



Universidad Nacional

SAN LUIS GONZAGA



Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Esta licencia es la más restrictiva de las seis licencias principales Creative Commons, permitiendo a otras solo descargar sus obras y compartirlas con otras siempre y cuando den crédito, pero no pueden cambiarlas de forma alguna ni usarlas de forma comercial.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>



CONSTANCIA DE REVISION

Se ha realizado el análisis con el software antiplagio de la Universidad Nacional "San Luis Gonzaga", por parte del Director encargado de la Unidad de Investigación de la Facultad de Ciencias Biológicas, quien deja:

CONSTANCIA

El que suscribe, deja constancia que se ha realizado el análisis con el software de verificación de similitud al documento cuyo título es:

Bacterias resistentes a metales pesados como promotores de crecimiento vegetal

Presentado por:

ROSA BERTHA ALTAMIRANO DÍAZ
JUAN CARLOS TANTALEÁN VÁSQUEZ

Docentes de la Facultad de **CIENCIAS BIOLÓGICAS** y colaboradores. El resultado obtenido es **4%** por el cual se otorga el calificativo de: **APROBADO**, según Reglamento de Evaluación de la Originalidad

Se adjunta al presente el reporte de evaluación con el software de verificación de originalidad.

Observaciones: Ninguna

SE APRUEBA EL PRESENTE TRABAJO POR TENER UNA SIMILITUD MENOR O IGUAL AL LIMITE ESTABLECIDO EN EL REGLAMENTO CORRESPONDIENTE (MENOR A 20%).

Ica, 24 de Enero de 2025

UNIVERSIDAD NACIONAL SAN LUIS GONZAGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN
Dr. Alejandro C. Martínez Villalobos
DIRECTOR(a)

UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA"
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN

Facultad de Ciencias Biológicas



Bacterias resistentes a metales pesados como promotores de
crecimiento vegetal

Línea de investigación:
Salud pública y conservación del medio ambiente

INFORME FINAL DE INVESTIGACIÓN

Dra. ROSA BERTHA ALTAMIRANO DÍAZ
Dr. JUAN CARLOS TANTALEÁN VÁSQUEZ

Ica - Perú

2024

Bacterias resistentes a metales pesados como promotores de crecimiento vegetal

Rosa B. Altamirano-Díaz, Juan C. Tantaleán Vásquez,
Universidad Nacional San Luis Gonzaga-Laboratorio de Biotecnología

RESUMEN

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) contribuyen con el desarrollo de las plantas mediante la solubilización de fosfatos, producción de ácido indolacético (AIA), producción de sideróforos, entre otros. Se propuso determinar dichas características como indicadores de capacidad promotora de crecimiento vegetal en 15 cepas de bacterias resistentes a metales pesados aisladas de suelos y agua contaminadas. Para la solubilización de fosfato, se utilizó el agar NBRIP y se determinó el halo formado alrededor de las colonias. Asimismo, se determinó la concentración de fósforo inorgánico liberado en medio NBRIP líquido, utilizando el kit Fosfatemia. Para la producción de AIA, las bacterias se crecieron en medio nutritivo con triptófano y la determinación se realizó con el reactivo de Salkowski, mediante lectura de absorbancia a 536 nm. Para la producción de sideróforos se empleó el medio CAS y se evidenció mediante la formación de halos de color naranja alrededor de las colonias. Las cepas NIA-3 y Y1-E*1, mostraron la mayor capacidad de solubilización de fosfato, con 124.95 y 113.84 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Las cepas C1G1 y C1J1 produjeron 14.96 y 11.81 $\mu\text{g/mL}$ de AIA; la mayor productora de sideróforos fue la cepa S2-1. Se concluye que bacterias resistentes a metales pesados provenientes de fuentes contaminadas tienen la capacidad de solubilizar fosfato, producir AIA y sideróforos. Estas cepas poseen una potencial aplicación como promotoras de crecimiento vegetal.

Palabras clave: solubilización fosfato, ácido indolacético, sideróforos,

ABSTRACT

Plant growth-promoting bacteria (PGPB) contribute to plant development through mechanisms such as phosphate solubilization, indole-3-acetic acid (IAA) production, and siderophore production, among others. This study aimed to determine these characteristics as indicators of plant growth-promoting capacity in 15 strains of heavy metal-resistant bacteria isolated from contaminated soil and water. Phosphate solubilization was assessed using NBRIP agar by measuring the halo formed around the colonies. The concentration of inorganic phosphorus released in liquid NBRIP medium was quantified using a phosphate kit. For IAA production, bacteria were grown in nutrient medium with tryptophan, and determination was carried out using Salkowski's reagent by absorbance reading at 536 nm. Siderophore production was evaluated using CAS medium, evidenced by the formation of orange halos around the colonies. The strains NIA-3 and Y1-E*1 showed the highest phosphate solubilization capacities, with 124.95 and 113.84 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The strains C1G1 and C1J1 produced 14.96 and 11.81 $\mu\text{g/mL}$ of IAA, while the highest siderophore producer was strain S2-1. It is concluded that heavy metal-resistant bacteria from contaminated sources have the ability to solubilize phosphate, produce IAA, and siderophores. These strains have potential applications as plant growth promoters.

Keywords: phosphate solubilization, indole-3-acetic acid, siderophores

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, debido al crecimiento de la agro exportación y a la mayor demanda del mercado mundial, se está promoviendo la producción de alimentos de calidad con mayor uso de agentes biológicos, para el control de enfermedades y plagas, frente a los pesticidas inorgánicos o sintéticos (1). Asimismo, se está aplicando mejoradores de terreno o promotores de crecimiento vegetal de origen microbiano (2). El uso de estas estrategias biológicas para fertilización y promoción del crecimiento vegetal es una alternativa cada vez más creciente en la agricultura sostenible frente a los agroquímicos sintéticos que eliminan la microbiota y dañan los suelos por sus efectos residuales (3,4).

Diversos organismos son utilizados como biofertilizantes, controladores biológicos o promotores de crecimiento vegetal, entre los que se encuentran virus, bacterias y hongos (3). Algunos de ellos participan en la eliminación de formas larvarias de organismos plaga y en el control de fitopatógenos (5). En el caso de promotores de crecimiento vegetal, éstos lo realizan mediante la liberación de metabolitos, los cuales permiten mayor absorción de nutrientes, solubilización de compuestos insolubles (6), protección contra el estrés hídrico (7,8), entre otros.

La microbiota del suelo que se relaciona con las plantas juega un rol muy importante favoreciendo su adaptación frente a los factores abióticos y bióticos limitantes (9,10). Algunas bacterias que componen esta microbiota viven en la superficie de las plantas y son llamadas epifitas; otras, lo hacen en las raíces y se denominan rizobacterias (2); mientras que otras, se han adaptado dentro de las plantas o llamadas endófitas (10). Todas ellas muestran características muy importantes como promotoras del crecimiento de las plantas (1,11) y en algunos casos contribuyen a la fitoremediación (12) reduciendo la toxicidad de los metales pesados, cuando las plantas crecen en suelos contaminados (13–15). Asimismo, de manera directa, favorecen la captación de nutrientes, modulan su crecimiento, regulan la producción de fitohormonas y confieren resistencia a estrés; y de manera indirecta, controlan patógenos, eliminan plagas, limitan nutrientes y contribuyen en la defensa de la planta (11,16,17). Los mecanismos involucrados en estos beneficios para las plantas esta dado por la liberación de sustancias solubles y la emisión de compuestos orgánicos volátiles (18–20).

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) estimulan el desarrollo de las plantas mediante la secreción de una variedad de metabolitos y hormonas, ayudan a la fijación de nitrógeno, aumentan la capacidad de absorción de otros nutrientes y mejoran la biodisponibilidad mediante la solubilización de minerales (12,21,22). Estas características deben ser evaluadas en el laboratorio antes de realizar ensayos en invernadero o en campo (23). Entre las pruebas más aplicadas se encuentran las determinaciones de solubilización de fosfatos, producción de ácido 3-indolacético (AIA) o típicamente ácido indolacético, producción de sideróforos (SD) (21,22) y actividad 1-amino ciclopentano 1-carboxilato deaminasa (24). La presencia de estas características en las bacterias se relaciona con genes específicos y los mecanismos de expresión presentes en su genoma (25).

El fósforo (P) es un elemento vital para el crecimiento de las plantas y su forma inorgánica no puede ser asimilado fácilmente por lo que generalmente se acumula en el suelo. La concentración de fosfato soluble en el suelo y asimilable por las plantas, generalmente es muy baja y la mayor parte del P que se añade se convierte en fosfato insoluble, generando deficiencia de fosfato soluble y por lo tanto un nutriente limitante para las plantas (26,27). El fosfato para que se encuentre en forma disponible para la planta, debe ser mineralizado y esto lo realizan los microorganismos llamados solubilizantes de fosfato (PSM), que se encuentran presentes en el suelo o pueden ser adicionados (27).

El AIA deriva del triptófano y es una hormona del grupo de las auxinas que cumple un rol importante en el crecimiento vegetal; se sintetiza en las zonas de crecimiento activo de la planta, como en meristemos apicales y hojas jóvenes. También se libera como componente del exudado radicular, donde incrementa la señalización entre las bacterias y la planta huésped mejorando la salud y la productividad, mediante el desarrollo y aumento de la superficie radicular, aumento de la longitud del pelo radicular y desarrollo de raíces adventicias, que contribuyen a la captación de agua y absorción de nutrientes (28). Su función principal es regular los procesos fisiológicos relacionados a la división celular y la diferenciación de los distintos tejidos y órganos de la planta. También el AIA se ha asociado a la respuesta frente a condiciones adversas, por lo que sería un factor importante para las plantas cuando crecen en suelos contaminados con metales pesados (29).

Los sideróforos son moléculas orgánicas de bajo peso molecular producidos por plantas monocotiledóneas, hongos y bacterias en respuesta a la carencia de hierro, debido a su capacidad quelante y alta afinidad por el ion férrico, Fe^{3+} . Aquellos producidos por microorganismos se clasifican en catecolatos, hidroxamatos y α -carboxilatos, según su naturaleza química y sus sitios de coordinación con el hierro. Asimismo, generan un cambio en el color del medio de cultivo; como es el caso de *Aspergillus niger* (productor de catecolato), de azul a violeta, *Bacillus cereus* (productor de hidroxamato), azul a naranja y *Rizopus oligosporus* (productor de carboxilato), de azul a amarillo claro (30). Sin embargo, algunos se clasifican como fenolatos como la yersiniabactina y otros, como “mixtos”, debido a que contienen hidroxamato y grupos funcionales catecolato, como en el caso de las pioverdinas, producidas por especies de *Pseudomonas* (21).

En el laboratorio, la solubilización de fosfatos insolubles se determina mediante la cuantificación de fósforo inorgánico liberado por la actividad microbiana sobre el fosfato (31). La producción de AIA se determina mediante un ensayo colorimétrico, utilizando el reactivo de Salkowski (23), por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (32) y mediante cromatografía líquida-ionización por electrospray- espectrometría de masa (LC-ESI-MS/MS) (33). La determinación de sideróforos se realiza mediante el medio CAS, con cromo azurol sulfonato (CAS), que permite visualizar la formación de un halo de color naranja alrededor de las colonias bacterianas productoras (34).

Diversas especies de bacterias, que favorecen el crecimiento de las plantas, se han aislado de fuentes como: suelos (14), ambientes contaminados con metales pesados (15), agua (35), raíces (1), entre otras. Los géneros bacterianos más estudiados como promotores de crecimiento vegetal son: *Bacillus*, (5,20,36), *Enterobacter* (37) y *Pseudomonas* (5,8,14,25,38). Este último destaca por su versatilidad metabólica (39–42), su capacidad para degradar compuestos recalcitrantes (43), su resistencia a metales pesados (44), a antibióticos (45,46) y a diversos tóxicos orgánicos (47). Asimismo, algunas bacterias promueven el crecimiento vegetal en condiciones de estrés salino (8). Estas bacterias podrían utilizarse específicamente cuando las plantas crecen bajo condiciones climáticas adversas y en presencia de metales pesados en los suelos (48). Entre las plantas que han sido utilizadas como hospederos para ensayar promotores de crecimiento se encuentran: *Arabidopsis thaliana* (38), *Lactuca sativa* (38), *Oriza sativa* L (49), *Cicer arietinum* L (14), *Zea mays* (25), entre otras. En todas ellas, el efecto bacteriano sobre su crecimiento ha sido muy favorable.

En la actualidad, la agroindustria es una actividad creciente y de gran importancia económica regional y nacional. Los cultivos de interés requieren nutrientes exentos de compuestos tóxicos y que sean amigables para el ambiente, por lo que el uso de microorganismos que ayuden al crecimiento vegetal y mejoren la producción de los mismos,

es una buena alternativa. Habitualmente, se usan abonos procedentes de ganado y aves, cuyo aporte de materia orgánica y microorganismos ayudan a metabolizar los compuestos orgánicos e inorgánicos del suelo.

Recientemente, extensas áreas de cultivo de diferentes lugares en Perú han sido reportadas con niveles de cadmio superiores a los permisibles, lo que ha generado pérdidas económicas y pone en riesgo la producción agrícola regional y nacional(50–53). En este sentido, las bacterias resistentes a metales pesados podrían favorecer el crecimiento de las plantas y protegerlas de estos tóxicos (15). En el laboratorio de Biotecnología de la Universidad San Luis Gonzaga se cuenta con una colección de bacterias con capacidad de resistir a metales pesados como cadmio, mercurio, arsénico, entre otros y requieren ser evaluadas para conocer su potencial aplicación como mejoradores de crecimiento vegetal, en especial en suelos contaminados con metales pesados. Especies de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* están entre las más utilizadas con este fin y corresponden a la mayoría de cepas de la colección del laboratorio de Biotecnología. El potencial de estas bacterias se conocerá luego de establecer si presentan características que favorecen el crecimiento de las plantas. En este sentido, en este estudio se planteó determinar la capacidad promotora de crecimiento vegetal de bacterias resistentes a metales pesados, mediante la producción de ácido indol-3-acético (AIA), producción de sideróforos (SD) y solubilización de fosfato a nivel de laboratorio.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Se utilizaron bacterias resistentes a metales pesados que pertenecen al cepario del laboratorio de Biotecnología, Biología Molecular y Microbiología Industrial de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad San Luis Gonzaga – Ica. Estas fueron aisladas de aguas de lagunas de oxidación: Cachiche, Marcona, Nazca, Sarmarica, Yaurilla y relaves mineros: Ingenio, del Departamento de Ica – Perú. Los códigos utilizados son: C1 G1, C1 J1, EI2-2, I3-2, I3-3, I4-1, I4-2, M1C-3, NIA-1, NIA-3, S2-1, Y1-E, Y1-E*1, Y1-F, Y1H-2. Las cepas se conservaron en glicerol al 30% y se reactivaron en caldo de Luria Bertani (LB) (g/L: cloruro de sodio, 1; extracto de levadura, 0.1 y peptona, 1). Las incubaciones se realizaron a 30°C durante 24 h.

Se utilizó como cepa control: *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048.

Determinación de la solubilización de fosfato inorgánico.

Se empleó el medio de crecimiento con fosfato NBRIP, sugerido por el Instituto Nacional de Investigación Botánica (National Botanical Research Institute's Phosphate); la composición es la siguiente, en g/L: glucosa, 10; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 5; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.25; KCl, 0.2 y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1. Para medio sólido se adicionó agar agar al 1.5% (6). Para la evaluación en medio NBRIP líquido, las cepas en estudio y control se sembraron en medio LB e incubaron a 30°C durante 24 h. Se inoculó 100 µl de cultivo de las cepas (1×10^9 cel/mL) a 10 mL de medio NBRIP. Se utilizó como control negativo un tubo sin inocular y positivo *E. aerogenes* ATCC 13048. La incubación se realizó a 30 °C durante 48 h en agitación a 180 rpm. Se centrifugó 1.5 mL de cultivo a 10,000 rpm por 5 min y se determinó el fosfato inorgánico en el sobrenadante utilizando el kit Fosfatemia de Wiener lab. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Para la evaluación en medio sólido, se sembró 2 µl de suspensión de cada cepa en el centro del agar NBRIP y las placas se incubaron a 30 °C durante 3 días. La formación de halos transparentes alrededor de las colonias se consideró como solubilización de fosfato (17). La medida del halo se determinó por la diferencia del tamaño de los halos y diámetro de la colonia. Se utilizó como control positivo *E. aerogenes* ATCC 13048 y los ensayos se realizaron por triplicado.

Determinación de la producción de ácido indolacético (AIA).

La evaluación y cuantificación de la producción ácido indolacético (AIA) se realizó mediante el método del reactivo de Salkowski (23). Una alícuota de las cepas crecidas en medio LB durante 24 h se sembraron en medio de precultivo sin triptófano (en g/L: D (+) glucosa, 1; peptona, 15; cloruro de sodio, 6; extracto de levadura, 3; pH final 7.5 ± 0.2) y se incubaron a 30 °C x 24 horas. Del precultivo se tomó 100 µL e inoculó en el medio de producción de AIA (medio de precultivo con triptófano al 0.15%), se agitó para uniformizar la suspensión y se llevó a incubar en oscuridad (envolviendo los tubos con papel aluminio) a 30 °C, entre 24 y 96 horas, dependiendo de la capacidad de producción de AIA de la cepa. Puede observarse disminución de producción de AIA después de las 72 h.

Cada 24 h de incubación, durante 96 h, se transfirió 1.5 mL del medio de cultivo de producción de AIA de cada cepa a un tubo Eppendorf. Se centrifugó a 10000 rpm durante 3 min, con cuidado se retiró 1 mL del sobrenadante y se transfirió a un tubo de 5 mL. Se adicionó 1ml del reactivo de Salkowski, se agito suavemente y se dejó incubar la mezcla a 30 °C en oscuridad durante 30 min. En un tubo de ensayo se mezcló 1 mL de medio de cultivo sin inocular con 1 ml del reactivo de Salkowski, se incubó junto con los tubos de

prueba y se utilizó como blanco. Después de la incubación, la aparición de un color rosa indicó la presencia de AIA. La cuantificación de AIA se realizó mediante lectura de absorbancia a 536 nm en un espectrofotómetro UNICO. Para calcular la concentración de AIA se comparó los valores de absorbancia de las muestras de prueba con una curva estándar de AIA (10-100 µg/mL).

Determinación de la producción de sideróforos.

Se utilizó el protocolo descrito por Lynne y Loudon (54). Se empleó en el ensayo el medio CAS y su preparación se realizó como sigue:

Solución CAS: compuesta de tres soluciones; la solución I: cromo azurol sulfonato (CAS), 0.06 g en 50 ml de H₂O; solución II: FeCl₃·6 H₂O, 0.0027 g en 10 mL de H₂O y solución III: HDTMA (Hexa-Decil Trimetil Bromuro de Amonio), 0.073 g en 40 ml de H₂O. Se mezcló la solución I con la solución II, luego lentamente se adicionó la solución III, con lo que se obtuvo una coloración azul y se llevó a esterilizar en autoclave a 15 lb de presión, 121 °C durante 15 min.

Solución de sales Medio Mínimo 9 (MM9): compuesta por KH₂PO₄, 15 g; NaCl, 25 g y NH₄Cl, 50 g; en 500 ml de H₂O, se ajustó el pH a 6,8 utilizando NaOH 5N (25 g en 150 mL de H₂O).

Preparación del agar CAS: se adicionó 100 ml de la solución de sales MM9 en 750 ml de H₂O y 15 g de agar agar, se esterilizó en autoclave como se indicó antes. La mezcla se mantuvo a 50°C, se agregó 10 mL de solución de glucosa estéril al 20% y lentamente 100 mL de solución CAS estéril. Se ajustó el volumen final a 1000 mL con agua destilada estéril, se mezcló y vertió en placas.

Se sembró 2 µl de cada cepa crecida en medio LB durante 24 h en el centro de placas con medio CAS y se incubaron a 28 °C por 72 h. Se utilizó como control del ensayo una placa sin inóculo y como control positivo la cepa *E. aerogenes* ATCC 13048. Los ensayos se realizaron por triplicado.

La producción de sideróforos se evidenció por la formación de un halo de color naranja alrededor de la colonia en el agar CAS. Esto sucede debido a que el complejo CAS-Fe⁺³-HDTMA se fragmenta por los sideróforos y se forma el complejo Fe⁺³-sideróforo con la liberación del colorante CAS, que da como resultado la formación de la zona naranja (34).

III. RESULTADOS

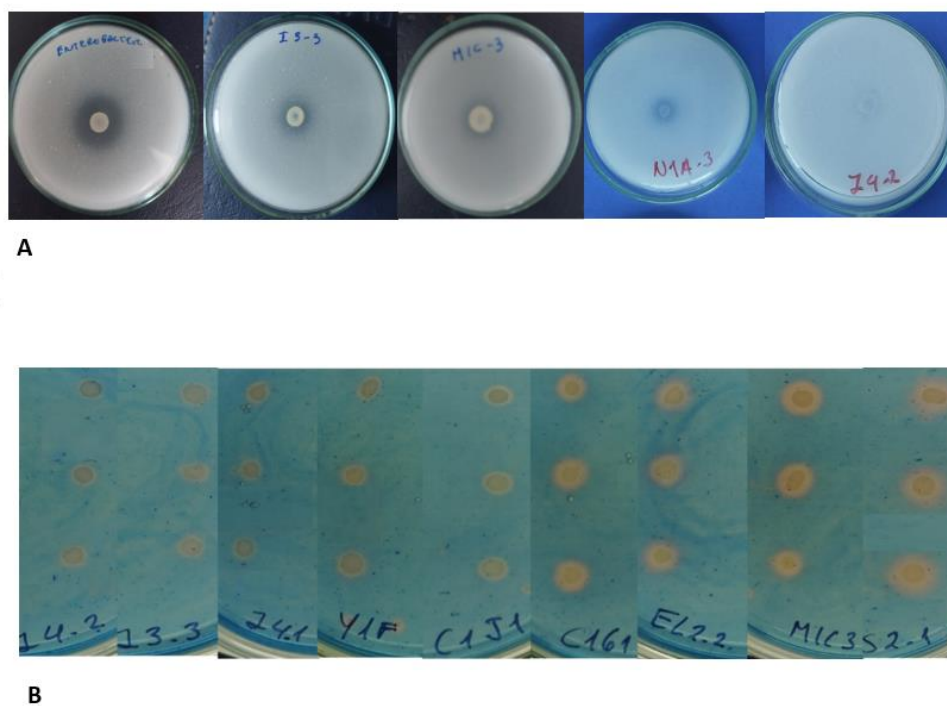


Figura 1. Producción bacteriana de promotores de crecimiento. A. Solubilización de fosfato por las cepas: control positivo *E. aerogenes*, I3-3, M13-3, N1A-3 e I4-2, B. Producción de sideróforos, halos de color naranja alrededor de las colonias, por las cepas I4-2, I3-3, I4-1, Y1F, C1J1, C1G1, EL2-2, M1C-3 y S2-1.

Tabla 1. Solubilización de fosfato inorgánico en medio NBRIP por bacterias aisladas de fuentes acuáticas.

Fuente	Lugar	Código	Solubilización de fosfato inorgánico	
			Medio sólido NBRIP (mm)*	Medio líquido NBRIP (µg/ml)
Laguna de Oxidación	Cachiche	C1G1	2±1	58.75±0.05
		C1J1	2±0	31.81±0.04
	Marcona	M1C-3	4±1	64.31±0.07
		NIA-1	2±1	106.16±0.04
	Yaurilla	NIA-3	4±1	124.95±0.11
		Y1-E	0±0	69.76±0.03
		Y1-E*1	2±0	113.84±0.09
		Y1-F	2±0.5	50.23±0.01
		Y1H-2	2±0.5	22.91±0.05
Relave minero	Ingenio	I3-2	2±0.5	39.49±0.03
		I3-3	5±1	81.62±0.03
		I4-1	2±0.5	82.36±0.03
		I4-2	0	45.42±0.10
	Saramarca	S2-1	2±0.5	27.82±0.04
		EL2-2	0	37.73±0.01
Agua estante		<i>E. aerogenes</i>	8±1	139.21±0.02
Control +		ATCC 13048		

Los datos se muestran como media ± DS (n = 3); *: Diferencia entre halo y diámetro de la colonia.

Tabla 2. Producción de ácido indol acético (AIA) y sideróforos por bacterias aisladas de fuentes acuáticas.

Fuente	Lugar	Código	AIA		Sideróforos*
			µg/mL	Tiempo (h)	
Laguna de Oxidación	Cachiche	C1G1	14.96±0.72	96	4±0
		C1J1	11.81±0.47	96	3±0
	Marcona	M1C-3	11.20±0.57	72	4±1
	Nazca	NIA-1	2.88±0.27	72	3±1
		NIA-3	5.47±0.10	96	N.D.
	Yaurilla	Y1-E	9.06±0.47	96	2±0
		Y1-E*1	2.19±0.57	48	2±0
		Y1-F	7.76±0.55	72	2±0.5
		Y1H-2	7.39±0.14	96	N.D.
Relave minero	Ingenio	I3-2	7.44±0.09	96	2±0
		I3-3	4.82±0.18	96	2±0
		I4-1	5.40±0.37	96	2±0
		I4-2	7.85±0.12	96	2±0.5
	Saramarca	S2-1	6.90±0.45	96	6±2
		EL2-2	3.93±0.54	72	4±1
		<i>E. aerogenes</i>	--	96	6±2
		ATCC 13048			

Los datos se muestran como media ± DS (n = 3); *: Diferencia entre halo y diámetro de la colonia; ND: no determinado.

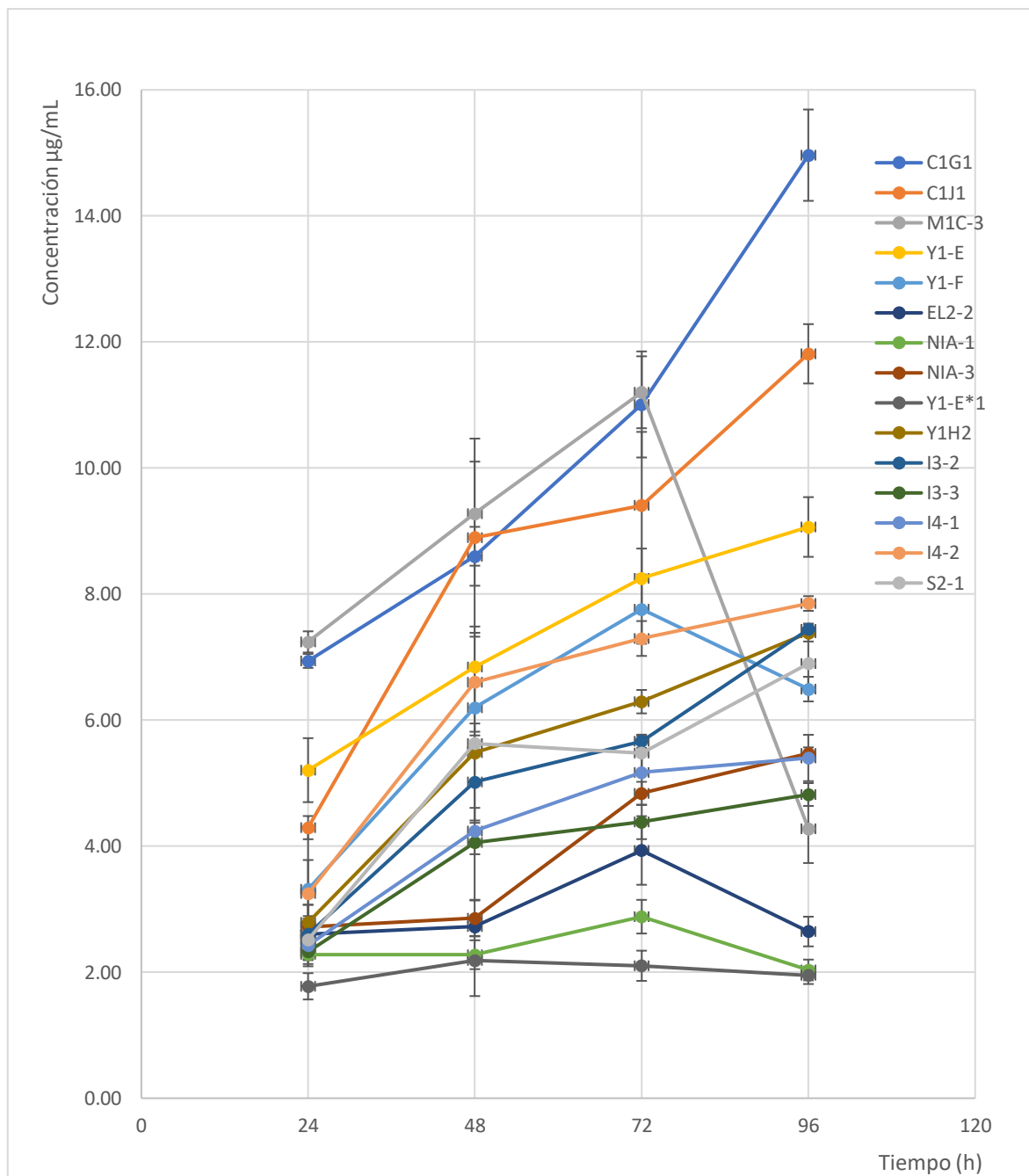


Figura 2. Producción de AIA por bacterias resistentes a metales pesados.

IV. DISCUSIÓN

La presencia de metales pesados contaminantes en los suelos agrícolas como mercurio, cadmio, arsénico y otros, es de interés (34), debido a que disminuyen los índices de actividad microbiana, de manera particular sobre las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (55) y a la vez podría exponer a las personas a los tóxicos a través de los alimentos producidos (13,34). La presencia en el suelo de bacterias resistentes a estos metales tóxicos y que a la vez sean promotoras de crecimiento vegetal es de gran utilidad, debido a que podrían cumplir ambos roles, como bioremediadores, para evitar la absorción de los metales por la planta y como promotores de su crecimiento (13).

La caracterización y evaluación de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal es necesaria, antes de su aplicación en los suelos. En este estudio, algunas de las cepas mostraron la capacidad de solubilizar fosfatos inorgánicos, producir ácido indol acético y sintetizar sideróforos (Figura 1). Estas características variaron según la especie, el tiempo de evaluación, las condiciones de crecimiento y es independiente una de otra. No siempre se presentan todas las características en cada aislado, muchas veces sólo presentan una o más de una de ellas (Tabla 1, Tabla 2). Sin embargo, indican su potencial aplicación y utilidad para la agricultura.

La solubilización de fosfato inorgánico se realizó tanto en medio líquido como en medio sólido NBRIP. El valor de solubilización en medio líquido osciló entre 22.91 y 124.95 $\mu\text{g/mL}$. Aquellas de mayor capacidad fueron las asignadas con los códigos NIA-3, Y1-E*1 y NIA-1 con 124.95, 113.84 y 106.16 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Tabla 1). Esta capacidad se debería a la secreción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, entre ellos: butírico, oxálico, succínico, málico, glucónico, acético, láctico, cítrico, fumárico y 2 cetoglucónico (56). Se ha documentado la actividad solubilizadora de fosfato de bacterias aisladas de plántulas de abeto chino, cuyas capacidades oscilaron entre 44.51 y 123.73 $\mu\text{g/mL}$ en medio de Pikovskaya (PVK) (57); entre 0.08 y 67.61 mg/mL en bacterias aisladas de rizosfera de *Paris polyphylla* var. *yunnanensi* (58) y entre 535.70 y 618.57 $\mu\text{g/mL}$ en medio NBRIP y entre 374.20 y 544.28 $\mu\text{g/mL}$ en medio PVK por *Pseudomonas fluorescens* aislada de suelos de Tunez (59), respectivamente. La capacidad solubilizadora de fosfato en las bacterias es variable, depende del medio donde se ha desarrollado y está relacionada con su carácter fisiológico y metabólico (57). En la mayoría de las bacterias, la solubilización de fosfato varía entre 26,9 a 43,3 mg/L , mientras que la capacidad de solubilización de fosfato de los hongos generalmente de 3,2 a 5,4 veces mayor que la de las bacterias (57).

En las evaluaciones realizadas en medio sólido, se observaron halos de solubilización de fosfato inorgánicos con medidas que variaron entre 2 a 6 mm. Las cepas que presentaron los mayores halos fueron NIA-3, NIA-1 y I3-3, con valores de 6, 4 y 4 mm, respectivamente. En este estudio se ha observado que el tamaño del halo no es concluyente sobre la capacidad solubilizadora de fosfato de la bacteria. Esto se debe a que, en algunos casos, se observó dicha actividad en medio líquido pero no se observó halo de solubilización en agar NBRIP, tal es el caso de las cepas Y1-E, Y1H-2, I4-1, I4-2 y EI2-2 (Tabla 1). Esto probablemente se deba a limitaciones de contacto entre el fosfato y la bacteria, por la condición del medio de cultivo o debido a que la bacteria secreta diferentes tipos de ácidos orgánicos en el agar y no difunden en forma adecuada. Esta observación ha sido documentada y se sugiere que la aplicación del método directo en medio líquido es más confiable para determinar la capacidad solubilizadora de fosfatos en bacterias (6).

La producción de AIA por las cepas, resistente a metales pesados, evaluadas en este estudio osciló entre 2.01 y 14.96 ug/mL. Las asignadas con los códigos C1G1 y G1J1 fueron las que presentaron la mayor producción con 14.96 y 11.81 ug/mL de AIA, respectivamente (Tabla N° 2) y según características bioquímicas y fisiológicas pertenecerían a especies del género *Pseudomonas*. Durante el proceso de evaluación, durante 96 h con mediciones a intervalos de 24 h, se observó que algunas de ellas alcanzan la mayor producción a las 48 y 72 h (Tabla 2). En el caso de las cepas M1C-3 y Y1-F alcanzaron su mayor valor a las 72 h y luego disminuye (Figura 2), lo que sugiere que un cultivo de estas bacterias para su aplicación no debe exceder de las 72 h. Esto sucedería porque el AIA es derivado a otra vía metabólica o debido a un efecto de regulación negativa por exceso de triptófano, como sucede en el caso del operón *trp*, precursor de la síntesis de AIA (60). Estas cepas mostraron ser buenas candidatas para aplicarlas como promotoras de crecimiento vegetal, debido a la similitud del AIA producido, en comparación con los valores mostrados por otras especies de bacterias como: *Azospirillum brasilense* CD, 10.8 µg/mL; *A. brasilense* Az39, 2.9 µg/mL (Perrig 2007); *Bacillus* sp. NCTB5I, 36.93 mg/L; *Brevundimonas* sp. CHTB 2C, 13.13 mg/L y *Pseudomonas* sp. CHTB5B, 6.65 mg/L.

En la determinación de los sideróforos las cepas M1C-3 y S2-1, que pertenecerían a especies del género *Pseudomonas*, mostraron ser las mayores productoras según la formación de halos en el medio agar CAS y cambiando el color del medio de azul verdoso a naranja (Figura 1, Tabla 2), característica útil en la detección de sideróforos, principalmente para las Gram negativas (54). Esta característica indicaría que el tipo de sideróforo generado sería hidroxamato (30). Se ha documentado que miembros del género *Pseudomonas* producen una amplia variedad de tipos de sideróforos (21).

La presencia de bacterias productoras de sideróforos en aguas residuales se relacionaría con la necesidad de captar hierro a través de receptores debido a su baja disponibilidad asimilable, a pesar de que éste metal es abundante en la corteza, pero se encuentra en su estado férrico (Fe^{3+}) insoluble en suelos con pH neutros y básicos (22). Como los sideróforos tienen una fuerte afinidad o selectividad al Fe, también pueden hacerlo con otros metales (21), por lo que es posible que su actividad quelante contribuya en la resistencia de las bacterias a los metales pesados, los cuales también inducen su producción (34). Esto requiere estudios adicionales en las bacterias evaluadas.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se sugiere realizar ensayos con plantas para determinar el efecto de las bacterias sobre su crecimiento, de manera particular aquellas cepas que mostraron los mayores valores de solubilización de fosfatos y producción de AIA y sideróforos. Es necesario hacer aplicaciones de cultivos bacterianos puros y de consorcios para determinar posibles efectos sinérgicos. Asimismo, realizar ensayos en suelos con presencia de metales pesados.

Las bacterias evaluadas para determinar su capacidad como promotoras de crecimiento vegetal proceden de aguas residuales, hábitat poco explorado con este fin. Esto sugiere que es una fuente muy importante de diversidad microbiana en particular de aquellas que muestran resistencia a diversos tóxicos como los metales pesados.

V. CONCLUSIONES

Bacterias resistentes a metales pesados aisladas de aguas residuales tienen la capacidad de solubilizar fosfato inorgánico, producir ácido indolacético y sideróforos, características relacionadas con la promoción de crecimiento vegetal.

VI. REFERENCIAS BIOBLOGRÁFICAS

1. Gouda S, Kerry RG, Das G, Paramithiotis S, Shin HS, Patra JK. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. Vol. 206, Microbiological Research. Elsevier GmbH; 2018. p. 131–40.
2. Vejan P, Abdullah R, Khadiran T, Ismail S, Nasrulhaq Boyce A. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability-A review. *Molecules*. 2016 May 1;21(5).
3. Bhardwaj D, Ansari MW, Sahoo RK, Tuteja N. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. Vol. 13, Microbial Cell Factories. BioMed Central Ltd.; 2014.
4. Cao M, Narayanan M, Shi X, Chen X, Li Z, Ma Y. Optimistic contributions of plant growth-promoting bacteria for sustainable agriculture and climate stress alleviation. *Environ Res*. 2023 Jan 15;217.
5. Adeniji AA, Babalola OO. Evaluation of *Pseudomonas fulva* PS9.1 and *Bacillus velezensis* NWUMFkBS10.5 as candidate plant growth promoters during Maize-*Fusarium* Interaction. *Plants*. 2022 Feb 1;11(3).
6. Nautiyal CS. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett*. 1999;170(1):265–70.
7. Numan M, Bashir S, Khan Y, Mumtaz R, Shinwari ZK, Khan AL, et al. Plant growth promoting bacteria as an alternative strategy for salt tolerance in plants: A review. Vol. 209, Microbiological Research. Elsevier GmbH; 2018. p. 21–32.
8. Lami MJ, Adler C, Caram-Di Santo MC, Zenoff AM, de Cristóbal RE, Espinosa-Urgel M, et al. *Pseudomonas stutzeri* MJL19, a rhizosphere-colonizing bacterium that promotes plant growth under saline stress. *J Appl Microbiol*. 2020 Nov 1;129(5):1321–36.
9. Kumar A, Verma JP. Does plant—Microbe interaction confer stress tolerance in plants: A review?. Vol. 207, Microbiological Research. Elsevier GmbH; 2018. p. 41–52.
10. Santoyo G, Moreno-Hagelsieb G, del Carmen Orozco-Mosqueda M, Glick BR. Plant growth-promoting bacterial endophytes. Vol. 183, Microbiological Research. Elsevier GmbH; 2016. p. 92–9.
11. Afzal I, Shinwari ZK, Sikandar S, Shahzad S. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. Vol. 221, Microbiological Research. Elsevier GmbH; 2019. p. 36–49.
12. Poria V, Dębiec-Andrzejewska K, Fiodor A, Lyzohub M, Ajjiah N, Singh S, et al. Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) integrated phytotechnology: A sustainable approach for remediation of marginal lands. Vol. 13, Frontiers in Plant Science. Frontiers Media S.A.; 2022.

13. Kumar V, Singh S, Singh J, Upadhyay N. Potential of plant growth promoting traits by bacteria isolated from heavy metal contaminated soils. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2015 Jun 1;94(6):807–14.
14. Adhikary A, Kumar R, Pandir R, Bhardwaj P, Wusirika R, Kumar S. *Pseudomonas citronellolis*; a multi-metal resistant and potential plant growth promoter against arsenic (V) stress in chickpea. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2019 Sep 1;142:179–92.
15. Chiboub M, Jebara SH, Saadani O, Fatnassi IC, Abdelkerim S, Jebara M. Physiological responses and antioxidant enzyme changes in *Sulla coronaria* inoculated by cadmium resistant bacteria. *J Plant Res*. 2018 Jan 1;131(1):99–110.
16. Zehra A, Raytekar NA, Meena M, Swapnil P. Efficiency of microbial bio-agents as elicitors in plant defense mechanism under biotic stress: A review. Vol. 2, *Current Research in Microbial Sciences*. Elsevier Ltd; 2021.
17. Khan N, Bano AMD, Babar A. Impacts of plant growth promoters and plant growth regulators on rainfed agriculture. *PLoS One*. 2020 Apr 1;15(4).
18. Fincheira P, Quiroz A. Microbial volatiles as plant growth inducers. Vol. 208, *Microbiological Research*. Elsevier GmbH; 2018. p. 63–75.
19. Fincheira P, Quiroz A, Tortella G, Diez MC, Rubilar O. Current advances in plant-microbe communication via volatile organic compounds as an innovative strategy to improve plant growth. Vol. 247, *Microbiological Research*. Elsevier GmbH; 2021.
20. Rath M, Mitchell TR, Gold SE. Volatiles produced by *Bacillus mojavensis* RRC101 act as plant growth modulators and are strongly culture-dependent. *Microbiol Res*. 2018 Mar 1; 208:76–84.
21. Ahmed E, Holmström SJM. Siderophores in environmental research: Roles and applications. *Microb Biotechnol*. 2014;7(3):196–208.
22. Kramer J, Özkaya Ö, Kümmerli R. Bacterial siderophores in community and host interactions. Vol. 18, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Research; 2020. p. 152–63.
23. Gang S, Sharma S, Saraf M, Buck M, Schumacher J. Analysis of indole-3-acetic acid (IAA) production in *Klebsiella* by LC-MS/MS and the Salkowski method. *Journal of Food Legumes*. 2020 Jul 1;33(3):181–90.
24. Ambrosini A, Passaglia LMP. Plant growth-promoting bacteria (PGPB): Isolation and screening of PGP activities. *Curr Protoc Plant Biol*. 2017 Sep 1;2(3):190–209.
25. Chlebek D, Płociniczak T, Gobetti S, Kumor A, Hupert-Kocurek K, Pacwa-Płociniczak M. Analysis of the genome of the heavy metal resistant and hydrocarbon-degrading rhizospheric *Pseudomonas qingdaonensis* zcr6 strain and assessment of its plant-growth-promoting traits. *Int J Mol Sci*. 2022 Jan 1;23(1).
26. Uma Maheswar N, Sathiyavani G. Solubilization of phosphate by *Bacillus Sps*, from groundnut rhizosphere (*Arachishypogaea* L). *J Chem Pharm Res*. 2012;4(8):4007–11.

27. Liang JL, Liu J, Jia P, Yang T tao, Zeng Q wei, Zhang S chang, et al. Novel phosphate-solubilizing bacteria enhance soil phosphorus cycling following ecological restoration of land degraded by mining. ISME Journal [Internet]. 2020;14(6):1600–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41396-020-0632-4>
28. Ratnaningsih HR, Noviana Z, Dewi TK, Loekito S, Wiyono S, Gafur A, et al. IAA and ACC deaminase producing-bacteria isolated from the rhizosphere of pineapple plants grown under different abiotic and biotic stresses. Heliyon. 2023 Jun 1;9(6).
29. He X, Xu M, Wei Q, Tang M, Guan L, Lou L, et al. Promotion of growth and phytoextraction of cadmium and lead in *Solanum nigrum* L. mediated by plant-growth-promoting rhizobacteria. Ecotoxicol Environ Saf. 2020 Dec 1;205.
30. Pérez-Miranda S, Cabirol N, George-Téllez R, Zamudio-Rivera LS, Fernández FJ. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. J Microbiol Methods. 2007 Jul;70(1):127–31.
31. Alaylar B, Güllüce M, Karadayi M, Isaoglu M. Rapid Detection of Phosphate-Solubilizing Bacteria from Agricultural Areas in Erzurum. Curr Microbiol [Internet]. 2019;76(7):804–9. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01688-7>
32. Perrig D, Boiero ML, Masciarelli OA, Penna C, Ruiz OA, Cassán FD, et al. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. Appl Microbiol Biotechnol. 2007 Jul;75(5):1143–50.
33. Chiwocha SDS, Abrams SR, Ambrose SJ, Cutler AJ, Loewen M, Ross ARS, et al. A method for profiling classes of plant hormones and their metabolites using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry: An analysis of hormone regulation of thermodormancy of lettuce (*Lactuca sativa* L.) seeds. Plant Journal. 2003 Aug;35(3):405–17.
34. Sarvepalli M, Velidandi A, Korrapati N. Optimization of Siderophore Production in Three Marine Bacterial Isolates along with Their Heavy-Metal Chelation and Seed Germination Potential Determination. Microorganisms. 2023 Dec 1;11(12).
35. Sarvepalli M, Velidandi A, Korrapati N. Optimization of Siderophore Production in Three Marine Bacterial Isolates along with Their Heavy-Metal Chelation and Seed Germination Potential Determination. Microorganisms. 2023 Dec 1;11(12).
36. Azizoglu U. *Bacillus thuringiensis* as a Biofertilizer and Biostimulator: a mini-review of the little-known plant growth-promoting properties of Bt. Vol. 76, Current Microbiology. Springer New York LLC; 2019. p. 1379–85.
37. Bennis M, Kaddouri K, Badaoui B, Bouhnik O, Chaddad Z, Perez-Tapia V, et al. Plant growth promoting activities of *Pseudomonas sp.* and *Enterobacter sp.* isolated from the rhizosphere of *Vachellia gummifera* in Morocco. FEMS Microbiol Ecol. 2023 Nov 1;99(11).
38. Trinh CS, Lee H, Lee WJ, Lee SJ, Chung N, Han J, et al. Evaluation of the plant growth-promoting activity of *Pseudomonas nitroreducens* in *Arabidopsis thaliana* and *Lactuca sativa*. Plant Cell Rep. 2018 Jun 1;37(6):873–85.

39. Krishnan SN, Nayariseri A, Rajamanickam U. Identification and characterization of cresol degrading *Pseudomonas monteilii* strain SHY from Soil samples. *Bioinformation*. 2018;14(9):455–64.
40. Ping L, Zhang C, Cui H, Yuan X, Cui J, Shan S. Characterization and application of a newly isolated pyrene-degrading bacterium, *Pseudomonas monteilii*. *3 Biotech*. 2017;7(5):1–7.
41. Carraro N, Sentchilo V, Polák L, Bertelli C, van der Meer JR. Insights into mobile genetic elements of the biocide-degrading bacterium *Pseudomonas nitroreducens* hbp-1. *Genes (Basel)*. 2020;11(8):1–19.
42. Cabral L, Giovanella P, Gianello C, Bento FM, Andreazza R, Camargo FAO. Isolation and characterization of bacteria from mercury contaminated sites in Rio Grande do Sul, Brazil, and assessment of methylmercury removal capability of a *Pseudomonas putida* V1 strain. *Biodegradation*. 2013;24(3):319–31.
43. Luque-Almagro VM, Escribano MP, Manso I, Sáez LP, Cabello P, Moreno-Vivián C, et al. DNA microarray analysis of the cyanotroph *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 in response to nitrogen starvation, cyanide and a jewelry wastewater. *J Biotechnol*. 2015;214:171–81.
44. Naguib MM, Khairalla AS, El-Gendy AO, Elkhatib WF. Isolation and characterization of mercury-resistant bacteria from 2 wastewater sources in Egypt Heavy metal tolerance in bacteria isolated from Egyptian wastewater. (002082):1–33. Available from: www.nrcresearchpress.com
45. Nowrotek M, Jałowiecki Ł, Plaza G. Fluoroquinolone resistance and virulence properties among wastewater *Aeromonas caviae* isolates. *Microbial Drug Resistance*. 2021;27(2):179–89.
46. Skwor T, Stringer S, Haggerty J, Johnson J, Duhr S, Johnson M, et al. Prevalence of potentially pathogenic antibiotic-resistant *Aeromonas spp.* in treated urban wastewater effluents versus recipient riverine populations: A 3-year comparative study. *Appl Environ Microbiol*. 2020;86(3):1–16.
47. Mosa KA, Saadoun I, Kumar K, Helmy M, Dhankher OP. Potential biotechnological strategies for the cleanup of heavy metals and metalloids. *Front Plant Sci*. 2016;7(MAR2016):1–14.
48. Ratnaningsih HR, Noviana Z, Dewi TK, Loekito S, Wiyono S, Gafur A, et al. IAA and ACC deaminase producing-bacteria isolated from the rhizosphere of pineapple plants grown under different abiotic and biotic stresses. *Heliyon*. 2023 Jun 1;9(6).
49. Hernández I, Taulé C, Pérez-Pérez R, Battistoni F, Fabiano E, Villanueva-Guerrero A, et al. Endophytic seed-associated bacteria as plant growth promoters of Cuban rice (*Oryza sativa* L.). *Microorganisms*. 2023 Sep 1;11(9).
50. Quispe N, Zanabria D, Chavez E, Cuadros F, Carling G, Paredes B. Health risk assessment of heavy metals (Hg, Pb, Cd, Cr and As) via consumption of vegetables cultured in agricultural sites in Arequipa, Peru. *Chemical Data Collections*. 2021 Jun 1;33.

51. Román-Ochoa Y, Choque Delgado GT, Tejada TR, Yucra HR, Durand AE, Hamaker BR. Heavy metal contamination and health risk assessment in grains and grain-based processed food in Arequipa region of Peru. *Chemosphere*. 2021 Jul 1;274.
52. Guarín D, Hamamura NR, Cortez JB, Benavides J, Spargo J, Guiltinan M, et al. Cadmium contamination in cacao farms of Piura, North Peru: A comprehensive assessment of geogenic and anthropogenic sources and implications for future production. *Environmental Challenges*. 2023 Dec 1;13.
53. Chirinos-Peinado D, Castro-Bedriñana J, Barnes EPG, Ríos-Ríos E, García-Olarte E, Castro-Chirinos G. Assessing the Health Risk and Trophic Transfer of Lead and Cadmium in Dairy Farming Systems in the Mantaro Catchment, Central Andes of Peru. *Toxics*. 2024 May 1;12(5).
54. Louden BC, Haarmann D, Lynne AM. Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *J Microbiol Biol Educ*. 2011 Jan;12(1):51–3.
55. Wang Y, Narayanan M, Shi X, Chen X, Li Z, Natarajan D, et al. Plant growth-promoting bacteria in metal-contaminated soil: Current perspectives on remediation mechanisms. Vol. 13, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
56. Liang JL, Liu J, Jia P, Yang T tao, Zeng Q wei, Zhang S chang, et al. Novel phosphate-solubilizing bacteria enhance soil phosphorus cycling following ecological restoration of land degraded by mining. *ISME Journal*. 2020 Jun 1;14(6):1600–13.
57. Chen J, Zhao G, Wei Y, Dong Y, Hou L, Jiao R. Isolation and screening of multifunctional phosphate solubilizing bacteria and its growth-promoting effect on Chinese fir seedlings. *Sci Rep [Internet]*. 2021;11(1):1–13. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88635-4>
58. Du HH, Zhu FR, Yang M, Guo DQ, Zhao SX, Li QT, et al. Isolation and identification of phosphatolytic bacteria in *Paris polyphylla* var. yunnanensis. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*. 2021 Feb 15;46(4):915–22.
59. Amri M, Rjeibi MR, Gatrouni M, Mateus DMR, Asses N, Pinho HJO, et al. Isolation, identification, and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from Tunisian soils. *Microorganisms*. 2023 Mar 1;11(3).
60. Vega-Celedón P, Canchignia Martínez H, González M, Seeger M. Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias Review Biosynthesis of indole-3-acetic acid and plant growth promoting by bacteria. *Cultivos Tropicales [Internet]*. 2016;37(especial):33–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.1.5158.3609>