidad de esta plántula de absorber Cu por la raíz y transportarlo a la parte aérea así como también el posible efecto que pudiera tener este elemento sobre la plántula. Los resultados arrojados de tres experimentos (Cuadro 15) muestran que el mayor número de plántulas se obtuvo con las semillas de alfalfa que fueron crecidas en solución Steiner. De la misma forma se evaluó la longitud de las plántulas tanto tallo como raíz. Los resultados muestran (Cuadro 16) que las plántulas desarrolladas en solución Steiner presentaron mayor longitud tanto de tallo como de raíz superando en un 41.2% a las plántulas desarrolladas en Steiner-Cu. Los resultados encontrados concuerdan con lo reportado por Burd et. al. (2000) ya que mencionan que los metales pesados en este caso el Cu, en altas concentraciones reduce el tamaño tanto de tallo como de raíz. En lo que respecta a peso seco de materia tanto de tallo como en raíz se encontró que las que presentaron mayor peso fueron las plántulas desarrolladas en medio Steiner-Cu superando al testigo en lo que respecta a tallo en 14.3% y en raíz 2.5%.

Por otra parte se determinó la cantidad de Cu acumulado tanto en tallo como en raíz de plántulas crecidas en solución Steiner y Steiner-Cu, los resultados muestran que la mayor cantidad de Cu fue encontrada en la raíz en plántulas desarrolladas en solución Steiner-Cu (Cuadro 18). Burd et. al., (2000), mencionan que las plantas de mostaza de la India sembradas en suelo con alto contenido de Ni, el mayor contenido de Ni y Pb fue encontrado en la raíz.

Una vez determinada la cantidad de Cu encontrada tanto en tallo como en raíz, se procedió a determinar el coeficiente de translocación, coeficiente de enriquecimiento y por último el factor de acumulación. En cuanto al coeficiente de translocación (Cuadro 19) los resultados encontrados demuestran que el mejor valor fue encontrado en las plántulas testigo superando a las plántulas desarrolladas en Steiner-Cu en un 53.6% probablemente debido a que la plántula solo tomo el Cu necesario para su desarrollo, por lo que se dice que el testigo transporto mayor Cu en proporción que las plántulas desarrolladas en solución Steiner-Cu.

Con lo que respecta a factor de enriquecimiento (Cuadro 20) y factor de acumulación (Cuadro 21) la que presentó mayores valores fueron las plántulas desarrolladas en solución Steiner-Cu debido a que esta solución contenía mayor cantidad de Cu, por lo tanto era razonable obtener estos resultados. Por lo que se puede concluir que la alfalfa es recomendable para procesos de fitorremediación ya que las cantidades de Cu encontradas muestran que esta planta puede ser llamada hiperacumuladora. Puesto que una planta hiperacumuladora es aquella que acumula 1 mg/kg de Cu de materia seca en la parte aérea. (Chaney et. al., 2000).

5.5 Contribución o mejoramiento de las condiciones de absorción de Cu en las plántulas de alfalfa por la presencia de células bacterianas fluorescentes asociadas a la raíz.

El siguiente paso consistió en evaluar la contribución de la inoculación de las semillas de alfalfa con los cuatro aislamientos fluorescentes para determinar si estos aumentaban tanto la absorción por parte de la raíz como la translocación a la parte aérea. Como se mencionó anteriormente los aislamientos que exhibieron los mayores valores de absorbencia fueron: 2S-10, 2R-2 y 2S-9 y el que menor valor de absorbencia presentó fue el aislamiento 1R-19 (Cuadro 14).

Con las suspensiones bacterianas de estos cuatro aislamientos bacterianos fluorescentes seleccionados se procedió a inocular la semilla de alfalfa para determinar el efecto que presentaba los sideróforos producidos por los aislamientos de *Pseudomonas* seleccionadas así como también el efecto de la solución de Steiner-Cu (control) sobre el desarrollo de plántulas generadas. Los resultados arrojados de tres experimentos (Cuadro 15), muestran que el mayor número de plántulas fue obtenido con las plántulas desarrolladas en la solución control, superando en número a las plántulas desarrolladas de las semillas que fueron inoculadas con los cuatro aislamientos fluorescentes.

Con los resultados encontrados del porcentaje de germinación descritos anteriormente y los resultados encontrados de el número de plántulas se dice que no existe efecto estimulante significativo por parte de los cuatro aislamientos del género *Pseudomonas* seleccionados por el cual se recomienda la inoculación de semillas de alfalfa.

5.6 Mediante la asociación de las bacterias con la raíz de las plántulas de alfalfa y desarrolladas en solución Steiner-Cu, se puede favorecer el desarrollo de algunos de los órganos de interés: Tallo y raíz.

Los resultados encontrados demuestran que inoculando las semillas con el aislamiento 2S-10 la longitud de tallo fue muy similar a la longitud del tallo presentada por las plántulas que fueron crecidas en la solución control, mientras que la longitud de la raíz de las plántulas que fueron inoculadas fue mayor. Por otro parte se observa (Cuadro 16) que la mejor longitud tanto de tallo como de raíz fue presentada por las plántulas de las semillas que fueron inoculadas con el aislamiento 2S-10, lo que nos indica que los sideróforos producidos por este aislamiento si presentan efecto sobre el desarrollo de las plántulas de alfalfa. Carrillo *et al.*, (2003) reportan que semillas de alfalfa inoculadas con 3 cepas de *Pseudomonas* desarrolladas en medio mínimo sin fierro, produjeron plántulas de mayor tamaño

Por otra parte se encontró que inoculando la semilla de alfalfa con suspensiones celulares del aislamiento 2S-10, se obtuvo mayor peso de materia seca en lo que respecta a parte aérea incluso superando en 12.5% al control. Cabe señalar que no todas las plántulas de las semillas que fueron inoculadas con las suspensiones bacterianas presentaron mayor peso de materia seca en parte aérea que el control. Mientras que el peso de materia seca obtenido en raíz de las semillas inoculadas fueron similares entre si inclusive comparándolo con el control (Cuadro 17). Es importante decir que el mayor peso de materia seca obtenida tanto de parte aérea como de raíz fue presentado por las semillas que fueron inoculadas, así como también crecidas en la solución de Steiner-Cu. La importancia de los resultados encontrados radica en que las bacterias y la solución de Steiner-Cu tienen efecto sobre el peso de materia seca de la parte aérea y da una clara idea de la contribución de las bacterias a la absorción del Cu por parte de las raíces y la promoción de la translocación del Cu a la parte aérea de las plántulas.

5.7 Cuantificación de la promoción de las bacterias en la absorción de Cu de la raíz y translocación a la parte aérea en plántulas de alfalfa.

El objetivo de evaluar la cantidad de Cu presente en raíz y tallo fue para determinar la contribución de los aislamientos fluorescentes a la translocación de este elemento puesto que la finalidad de esta investigación fue determinar que tanto Cu fue transportado a la parte

aérea de la plántula para ver si es recomendable la aplicación de esta metodología para procesos de fitorremediación. Los resultados demuestran que la mayor concentración de Cu absorbida por las plántulas de alfalfa se encontró en las plántulas provenientes de las semillas que fueron inoculadas con los aislamientos bacterianos fluorescentes. Con lo que respecta al tallo, se encontró que el aislamiento que más contribuyó a la translocación de Cu fue el aislamiento 2S-10 con un total de 1247.2 mg/kg (miligramos de Cu/ kg de materia seca), mientras que las plántulas generadas a partir de semillas que fueron tratadas con la solución control fueron de 945.6 mg/kg. En raíz se encontró mayor concentración Cu en todos los experimentos. Carrillo et. al., (2005) menciona que en plántulas de frijol inoculadas con bacterias del género *Pseudomonas*, la mayor cantidad de Cu fue encontrada en raíz, de la misma forma Burd et. al., (2000), menciona que plantas de mostaza de la India sembradas en suelo con alto contenido de Ni el mayor contenido de Ni y Pb fue encontrado en raíz y no en tallo.

Comparando el aislamiento 2S-10 contra las plántulas de las semillas que fueron tratadas con Cu pero no inoculadas se puede ver (Cuadro18), que en tallo, la mayor absorción de Cu fue presentada por el aislamiento 2S-10, mientras que en raíz la mayor acumulación fue presentada por la inoculación con el aislamiento 2S-9, es importante señalar que aunque ambos aislamientos fueron seleccionados en la misma localidad y presentaron características similares no contribuyeron de la misma forma, lo que corrobora lo anteriormente descrito que entre bacterias del mismo género existen diferencias.

5.8 Cuantificación de la translocación de Cu de la raíz al tallo en plántulas de alfalfa.

Una vez determinado la contribución de las células de los aislamientos en la absorción del Cu y el efecto sobre las plántulas de alfalfa se procedió a realizar algunos cálculos los cuales sirven para la cuantificación de Cu en la plántula de alfalfa para determinar hasta que punto es recomendada la utilización de estas cepas fluorescentes. En la determinación del factor de translocación se encontró que las plántulas generadas a partir de las semillas que fueron inoculadas con el aislamiento 2S-10 fueron las mejores superando a las plántulas control en un 50%. Por otra parte las plántulas que menos translocaron Cu de la raíz al tallo fueron las plántulas control (Cuadro 19), nuevamente se corrobora la influencia que ejerce la inoculación de semillas de alfalfa con aislamientos fluorescentes. Carrillo et al., (2005) reporta que comportamiento similar existe en plántulas de frijol inoculadas con distintas

cepas, de la misma forma Clarke *et al.*, (1987) demostró que cuando el Cu es atrapado por los sideróforos producido por células de *Anabaena sp* el efecto toxico del Cu es disminuido y por lo tanto no causa toxicidad.

5.9 Cuantificación del factor de enriquecimiento en plántulas de alfalfa.

En la determinación del factor de enriquecimiento, el mayor valor presentado fueron las plántulas de las semillas inoculadas con el aislamiento 2S-10 superando a las plántulas control en un 32.9%. Las plántulas que menor valor del factor de enriquecimiento presentaron fueron las plántulas control seguidas por las plántulas desarrolladas a partir de las semillas inoculadas con el aislamiento 1R-19, cabe resaltar que este aislamiento fue el que menor producción de sideróforos presentó. Con los resultados encontrados se concluye que los sideróforos juegan un papel importante en la absorción de Cu por parte de la planta y es recomendable su utilización.

5.10 Cuantificación de la acumulación de Cu en raíz y tallo de plántulas de alfalfa.

La mayor acumulación de Cu se encontró en la raíz en general, pero las plántulas generadas a partir de las semillas inoculadas con el aislamiento 2S-9 fue donde mayor cantidad de Cu se encontró (40.8mg/kg) y donde menor cantidad de Cu se encontró fue en las raíces de las semillas inoculadas con el aislamiento 2S-10 (32.91 mg/kg). En tallo se encontró que la mayor acumulación de Cu fue en las plántulas inoculadas con el aislamiento 2S-10 (32.91 mg/kg) y donde menor acumulación de Cu se encontró fue en las plántulas control (17.25 mg/kg) con un valor similar a las plántulas inoculadas con el aislamiento 1R-19. Los resultados encontrados demuestran que las plántulas que tuvieron mayor relación de Cu absorbido por la raíz y translocado a la parte aérea fueron las inoculadas con el aislamiento 2S-10 ya que fue donde menor concentración de Cu se encontró en raíz y mayor concentración de Cu en el tallo (Cuadro 21). Estos resultados permiten concluir que inoculando plántulas con el aislamiento 2S-10 ayuda a la translocación de Cu de la raíz al tallo de manera efectiva. Algo muy importante encontrado fue que la mayor concentración de Cu siempre fue encontrada en la raíz. Carrillo *et al.*, (2004) reportan que en plántulas de frijol inoculadas con células bacterianas, la mayor concentración de Cu siempre fue encontrada en raíz.

En lo que respecta al factor de acumulación y factor de translocación los resultados encontrados muestran que inoculando las semillas de alfalfa con el aislamiento 2S-10 si contribuyeron a obtener mejores resultados. El factor de acumulación fue determinado para conocer la cantidad de Cu presente tanto en tallo como en raíz de plántulas de alfalfa así como para determinar cual de los cuatro aislamientos utilizados fue el mejor (2S-10). En el factor de translocación que en esta investigación fue el más significativo, ya que el objetivo fue evaluar la contribución de las bacterias de este género en asociación con plántulas de alfalfa para promover la absorción de Cu y transportarlo a la parte aérea para así tener una idea clara de que tanto Cu puede ser extraído de suelos contaminados, ya que de antemano se sabe que la planta de alfalfa se cosecha 4 veces por año (Gary, 1983). Los resultados encontrados permitieron conocer que inoculando las semillas con el aislamiento 2S-10 tanto la absorción como la translocación se ve favorecida incluso superando a las semillas que no fueron inoculadas en un 50%.

Por otra parte es recomendable la realización de esta investigación en campo ya que los resultados obtenidos pueden no ser los mismos al momento de realizarlo a gran escala ya que en campo pueden existir diferentes factores físicos, químicos y biológicos (temperatura, la presencia de otros metales, inhibición de las bacterias por la presencia de otros microorganismos), los cuales no permitan que se obtengan los mismos resultados y por lo tanto no sea recomendable la aplicación de esta metodología.

Para concluir con la investigación se determinó la posible cantidad de Cu que se podría extraer de suelos contaminados con Cu, utilizando semillas de alfalfa inoculadas con el aislamiento 2-10 (se aclara que esta investigación fue realizada a nivel laboratorio).

Al cultivo de alfalfa se cosecha 4 veces al año con un rendimiento de alrededor de 5 toneladas de peso seco por hectárea (Gary 1983), con los datos obtenidos se puede decir que la cantidad de Cu que se puede recuperar por corte es de aproximadamente de 6 kg Cu/ha ésta es una cantidad considerable con la que se dice que es una metodología recomendable para aplicar en la actualidad para tratar suelos contaminados.

VI. CONCLUSIONES

Los resultados encontrados confirman lo encontrado por Carrillo *et al.*, (2005) quienes demostraron que inoculando semillas con suspensiones celulares de *Pseudomonas fluorescens* ayudaron a una mayor translocación de Cu de la raíz al tallo, aumentaron proporción de follaje.

El porcentaje de germinación de la semilla de alfalfa no tiene relación con la producción de pigmentos (sideróforos) de los cultivos de los aislamientos fluorescentes ya que como se observó existieron aislamientos con baja producción de pigmentos y un alto porcentaje de germinación.

Las semillas que fueron inoculadas con suspensiones celulares de los aislamientos del género *Bacillus* no promovieron la germinación ya que los resultados obtenidos fueron muy similares al testigo.

Los resultados obtenidos del factor de translocación, factor de acumulación y coeficiente de enriquecimiento siempre fueron mayores en las plántulas desarrolladas a partir de las semillas inoculadas con células del aislamiento 2S-10. En lo que respecta al factor de acumulación, la mayor cantidad de Cu siempre fue encontrada en raíz.

Los resultados encontrados confirman que la asociación entre plántulas de alfalfa y el aislamiento de *Pseudomonas fluorescens* (2S-10) pueden contribuir al proceso de fitorremediación ya que incrementa significativamente la translocación de Cu de la raíz al tallo, proporción de follaje y una mayor acumulación de Cu en el mismo.

LITERATURA CITADA

- Abda, M. y Oren, V. (1993). Removal of cadmium and associated contaminants from aqueous wastes by fibrous carbon electrodes. *Water Res.* 27, 1535-1544.
- Adriano, D. C. (1990). Bioengineering of Trace Metals. *Advances in Trace Substances Research*. Lewis, Boca Raton, Fl. 513.
- Adriano, D.C. (1992). Bioengineering of trace metals. *Advances in Trace Substances Research*. Lewis Boca Raton, Fl. 513.
- Allen, H.E. y Chen, P.H.(1993). Remediation of metal contaminated soil by EDTA incorporating electrochemical recovery of metal and EDTA. *Environ. Prog.* 12, 284-293.
- Alloway, B.J. (1990). Soil processes and the behaviour of metals. In: *Heavy Metals in Soils*. 7-28.
- Anderson TA y Coats JR.(1994). Bioremediation Through Rhizosphere Technology. ACS Symposium Series No. 563. American Chemical Society, Washington DC, USA.
- Angle, J.S., y J. R., Heckman, (1997). Effects of soil pH and sewage sludge on VA mycorrhizal infection of soybeans. *Plant Soil.* 93, 437-441.
- Baker, D.G. (1965). Factors affecting soil temperature. *Minn. Farm Home. Sci.* 22: 11-13.
- Baker, A.J.M., McGrath, S.P., Sidoli, C.M.D.y Reeves, R.D. (1994). Resources, Conservation and Recycling. 11:41.
- Baker, A.J.M., and Walker, P.L. (1997). Ecophysiology of Metal Uptake by Tolerant Plants. In *Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects*. 155-177.

- Berti, W. R. y J.W., Huang, (1995). Phytoremediation of contaminated soil. Trends in Biotech. 13, 393 – 397.
- Besthelin, J., Munier-Lamy., Leyval, C. (1995). Effect of microorganisms on mobility of heavy metals in soils. In: Environmental Impact of Soil Component Interactions Volume 2. Edited by Huanag P.M. Boca Raton: CRC Press: 3-17.
- Brock T. (1978). Biología de los microorganismos. Segunda edición. Ed. Prentice Hall. p: 761.
- Brooks, R.R. (1998). Plants that hyperaccumulate heavy metal. CAB International. 380.
- Burd, G. I., D. G. Dixon, and B.R. Glick 2000. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in pants. Canadian Journal of Microbiology 46: 237-245.
- Burns, R. G., Rogers, S. y McGhee. (1996). Remediation of inorganic and organic in Industrial and Urban Contaminated Soil. Contaminants and the Soil Environment in the Australia-Pacific Region. 125-181.
- Brown, S.L., Chaney, R, L., Angle, J.S., Baker, A. J. M., (1995). Zinc and Cadmium Uptake by Hyperaccumulator *Thlaspi caerulencens* an Metal Tolerant *Silene vulgaris* Grown on Sludge-Amended Soil, Environ. Sci. and Technol. 29(6), 1581-1585.
- Cabrera, F., Clemente L., Díaz Barrientos, E. López R. y Murillo, J.M. (1999). Heavy metal pollution of soils affected by the Guadiamar toxic flood. Sci Total Environ. 242 (1-3): 117-29.
- Carrillo Castañeda G., Juárez Muños J., Peralta Videa J.R., Gomez E., Gardea Torresday J.L. (2005). Modulation of uptake and translocation of iron and cooper from root to shoot in common bean by siderophore-producing microorganisms. Journal of plant nutrition. Vol 28, pp. 1853-1865.

- Carrillo Castañeda G., Juárez Muños J., Peralta Videá J.R., Gomez E., Gardea Torresday J.L. (2003). Plant growth-promoting bacteria promote copper and iron translocation from root to shoot in alfalfa seedlings. *Journal of plant nutrition*. Vol 26, No. 9, pp. 1801-1814.
- Chaney, R. L., Mallik M., Li Y. M., Brown S.L., y Brewer E. P. (1997). Phytoremediation of soil metals. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 279-84.
- Chaney, R. L., Ryan, J.A., Li Y. M., y Brown S.L. (1999). Soil cadmium as a threat to human health.. In: M.J. McLaughlin and B.R. Singh (eds.) *Cadmium in Soil and Plants*. pp. 219-256
- Chaney, R. L., Angle, S. J., y Baker, A. J.M. (2001). The phytomining of certain elements. Cooperative Research and Development Agreement N° 58-3k95-7-570.
- Chaudhry, T.M., Hayes, A.G., Khan, A.G., y Koo, C.S. (1998). Phytoremediation focusing on accumulator plants that remediate metal contaminated soil. *Australasian J. Ecotoxicol.* 56: 59-65.
- Chen, Z.S. (1992). Metal contamination of flood soils, rice plants, and surface waters in Asia. In: *Biogeochemistry of Trace Metals*, Adriano. D.C. (ed) Lewis Publishers. pp 85-108.
- Chen, J. Cunningham, S.D., y Huang, J.W. (1997). Phytoremediation of Soil and Water Contaminants. pp 89-97.
- Chen, Z.S. (1992). Metal contamination of flood soils, rice plants, and surface waters in Asia. In: *Biogeochemistry of Trace Metals*, Adriano. D.C. (ed) Lewis Publishers. 85-108.
- Chen, B., Christie, P., y Li, L. (2001). A modified glass bead compartment cultivation system for studies on nutrient and trace metal uptake by arbuscular mycorrhiza. *Chemosphere*. 42, 185-192.

- Chiarine L, Bevivino A, Yabacchioni S, Dalmastrì C. (1998). Inoculation of *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter* sp. on *Sorghum bicolor*: root colonization and plant growth promotion of dual strain inocula. *Soil Biol Biochem.* 30:81–7.
- Christie, P., Li, X., Chen, B.(2004). Arbuscular mycorrhiza can depress translocation of zinc to shoots of host plants in soils moderately polluted with zinc. *Plant and Soil*, 261 (1-2), 209-217.
- Chumbley, G.G. (1991). Permissible levels of toxic metals in sewage sludge used in agriculture land, Agriculture Development and Advisor service. Report No. 10.
- Clarke, S.E., Stuart J. y Sandres-Lohers J. (1987) Induction of siderophore activity in *Anabaena* spp. and its moderation of copper toxicity. *Appl. Environ, Microbiol.* 53: 917-922.
- Clemens, Stephan, Palmgren, Michael G., y Kramer, Ute. (2002). A long way ahead: underting and engineering plant metal accumulation. *TRENDS in Plant Science* 7 (7): 309-314.
- Comis, D. (1996). Green remediation. *Journal of soil and Water Conservation.* 51, 184-187.
- Cunningham, S. D., y Lee, C. R. (1995). Phytoremediation: Plant-Based Remediation of Contaminated Soils and Sediments. In: Skipper, H. D., & Turco, R. F. (Ed) *Bioremediation: Science and Applications.* Wisconsin: Soil Science Society of America., Inc., American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc. pp 145-147.
- Cunningham, S. D., (1996). Promises and Prospects of Phytoremediation. *Plant Physiol.* 110, 715-719.

- Davies, F.T. Jr., Jeffrey D. Puryear, R. J. Newton, J. N. Egilla, J. A., y Saraiva, G. (2001). Mycorrhizal fungi enhance accumulation and tolerance of chromium in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Physiol.* 158, 777-786.
- De Oliveira, F., Maria, V. P., y Narasimha, F. (1999). Feasible biotechnological and bioremediation strategies for serpentine soils and mine spoils. *Electronic Journal of Biotechnology.* 20-34.
- Drake, P. Baldo, F., Cuesta, J. A., García- González, D., Silva –García, A., Arias AM., Rodríguez, A., Sobrino, I., y Fernández-Delgado C. (1999). Initial effects of the toxic waste spill (*Aznalcollar mine accident*) on the aquatic macrofauna of the Guadalquivir Estuary. *Science of the Total Environment.* 242 (1-3), 271-280.
- El-Demerdash, S., Dahdoh M.S.A., y Hassan F.A. (1994). Residual effects of sludge application on corn growth, nutrients and heavy metals uptake. *Fertilizer and Environment, VII International symposium, C.I.E.C., IRNA-CSIC. Salamanca, Spain.*
- Ernst, W.H.O. (2000). Evolution of metal hyperaccumulation and phytoremediation. *New Phytol.* 146, 357-357.
- Freitas, H., Prasad, M.N.V., y Pratas, J. (2004). Heavy metals in the plant community of Sao Domingo an abandoned mine in SE Portugal: Possible applications in mine remediation. *Environmental International.* 30 (1), 65-72.
- Garbisu, C., y Alkorta, I. (1997). Bioremediation: Principles and Future. *J. Clean Technol., Environ. Toxicol. & Occup. Med.* 6(4), 351-366.
- Glass, D.J.(2000) Economic potential of phytoremediation. P. 15-31. In I. Raskin and B.D. Ensley (Eds). *Phytoremediation of toxic metals* .John Wiley & Sons, New York.

- González, M. J., y Hernández, L. M. (1999). Heavy Metal pollution in water, sediments, and earthworms from the Ebro River, Spain. *Bolletín of Environmental Contamination & Toxicology*. 63(3), 305- 311.
- Guilder, K. E., Witter, E., y McGrath, S.P. (1999). Assessing risks of heavy metal toxicity in agricultural soils: Do microbes matters?. *Human & Ecological Risk Assessment*. 5(4), 683- 689.
- Hall, J.L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 53 (366): 1-11.
- Hasler, B. (1998). Analysis of environmental measures aimed at reducing nitrogen leaching at the farm level. *Environ. Pollut.* 102, 227-233.
- Hausenbuiller R.L. (1981). *Soil Science principles and practices*. Second edition. Wm. C. Brown Company Publishers. Dubuque Iowa. Pp. 611.
- Huang, J. W., y Cunningham, S. D. (1996). Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. *New Phytol.* 134, 75-85.
- Jensen, D.L., Holm, P. E., y Christensen, T. H. (2000). Soil and ground water contamination with heavy metals at two scrap iron and metal recycling facilities. *Waste Management & Research*. 18 (1), 52- 63.
- Kabata Pendias, A. (1995). Agricultural problems related to extensive trace metal contents of soil. In: Salomons, W. V. Forstener C.P. Mader (eds) *Heavy metals, problems and solutions*. 3-18 Springer-Verlag, Berlin, Germany: 412.
- Kabata Pendias, A. S., y Pendias, H. (2000). *Trace elements in soils and plants*. CRC Press, An. Arbor, Michigan 432.
- Kabir, Z, y Koide, R.T. (2000). The effect of dandelion or a cover crop on mycorrhiza inoculum potential, soil aggregation and yield of maize. *Agric. Ecosyst. Environ.* 22, 15-28.

- Karthikeyan, R., y Kulakow, P.A. (2003). Soil plant microbe interactions in phytoremediation. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*. 78, 53-74.
- Khan, A.G., y Chaudhry, T.M., Hayes, W.J., Khoo, C. S., Hill, L., Fernández, R., y Gallardo, P. (1997). Growth responses of endomycorrhizal onions in unsterilized coal waste. *New Phytologist*. 87: 363-370.
- Khan, A.G. (2001). Relationships between chromium biomagnification, ratio, accumulation factor, and mycorrhizae in plants growing on tannery effluent-polluted soil. *Environ. Int.* 26, 417-423.
- Khan, AG., Kuek, C., Chaudhry, TM. Khoo, CS, Hayes, WJ. (2002). Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere*. 41(1-2): 197- 207.
- Kloke, A. (1980). Richtwerte'80, Orientierungsdaten für tolerierbare Gesamtgehalte einiger Elemente in Kulturböden, Mitt VDLUFA, H. 2, 9-11.
- Kuleff, I., Djingova, R. (1991). The dandelion (*Taraxacum officinale*) A monitor for environmental pollution? *Water Air Soil Pollution*. 21, 77-85.
- Kumar, P.B.A.N., Dushenkov, V. Motto, H., y Raskin, I. (1995). Phytoextraction: The use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental Science & Technology* 29 (5): 1232 (7).
- Lasat, M.M. (2002). Phytoextraction of toxic metals: A review of biological mechanisms. *Journal of Environmental Quality*. 31(1): 109-120.
- Lemanceau P (1992) Effets bénéfiques de Rhizobactéries sur plantes: exemple des *Pseudomonas spp fluorescens*. *Agronomie*. 12: 413-434.

- Leyval, C., Turnau, K., y Haselwandter, K. (1997). Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza*. 7: 39-153.
- Leyval, C., Singh, B.R., y Janer, E.J., (1995). Occurrence and infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi in some Norwegian soils influenced by heavy metals and soil properties. *Water, Air Soil Pollut.* 83: 203-216.
- Liao, J. P., Lin, X. G., Cao, Z.H., Shi, Y. Q., Wong, M. H. (2003). Interactions between arbuscular mycorrhizae and heavy metals under sand culture experiment. *Chemosphere* 50 (6), 847-853.
- Licsko, I., Lois, I.,y Szebenyi, G. (1999). Tailings as a source of environmental pollution. *Water Sic. Techno.* 39 (10-11): 333-336.
- Loth, C. (1996). Abundance of arbuscular mycorrhizal fungi spores at different natives sites in dependence of sludge applications. *Bodenkultur.* 47, 89-96.
- Lovley, D.R.(1995). Bioremediation of organic and metal contaminants with dissimilatory metal reduction. *J. Indust. Microbiol.* 14, 85-93.
- Lovley, D.R. (2000). *Environmental Microbe-Metal interactions*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Lovley, D. R., y J. D. Coates. (1997). Bioremediation of metal contamination. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 285-289.
- Lynch, J.M. (1990). *The rhizosphere*. J.M. Lynch (ed.). John Wiley and sons. Chichester. Pp 458.
- Macek, T., Mackova M. Kas J. (2000). Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnology Advances.* 18(1), 23-34.

- Martin, H. W., Young, T.R., Kaplan, D.I., Simon, L., y Adriano. D.C. (1996). Evaluation of three herbaceous index plant species for bioavailability of soil cadmium, chromium, nickel and vanadium. *Plant Soil*. 182: 199-207.
- Martin, C.W. (2000). Heavy metals trends in floodplain sediments and valley fill. *Catena*. 39: 53-68.
- McEldowney, S., Hardman, D.J. y Waite, S. (1993). *Pollution, Ecology and Biotreatment*. pp 48-58.
- McGrath, S.P., Shen, Z.G., y Zhao F.J. (1997). Heavy metal uptake and chemical changes in the rhizosphere of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi ochroleucum* grown in contaminated soils. *Plant Soil*. 188: 153-159.
- McNeill, K.R. y Waring, S. (1992). Vitrification of Contaminated soils. In: J.F. Rees (ed): *Contaminated Land Treatment Technologies*. Society of Chemical Industry, Elsevier Applied Science, London.
- Meagher, R. B. (2000). Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Current Opinion in Plant Biology* 3:,153-162.
- Nies, D, H., (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 730-750.
- Pawlowska, T.E., Blaszkowski, J., y Ruhling, A. (1996). The mycorrhizal status of plants colonizing a calamine spoil mound in southern Poland. *Mycorrhizae* 6: 499-505.
- Pawlowska, T. E., Chaney, R.L., Chin, M. y Charvat, I. (2000). Effects of metal phytoextraction practices on the indigenous community of arbuscular mycorrhizal fungi at a metal contaminated landfill. *Appl. Environ. Microbiol.* 6: 2526-2530.
- Perotti, E.B.R., Menéndez, L.T., Gaia, O.E., Pidello A., (2005). Supervivencia de *Pseudomonas fluorescens* en suelos con diferente contenido de materia orgánica. *Revista Argentina de Microbiología* 37: pp. 102-105.

- Peters, R. S. y Shem, I. (1994). Use of chelating agents for remediation of heavy metal contaminates soil. In *Environmental Remediation Removing Organic and Metal Ion Pollutants*. 12 (3): 89-97.
- Pilon-Smits, E., y Pilon, M. (2003). Phytoremediation of metals using transgenic plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21 (5), 439-456.
- Prasad, M.N.V., y Freitas, H. (2003). Metal hyperaccumulation in plants-biodiversity prospecting for phytoremediation *Technology Electronic Journal of Biotechnology* 54 (11), 25-42.
- Probanza, A., Lucas, J.A., Acero, N. y Gutiérrez M., FJ. (1996). The influence of native rhizobacteria on European alder [*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn] growth. I. Charaterization of growth promoting and growth inhibiting strains. *Plant Soil*, 182: 59-66.
- Rao, P.S.C., Davis, G,B, y Johnston, C.D. (1996). Technologies for enhanced remediation of contaminated soil and aquifers: an Overview, analysis and Case Studies: 189-210.
- Rascio, W. (1977). Metal accumulation by some plants growing on Zn mine deposits. *Oikos* 29: 250-253.
- Raskin, I., Kumar, P.B.A.N., Dushenkoy, S., y Salt, D.E. (1994). Bioconcentration of heavy metals by plants. *Current Opinion in Biotechnology* 5: 285-290.
- Raskin, I., Smith, R.D., y Salt, D. E., (1997). Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology* 8: 221-22.
- Reed, D.T., Tasker, I. R., Cunnane, J.C., y Vandegrift, G. F (1992). Environmental restoration and separation science. In: *Environmental Remediation* 45-62.
- Reeves, R. (2003). Tropical hyperaccumulators of metals and their potential for

phytoextraction. *Plant and Soil* 249: 57-65.

Rother, J.A., Milbank, J.W., y Thorntonb, I. (1993). Nitrogen fixation by white clover (*Trifolium repens*) in glass land on soil contaminated with cadmium to lead and zinc. *J. Soil. Sci.* 34: 127- 136.

Roane, T.M., Perpper, M. (1996). Microbial remediation of metals. In Craford, L., Ronolad & Cfawford, L., Don (Ed) *Bioremediation Principles and Applications*. pp 312-340.

Salt, D.E., Blaylock, M., Kumar, PBAN., Viatcheslav, D., y Ensley, B. D. (1995). Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Bio-Technology* 13: 468-74.

Salt, D.E., Blaylock, M., Kumar, PBAN., Dushenkov, S. Ensley, B. D., Chet, I. Raskin, I. (1997). Phytoremediation: A novel strategy for the removal of toxic metals .from environments using plants. *Bio/ Tech* 13: 468-474.

Schmitt, H. W., y Sticher, H. (1991). Heavy metals compounds in the soil. In: Marina, E. (ed): *Metals and their Compounds in the Environment*, VCH Verlagsgesellschaft Weinheim, Germany, pp. 312-331.

Simonton, S., Dimsha, M., Thomson, B., Barton, L., y Cathey, G. (2000). Long-Terms stability of metals immobilized by microbial reduction. *Environ. Engr.* 121, (11): 798-804.

Siqueira, J.O., y Moreira, E.M.S. (1997). Microbial populations and activities in highlyweathered acidic soils: Schaeffert, N.K. Gageria, C.A. Rosolem, and H. Cantarella (Eds). *Proceedings of the 4th International Symposium on Plant-Soil Interactions at low pH Brazil*. Brazilian Soil Science Society. pp 193-156,

Spain, A. (2003). Implications of microbial heavy metals tolerance in the environment. *Reviews in undergraduate research*, 2: 1-6.

- Sopper, W. E. (1988). Revegetation of a Contaminated Zinc Smelters Site. *Landscape and Urban Planning* 17: 241-250.
- Turnnell, D.M., Dennis, R., y Roth, M. (1996) Soil-Washing Evaluation Program for Palmerton Zinc Site. *Journal of Environmental Science Health A31*, (6): 1459-1468.
- Wang, Y. P., Wang, .M.K., y Liu, C. L. (1992). The relationships between heavy metals in soils, waters, and sediments: Case study in Chang-Hwa Industrial park. Project report of EPA-ROC.
- Watanabe, M.E. (1997). Phytoremediation on the brink of commercialisation. *Environ, Sci. Technol.* 31: 182-186.
- Weissenhorn, I., Leyval, C., y Berthelin, J. (1993). Cd-tolerant arbuscular mycorrhizal (AM) fungi from heavy metals polluted soils. *Plant and Soil.* 157: 274-256.
- Weissenhorn, I., Leyval, C., y Berthelin, J. (1995). Bioavailability of heavy metals and abundance of arbuscular mycorrhiza in soil pollutes by atmospheric deposition from a smelter. *Biol. Fertil. Soils.* 19: 22-28.
- Zhang, Q, Davis, L.C., y Erick, L.E. (2000). Heavy metal. In: *Hazardous Substance Res.* 2 (4):1
- Zier, N. Schiene, R. Koch H., y Fischer, K. (1999). Agricultural reclamation of disturbed soils in a lignite mining area using municipal and coal wastes: the humus situation at the beginning of reclamation. *Plant and Soil.* 213, (1-2): 241-250.
- Zhu, Y. G., Christie, P., y Laidlaw, A. S. (2001). Uptake od Zn by arbuscular mycorrhizal white clover from Zn-contaminated soil. *Chemosphere.* 42, 193-199.

ANEXO I

Cuadro 1. Comparación de medias de germinación de semillas de alfalfa inoculadas con aislamientos fluorescentes.

	Asilamiento	%S. Germinadas
a	6R-8	89.5
a	2S-9	88.5
a	TESTIGO	88
ab	4R-2	86.5
ab	6R-2	86.0
ab	6R-1	83.5
abc	4R-3	81.5
abc	4R-1	80.0
abc	7R-9	79.5
abc	2S-6	78.5
abc	2S-10	78.0
abc	9R-6	77.0
abc	6R-9	76.5
abc	4R-6	76.0
abc	4R-5	74.5
abc	4R-4	74.0
abc	2S-7	73.0
abc	4S-4	69.0
abc	1S-37	66.5
abc	1S-28	65.0
bc	1R-19	62.0
c	2R-2	56.5
d	3R-4	2.0
d	3S-2	0.0

Análisis de varianza de germinación de semillas de alfalfa inoculadas con aislamientos bacterianos fluorescentes

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Pr > F
Modelo	22	23741.82609	1079.17391	27.35	<.0001
Error	23	907.50000	39.45652		
Total Corregido	45	24649.32609			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	y Mean
0.963184	9.009865	6.281443	69.71739

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
a	22	23741.82609	1079.17391	27.35	<.0001

Cuadro 2. Comparación de medias de germinación de semillas de alfalfa inoculadas con aislamientos género Bacillus sp.

	Asilamiento	%S. Germinadas
a	5R-9	88.0
a	8R-3	87.0
a	6S-2	87.0
a	1S-21	86.5
a	1R-17a	86.0
a	5R-4	86.0
a	5R-4a	85.5
a	5R-3	85.5
a	1R-17b	85.0
a	6R-6	85.0
a	6R-7	84.5
a	1R-5	84.0
a	5R-8	84.0
a	5R-1a	83.5
a	5R-1	82.0
a	5R-10	82.0
a	TESTIGO	82.0
a	1S-33	81.5
a	5R-5a	81.5
a	1R-18a	80.0
a	5R-6	79.5
a	6S-3	79.5
a	5S-4	79.0
a	5R-2	79.0
a	5R-3a	79.0
a	1S-34	79.0
a	5S-6	79.0
a	6R-3	77.0
a	1S-39	76.0

Análisis de varianza de germinación de semillas de alfalfa inoculadas con aislamientos bacterianos del género *Bacillus* sp.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F
Modelo	29	643.933333	22.204598	0.47	0.9772
Error	30	1415.000000	47.166667		
Total Corregido	59	2058.933333			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	y Mean
0.312751	8.321243	6.867799	82.53333

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
a	29	643.9333333	22.2045977	0.47	0.9772

Cuadro 3.Comparación de medias de lecturas de absorbencia a 400 nm de aislamientos bacterianos fluorescentes.

	Asilamiento	Absorbencia 400nm.
a	2S-10	0.17967
ab	2R-R	0.15700
abc	2S-9	0.13867
bc	2S-7	0.12600
cd	1S-28	0.10200
de	2S-6	0.06400
def	3R-4	0.05933
def	3S-2	0.05733
ef	4R-3	0.03733
ef	4R-2	0.03500
ef	4R-6	0.03433
ef	4R-4	0.03167
ef	4R-5	0.02967
ef	1S-37	0.02633
ef	4S-4	0.02367
ef	6R-1	0.02100
ef	6R-2	0.02067
ef	6R-8	0.02067
ef	9R-6	0.02067
ef	6R-9	0.02067
ef	7R-8	0.02000
ef	4R-1	0.01967
f	1R-19	0.01567

Análisis de varianza de las lecturas de Absorbencia a 400 nm. de aislamientos fluorescentes

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	F Value	Pr > F
Modelo	22	0.16296325	0.00740742	32.67	<.0001
Error	46	0.01043067	0.00022675		
Total Corregido	68	0.17339391			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	y Mean
0.939844	27.46565	0.015058	0.054826

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
a	22	0.16296325	0.00740742	32.67	<.0001

ANEXO II

Medio de cultivo para bacterias B. de King, las cantidades descritas a continuación es para 1 litro de agua.

Caseína	15 mg.
Glicerol	10 ml.
K ₂ HPO ₄	1.5 gr.
Agar	18 gr
MgSO ₄	6 ml. (Esterilizado por separado).
