

## **Utilización de microorganismos para incrementar la eficiencia de acumulación de cobre de las plantas**

CARRILLO-CASTAÑEDA, Guillermo

G. Carrillo

‘Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. Km. 36.5 Carretera Federal Los Reyes-Texcoco. Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México. C. P. 56230. México.  
carrillo@colpos.mx

F. Rérez, E. Figueroa, L. Godínez, J. Quiroz y R. García (eds.) Química, Biología y Agronomía. Handbook T-I. - ©ECORFAN, Texcoco de Mora-México, 2016.

## Abstract

Copper is both an essential and a toxic element since it participates in numerous physiological processes and as a cofactor for many metal proteins; although, excess copper inhibits and impairs photosynthetic electron transport. Microbial consortia for regulating trace-metal uptake are important factors in either limiting or present at toxic levels. It was isolated 18 isolates of fluorescent *Pseudomonas* which are able to grow and produce siderophores in the presence of  $10^{-4}$  up to  $2.5 \times 10^{-3}$  M  $\text{CuSO}_4$ . It was important to define the optima growth condition of these cultures, using as criteria growth and pigment accumulation. For that reason the original BK medium was modified reducing: the amounts of casein hydrolysate (45%), and 67 and 33% of  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Out of the 18 isolates, 8 of them accumulated high amounts of siderophores and in the strains A7 and T16,  $2.5 \times 10^{-3}$  M  $\text{CuSO}_4$  induced the biosynthesis of siderophores.

## 8 Introducción

El cobre es un metal que ha sido ampliamente utilizado en agricultura como principio activo, de muchos compuestos para el control de hongos fitopatógenos y, por esta razón, está siendo acumulado en suelos a concentraciones que ya son tóxicas para los cultivos e incluso para la microflora del suelo que es tan importante para las plantas. Ciertos aislamientos bacterianos toleran la presencia de cobre y lo solubilizan (González-Chávez *et al.* 2009), otros regulan la asimilación cuando la cantidad es baja (Kloepper *et al.*, 1980) o es tóxica por altos niveles mientras que otros microorganismos son potencialmente útiles en sistemas de fitorremediación (Carrillo-Castañeda *et al.* 2011).

Existen ciertas plantas que pueden crecer en estos suelos contaminados y que, además, pueden acumular relativamente altas cantidades de metales como el cobre. Ciertos microorganismos de la rizosfera que se han detectado, estimulan o promueven la capacidad de acumulación de metales por ciertas plantas de *Phaseolus vulgaris* (Carrillo-Castañeda *et al.* 2005; Martínez y Carrillo-Castañeda, 1990) e incluso, promueven el desarrollo de estas plantas acumuladores de metales (Carrillo-Castañeda *et al.* 2002). Algunos aislamientos de estos microorganismos cuando se encuentran desarrollándose en medios en los que el hierro es muy escaso, producen pigmentos fluorescentes que son en realidad sideróforos (Carrillo-Castañeda y Vázquez, 1992; Carrillo-Castañeda y Alvarado-Cano, 2000). Los sideróforos forman de manera selectiva complejos con Fe, Cu, Al, Ca y Cr (McKnight y Morel, 1980).

Posiblemente mediante estos compuestos, la planta modifica el transporte de metales de la raíz al tallo (Carrillo-Castañeda *et al.* 2003) pues el papel de los sideróforos en el proceso de la asimilación y translocación del cobre en las plantas no está plenamente conocido, tema que es muy importante pues toda esta información es de utilidad para incrementar la habilidad de las plantas para remover los metales de las tierras contaminadas. Por esta razón esta investigación, que es muy básica y elemental, se llevó a cabo para establecer condiciones más favorables en el proceso de selección de microorganismos capaces de producir sideróforos cuando se desarrollan en medios con relativa alta concentración de cobre.

Las células bacterianas asociadas a las raíces en la rizosfera, se nutren de las sustancias que exudan las plantas a la vez que son protegidas del estrés cuando el pH del suelo es extremo y de la presencia de metales tóxicos, etc. (Paulsen *et al.*, 2005). Las sustancias que más comúnmente se encuentran en los exudados de las raíces de las plantas de jitomate son carbohidratos de peso molecular bajo, ácidos orgánicos que participan promoviendo o facilitando la colonización de las raíces por las células bacterianas (Kravchenko *et al.*, 2003).

La acumulación de compuestos secundarios, en general, así como de otros como los sideróforos es específicamente regulado por la carencia de hierro en el medio, carencia que induce la producción de sideróforos en las células pero, también, la composición química del medio (da Silva y Amazonas de Almeida. 2006) o la presencia de magnesio (King *et al.*, 1948), modulan la biosíntesis y acumulación de pigmentos fluorescentes en las células desarrolladas en los medios G7c y CYE. Por estas razones la presente investigación fue llevada a cabo para establecer un medio de cultivo práctico y económico para el desarrollo óptimo de ciertas cepas de *Pseudomonas* fluorescentes.

## 8.1 Metodología

Material biológico. Las cepas bacterianas: A7, A9, A9m, Avm, E2, E5, E14, T1, T12, T16, T20, T47, Sv, Pf, Pp y Sm. Para el cultivo de estos microorganismos, el medio de cultivo base utilizado fue el BK, preparado en la condición sólida o líquida. Una serie de medios fue preparado con hidrolizado de caseína de la casa Fluka y, en presencia de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  ( $1.0 \times 10^{-4}$ ,  $5.0 \times 10^{-4}$ ,  $1.0 \times 10^{-3}$ ,  $2.5 \times 10^{-3}$  y  $5.0 \times 10^{-3}$  M). Los cultivos líquidos fueron incubados en un agitador a 100 rpm y los sólidos sobre la superficie del medio en cajas Petri a la temperatura de incubación 26-28 °C. Después del período de incubación, fue determinado el crecimiento bacteriano (turbidez a 660 nm) así como la acumulación de pigmentos fluorescentes en el sobrenadante de medio de cultivo gastado libre de células (absorbencia a 400 nm) de acuerdo a Carrillo-Castañeda y colaboradores (2005). En los cultivos sólidos también fue determinada la capacidad de producción de pigmentos fluorescentes. Tanto para la determinación espectrofotométrica de la turbidez como la de la acumulación de pigmentos fueron tomadas muestras alícuotas de 200  $\mu\text{L}$  del cultivo mezclados con 1800  $\mu\text{L}$  agua destilada o 200  $\mu\text{L}$  de sobrenadante de medio gastado libre de células mezclados con 1800  $\mu\text{L}$  agua destilada.

Debido a que este trabajo es elemental y los resultados que fueron analizados consistían en determinar presencia o ausencia de desarrollo o pigmentos fluorescentes en el medio, no se consideró esencial aplicar diseños y análisis estadísticos.

## 8.2 Resultados

El trabajo consistió en definir las condiciones de cultivo que pudieran mejorar tanto el desarrollo de los cultivos bacterianos como la acumulación de los pigmentos fluorescentes en el medio de cultivo y, para tal fin, la composición del medio de cultivo B de King (BK) fue modificada de manera arbitraria, cuya composición original y los cambios que fueron llevados a cabo se presentan en la Tabla 3.

En este trabajo fueron utilizadas 16 cepas bacterianas que rutinariamente habían sido desarrolladas en el medio BK sólido o líquido, de las cuales, 9 de ellas presentaban fluorescencia. En este trabajo, las 16 cepas fueron cultivadas en cada uno de los medios diseñados para determinar los patrones de desarrollo así como la presencia de pigmentos fluorescentes, pudiéndose presentarse el caso de que cultivos que no producen pigmentos fluorescentes cuando se cultivan en el medio BK, pudieran desarrollar pigmentos en alguno de los medios BK modificados.

1. Hidrolizado de caseína (Fluka). En primer término se trató de determinar la cantidad de hidrolizado de caseína requerida para el desarrollo óptimo de los cultivos, para lo cual, una serie de medios en condición sólida fue preparada que contenían 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 20 g de hidrolizado de caseína por litro (de aquí en adelante, las cantidades de los componentes del medio de cultivo se expresan por litro de medio).

Las células fueron sembradas sobre la superficie del medio para incubarse durante 48 h. Después de la incubación el área de crecimiento bacteriano fue determinado. En los medios que contenían 9 a 20 g de hidrolizado de caseína el tamaño de las colonias fue tan similar que de aquí en adelante el medio fue preparado con únicamente 9 g de hidrolizado de caseína.

2.  $K_2HPO_4$ . En este caso, los cultivos fueron desarrollados en medios en condición sólida y contenían 1.5 ó 2.0 g de  $K_2HPO_4$ . El área de crecimiento bacteriano y la presencia de pigmentos fluorescentes difundidos en el medio sólido fueron determinados después de tres períodos de incubación. Como se muestra en los resultados (Tabla 1), se encontraron diferencias importantes en el patrón de producción de pigmentos, particularmente después de 72 h de incubación ya que en el medio con 1.5 g de  $K_2HPO_4$ , 11 cultivos desarrollaron pigmentos pero con 2.0 g únicamente 6 y 10 no lo presentaron. En el desarrollo de los 16 cultivos no grandes hubo diferencias.
3.  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ . En este caso los cultivos fueron desarrollados en medios líquidos que contenían 0.5, 1.0 y 1.5 g de  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$  y, después de 72 h de incubación, la turbidez de los cultivos fue determinada. A las 72 h de incubación fueron comparadas las lecturas de turbidez obtenidas en los tres medios de cultivo de cada cepa encontrándose que en el medio que contenía 0.5 g de  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 9 de los cultivos presentaron la máxima turbidez (Tabla 2), en el que contenía 1.0 g, únicamente 3 y con 1.5 g fueron 4. Resalta el hecho que el medio en que un mayor número de cultivos se desarrollaron mejor fue en el medio que contenía 0.5 g de  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ .

**Tabla 8** Determinación del desarrollo de los cultivos en medios sólidos que contienen 1.5 y 2.0 g de  $K_2HPO_4$  y de la presencia de pigmentos fluorescentes difundidos en el medio a los tiempos de incubación indicados (+ significa crecimiento o presencia de pigmentos, - ausencia de pigmentos).

Ce	24 h incubación		n KB		48 h incubación		KB		72 h incubación		KB	
	1.5 g	2.0	1.5	2.0	1.5 g	2.0	1.5	2.0	1.5 g	2.0	1.5	2.0
	Crecimiento		Pigmentos		Crecimiento		Pigmentos		Crecimiento		Pigmentos	
A7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++
A9	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
A9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++
Av	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
E3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+
E5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E14	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
T1	+	++	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
T12	+	+	++	+	+	+	+	-	+	+	++	-
T16	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
T20	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
T47	+	+	++	+	+	+	+	-	+	+	++	-
Sv	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	++	-
Pf	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Pp	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	++	-
Sm	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	++	-

**Tabla 8.1** Determinación de la turbidez de los cultivos en medios que contienen 0.5, 1.0 ó 1.5 g de  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$  a los tiempos de incubación indicados.

Cepa	24 h incubación			48 h incubación			72 h incubación		
	0.5 g	1.0 g	1.5 g	0.5 g	1.0 g	1.5 g	0.5 g	1.0 g	1.5 g
<b>A7</b>	.546	.340	.370	1.013	.460	.480	1.085	.578	.639
<b>A9</b>	.448	.344	.271	.559	.703	.667	1.045	.670	.765
<b>A9m</b>	.226	.440	.350	.282	.689	.545	.278	.893	.657
<b>Avm</b>	.145	.124	.064	.223	.221	.036	.227	.178	.083
<b>E2</b>	.570	.610	.499	.794	.721	.680	.820	.760	.870
<b>E5</b>	.357	.850	.442	.415	1.068	.556	.433	1.400	.633
<b>E14</b>	.544	.624	.704	.674	.996	1.056	.628	1.053	1.124
<b>T1</b>	.190	.374	.342	.267	.458	.413	.303	.458	.558
<b>T4</b>	.756	.390	.516	1.105	.649	.825	1.089	.645	.932
<b>T12</b>	.765	.470	.756	1.169	.712	1.069	1.234	.793	1.013
<b>T16</b>	.291	.310	.285	.479	.545	.483	.997	1.057	.894
<b>T20</b>	.199	.571	.687	.265	.909	1.052	.264	.944	.981
<b>T47</b>	.576	.434	.618	.958	.749	.816	.903	.801	1.012
<b>Sv</b>	.499	.700	.768	.690	.870	.900	1.050	.840	.921
<b>Pf</b>	.375	.328	.066	.791	.759	.109	.973	.908	.111
<b>Pp</b>	.770	.833	.650	.918	.864	.682	1.161	.943	.994
<b>Sm</b>	.340	.330	.297	.471	.450	.373	.699	.657	.423

En la Tabla 3 se muestra la composición del medio que reúne, de acuerdo a los resultados experimentales observados, las mejores condiciones para el desarrollo de los cultivos bacterianos en estudio. En realidad se llegó a la conclusión de que este medio óptimo debe prepararse con tres cantidades de  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ , de acuerdo a las condiciones específicas de requerimiento de este compuesto de cada cepa: medio de cultivo BK que contiene 0.5 (BK.5), 1.0 (BK1) y 1.5 g (BK1.5) de  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ . El hidrolizado de caseína es un compuesto relativamente caro y desde el punto de vista económico, el medio de cultivo óptimo diseñado para el desarrollo de nuestros cultivos bacterianos contiene menos de la mitad de la cantidad estipulada en el medio BK.

**Tabla 8.2** Composición y modificaciones (1 a 4) realizadas al medio de cultivo para incrementar el desarrollo de los cultivos bacterianos y la producción de pigmentos. (Las cantidades están expresadas en gramos por litro).

<b>Componente</b>	<b>Composición del medio BK original</b>	<b>Cambios efectuados.</b>
<b>1. Proteosa peptona # 3 (Difco)</b>	20.0 g	Hidrolizado de caseína de la casa Fluka: 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 20 g
<b>2. K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	1.5 g	1.5 y 2.0 g
<b>3. MgSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O</b>	1.5 g	0.5, 1.0 y 1.5 g
<b>Glicerol</b>	10.0 mL	
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1000.0 mL	
<b>4. pH</b>	7.2	7.2 y 5.0

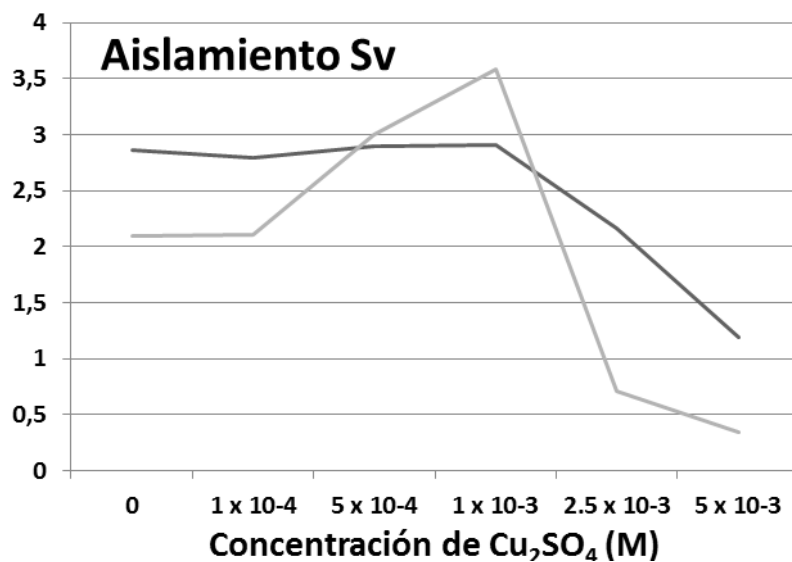
En esta investigación que se basa en un aspecto metodológico, fueron utilizados medios de cultivo en condición sólida y líquida para demostrar, que es posible, determinar y poder comparar entre todas las cepas en estudio tanto el desarrollo así como la acumulación de pigmentos fluorescentes por los cultivos.

El siguiente aspecto a explorar fue la determinación de la capacidad de desarrollo de cada una de las cepas bacterianas así como, el aspecto más importante de esta investigación, la capacidad de acumular los pigmentos fluorescentes cuando estas se desarrollan en presencia de altas concentraciones de cobre y, con tal finalidad las células bacterianas fueron cultivadas en medios que contenían CuSO<sub>4</sub>. En este caso fueron preparados los medios de cultivo con la cantidad específica de MgSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O requerida por cada cepa bacteriana. Los medios de cultivo en estado líquido fueron preparados con 1x10<sup>-4</sup>, 5x10<sup>-4</sup>, 1x10<sup>-3</sup>, 2.5x10<sup>-3</sup> y 5x10<sup>-3</sup> M de CuSO<sub>4</sub>. Después de incubar los cultivos hasta 48 h los patrones de turbidez así como de acumulación de pigmentos fluorescentes en los medios gastados libres de células fueron analizados.

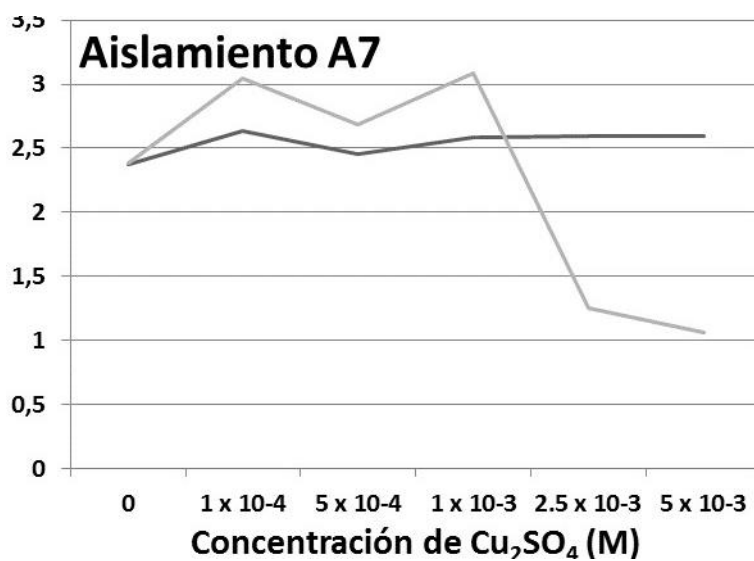
En la Figura 1 se muestran, como ejemplo, los patrones de crecimiento y acumulación de pigmentos por cultivos que fueron seleccionados por ser el número 1 y 2 en haber acumulado pigmentos fluorescentes. En ambos caso la máxima acumulación se presentó en los cultivos desarrollados con 10<sup>-3</sup> M de CuSO<sub>4</sub> y llama la atención que el cultivo A7 presenta dos picos de máxima absorción, una a la concentración de 10<sup>-4</sup> y otro a la concentración de 10<sup>-3</sup> M de CuSO<sub>4</sub> lo cual se interpreta como la capacidad de estas células de producir 2 tipos distintos de sideróforos. Se conoce que muchos microorganismos pueden sintetizar más de un tipo de sideróforo. El segundo aspecto muy importante es el hecho que, de acuerdo con los patrones de acumulación de pigmentos fluorescentes, pareciera que en las células la biosíntesis de estos sideróforos se induce con la presencia de cobre a las concentraciones indicadas y, por ello se ha encontrado la mayor acumulación de pigmentos fluorescentes en esas condiciones de cultivo.

**Figura 8** Ejemplo de los patrones de: crecimiento bacteriano a 660 nm (línea oscura) y acumulación de pigmentos fluorescentes a 400 nm (línea clara), de los cultivos de dos aislamientos (A y B) desarrollados durante 48 h en presencia de las concentraciones de  $\text{CuSO}_4$  indicadas.

A



B



**Tabla 8.3** Desarrollo (660 nm) y acumulación de pigmentos fluorescentes (400 nm) de los cultivos, desarrollados en presencia de cobre, a los tiempos de incubación indicados.

Cepa	Concentración	Incubación (24 h)		Incubación (48 h)		
	molar de	Turbidez (660 nm)	Pigmentos (400 nm)	Turbidez (660 nm)	Pigmentos (400 nm)	
<b>1. A7</b>	$1.0 \times 10^{-4}$		2.03	1.26	2.63	3.05
	$1.0 \times 10^{-3}$		1.91	1.56	2.58	3.09
<b>2. A9</b>	$1.0 \times 10^{-3}$		2.21	0.95	2.43	2.56
<b>3. A9m</b>	0.0		2.35	1.06	2.41	1.41
<b>4. Avm</b>	$1.0 \times 10^{-4}$		2.18	0.56	2.23	0.86
<b>5. E2</b>	$5.0 \times 10^{-4}$		2.21	0.76	2.58	1.62
<b>6. E5</b>	$2.5 \times 10^{-3}$		2.16	0.49	2.42	1.28
<b>7. E14</b>	$2.5 \times 10^{-3}$		2.40	0.12	2.59	0.18
<b>8. T1</b>	$5.0 \times 10^{-3}$		1.77	0.14	1.91	0.17
<b>9. T12</b>	$1.0 \times 10^{-4}$		2.27	0.37	2.60	0.77
<b>10. T16</b>	$5.0 \times 10^{-3}$		1.34	0.44	1.67	0.55
<b>11. T20</b>	0.0		2.01	0.10	2.42	0.25
<b>12. T47</b>	0.0		2.06	0.24	2.23	1.38
<b>13. Pf</b>	$1.0 \times 10^{-3}$		2.30	0.73	2.56	1.12
<b>14. Pp</b>	$1.0 \times 10^{-4}$		2.23	0.48	2.42	0.74
<b>15. Sm</b>	$1.0 \times 10^{-4}$		2.22	0.09	2.60	0.33
<b>16. Sv</b>	$1.0 \times 10^{-3}$		2.45	0.69	2.91	3.58

En la Tabla 4 se presentan los resultados de los valores de la máxima acumulación de pigmentos observados en cada uno de los cultivos desarrollados en presencia de las diferentes concentraciones de cobre los cultivos durante 48 h de incubación, y llama la atención que de las 16 cepas estudiadas, 8 acumulan pigmentos fluorescentes, 5 superando la lectura de 1.0, 1 la lectura de más de 2 y 2 superando la lectura de más de 3.



**Tabla 8.4** Desarrollo (660 nm) y acumulación de pigmentos fluorescentes (400 nm) por los cultivos desarrollados en medios de cultivo ajustados a pH de 5 y, a los tiempos de incubación indicados.

Cepa	48 h incubación		72 h incubación		7 días de incubación	
	400 nm	660 nm	400 nm	660 nm	400 nm	660 nm
<b>A7</b>	1.682	.789	2.036	.837	2.146	.577
<b>A9</b>	1.103	.728	1.275	.750	1.128	.358
<b>A9m</b>	.510	.680	.994	.761	1.097	.567
<b>Avm</b>	.218	.434	1.314	.628	1.943	.504
<b>E2</b>	.024	.900	.098	1.013	.250	.751
<b>E5</b>	.120	1.031	.224	1.335	.333	1.010
<b>E14</b>	.002	.840	.021	.750	.070	.690
<b>T1</b>	.002	.408	.009	.414	.031	.448
<b>T12</b>	.059	.789	.087	.800	.152	.578
<b>T16</b>	.050	.810	.067	.818	.387	.271
<b>T20</b>	.011	.658	.035	.745	.087	.770
<b>T47</b>	.042	.860	.082	.834	.091	.630
<b>Sv</b>	.522	.871	.532	.832	.640	.884
<b>Pf</b>	.136	.629	.422	.802	.697	.479
<b>Pp</b>	.089	.740	.198	.764	.354	.423
<b>Sm</b>	.004	.770	.022	.905	.141	.575

El otro aspecto importante es el pH del medio en el que se desarrollan los cultivos, que tiene repercusión en la capacidad de las células para colonizar la raíz de la planta (Nye, 1981), así como la capacidad de producción de pigmentos fluorescentes. Hayashi *et al.* (2005) estudiaron el pH de la rizosfera de plantas de arroz y trigo y, de acuerdo a su escala de pH, se observa que el pH de la rizosfera en ambos casos esta en torno al pH 5. Se conoce que las células de *P. fluorescens* viven a expensas de las sustancias que se encuentran en los exudados de las raíces de las plantas, que fundamentalmente son carbohidratos de bajo peso molecular y ácidos orgánicos (Kravchenko *et al.*, 2003). En realidad esta condición de la raíz es muy variable y depende de muchos factores ambientales pero, la presencia casi constante de ácidos orgánicos hace pensar que el pH de la rizosfera debe ser ácido. En este trabajo y, tomando en cuenta los resultados obtenidos por otros investigadores, la capacidad de los cultivos en estudio para desarrollarse en medios de cultivo ajustados a pH 5 fue analizada y, para lo cual, los cultivos fueron establecidos en los medios: BK.5 ajustado a pH5 (BK.5-5), BK1 ajustado a pH5 (BK1-5) y BK1.5 ajustado a pH5 (BK1.5-5).

Los resultados se muestran en la Tabla 5 y de las 16 cepas en estudio, 4 de ellas, la A7, A9, A9m y Avm desarrollándose en estas condiciones, tuvieron la capacidad de acumular relativamente, gran cantidad de pigmentos fluorescentes aunque el grado de desarrollo se encontró disminuido en relación al desarrollo que presentan a pH neutro. Es posible que la habilidad de los microorganismos para mantenerse asociados a las raíces de las plantas, en gran medida se deba a la capacidad que tengan de poder desarrollarse a pH en torno a 5.

Existe poca información acerca de microorganismos capaces de desarrollarse en medios con alto contenido de cobre (Teitzel *et al.*, 2006), de la inducción de la biosíntesis de sideróforos en relación con el cobre (Clarke *et al.*, 1987), a pesar de que estos microorganismos que presentan estas características son de gran utilidad para promover en las plantas la potencialidad para remover de manera eficiente metales pesados de suelos altamente contaminados (Macnair *et al.*, 2009; Rajkumar *et al.*, 2010). Finalmente, estamos iniciando el proceso de identificación y selección de microorganismos que promueven el desarrollo de las plantas en tierras contaminadas mediante nuevos mecanismos y de manera más eficiente (Ahemad y Kibret, 2014), con los medios de cultivo diseñados para ese propósito.

### 8.3 Conclusiones

Fue posible diseñar los medios de cultivo idóneos para el cultivo de cada una de las cepas bacterianas.

Un número de 8 cepas con las características requeridas 1. Capaces de desarrollarse y producir sideróforos en medios de cultivo que contenían altas concentraciones de cobre.

Demostramos que el pH del medio de cultivo es determinante tanto para el desarrollo de los cultivos bacterianos como para la producción de pigmentos fluorescentes por las bacterias en cultivo.

Estas condiciones óptimas de cultivo serán utilizadas para el aislamiento de nuevas cepas con alta capacidad de producir sideróforos.

### 8.4 Referencias

Ahemad, M y M. Kibret. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University-Science*. 26: 1-20.

Carrillo-Castañeda G. y Ma. E. Alvarado-Cano. 2000. Characterization of siderophore-mediated iron transport from *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli. *Journal of Plant Nutrition*. 23: (11) 150-156.

Carrillo-Castañeda, G, J. Juárez-Muñoz y J. Peralta-Videa. 2005. A spectrophotometric method to determine the siderophore production by strains of fluorescent *Pseudomonas* in the presence of copper and iron. *Microchemical Journal*. 81: 35-40.

Carrillo-Castañeda, G, J. Juárez-Muñoz, J. Peralta-Videa, E. Gomez, K. J. Tieman y J. L. Gardea-Torresdey. 2002. Alfalfa growth promotion by bacteria grown under iron limiting conditions. *Advances in Environmental Research*. 6: 391-399.

- Carrillo-Castañeda, G, J. Juárez-Muñoz, J. Peralta-Videa, E. Gomez, y J. L. Gardea-Torresdey. 2003. Plant growth-promoting bacteria promote copper and iron translocation from root to shoot in alfalfa seedlings. *Journal of Plant Nutrition*. 26 (9): 1801-1814.
- Carrillo-Castañeda, G, J. Juárez-Muñoz, J. Peralta-Videa, E. Gomez, y J.L. Gardea-Torresdey. 2005. Modulation of uptake and translocation of iron and copper from root to shoot in common bean by siderophore-producing microorganisms. *Journal of Plant Nutrition*. 28: 1853-1865.
- Carrillo-Castañeda, G., J. Juárez-Muñoz y G. Tijerina-Castro. 2011. Isolation of innocuous microorganisms able to produce siderophores useful in phytoremediation systems. *Tropical and Subtropical Agroecosystems, North America*. 13: 501-509. Available at: <<http://www.veterinaria.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/1374>>. Date accessed: 28 Nov. 2011.
- Carrillo-Castañeda G. y Ma. del R. Vázquez-Gutiérrez. 1992. Comparative study of siderophore-like activity of *Rhizobium phaseoli* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Plant Nutrition*. 15 (5): 579-590.
- Clarke, S. E., J. Stuart y J. Sanders-Loehr. 1987. Induction of siderophore activity in *Anabaena* spp. and its moderation of copper toxicity. *Apply Environmental Microbiology*. 53 (5): 917-922.
- da Silva, G. A. y E. Amazonas de Almeida. 2006. Production of yellow-green fluorescent pigment by *Pseudomonas fluorescens*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 49 (3): 411-419.
- González-Chávez, M. del C., A. R. Argumedo-Delira, R. Carrillo-González, P. González-Ramírez, G. Carrillo-Castañeda, R. Rojas y J. Cruz-Díaz. 2009. Tolerancia y solubilización de cobre por rizobacterias aisladas de sitios contaminados con elementos potencialmente tóxicos. *Terra Latinoamericana*. 27: 17-25.
- Hayashi Y., K. Tanoi, H. Nishiyama, T. M. Nakanishi. 2005. Rhizosphere pH profile of rice plant influenced by Al treatment. *Soil Science and Plant Nutrition*. 51 (5): 729-731.
- King, J. V., J. R. Campbell y B. A. Eagles. 1948. The mineral requirements for fluorescein production. *Canadian Journal Research*. 26: 514-519.
- Kloepper, J. W., J. Leong, M. Teintze y M. N. Schroth. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*. (London) 286: 885-886.
- Kravchenko L. V., T. S. Azarova, E. I. Leonova-Erko, A. I. Shaposhnikov, N. M. Makarova, I. A. Tikhonovich. 2003. Root exudates of tomato plants and their effect on the growth and antifungal activity of *Pseudomonas* strains. *Microbiology*. 72 (1): 37-41.
- Martínez, C. B. y G. Carrillo-Castañeda. 1990. Estudio sobre el efecto de *Pseudomonas fluorescens* en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. *Agrociencia*. 3: 127-139.
- Macnair, M. R., G. H. Tilstone, S. E. Smith. 2000. The genetics of metal tolerance and accumulation in higher plants. In: Terry N., Banuelos G. (eds.). *Phytoremediation of contaminated soil and water*, pp. 235-250. CRC Press LLC.

McKnight, D. M. y F. M. M. Morel. 1980. Copper complexation by siderophores from filamentous blue-green algae. *Limnology and Oceanography*. 25(1): 62-71.

Nye, P. H. 1981. Changes of pH across the rhizosphere induced by roots. *Plant and Soil*. 61 (1) 7-26.

Paulsen, I. T., C. M. Press, J. Ravel, D. Y. Kobayashi, G. S. Myers, D. V. Mavrodi, R. T. DeBoy, R. Seshadri, Q. Ren, R. Madupu, R. J. Dodson, A. S. Durkin, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, S. A. Sullivan, M. J. Rosovitz, M. L. Gwinn, L. Zhou, D. J. Schneider, S. W. Cartinhour, W. C. Nelson, J. Weidman, K. Watkins, K. Tran, H. Khouri, L. S. Pierson, L. S. Thomashow, J. E. Loper. 2005. Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nature Biotechnology*. 23: 873-878.

Rajkumar, M., N. Ae, M. N. V. Prasad, H. Freitas. 2010. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends Biotechnology*. 28: 142–149.

Teitzel, G. M., A. Geddie, S. K. De Long, M. J. Kirisits, M. Whiteley, M. R. Parsek. 2006. Survival and growth in the presence of elevated copper: Transcriptional profiling of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*†. *Journal of Bacteriology*. 188 (20): 7242-7256.