

*Artículo original de investigación*

## **Análisis de la diversidad microbiana de la rizosfera de tres especies vegetales de un suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo y su potencial rizoremediador**

Ana Lilia Hernández Bejarano<sup>1</sup>, Angélica Ma. Rodríguez Dorantes<sup>1\*</sup>, Miguel Ángel Barrios Rodríguez<sup>1</sup>, Aída Rodríguez Tovar<sup>2</sup> y L. Angélica Guerrero Zúñiga<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Botánica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N.  
Prol. Carpio y Plan de Ayala s/n. C.P.11340, México, D.F.

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N.  
Prol. Carpio y Plan de Ayala s/n. C.P.11340, México, D.F.

<sup>3</sup>Dirección de Seguridad y Medio Ambiente, Instituto Mexicano del Petróleo  
Eje Central Lázaro Cárdenas 152, C.P. 07730, México, D.F.

\* Autor de correspondencia: anrodo2000@hotmail.com

### **Resumen**

Todas aquellas bacterias que habitan en las raíces de las plantas y que influyen sobre el crecimiento de éstas de manera positiva indirecta o directamente por cualquier mecanismo, se denominan rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, entre ellas, los productores bacterianos de ácido indol acético (AIA) poseen el potencial para interferir en el contenido de las pozas de auxinas vegetales. El análisis de las poblaciones microbianas de la rizosfera y la evaluación *in vitro* de su producción auxínica constituye una base importante para la selección de cepas efectivas. El presente estudio consistió en el análisis y la caracterización morfológica y fisiológica de las poblaciones microbianas rizosféricas del suelo y del rizoplano de tres especies de pastos crecidos en suelo contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo, con la finalidad de seleccionar aquellas rizobacterias con producción de fitohormonas como potencial rizoremediador. Las rizobacterias caracterizadas de estas tres especies vegetales evidenciaron la diversidad y abundancia de las mismas que se condicionaron por la presencia y la acumulación de contaminantes por las plantas hospederas; donde *Cyperus hermaphroditus* presentó un menor número de poblaciones rizosféricas pero una mayor acumulación de contaminantes, comparada con *Paspalum arundinaceum* la especie con mayor número de microorganismos asociados a su rizosfera, definidos también por sus características fenéticas a través del análisis numérico. Todas las rizobacterias fueron productoras de AIA; donde las rizobacterias del rizoplano caracterizadas como productoras intermedias, pueden recomendarse para eventos rizoremediadores, en los que la promoción del crecimiento de plantas contribuya a su protección y tolerancia en suelos contaminados.

**Palabras clave:** *ácido indol acético, rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, rizosfera*

## Microbial diversity analysis of the rhizosphere of three plant species from petroleum hydrocarbon contaminated soil and its rhizoremediation potential

### Abstract

All of the bacteria that live in the roots of the plants involved directly or not by any mechanism on the plant's growth are named Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR); among them the Indolic Acetic Acid (IAA) bacterial producers have the potential to participate in the plant's auxins supply. The microbial population's analysis of the rhizosphere and the quantification of the *in vitro* auxins production constitute important characteristics for the selection of effective rhizobacteria. The aim of the present study was the analysis and the morphological and physiological characterization of the microbial rhizosphere populations of the soil and rhizoplane of three grasses species from a contaminated soil with petroleum hydrocarbons, in order to make the selection of those rhizobacteria with phytohormones production and therefore with potential for rhizoremediation. The characterized rhizobacteria of these three species showed that the diversity and abundance of them was conditioned by the presence and accumulation of contaminants by the host plants. *Cyperus hermaphroditus* was the species with the lowest number of rhizosphere microorganisms but with the highest accumulation of contaminants and *Paspalum arundinaceum* with the highest number of rhizospheric microorganisms associated to its rhizosphere, defined too by their phenetic characteristics trough the numerical analysis. All the rhizobacteria isolated and analyzed were IAA producers and in the plant's rhizosphere habitat the rhizoplane bacteria characterized as medium producers could be recommended for rhizoremediation procedures, where the plant growth promotion contributes to their protection and tolerance in contaminated soils.

**Key words:** *indole acetic acid, plant growth promoting rhizobacteria, rhizosphere*

### 1. Introducción

La rizosfera se define como “el volumen del suelo que recibe influencia de la raíz”. Esta capa delgada que circunda la raíz de la planta (cerca de 1 a 2 mm de espesor) ha sido estudiada intensamente en los últimos años. En esta zona residen la mayoría de los microorganismos del suelo, atraídos por los metabolitos que la planta exuda; lo que ocasiona el incremento de las poblaciones microbianas y con ello su actividad (Kuiper *et al.*, 2004; Bartelt-Ryser *et al.*, 2005; Rodríguez-Loinaz *et al.*, 2008; Epelde *et al.*, 2010).

Las interacciones entre bacterias y las raíces pueden ser benéficas, dañinas, o neutras para las plantas. A partir del conocimiento de la rizosfera se ha visto la necesidad de dividir este espacio en endorizosfera y ectorizosfera; la colonización puede ocurrir en la superficie completa de algunas células rizodérmicas y las bacterias pueden establecerse como microcolonias o biofilms (Benizri *et al.*, 2001; Bais *et al.*, 2006); si se coloniza sólo la superficie de la raíz se conoce como rizoplano, que pertenece a la ectorizosfera y si invade las células de las capas superficiales de la raíz corresponde a la zona conocida como endorizosfera (Pérez *et al.*, 2002; Tsavkelova *et al.*, 2006). La presión de

selección de las plantas sobre las poblaciones bacterianas ha tenido su máximo efecto cerca de la superficie radical o en su interior (Marilley y Aragno, 1999; Siciliano *et al.*, 2001).

Todas aquellas bacterias que habitan en las raíces de las plantas y que influyen sobre el crecimiento de éstas de manera positiva indirecta o directamente por cualquier mecanismo, se denominan rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés: Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Kloepper *et al.*, 1989; Arshad y Frankenberger, 1998; Ahmad *et al.*, 2008). Antes de ser capaces de conferir cualquier efecto benéfico en las plantas, las PGPR's por inocular deben ser rizosfera o rizoplano competentes (Compant *et al.*, 2005); esto es que sean capaces de colonizar la rizosfera o el rizoplano durante un período extendido que se caracteriza por una fuerte competencia microbiana (Whipps *et al.*, 2001).

El ácido indol acético (AIA) es la principal auxina de las plantas, que controla una variedad de procesos importantes que incluyen el alargamiento y división celular, la diferenciación tisular y las respuestas fisiológicas a la luz y la gravedad.

Los productores bacterianos de AIA (BIP's por sus siglas en inglés: Bacterial IAA Producers) poseen el potencial para interferir en el contenido de las pozas de auxinas vegetales en particular del AIA. La consecuencia para la planta es que usualmente este es una función tanto de la cantidad de AIA que ella produce como de la sensibilidad que tienen los tejidos vegetales para inducir cambios por la concentración de AIA. La existencia de las BIP's se reconoció muy temprano en la búsqueda de auxinas y las BIP's asociadas a plantas habían sido consideradas como una fuente de contaminación en las mediciones de la concentración de AIA presente en los tejidos vegetales (Wichner y Libbert, 1968a y b;

Libbert y Risch, 1969; Patter y Glick, 1996; Lambrecht *et al.*, 2000; Leveau y Lindow, 2005). Actualmente se han realizado numerosas investigaciones sobre la genética y bioquímica de la producción bacteriana de esta auxina (Lambrecht *et al.*, 2000; Leveau y Lindow, 2005). El L-triptofano (L-Trp) es un aminoácido que es precursor fisiológico para la biosíntesis de auxinas en plantas y microorganismos. Los exudados radicales son fuente natural del Trp para la microbiota rizoférica, la cual puede potenciar la biosíntesis de auxinas en la rizosfera. Se sabe que las auxinas de origen microbiano en la vecindad de las raíces de las plantas, pueden dar también una respuesta fisiológica para la planta hospedera.

Las raíces en primera instancia, son uno de los órganos más sensibles de la planta a las fluctuaciones en el contenido de AIA y su respuesta al incrementarse las cantidades de ésta fitohormona de manera exógena van desde la elongación de la raíz primaria, la formación de raíces laterales y raíces adventicias al cese del crecimiento de la planta (Davies, 1995). Como otras fitohormonas, las auxinas también se sintetizan endógenamente por las plantas; sin embargo, sus efectos hormonales se han elucidado por sus aplicaciones exógenas.

El presente estudio consistió en el análisis y la caracterización morfológica y fisiológica de las poblaciones microbianas rizosféricas del suelo y del rizoplano aisladas de tres especies de pastos crecidos en suelo contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo, con la finalidad de seleccionar aquellas rizobacterias a través de su producción de fitohormonas como potencial rizoremediador, para favorecer el crecimiento de las plantas en suelos contaminados.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Obtención de material vegetal y suelo rizosférico

El material bajo estudio proviene de una colecta realizada en una de las zonas contaminadas del Pantano Santa Alejandrina situado en las inmediaciones de la refinera "Lázaro Cárdenas del Río", en Minatitlán, Veracruz ubicada dentro de la planicie costera del Sureste de México. Con base en evaluaciones realizadas con anterioridad por el Instituto Mexicano del Petróleo y la Universidad Autónoma Metropolitana (IMP y UAM-I, 1997), la cantidad de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) de la zona A es de 47,432 mg/Kg de suelo seco y el contenido de la zona B de 81,640 mg/Kg de suelo seco. De este sitio, se colectaron ejemplares de *Cyperus hermaphroditus* (Jacquin) Standley, *Echinochloa polystachya* y *Paspalum arundinaceum*. Estas especies se colectaron en época de verano y las tres en etapa de floración.

## **2.2 Determinación del Factor de Concentración Radical (FCR) de metales pesados e hidrocarburos aromáticos policíclicos de las especies bajo estudio**

Se colectaron también muestras de suelo del pantano contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo, realizándose su caracterización físico-química y la cuantificación del contenido de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y metales pesados.

La evaluación del contenido de HAP y metales pesados en las plantas colectadas se realizó a partir del material vegetal cosechado, que se fraccionó en raíces, tallos y hojas, se secó a 70 °C por 24 horas, para guardar el material de biomasa seca.

Para la determinación de la concentración de los HAP, entre ellos de los 16 considerados por la EPA como prioritarios, de los ejemplares de las especies de plantas colectadas se tomaron fracciones de la biomasa seca del material colectado, que se fraccionó aún más en porciones de 1cm<sup>2</sup>, las cuales se depositaron en tubos de tapón de

rosca de 20mL a los que se les adicionó por muestra 5mL de diclorometano (grado HPLC) para efectuar la extracción de las fracciones de los HAP presentes. Este material se sometió a ultrasonicación utilizando un Ultrasonic Cleaner Branson Model 321 OR-MT, a 130W (47kHz) por 15 minutos, siguiendo la modificación establecida al protocolo sugerido por Ratola et al. (2006). Se recuperaron muestras del extracto ultrasonicado de 2mL cada una, las cuales se transportaron al Laboratorio de Análisis Químicos del IMP, para ser analizadas empleando el método 8270C de la EPA para el análisis por cromatografía de gases para este tipo de compuestos.

La determinación de los metales pesados, se realizó a partir de la biomasa seca obtenida de las plantas colectadas, también se trasladaron las muestras al Laboratorio de Análisis Químicos del IMP, donde se efectuó una digestión del material con una mezcla de HNO<sub>3</sub> y HClO<sub>4</sub> previamente a la extracción de los metales pesados seleccionados, realizando su detección y cuantificación a través de la aplicación de técnicas de Espectroscopia de Absorción Atómica.

Las concentraciones de los HAP y de los metales pesados, tanto de los extractos del suelo como de las raíces de las plantas, se expresaron con base en peso seco: µg HAP o metal / Kg peso seco radical. El factor de concentración radical (FCR) se empleó para determinar las concentraciones de los contaminantes en las raíces de las plantas y se calculó como sigue:

$FCR = C_{raíz} / C_{suelo}$ , donde:

$C_{raíz}$  y  $C_{suelo}$ , representan la concentración del contaminante en las raíces y el suelo con base en peso seco.

## **2.3 Aislamiento de los microorganismos rizosféricos del suelo y epífitos de las especies vegetales bajo estudio**

El aislamiento de las rizobacterias del suelo rizosférico se realizó tomando 1 g de suelo

removido de las raíces (de tres muestras combinadas) que se colocó en matraces Erlenmeyer de 50 mL de capacidad con 5 perlas de vidrio de 2 mm de diámetro, con 10mL de regulador de fosfatos salino estéril ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.44g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.24g, KCl 0.20g, NaCl 8g/L, pH=7.4), para igualar la presión osmótica. Los matraces se agitaron por 30 minutos y las suspensiones resultantes se evaluaron por las unidades formadoras de colonias (UFC) de acuerdo al método de dilución en placa en agar nutritivo suplementado con fungicida (1 g/L), incubándose las placas por 48 horas a 28°C. Después de este tiempo se determinó el número de unidades formadoras de colonias / g de suelo rizosférico, la cuenta estándar bacteriana se realizó por triplicado.

Las rizobacterias adheridas a la superficie radical (rizodermis) de las plantas bajo estudio (de tres muestras combinadas), se aislaron a partir de colocar 0.6 g de material radical de las especies seleccionadas en matraces Erlenmeyer de 50 mL de capacidad con 5 perlas de vidrio de 2 mm de diámetro, con 10mL de regulador de fosfatos salino estéril ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.44g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.24g, KCl 0.20g, NaCl 8g /L, pH= 7.4), para igualar la presión osmótica. Se agitaron los matraces por un minuto y después se prepararon las diluciones apropiadas del contenido de los matraces y se sembraron por extensión en placa en agar nutritivo suplementado con fungicida (1 g/L), incubándose las placas por 7 días a 28 °C. Después de este tiempo se determinó el número de unidades formadoras de colonias /g de raíces y suelo adherido, la cuenta estándar bacteriana se realizó por triplicado.

#### **2.4 Caracterización de las rizobacterias aisladas**

Una vez crecidas las colonias de rizobacterias aisladas del rizoplano y del suelo rizosférico, se procedió a su purificación sembrando por estría cruzada en medio sólido de agar

nutritivo para su caracterización morfológica macroscópica y microscópica (morfología bacteriana, afinidad tintorial y arreglo celular empleando la técnica de tinción de Gram), de los aislados bacterianos. También se efectuó su caracterización bioquímica a través de la medición de la actividad de la enzima L-alanina aminopeptidasa empleando el Kit de Diagnostico, BioFix® (No. 960003) y también la presencia de la actividad de la enzima citocromo oxidasa, con las tiras reactivas del Kit de Diagnostico, BioFix® (No. 960001), ambas pruebas se llevaron a cabo de acuerdo con las indicaciones del fabricante (Macherey-Nagel GmbH Co. KG Dueren Germany), para ambas pruebas; se utilizaron como controles positivos cepas de *Pseudomonas sp.* y *Escherichia coli*.

#### **2.5 Caracterización fisiológica de las rizobacterias por su producción de fitohormonas**

La evaluación cuantitativa de la producción de AIA se realizó de acuerdo con el método modificado de Ahmad *et al.*, (2005) por Campos *et al.* (2007); por el cual se midió la capacidad intrínseca de estas bacterias para producir AIA en presencia de diferentes concentraciones de triptofano. Se emplearon tubos de ensaye con tapón de rosca de 20 mL de capacidad con 4.9 mL de caldo nutritivo adicionado de L-triptofano a diferentes concentraciones: 1, 2 y 5 mg/L y como testigo una serie de tubos con caldo nutritivo sin L-triptofano; los tubos se inocularon con 0.1 mL de cada inóculo bacteriano aislado a una concentración de  $4.6 \times 10^6$  UFC/mL. Se incubaron por 96 horas a 28°C; como control se manejaron tubos inoculados y no inoculados.

Después del período de incubación, los cultivos se centrifugaron a 3,000 r.p.m. por 30 minutos a 25 °C y el contenido de auxinas se cuantificó como equivalentes de AIA por un análisis espectrofotométrico. El análisis se llevó a cabo mezclando en un tubo, 1 mL del

sobrenadante de los cultivos bacterianos con 2 mL del reactivo de Salkowski (2% (w/v) de  $\text{FeCl}_3$  0.5M disuelto en ácido perclórico al 35%), se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos y el desarrollo de una coloración rosada indicó la presencia de AIA el cual se cuantificó leyendo su absorbancia a 535 nm de longitud de onda y la lectura se interpoló en una curva tipo de AIA (Khalid *et al.*, 2004; Leveau y Lindow, 2005; Sheng y Xia, 2006).

### 2.6 Análisis de los resultados

Se realizó un análisis numérico comparativo de las rizobacterias aisladas de los diferentes hábitats radicales empleando sus caracteres bacterianos y de las pruebas bioquímicas realizadas para determinar la similitud de las rizobacterias por sitio radical, empleando el programa PAST versión 2.02 (Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis) de Hammer *et al.* (2001) para la aplicación del índice de Gower y para los datos de la respuesta fisiológica en términos de la producción de ácido indol acético empleando el programa NTSyS-PC versión 2.11T (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) de Rohlf (2004) para la aplicación del índice de distancia. Una vez obtenidos los valores de distancia de los coeficientes aplicados en ambos casos, se construyó el fenograma respectivo utilizando el método de agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair Group Method of Arithmetic Averages) para todos los casos analizados. También se estableció la veracidad y confianza de los fenogramas obtenidos a través de la obtención del coeficiente de correlación producto-momento de Pearson (Sneath y Sokal, 1973).

## 3. Resultados

### 3.1 Bioconcentración de hidrocarburos policíclicos y metales pesados de las especies vegetales

La concentración de los metales pesados y de algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos determinados; así como los datos sobre el FCR de las plantas bajo estudio, se presentan en la Tabla 1. La comparación de la concentración medida de los contaminantes acumulados reflejó que la especie que acumuló un mayor contenido de contaminantes fue *C. hermaphroditus*, comparada con los datos de bioconcentración obtenidos, repartida la respuesta acumulativa entre *E. polystachya* y *P. arundinaceum*; donde en la primera la acumulación de HAP's fue mayor para los de menor peso molecular y mayor contenido de metales pesados y menor para el caso de *P. arundinaceum*.

### 3.2 Cuantificación y caracterización de las rizobacterias aisladas del suelo y rizoplano de las tres especies vegetales

En cuanto a la densidad de las poblaciones rizobacterianas encontradas, el número encontrado en el suelo rizosférico y el rizoplano de las especies analizadas, mostró que las características de la acumulación de los contaminantes condicionaron la distribución de éstas y la abundancia de las mismas: para *C. hermaphroditus* se obtuvo un número de 4 cepas del suelo rizosférico y solo 3 cepas del rizoplano, para *E. polystachya*. 7 cepas del suelo rizosférico y también 3 cepas del rizoplano y para *P. arundinaceum* 5 cepas bacterianas del suelo rizosférico y 9 cepas del rizoplano. En cuanto a la abundancia bacteriana para *C. hermaphroditus* los valores promedio fueron de  $2 \times 10^3$  UFC/ g de suelo rizosférico y  $3.6 \times 10^5$  UFC/ g de raíces y suelo adherido, para *E. polystachya* de  $2 \times 10^6$  UFC/ g de suelo rizosférico y  $1.1 \times 10^8$  UFC/ g de raíces y suelo adherido y finalmente para *P. arundinaceum* de  $3.1 \times 10^9$  UFC/ g de suelo rizosférico y  $5.1 \times 10^9$  UFC/ g de raíces y suelo adherido.

**Tabla 1.** Cuantificación de metales pesados e Hidrocarburos Aromáticos Políciclicos en el suelo contaminado y determinación del Factor de Concentración Radical (FCR) de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y los metales pesados acumulados en *Cyperus hermaphroditus*, *Echinochloa polystachya* y *Paspalum arundinaceum*.

Factor de Concentración Radical (FCR)				
Metal	Concentración en el suelo contaminado (mg/Kg peso seco)	<i>Cyperus hermaphroditus</i>	<i>Echinochloa polystachya</i>	<i>Paspalum arundinaceum</i>
Cd	3.6	0.00027 ± 0	0.16 ± 0.18	0.00027 ± 0
Cr	909.2	0.054 ± 0.08	0.081 ± 0.08	0.004 ± 0.001
Ni	17.05	0.28 ± 0.49	1.58 ± 1.81	0.028 ± 0.04
Zn	81.13	1.48 ± 1.6	5.14 ± 7.6	0.84 ± 0.34

HAP†	Concentración en el suelo contaminado (µg/Kg peso seco)	<i>Cyperus hermaphroditus</i>	<i>Echinochloa polystachya</i>	<i>Paspalum arundinaceum</i>
Nap (2)	55.86	1.15 ± 0.61	0.77 ± 0.10	1.47 ± 0.66
Flu (3)	127.15	0.20 ± 0.04	0.20 ± 0.04	0.17 ± 0.12
Phe (3)	668.15	0.07 ± 0.03	0.1 ± 0.01	0.09 ± 0.04
Fla (3)	184.05	0.19 ± 0.08	0.23 ± 0.06	0.14 ± 0.13
Pyr (4)	2,765.97	0.02 ± 0.004*	0.003 ± 0.005*	0.016 ± 0.010
Cry (4)	678.01	0.09 ± 0.13	0.05 ± 0.07	0.013 ± 0.02
BbF (5)	1,009.89	0.009 ± 0.01	---	0.009 ± 0.01
BaP (5)	2,067.2	0.011 ± 0.01	---	0.012 ± 0.01

†Donde: Nap= Naftaleno, Flu= Fluoreno, Phe= Fenantreno, Fla= Fluoranteno, Pyr= Pireno, Cry= Criseno, BbF= Benzo (b) Fluroanteno, BaP= Benzo (a) Pireno. El número del paréntesis corresponde al número de anillos aromáticos del compuesto (\* = p<0.05).

A los aislados bacterianos se les agrupó de acuerdo con una clave determinada: a las cepas aisladas de *E. polystachya* se les asignó la inicial A, a las cepas aisladas de *C. hermaphroditus* la B y las cepas aisladas de *P. arundinaceum* inician con la letra C; la siguiente letra "R o S", indica si la cepa se aisló del Rizoplano o del Suelo Rizosférico respectivamente; el primer número indica el número de colonia aislada en la misma dilución y el último número representa la dilución de la cual se aisló la cepa.

En total se aislaron 31 cepas: 16 del suelo rizosférico de las cuales 7 pertenecen a *E. polystachya*, 4 a *C. hermaphroditus* y 5 a *P. arundinaceum*; así como 15 del rizoplano: 3 de *E. polystachya*, 3 de *C. hermaphroditus* y 9 de *P. arundinaceum*. Las características que definieron la morfología colonial de las rizobacterias aisladas de cada especie vegetal desde el punto de vista fenotípico y la definición del comportamiento Gram, así

como la actividad de la L alanina aminopeptidasa, la citocromo oxidasa y la cuantificación del ácido indol acético, se muestran en las Tablas 2 y 3, correspondientes a las cepas bacterianas aisladas del suelo rizosférico y del rizoplano. Más del 70% del total de las cepas fueron bacilos Gram positivos esporulados, cerca del 19% fueron bacilos Gram positivos sin esporas y sólo el 11% restante (4 cepas de *E. polystachya*) resultaron Gram negativos. La importancia de la presencia de la actividad de citocromo oxidasa radica en la posibilidad de que las bacterias pudieran oxidar compuestos aromáticos complejos como los hidrocarburos derivados del petróleo donde el 71% de las bacterias aisladas del suelo rizosférico de *E. polystachya* dieron prueba positiva mientras que sólo el 33% de las cepas aisladas de *C. hermaphroditus* y el 40% de las de *P. arundinaceum* fueron citocromo oxidasa positivas.

**Tabla 2.** Características fenotípicas, bioquímicas y fisiológicas de las cepas bacterianas aisladas del suelo rizosférico de las tres especies vegetales crecidas en suelo contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo. \*producción de AIA ( $\mu\text{g/mL}$  AIA)

Cepa	1. Color	2. Tamaño (cm)	3. Forma	4. Borde	5. Elevación	6. Superficie	7. Luz reflejada	8. Luz transmitida	9. Actividad de amino peptidasa	10. Actividad de citocromo oxidasa	11. Comportamiento gram	12. Baasal*	13. 1mg/L Trp*	14. 2mg/L Trp*	15. 5mg/L Trp*
AS13	Blanca	0.3	Redonda	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Opaca	-	+	+	3.75	3.68	2.97	3.57
AS23	Naranja	0.4	Redonda	Ondulado	Plana	Lisa	Opaca	Opaca	-	+	+	3.15	3.54	1.84	3.43
AS33	Blanca	0.5	Redonda	Ondulado	Plana	Rugosa	Opaca	Opaca	-	+	+	3.08	3.64	3.29	3.61
AS14	Crema	0.3	Irregular	Entero	Convexa	Lisa	Brillante	Opaca	+	+	-	3.64	3.5	4.42	4.91
AS24	Crema	0.8	Irregular	Rizoide	Plana	Lisa	Brillante	Opaca	-	+	+	2.83	3.5	3.75	3.29
AS16	Crema	1.5	Irregular	Ondulado	Plana	Lisa	Brillante	Opaca	+	-	-	2.9	3.33	3.54	3.04
AS43	Blanca	0.5	Redonda	Filamentoso	Plana	Lisa	Opaca	Opaca	-	-	+	1.88	2.72	1.53	1.92
BS11	Blanca	0.5	Irregular	Entero	Plana	Rugosa	Brillante	Opaca	-	+	+	3.43	3.89	3.43	4.1
BS21	Blanca	0.5	Irregular	Entero	Plana	Lisa	Opaca	Opaca	-	-	+	4.84	4.07	3.86	3.04
BS13	Crema	0.3	Redonda	Ondulado	Plana	Rugosa	Opaca	Opaca	-	-	+	4.1	4.45	4.1	4.84
BS23	Blanca	0.5	Irregular	Entero	Plana	Lisa	Opaca	Opaca	-	-	+	3.82	3.71	3.78	3.46
CS14	Amarillo	0.2	Redonda	Entero	Convexa	Lisa	Brillante	Opaca	+	-	-	10.3	8.44	8.05	9.57
CS24	Crema	0.3	Redonda	Entero	Plana	Arenosa	Brillante	Opaca	-	+	+	3.53	3.71	4.0	3.89
CS15	Crema	0.25	Irregular	Dentado	Plana	Lisa	Opaca	Translúcida	-	+	+	4.84	4.03	4.03	4.06
CS16	Crema	0.1	Redonda	Entero	Convexa	Lisa	Brillante	Opaca	-	-	+	2.27	1.81	1.56	1.67
CS26	Crema	0.5	Redonda	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Opaca	-	-	+	2.69	2.73	2.16	2.16



**Tabla 3.** Características fenotípicas, bioquímicas y fisiológicas de las cepas bacterianas aisladas del rizoplaneo de las tres especies vegetales crecidas en suelo contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo. \*producción de AIA ( $\mu\text{g/mL}$  AIA)

Cepa	1. Color	2. Tamaño (cm)	3. Forma	4. Borde	5. Elevación	6. Superficie	7. Luz reflejada	8. Luz transmitida	9. Actividad de amino peptidasa	10. Actividad de citocromo oxidasa	11. Comportamiento gram	12. Baasal*	13. 1mg/L Trp*	14. 2mg/L Trp*	15. 5mg/L Trp*
AR11	Crema	0.3	Redonda	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Opaca	-	+	+	1.7	1.42	1.52	1.6
AR21	Amarilla	0.3	Irregular	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Translúcida	+	+	-	2.34	2.9	2.2	3.46
AR17	Crema	1.5	Irregular	Ondulado	Plana	Lisa	Brillante	Translúcida	-	-	+	1.84	2.27	1.56	1.67
BR11	Crema	0.1	Irregular	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Opaca	-	+	+	3.71	2.62	3.64	4.38
BR21	Crema	0.2	Redonda	Dentado	Plana	Lisa	Brillante	Opaca	-	-	+	3.5	3.82	5.09	3.89
BR12	Amarilla	0.2	Redonda	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Opaca	-	+	+	3.4	3.96	3.5	4.45
CR11	Crema	0.7	Redonda	Dentado	Pulvinada	Lisa	Opaca	Opaca	+	+	-	1.77	2.45	2.16	2.27
CR21	Crema	0.4	Redonda	Entero	Rugosa	Plana	Brillante	Opaca	-	-	+	3.47	4.0	4.24	5.62
CR31	Crema	0.6	Redonda	Entero	Convexa	Lisa	Brillante	Opaca	+	-	-	2.8	3.89	10.77	3.89
CR12	Crema	2	Irregular	Dentado	Plana	Lisa	Opaca	Opaca	-	+	+	4.74	5.44	4.56	5.27
CR13	Crema	0.4	Redonda	Ondulado	Plana	Arenosa	Brillante	Opaca	-	+	+	3.22	2.69	3.04	3.22
CR33	Crema	0.2	Redonda	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Opaca	-	-	+	4.6	4.7	4.63	4.7
CR23	Naranja	0.4	Redonda	Entero	Crateriforme	Lisa	Brillante	Opaca	-	+	+	4.59	4.56	4.49	5.12
CR43	Crema	0.7	Redonda	Entero	Convexa	Lisa	Brillante	Opaca	-	-	+	4.8	5.27	5.51	4.91
CR17	Crema	0.3	Redonda	Ondulado	Pulvinada	Lisa	Opaca	Opaca	-	+	+	4.98	3.89	4.24	4.28

Todas las cepas de *P. arundinaceum* y de *C. hermaphroditus* fueron oxidasas positivas; en el caso de *E. polystachya*, veintiún de las veinticuatro cepas (87.5%) también dieron positiva esta prueba.

En general, de las tres especies vegetales analizadas la mayoría de las rizobacterias aisladas presentan actividad de citocromo oxidasas, las que más la presentaron fueron *E. polystachya* y *P. arundinaceum*; la primera en las cepas del suelo rizosférico y la segunda en las aisladas del rizoplano.

El fenotipo es la expresión observable del genotipo y antes del manejo de las técnicas moleculares disponibles para los taxónomos de procariontes, las clasificaciones se basaban únicamente en las condiciones morfológicas, fisiológicas y del crecimiento de los microorganismos. En la actualidad, la información fenotípica recae principalmente en el desarrollo de técnicas experimentales que analicen de manera directa o indirecta las diferentes propiedades fenotípicas; tales como las actividades enzimáticas y las condiciones del crecimiento microbiano, entre otras. De aquí que los datos fenotípicos en contraste con las secuencias genéticas, pueden en su mayoría compararse fenéticamente; lo que significa la comparación de un gran número de características independientes que producen resultados que reflejan el grado de similitud de las unidades bajo análisis (Rosselló-Mora y Amann, 2001). En este estudio, la información fenética obtenida, se sometió al siguiente análisis numérico para establecer las similitudes entre las rizobacterias aisladas.

### **3.3 Agrupamiento de las rizobacterias aisladas según su hábitat microbiano**

El agrupamiento de las rizobacterias se realizó mediante la aplicación de un método numérico con base en las características fenotípicas de la morfología colonial y la bacteriana, así como de las pruebas bioquímicas aplicadas, donde se empleó un

índice numérico que permitiera considerar este tipo de datos dada la naturaleza microbiana (Austin y Priest, 1992). Se realizaron tres agrupaciones, dos de ellas relacionando los caracteres 1 al 11 para las agrupaciones del suelo rizosférico y rizoplano (Figuras 1 y 2, respectivamente) y una tercera con los caracteres fisiológicos de la producción de fitohormonas del 12 al 15 (Figura 3).

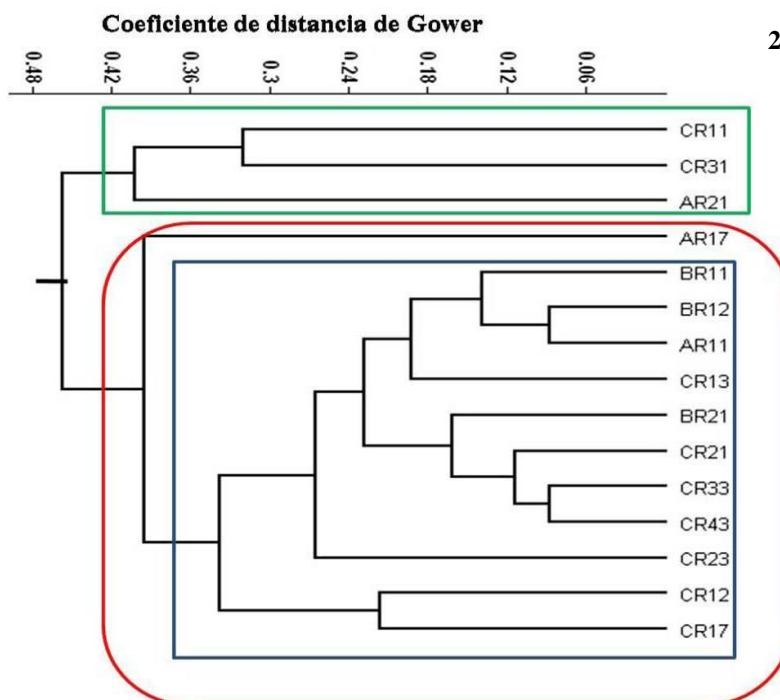
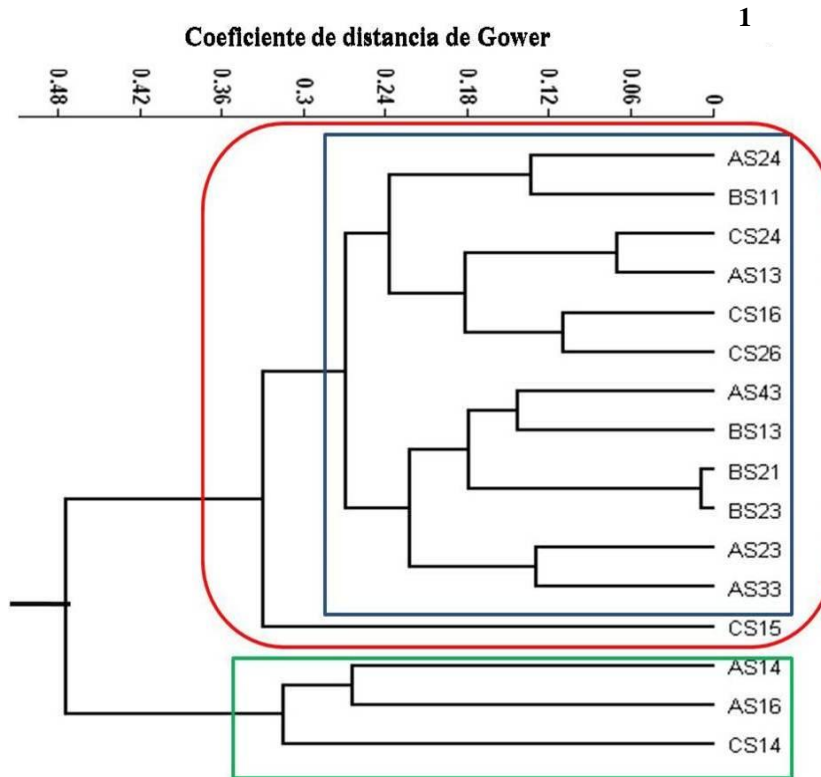
Para el agrupamiento de las rizobacterias del suelo rizosférico, se tienen dos grupos bien definidos de manera inicial, donde dos cepas de *E. polystachya* comparten características y son similares con una cepa de *P. arundinaceum*. El grupo más grande resalta el aislamiento de una rizobacteria de *P. arundinaceum* la CS15, cuyas características la hacen particular del resto, separada de un grupo grande que a su vez agrupa de manera particular a casi todas las rizobacterias de *C. hermaphroditus* y otro que consiste de un grupo diverso de rizobacterias de las tres especies con mayor similitud entre ellas. Para el rizoplano, se ubican también dos grupos en el inicio: uno de ellos con sólo 3 cepas, dos de *P. arundinaceum* y uno de *E. polystachya*, el segundo aísla a la rizo-bacteria AR17 del resto y finalmente dos grupos asociados entre las cepas de *P. arundinaceum* y en otro, la agrupación diversa de las rizobacterias de las tres especies. Cabe mencionar que en esta agrupación, se separa casi en su mayor distribución a las cepas de *P. arundinaceum* que fueron más abundantes en esta especie, y por lo que se observa con características muy particulares que las separan de la agrupación general.

### **3.4 Determinación de la producción de AIA en presencia de L-triptófano de las rizobacterias aisladas**

En general, todas las rizobacterias aisladas son productoras de AIA con un intervalo de producción de AIA de 1 a 10 µg/mL.

Las más bajas productoras encontradas corresponden a AS43, CS16, AR11, AR21, AR17 y CR11 y la rizobacteria CS14 aislada

de *P. arundinaceum* es la más alta productora de AIA de todas las rizobacterias aisladas de suelo rizosférico.



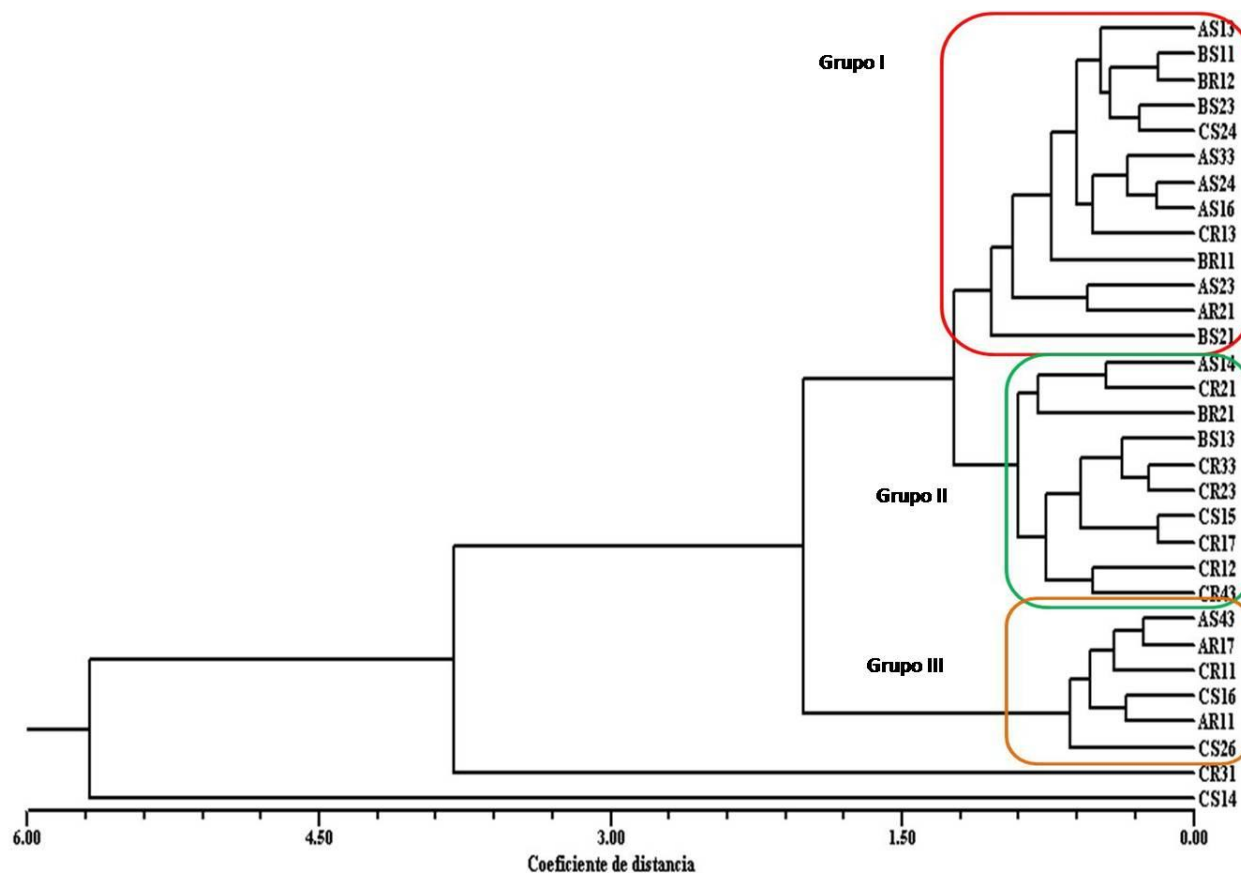
**Figuras 1 y 2.** Comparación del agrupamiento de las rizobacterias aisladas de las tres especies vegetales.

**1)** suelo rizosférico  
( $r = 0.84$ )

**2)** rizoplano  
( $r = 0.80$ ).

La agrupación de todas las rizobacterias (Figura 3), mostró que la cepa CS14 es la rizobacteria que no solamente es considerada como la mayor productora de AIA (8 a 10  $\mu\text{g/mL}$ ) sino una de las más particulares de todas las rizobacterias aisladas. De esta

agrupación le siguen dos grupos: uno muy grande y otro que lo constituye una rizobacteria del rizoplano la CR31 que también presentó una alta producción de AIA (3 a 10  $\mu\text{g/mL}$ ).



**Figura 3.** Comparación del agrupamiento de las rizobacterias aisladas de las tres especies vegetales en relación con la producción de ácido indol acético ( $r=0.93$ ).

El grupo más amplio, a su vez dividido en dos grupos: I y II que se unen y un III aparte, se describe como sigue: el Grupo I: conformado por 9 del suelo rizosférico y 4 cepas del rizoplano, de las cuales en conjunto 6 son de *E. polystachya*, 5 de *C. hermaphroditus* y 2 de *P. arundinaceum*.

El Grupo II: conformado por 3 del suelo rizosférico y 7 cepas del rizoplano, de las cuáles 1 es de *E. polystachya*., 2 de *C. hermaphroditus* y 7 de *P. arundinaceum*; y

finalmente el Grupo III: conformado por 3 cepas del suelo rizosférico y 3 cepas del rizoplano, de las cuales 3 son de *E. polystachya* y 3 de *P. arundinaceum*.

Los grupos I y II que se definieron por 13 y 10 rizobacterias totales respectivamente, a su vez mostraron un número proporcional de rizobacterias en cada uno de ellos; el Grupo I a las rizobacterias del suelo rizosférico y el Grupo II a las rizobacterias del rizoplano. La agrupación de todas las rizobacterias no

solamente mostró tendencias por su hábitat rizobiano, sino también las agrupaciones mostraron un gradiente en la producción de AIA; considerando tanto la producción basal como la producción con la adición del precursor de la fitohormona al medio de cultivo donde el Grupo III además de presentar el menor grupo de microorganismos muestra a los más bajos productores cuya producción de AIA en promedio para todas las cepas fue de 1.9  $\mu\text{g/mL}$  (1.85  $\mu\text{g/mL}$  para las rizobacterias del rizoplano y 2  $\mu\text{g/mL}$  para las del suelo rizosférico), para el grupo I: con una producción promedio de 3.3  $\mu\text{g/mL}$  (3.2  $\mu\text{g/mL}$  para las rizobacterias del rizoplano y 3.5  $\mu\text{g/mL}$  para las del suelo rizosférico) y para el grupo II una producción promedio de 4.4  $\mu\text{g/mL}$  (4.5  $\mu\text{g/mL}$  para las rizobacterias del rizoplano y 4.2  $\mu\text{g/mL}$  para las del suelo rizosférico), quedando las cepas CR31 con una producción de 5.3  $\mu\text{g/mL}$  y la rizobacteria CS14 con 9  $\mu\text{g/mL}$  de AIA de producción promedio.

#### 4. Discusión

El ambiente donde se desarrollan las especies vegetales bajo estudio es un sitio con una alta concentración de contaminantes; tanto de metales pesados y los HAP's analizados en el interior de las plantas; en particular, los de menor peso molecular, cuya estructura presenta de 2 a 3 anillos aromáticos.

La acumulación de contaminantes de acuerdo con su FCR fue en todos los casos menor de 1 y en cada caso éste varió de acuerdo con el metal, la especie vegetal y la concentración de los metales en el suelo (Epelde et al., 2010); algunos investigadores de las PGPR's aisladas de suelos contaminados, han orientado su investigación hacia las plantas con las que se asocian para hallar respuestas al estrés inducidas por los contaminantes (Lebeau et al., 2008; Weyens et al., 2009);

sin embargo Koo et al. (2010) mencionan que las características ecológicas y fisiológicas de las PGPR's en los suelos contaminados se ven afectadas de manera directa o indirecta por parámetros abióticos (textura del suelo, contaminantes, temperatura, pH, salinidad, entre otros) así como por parámetros bióticos (plantas y organismos del suelo); por ello, la información que se obtenga sobre los efectos de los parámetros bióticos y abióticos sobre la actividad de las PGPR's debe estar disponible para diseñar una estrategia de remediación.

Aquí se mostró el efecto muy particular de los contaminantes en las poblaciones microbianas de *C. hermaphroditus* con el número más bajo de microorganismos tanto en el suelo como en el rizoplano; siguiéndole *E. polystachya* y finalmente *P. arundinaceum* con un menor grado de acumulación de los contaminantes y un mayor número de microorganismos tanto en el suelo rizosférico como en el rizoplano de esta especie, con valores mucho mayores a las poblaciones de las gramíneas perennes reportadas por Brim et al. (1999) y Sandaa et al. (1999), donde la cuenta del número de microorganismos del rizoplano fue de  $3.7 \times 10^8$  a  $2 \times 10^7$  UFC/g de raíz y para el suelo rizosférico de  $3.1 \times 10^8$  a  $2 \times 10^7$  UFC/ g de suelo. Cabe mencionar también que en condiciones ambientales estresantes, las bacterias rizosféricas con características de promoción del crecimiento, juegan un papel importante en el crecimiento de las plantas (Dell'Amico et al., 2005).

Se tienen numerosos microorganismos del suelo implicados en la síntesis de auxinas tanto en cultivos puros como en el suelo (Barazani y Friedman, 1999). Algunos microorganismos producen auxinas en presencia de un precursor adecuado como el L-triptofano. Los efectos de las auxinas sobre las plántulas son dependientes de la concentración; esto es que la baja concentración puede estimular el crecimiento mientras que las altas concentraciones pueden ser inhibitorias (Arshad y Frankenberger,

1991); no obstante que se tiene que considerar que existe una variabilidad en la respuesta; esto es que diferentes plantas no solamente responden de manera diferente a las concentraciones variables de auxinas producidas (Sarwar y Frankenberger, 1994); sino también al tipo de microorganismos que las producen (Arshad y Frankenberger, 1998; Ahmad *et al.*, 2005; Ahmad *et al.*, 2008).

Los resultados obtenidos muestran que las concentraciones producidas de ácido indol acético pueden variar de un microorganismo a otro; comparando con los resultados de Vivas *et al.* (2006) se tiene la concentración de 4 µg/mL producidos por la cepa *Brevibacillus* B-I y los de Zaidi *et al.* (2006) con *Bacillus subtilis* ST-101 cuya producción de AIA fue de 55 µg/mL.

Finalmente, las poblaciones microbianas aisladas de estas tres especies de un ambiente tan particular, mostraron que aunque no poseen una alta productividad de AIA, pueden desempeñar un papel importante en el ambiente del suelo y la rizosfera de las plantas, como lo mencionan Dell'Amico *et al.* (2005) y Compant *et al.* (2010) que demostraron que diferentes comunidades microbianas viven en asociación con el suelo rizosférico y el rizoplasma y poseen características promotoras del crecimiento vegetal que pueden sobrellevar condiciones de estrés abiótico. Este tipo de bacterias pueden emplearse para inocular semillas y verificar su habilidad como protectoras de plántulas contra los efectos de contaminantes en el suelo. Así mismo, Leveau y Lindow (2005), mencionan que se establece un tipo de interacción interorganísmica interesante, cuando se da la manipulación por algunos microorganismos del sistema hormonal de sus hospederos. Uno de esos ejemplos lo mencionan que es la producción microbiana de hormonas vegetales como las auxinas, las citocininas y las giberelinas, las cuales permiten que ciertas bacterias y hongos dirijan la fisiología de las plantas, tomando

ventaja sobre ellas (Costacurta y Vanderleyden, 1995; Lambrecht *et al.*, 2000). De manera general, los microorganismos aislados de la rizosfera y del rizoplasma de varios cultivos han revelado más potencial en la producción de auxinas que aquellos que se tienen en el suelo no rizosférico (Sarwar y Kremer, 1995).

El analizar las rizobacterias por su potencial *in vitro* de producción de auxinas, puede proveer una base importante para la selección de PGPR's efectivas, particularmente si esta capacidad se emplea en combinación con el análisis de las rizobacterias, por su actividad promotora del crecimiento (Khalid *et al.*, 2004). La fitoremediación asistida o rizoremediación, es una disciplina prometedora para mejorar la remediación al emplear microorganismos asociados con plantas para potenciar su crecimiento y con ello, favorecer su tolerancia al estrés (Dowling y Doty, 2009).

## 5. Conclusiones

Las fitohormonas de origen microbiano (en particular las auxinas) en la vecindad de las raíces de las plantas pueden inducir una respuesta fisiológica en la planta hospedero; por lo que el análisis de las poblaciones microbianas de la rizosfera, desde su aislamiento, caracterización y evaluación *in vitro* de su producción auxínica constituye una base importante para la selección de PGPR's efectivas. El análisis de las rizobacterias aisladas del suelo rizosférico y del rizoplasma de *Cyperus hermaphroditus*, *Echinochloa polystachya* y *Paspalum arundinaceum* crecidas en un suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo, evidenciaron la diversidad y abundancia de las mismas que se condicionaron por la presencia y la acumulación de contaminantes por las plantas hospederas; donde *Cyperus hermaphroditus* presentó un menor número de poblaciones rizosféricas pero una mayor

acumulación de contaminantes, comparada con *Paspalum arundinaceum* la especie con mayor número de microorganismos asociados a su rizosfera, definidos también por sus características fenéticas a través del análisis numérico. Todas las rizobacterias fueron productoras de AIA, en particular destacan dos de ellas (CR31 y CS14) por su máxima producción, así mismo en el hábitat rizobiano, las rizobacterias del rizoplano caracterizadas como productoras intermedias, pueden recomendarse para eventos rizoremediadores, en los que la promoción del crecimiento de plantas contribuya a su protección y tolerancia en suelos contaminados.

## 6. Agradecimientos

El segundo autor agradece al M. en I. Ricardo González López por la colección del material biológico y del suelo del Pantano Santa Alejandrina y también a la Secretaría de Investigación y Posgrado del I.P.N., el apoyo financiero otorgado al Proyecto SIP: 20090136, para la realización de este trabajo.

## 7. Referencias

- Ahmad, F., Ahmad, I., Khan M.S. 2005. Indole acetic acid production by the indigenous isolated of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turk J Biol* 29: 29-34.
- Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M.S. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol Re.* 15 173-181.
- Arshad, N., Frankenberger, Wt. Jr. 1991. Microbial production of plant hormones. *Plant Soil* 133: 1-8.
- Arshad, N., Frankenberger, Wt. Jr. 1998. Plant Growth regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. *Adv Agron* 62: 146-151.
- Austin, B., Priest, F. 1992. *Taxonomía Bacteriana Moderna*. Editorial Limusa, S.A. México. p. 23-32.
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Ann Rev Plant Biol* 57: 233-266.
- Barazani, O., Friedman, J.I. 1999. Is IAA the major root growth factor secreted from plant growth, -mediating bacteria?. *J Chem Ecol* 25: 2397-2406.
- Bartelt-Ryser, J., Joshi, J., Schmid, B., Brandl, H., Balser, T. 2005. Soil feedbacks of plant diversity on soil microbial communities and subsequent plant growth. *Perspect Plant Ecol* 7: 27-49.
- Benizri, E., Baudoin, E., Guckert, A. 2001. Root colonization by inoculated plant growth rhizobacteria. *Biocontrol Sci Techn* 11: 557-574.
- Brim, H., Heuer, H., Krogerrecklenfort, M., Mergeay, M., Smalla, K. 1999. Characterization of the bacterial community of a zinc-polluted soil. *Can J Microbiol* 45: 326-338
- Campos, G.A., Guerrero, Z.A., Rodríguez, D.A., Montes, V.S. 2007. Evaluación de la producción de ácido indol acético de rizobacterias aisladas de un suelo contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo y su aplicación en fitoremediación. 2º Taller Internacional de Biotecnología y 2º Encuentro Internacional de Energías Alternativas, Pachuca, Hidalgo, México.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., Barka, E.A. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *App Environ Microbiol* 71: 4951-4959.
- Compant, S., Clément, C., Sessitsch, A. 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and

- prospects for utilization. *Soil Biol Biochem* 42: 669-678.
- Costacurta, A., Vanderleyden, J. 1995. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit Rev Microbiol* 21:1-18.
- Davies, P. J. 1995. The plant hormone concept: concentration, sensitivity, and transport. In: Davies, P.J. (Ed.), *Plant hormones: physiology, biochemistry, and molecular biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp. 13-18.
- Dell' Amico, E., Cavalca, L., Andreoni, V. 2005. Analysis of rhizobacterial communities in perennial Gramineae from polluted water meadow soil, and screening of metal-resistant, potentially plant growth-promoting bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 52: 153-162.
- Dowling, D.N., Doty, S.L. 2009. Improving phytoremediation through biotechnology. *Curr Opin Biotech* 29: 1-3.
- Epelde, L., Becerril, J.M., Barrutia, O., González-Oreja, J.A., Garbisu, C. 2010. Interactions between plant and rhizosphere microbial communities in a metalliferous soil. *Environ Pollut* 158: 1576-1583.
- Hammer, Φ, Harper, D.A.T., Ryan, P.D. 2001. Past: Paleontological Statistics Software for Education and Data Analysis. *Palaeontol electron* 4: 9.
- I.M.P. y UAM-I. 1997. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos en el Pantano Santa Alejandrina, Minatitlán, Ver. Reporte Técnico, México.
- Khalid, A., Arshad, M., Zahir, Z.A. 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J Appl Microbiol* 96: 473-480.
- Kloepper, J.W., Lifshitz, R., Zablutowicz, R.M. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol* 7: 39-43.
- Koo, S.Y., Hong, S.H., Ryu, H.W., Cho, K. 2010. Plant Growth-Promoting trait of rhizobacteria isolated from soil contaminated with petroleum and heavy metals. *J Microbiol Biotechnol* 20: 587-593.
- Kuiper, I., Legendik, E.L., Bloemberg, G.V., Lugteberg, B.J. 2004. Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. *Mol Plant Microbe* 17: 6-15.
- Lambrecht, M., Okon, Y., Vande Broek, A., Vanderleyden, J. 2000. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signaling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends Microbiol* 8:298-300.
- Lebeau, T., Braud, A., Jézéquel, K. 2008. Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: a review. *Environ Pollut* 153: 497-522.
- Leveau, J.H.J., Lindow, S.E. 2005. Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290. *App Environ Microbiol* 71: 2365-2371.
- Libbert, E., Risch, H. 1969. Interactions between plants and epiphytic bacteria regarding their auxin metabolism. V. Isolation and identification of the IAA-producing and -destroying bacteria from pea plants. *Physiol Plantarum* 22:51-58.
- Marilley, L., Aragno, M. 1999. Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. *Appl Soil Ecol* 13:127-136.
- Patten, C.L., Glick, B.R. 1996. Bacterial biosynthesis on indole-3-acetic acid. *Can J Microbiol* 42:207-220.
- Pérez, V.J., García, E.G., Esparza, G.F. 2002. Papel ecológico de la flora rizosférica en fitorremediación. *Avance y Perspectiva* 21:297-300.
- Ratola, N., Lacorte, S., Alves, A., Barceló, D. 2006. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in pine needles by gas chromatography-mass spectrometry. Comparison of different extraction and



- clean-up procedures. *J Chromatogr A* 114: 198-204.
- Rohlf, J. 2004. NTSYS-PC Version 2.11T. *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. Applied Bioestastistics, Inc.
- Rodríguez-Loinaz, G., Onaindia, M., Amezaga, I., Mijangos, I., Garbisu, C. 2008. Relationship between vegetation diversity and soil functional diversity in native mixed-oak forests. *Soil Biol Biochem* 40: 49–60.
- Rosselló-Mora, R., Amann, R. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 39-67.
- Sandaa, R.A., Torsvik, V., Enger, O., Daae, F.L., Castberg, T., Hahn, D. 1999. Analysis of bacterial communities in heavy metal contaminated soils at different levels of resolution. *FEMS Microb Ecol* 30: 237–251.
- Sarwar, M., Frankenberger, Wt. Jr. 1994. Tryptophan dependent biosynthesis of auxins in soil. *Plant Soil* 160: 97-104.
- Sarwar, M., Kerner, R.J. 1995. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. *Lett Appl Microbiol* 20: 282-285.
- Sheng X.F., Xia, J.J. 2006. Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium-resistant bacteria. *Chemosphere* 64: 1036-1042.
- Siciliano, S.D., Fortin, N., Mihoc, A., Wisse, G., Labelle, S., Beaumier, D., Ouellette, D., Roy, R., Whyte, L.G., Banks, M.K., Schwab, P., Lee, K., Greer, C.W. 2001. Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination. *App Environ Microbiol* 67: 2469-2475.
- Sneath P.H.A., Sokal, R.R. 1973. Numerical Taxonomy: the principles and practice of numerical classification. Freeman, San Francisco.
- Tsavkelova, E.A., Klimova, S.Y., Cherdyntseva, T.A., Netrusov, A.I. 2006. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Appl Biochem Microbiol* 42:117-126.
- Vivas, A., Biro, B., Ruiz-Lozano, J.M., Barea, J.M., Azcon, R. 2006. Two bacterial strains isolated from a Zn-polluted soil enhance plant growth and mycorrhizal efficiency under Zn-toxicity. *Chemosphere* 62: 1523-1533.
- Weyens, N., van der Lelie, D., Taghavi, S., Vangronsveld, J. 2009. Phytoremediation: plant-endophyte partnerships take the challenge. *Curr Opin Biotechnol* 20: 248-254.
- Whipps, J.M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J Exp Bot* 52: 487-511.
- Wichner, S., Libbert, E. 1968a. Interactions between plants and epiphytic bacteria regarding their auxin metabolism. I. Detection of IAA-producing epiphytic bacteria and their role in long duration experiments on tryptophan metabolism in plant homogenates. *Physiol Plant* 21:227–241.
- Wichner, S., Libbert, E. 1968b. Interactions between plants and epiphytic bacteria regarding their auxin metabolism. II. Influence of IAA-producing epiphytic bacteria on short-term IAA production from tryptophan in plant extracts. *Physiol Plant* 21:500–509.
- Zaidi, S., Usmani, S., Singh, B.R., Musarrat, J. 2006. Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ-101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*. *Chemosphere* 64: 991-997.