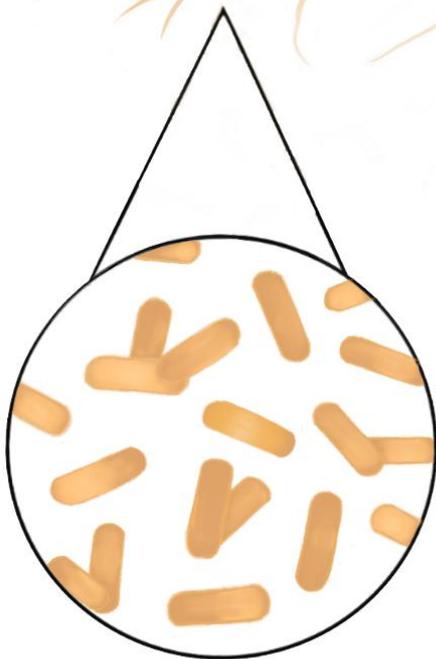




Aislamiento y caracterización de bacterias que ayudan a la nodulación de plantas del género *Medicago* spp. en suelos contaminados con metales pesados



Sara Caballero Delgado

Facultad de Farmacia

2020/21

**Aislamiento y caracterización de bacterias
que ayudan a la nodulación de plantas del
género *Medicago* spp. en suelos
contaminados con metales pesados.**

Trabajo Fin de Grado experimental

Sara Caballero Delgado

Departamento de Microbiología y Parasitología

Tutores: Ignacio D. Rodríguez Llorente y Salvadora Navarro de la Torre.

Facultad de Farmacia

Grado en Farmacia

20 de julio de 2021, Facultad de Farmacia

Índice

RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1 CONTAMINANTES Y COMPUESTOS PRESENTES EN EL SUELO.	7
1.2 SITUACIÓN ACTUAL DE LOS FERTILIZANTES QUÍMICOS Y SU LEGISLACIÓN.....	9
1.3 PRINCIPALES TÉCNICAS DE REMEDIACIÓN.....	10
1.4 SIMBIOSIS LEGUMINOSAS-RIZOBIOS.	11
2. OBJETIVOS.....	13
3. METODOLOGÍA.....	13
3.1 RECOGIDA DE MUESTRAS.....	13
3.2 AISLAMIENTO DE ENDÓFITOS DEL NÓDULO.....	14
3.3 IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS.....	14
3.4 MEDICIÓN DE LA TOLERANCIA A METALES.	15
3.5 MEDICIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	16
3.5.1 ADNasa.....	16
3.5.2 Actividad amilasa.....	16
3.5.3 Actividad celulasa.....	16
3.5.4 Actividad lipasa.....	16
3.5.5 Actividad pectinasa.....	16
3.5.6 Actividad proteasa.....	17
3.5.7 Actividad quitinasa.....	17
3.6 MEDICIÓN DE PROPIEDADES PGP.....	17
3.6.1 Producción de IAA.....	17
3.6.2 Producción de sideróforos.....	18
3.6.3 Solubilización de fosfato.....	18
3.6.4 Fijación de nitrógeno.....	18
3.6.5 Formación de biopelículas.....	18
3.6.6 Presencia del gen de la enzima ACC desaminasa.....	19
3.7 DETERMINACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS DE INOCULACIÓN.....	19
3.8 INOCULACIÓN DE PLANTAS DE <i>MEDICAGO SATIVA</i>	20
3.8.1 Germinación de las semillas.....	20

3.8.2	Preparación de los inóculos bacterianos.....	21
3.8.3	Siembra y riego de las macetas.	21
3.9	MEDICIÓN PARÁMETROS OBTENIDOS DE LAS PLANTAS.	22
3.9.1	Análisis estadístico de los datos.	22
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
4.1	AISLAMIENTO DE LOS ENDÓFITOS.	22
4.2	IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS.....	23
4.3	TOLERANCIA A METALES.	23
4.4	ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.	24
4.5	PROPIEDADES PGP.	26
4.6	INOCULACIÓN DE SEMILLAS DE <i>MEDICAGO SATIVA</i>	28
4.6.1	Efecto de las bacterias seleccionadas en las plantas.	28
4.6.2	Recuento del número de hojas y nódulos.....	30
5.	CONCLUSIONES.....	32
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	33

Resumen

Para alimentar a la creciente población y abastecer las necesidades de nutrientes de los suelos, se extendió el uso de fertilizantes sintéticos a lo largo del siglo XX (Tilman et al., 2002). En muchos de estos fertilizantes también se documentó la presencia de metales pesados como As, Cd, Cr, Hg, Pb y Zn (Brevik, 2013). Desde entonces, la contaminación de los suelos ha aumentado hasta alcanzar niveles tóxicos y perjudiciales para los seres vivos. Por esta creciente preocupación mundial, las técnicas basadas en el uso de microorganismos han alcanzado una gran importancia, no solo por su función promotora del crecimiento sino como técnica de biorremediación por las propiedades de las bacterias y su capacidad para tolerar altas concentraciones de metales pesados. Gracias a su versatilidad, su fácil cultivo y la poca especificidad de las bacterias para establecer relaciones simbióticas con las plantas leguminosas, que se han convertido en una potencial herramienta clave en la solución del problema de la contaminación de los suelos. En este trabajo se aislaron bacterias procedentes de nódulos de plantas de *Medicago* spp. y se caracterizaron, con intención de utilizar aquellas que reunieran las mejores características para inocular semillas del mismo género en condiciones controladas. Los resultados mostraron un efecto positivo de las bacterias seleccionadas sobre dichas plantas, que aumentaron no solo su peso y su longitud, sino también su número de hojas y nódulos. Se concluyó, por lo tanto, que la asociación leguminosa-rizobio era beneficiosa para las plantas, y que la adición a esta simbiosis de una bacteria con ciertas propiedades promotoras del crecimiento vegetal (PGPB; (plant growth-promoting bacteria)) incrementaba aún más el efecto positivo.

Palabras clave: rizobios, nódulo, leguminosas, inoculación, PGPB, metales pesados

1. Introducción.

Cuando se habla de “contaminación del suelo” se hace referencia a la presencia en el suelo de cualquier sustancia que se encuentre fuera de su sitio natural y/o esté presente en una concentración más alta de lo normal, teniendo efectos adversos sobre cualquier organismo al que no está destinado (FAO e ITPS, 2015). A pesar de que la mayoría de los contaminantes tienen origen antropogénico, algunos pueden encontrarse de forma natural en los suelos como componentes de minerales y pueden ser tóxicos en concentraciones altas. La cantidad y diversidad de contaminantes se encuentra en constante aumento debido al continuo desarrollo agroquímico e industrial (FAO e ITPS, 2015).

La contaminación del suelo fue identificada como la tercera amenaza más importante para el suelo en Europa (FAO, 2015). La única estimación global de este problema fue realizada en la década de los 90 y concluyó que 22 millones de hectáreas estaban contaminadas (Oldeman, 1991). Sin embargo, datos más recientes indican que este número podría ser mayor (CCICED, 2015). Por suerte, la gravedad del problema está haciendo que la población sea cada vez más consciente de ello, favoreciéndose así la búsqueda de posibles soluciones.

Como ya se ha dicho anteriormente, las principales fuentes de contaminantes en el suelo son el ser humano y sus actividades (figura 1). Siglos de actividades antropogénicas han convertido la contaminación del suelo en un problema generalizado en todo el mundo (FAO, 2015). Las principales fuentes son los químicos usados o producidos en las actividades industriales y los desechos domésticos y municipales. Estos productos son liberados al medio ambiente de forma accidental o intencionadamente, como ocurre con los fertilizantes y plaguicidas. Los metales presentes en estos agroquímicos (Cu, Cd, Pb y Hg) son considerados también contaminantes porque pueden alterar el metabolismo de las plantas y disminuir la productividad de los cultivos. El exceso de metales pesados y otros elementos como el N y el P supone, además, un peligro para la población humana cuando estos elementos entran en la cadena trófica y/o alteran la calidad del agua (FAO, 2015). Por ello, la correcta manipulación y utilización de los fertilizantes es clave para evitar la contaminación del suelo (Stewart et al., 2005).

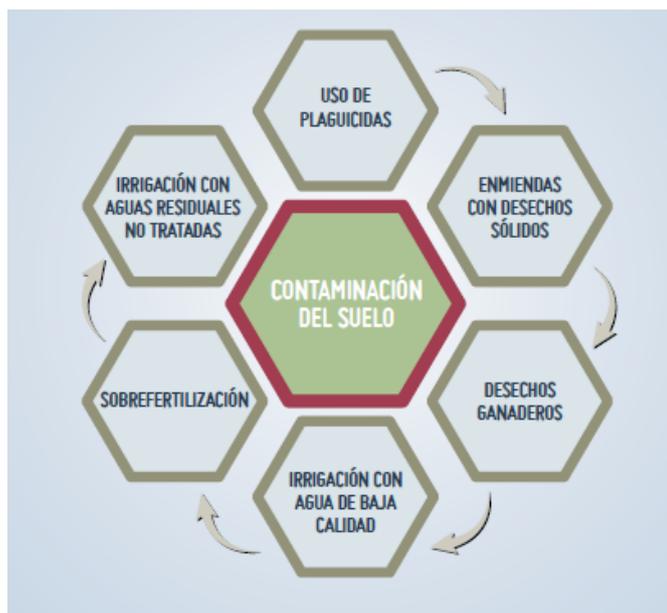


Figura 1. Esquema de las principales actividades humanas contaminantes del suelo (Rodríguez-Eugenio et al., 2019).

1.1 Contaminantes y compuestos presentes en el suelo.

Cuando se habla de “metales pesados”, se hace referencia a un grupo de metales de masa relativamente alta ($> 4,5 \text{ g/cm}^3$) como Pb, Cd, Cu, Hg, Sn y Zn, que pueden causar problemas de toxicidad. Existen otros no metales (As, Sb y Se) que son incluidos con frecuencia en esta misma categoría (Kemp, 1998). Aunque muchos de ellos son micronutrientes esenciales para plantas, animales y humanos, no están sujetos a degradación metabólica por lo que se acumulan en los tejidos y, en altas concentraciones, pueden dañar la salud humana (Tchounwou et al., 2012; figura 2). Además, estimulan la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Mithofer et al., 2004) e interaccionan con el sistema antioxidante de los vegetales (Srivastava et al., 2004), causando fitotoxicidad.

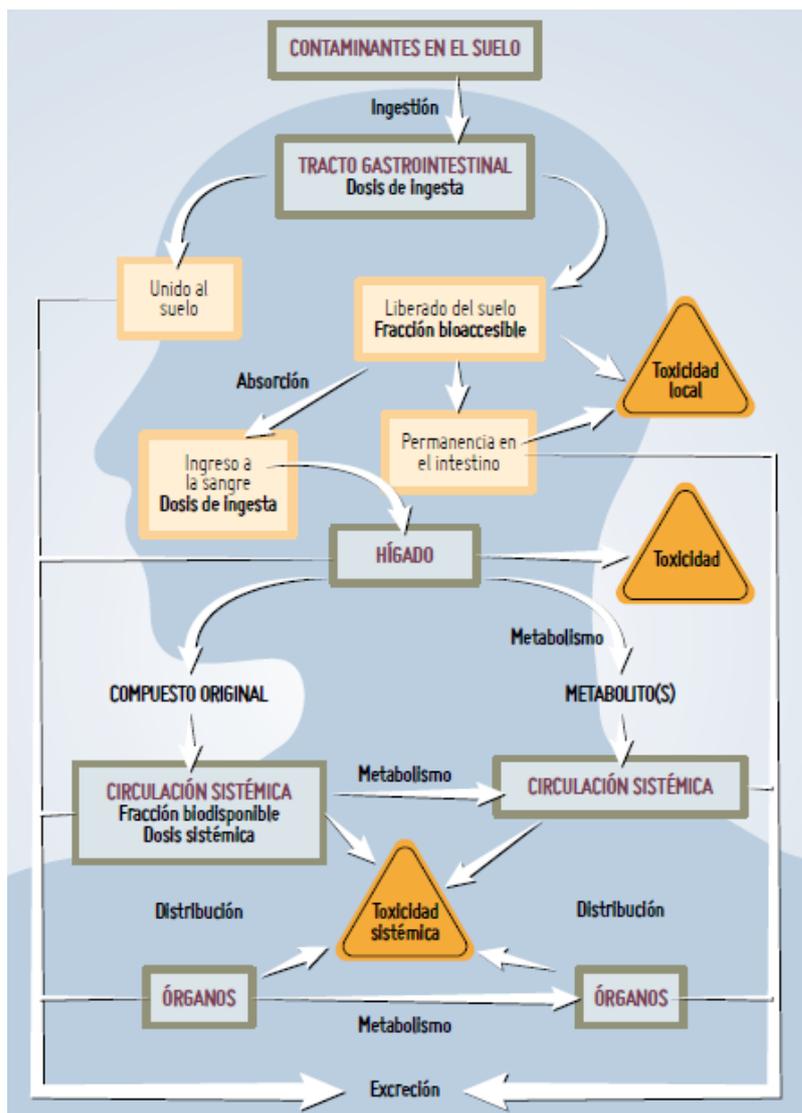


Figura 2. Esquema de los posibles efectos tóxicos en el ser humano de los contaminantes del suelo en exposición oral (Hosford, 2008).

Encontramos diferencias en cuanto al efecto de estos metales sobre los seres vivos: mientras que Zn, Ni, Co y Cu son más tóxicos para las plantas; As, Cd, Pb, Cr y Hg lo son más para los animales superiores (McBride, 1994). Estos últimos son especialmente relevantes para la salud de los seres humanos (McLaughlin, Parker y Clarke, 1999; figura 3).

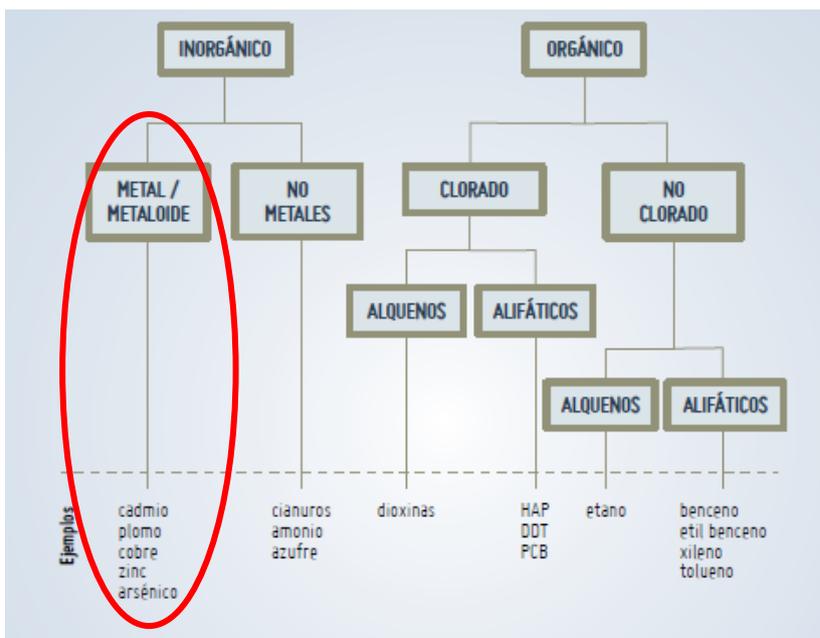


Figura 3. Esquema de los elementos que se pueden encontrar en los suelos contaminados (Rodríguez-Eugenio et al., 2019).

Otros nutrientes anteriormente mencionados (N y P) pueden convertirse en contaminantes a elevadas concentraciones a pesar de que su importante papel en el funcionamiento de todos los seres vivos (Yaron et al., 2012; Frumin y Gildeeva, 2014).

1.2 Situación actual de los fertilizantes químicos y su legislación.

Desde la FAO (Food and Agriculture Organization) se promueve un enfoque de la fertilidad del suelo basado en los siguientes principios: 1) “ni las prácticas basadas exclusivamente en fertilizantes minerales, ni el manejo exclusivo de materia orgánica son suficientes para la producción agrícola sostenible”; 2) “es necesario un germoplasma bien adaptado y resistente a las enfermedades para hacer un uso eficiente de los nutrientes disponibles”, y 3) “son esenciales las buenas prácticas agronómicas para garantizar el uso eficiente de los recursos”. Este organismo internacional anima a los gobiernos de cada país a regular los niveles de contaminación del suelo, más allá de los ya establecidos. Se les aconseja también que, para proteger la salud de los humanos y el medio ambiente, faciliten la remediación de los suelos contaminados (FAO, 2015).

En junio de 2019, el Parlamento Europeo derogó el Reglamento (CE) 2003/2003, que regulaba casi exclusivamente el uso de fertilizantes químicos o inorgánicos, y mostró su deseo de favorecer la disponibilidad en el mercado europeo de otros productos que fueran reciclados u orgánicos. En el Reglamento (CE) 2019/100 se defendió que el

beneficio derivado del uso estos nuevos abonos no sería solo la reducción de la contaminación, sino que también contribuiría al mejor aprovechamiento de los nutrientes, reduciendo así la dependencia de la Unión Europea del suministro de terceros países. También incluyó este Reglamento la necesidad de limitar la presencia de contaminantes, como el Cd, en los fertilizantes debido a su acumulación en el medio ambiente y su entrada en la cadena trófica. Además, se animó a promover no solo el uso de productos destinados a proporcionar nutrientes a las plantas, sino también el de los destinados a mejorar la eficiencia nutricional de los vegetales.

A nivel internacional, muchos países de todo el mundo han adoptado o están en vías de adoptar regulaciones nacionales para proteger sus suelos, prevenir la contaminación y abordar los problemas históricos de contaminación. Incluso países en desarrollo, donde los recursos son más limitados, han adoptado regulaciones para impedir y controlar la contaminación del suelo (Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2009; MINAM, 2017; MMA, 2013).

1.3 Principales técnicas de remediación.

Pueden ser clasificadas principalmente en *in situ* (tratamiento en el sitio) y *ex situ* (tratamiento del suelo fuera del sitio). En ellas se incluyen tratamientos físicos, químicos y biológicos, y ofrecen soluciones para la mayoría de los contaminantes del suelo (Scullion, 2006). Muchos de los métodos físicos *ex situ* disponibles en la actualidad son costosos por el elevado coste de la excavación y del transporte de los materiales, lo que ha propiciado que crezca el interés en tecnologías *in situ* alternativas, en especial aquellas basadas en la remediación biológica de ciertas plantas y microorganismos (Chaudhry et al., 2005).

La biorremediación es una técnica basada en la destrucción o conversión a compuestos inocuos de los contaminantes, utilizando el crecimiento y la actividad biológica de algunos microorganismos. Por ello, su efectividad depende en gran parte de las condiciones ambientales y del suelo. Ha sido usada mundialmente con éxito variable y se considera una tecnología con un gran potencial (Zouboulis et al., 2011).

En paralelo al creciente interés de las técnicas de biorremediación, ha aumentado la demanda del mercado de fertilizantes más respetuosos con el medio ambiente. Los biofertilizantes, formados por microorganismos vivos (bacterias, hongos, protozoos, algas y virus), desempeñan un papel fundamental en la fertilidad del suelo, la rentabilidad de los cultivos y su productividad sin las consecuencias de los productos utilizados hasta

el momento. Algunos de los microorganismos beneficiosos más usados en estos fertilizantes pertenecen a los grupos comúnmente denominados rizobios y micorrizas, y a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces*. Estos son capaces de aumentar la disponibilidad de los macro y micronutrientes esenciales para las plantas y descomponer la materia orgánica del suelo. También resultan muy útiles en el manejo de desechos sólidos y aguas residuales, y aumentan la tolerancia de las plantas a las agresiones externas (por ej.: sequía, calor, frío, salinidad), a los insectos y a las enfermedades (Rodríguez-Eugenio et al., 2019). Por ello, cuando se utilizan estos biofertilizantes no solo se produce un mayor crecimiento y un incremento de la productividad de los cultivos, sino que la calidad de estos se ve mejorada al controlar diversos insectos y enfermedades que atacan a las plantas.

1.4 Simbiosis Leguminosas-rizobios.

La asociación simbiótica Leguminosas-rizobios ha sido estudiada como una herramienta de biorremediación y recolonización de suelos contaminados (Pajuelo et al., 2007; Graham y Vance, 2003). Las Leguminosas son una familia grande y diversa de vegetales que se encuentran distribuidos en distintos ecosistemas alrededor de mundo. Presentan, además, una característica diferenciadora: en sus raíces hay nódulos, estructuras que albergan bacterias de géneros como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Mesorhizobium* especializadas en la fijación de nitrógeno atmosférico. Estos microorganismos son capaces de transformar el nitrógeno de la atmósfera (N_2), que las plantas no pueden absorber, en nitrato (NO_3^-), que sí pueden utilizar (Franche et al., 2009). Además, pueden favorecer el desarrollo de otros géneros de bacterias en los que se ha observado esta fijación de N_2 , como son *Azospirillum* (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000) o *Xanthobacter* (Alam et al., 2001).

Para la formación de los nódulos, las raíces de las plantas leguminosas liberan al suelo metabolitos secundarios (flavonoides) que atraen quimiotácticamente a las bacterias (Bauer, 1981). A continuación, estos microorganismos penetran en el pelo radical al disolver parte de la pared celular de este (Callaham y Torrey, 1981; Turgeon y Bauer, 1985). En este lugar se forma una pared celular secundaria que forma el denominado cordón de infección, a través del cual las bacterias viajan hasta las células de la raíz donde crecen. Las bacterias son liberadas en una estructura denominada *primordio nodular* (Kijne, 1992; Dudley et al., 1987). Tras esta liberación, se diferencian a bacteroides,

capaces de fijar el nitrógeno gaseoso, y el primordio se desarrolla hasta formar el nódulo (Rodríguez-Llorente, 2001; figura 4).

Además, se ha demostrado que los rizobios (simbiontes naturales de leguminosas) son resistentes a altas concentraciones de metales pesados (Carrasco et al., 2009; Noguez-Inesta et al., 2017) y que algunos son capaces de colonizar diferentes leguminosas, por lo que existe poca especificidad por parte del rizobio con respecto a la planta hospedadora (Broughton, 2003).

El uso de leguminosas en la rehabilitación de suelos contaminados es una técnica viable económicamente, al alcance de productores y empresarios (Graham y Vance, 2003; Wang et al., 2012). Así mismo, estas son plantas altamente productoras de biomasa y fitoestabilizadoras, por lo que se pueden usar como forraje (Guefrachi et al., 2013). Sin embargo, es necesario seleccionar la cepa bacteriana y la planta hospedadora adecuada, ya que de eso depende el éxito de la técnica (Kuiper et al., 2004).

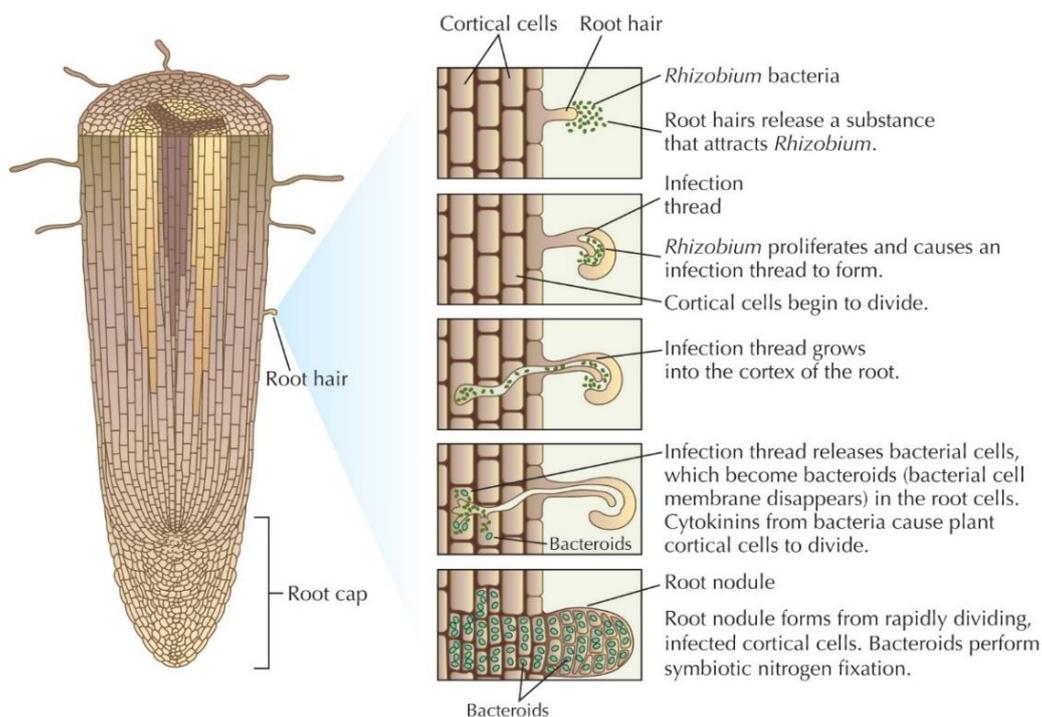


Figura 4. Esquema del proceso de nodulación (Barton et al., 2007).

Si bien la demanda de fertilizantes ha aumentado globalmente, no existe una correlación lineal entre ello y el aumento en la producción de las cosechas; al contrario, estos incrementos podrían provocar un descenso de la eficiencia en el uso de nutrientes y, con ello, rendimientos más bajos (Hossain et al., 2005; Zhu et al., 2005). La

contaminación global, así como la de los terrenos usados para la agricultura, es un problema mundial con repercusiones en todos los ámbitos, tanto económicos como sociales. Es por ello por lo que la búsqueda de alternativas ecológicas, basadas sobre todo en el empleo de microorganismos, es de gran relevancia en la actualidad.

2. Objetivos.

El objetivo general de este trabajo será aislar y caracterizar bacterias extraídas de los nódulos de plantas leguminosas para posteriormente ensayar sus efectos en terrenos contaminados sobre el crecimiento de plantas de la misma familia. De esta forma, se tratará de constatar el efecto positivo de estos microorganismos sobre dichas plantas. Para ello, se desarrollaron los siguientes objetivos específicos:

1. Aislamiento de endófitos extraídos de nódulos de *Medicago* spp.
2. Caracterización de dichos endófitos, buscando propiedades promotoras del crecimiento vegetal (PGP), enzimas beneficiosas para los cultivos, y tolerancia a metales pesados.
3. Selección de las mejores bacterias en base a sus propiedades PGP, actividades enzimáticas y tolerancia a metales pesados.
4. Estudio de los efectos de las bacterias tras la inoculación de plantas de *Medicago sativa* con las mejores bacterias aisladas.

3. Metodología.

3.1 Recogida de muestras.

En febrero de 2020 se recogieron plantas de *Medicago* spp. con una edad y tamaño similar de las marismas del río Odiel (Huelva, España). Las muestras se recolectaron utilizando una pala y guantes de plástico, se metieron en bolsas de plástico, y se transportaron inmediatamente al laboratorio. Después, se almacenaron a 4 °C hasta su procesamiento.

3.2 Aislamiento de endófitos del nódulo.

Para el aislamiento de los endófitos, se separaron la parte aérea y las raíces de las plantas. Las raíces se lavaron con agua y se introdujeron en tubos Falcon. Se sumergieron las muestras en etanol al 70% (v/v) y se sometieron a agitación durante 1 minuto para desinfectar su superficie. A continuación, se lavaron de nuevo con agua estéril y fueron sometidas a agitación durante 15 minutos mientras permanecían sumergidas en hipoclorito sódico al 3% (v/v). Finalmente, se lavaron cuatro veces con agua destilada estéril. Una vez desinfectada la superficie, los nódulos se cortaron y se trituraron en un mortero estéril con 1 ml de solución salina estéril al 0,9% (p/v). De la mezcla formada se sembraron 100 µl por placa, utilizando una espátula, en dos placas de Petri con medio TY (agar de tripton-extracto de levadura) que se incubaron a 28 °C durante 72 horas. Se hicieron controles de la solución salina, del aire de la cabina donde se manipularon las muestras, del agua estéril y de los nódulos antes de triturar.

Las bacterias se aislaron en base a la diferente morfología y coloración de las colonias en placas, y la tipología y morfología de las células observadas en la tinción de Gram.

3.3 Identificación de las bacterias.

Las bacterias que mostraron mejores propiedades para ser utilizadas en la inoculación de las plantas de *Medicago sativa* fueron identificadas. Para ello, las bacterias se cultivaron en 3 ml de TY durante 24 horas a 28 °C en agitación continua. El ADN genómico fue extraído utilizando el kit G-spinTM for Bacteria (iNtRON Biotechnology), siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras la extracción, se realizó la PCR utilizando como cebadores *16F27* y *16R1488* (tabla 1), y la enzima i-Taq polimerasa (Maxime PCR PreMix Kit, Intron Biotechnology) con una desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 20 segundos, alineamiento a 58 °C durante 10 segundos y extensión a 72 °C durante 50 segundos, seguido de una extensión final a 75 °C durante 5 minutos. Tras la realización de la PCR, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con RedSafeTM utilizando 5 µl de los productos de la PCR. Dicho gel fue sometido a una corriente eléctrica de 100V durante 30 minutos y fue revelado por exposición a radiación UV. Finalmente, los restos de los productos de la PCR se purificaron utilizando la enzima ExoSAP-IT (Affymetrix USB) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se enviaron para su secuenciación a la empresa StabVida (Portugal). Se utilizó el servidor EzTaxon para determinar la

homología de las secuencias del gen del ARNr 16S amplificadas con las ya conocidas de la base de datos EzBioCloud (Chun et al., 2007).

Tabla 1. Cebadores utilizados en las amplificaciones del gen del ARNr 16S y del gen de la enzima ACC desaminasa.

Cebador	Secuencia
<i>16F27</i>	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
<i>16R1488</i>	5'-CGGTTACCTTGTTAGGACTTCACC-3'
<i>acdSf3</i>	5'-ATCGGCGGCATCCAG-3'
<i>acdSr3</i>	5'-GTGCATCGACTTGCCCT-3'

3.4 Medición de la tolerancia a metales.

La medición de la tolerancia a metales pesados de las bacterias aisladas se realizó en placas de medio TY preparadas añadiendo concentraciones crecientes de dichos metales. Se utilizaron soluciones stock de NaAsO₂ 1 M, CuSO₄ 1 M, CdCl₂ 1 M y ZnSO₄ 1M. Las placas inoculadas se incubaron durante tres días a 28 °C. La aparición de crecimiento bacteriano indicaba que las bacterias podían tolerar la concentración de metal ensayada, por lo que se aumentó en 0,1 mM dicha concentración y se repitió el experimento. En caso contrario, la concentración expuesta se reducía en 0,1 mM y se volvía a ensayar. Se consideró la CMT (concentración máxima tolerada) la concentración más alta a la cual se observó crecimiento bacteriano (figura 5).

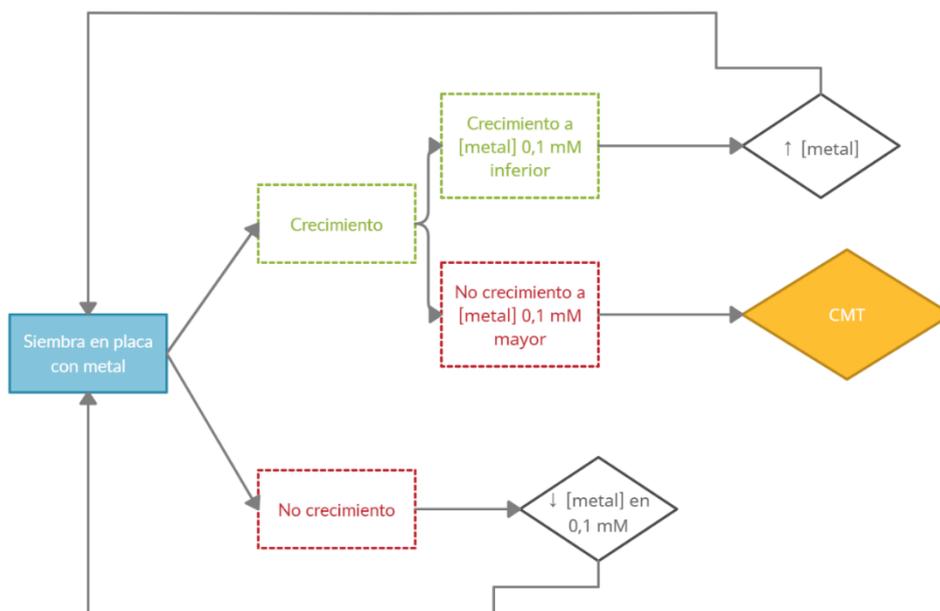


Figura 5. Esquema del proceso de tolerancia a metales. CMT: concentración máxima tolerada (Elaboración propia).

3.5 Medición de actividades enzimáticas.

3.5.1 ADNasa.

Se sembraron las bacterias en el medio Agar ADN (Scharlau, España) y se incubaron las placas a 28 °C durante 7 días. Tras ese tiempo, se revelaron añadiendo 10 ml de HCl 1 N. La aparición de un halo transparente alrededor de la zona de crecimiento bacteriano hace que esta prueba se considere positiva (Mesa et al., 2015).

3.5.2 Actividad amilasa.

Se sembraron las bacterias en el medio Agar almidón y se incubaron las placas a 28 °C durante 7 días. Pasado ese tiempo, se adicionaron de 10 ml de Lugol para su revelación. La aparición de un halo transparente alrededor del crecimiento de la bacteria indica que las bacterias poseen esta actividad (Mesa et al., 2015).

3.5.3 Actividad celulasa.

Se sembraron las bacterias en el medio CMC y se incubaron a 28 °C durante 7 días. Para revelar las placas se utilizó una solución de Rojo Congo al 0,1% (p/v), que se dejó actuar 20 minutos. Tras esta solución, se añadió NaCl 1 M para decolorar las placas. La aparición de un halo claro alrededor del crecimiento de la bacteria confirma la presencia de la actividad en los microorganismos de la placa (Elbeltagy et al., 2000).

3.5.4 Actividad lipasa.

Se sembraron las bacterias en el medio Tween80 y se incubaron a 28 °C durante 7 días. La presencia de un halo alrededor del crecimiento bacteriano indica una prueba positiva (Harley y Prescott, 2002).

3.5.5 Actividad pectinasa.

Se sembraron las bacterias en el medio AMA y se incubaron a 28 °C durante 7 días. Posteriormente, se revelaron las placas con CTAB al 2% (p/v). La presencia de un halo alrededor del crecimiento bacteriano identifica la prueba como positiva (Elbeltagy et al., 2000).

3.5.6 Actividad proteasa.

Se sembraron las bacterias en el medio Agar caseína y se incubaron a 28 °C durante 7 días. La aparición de un halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano confirma una prueba positiva (Harley y Prescott, 2002).

3.5.7 Actividad quitinasa.

Se sembraron las bacterias en un medio mínimo suplementado con quitina coloidal y se incubaron a 28 °C durante 7 días. La presencia de halos alrededor del crecimiento bacteriano indica que la prueba es positiva (Mesa et al., 2015).

3.6 Medición de propiedades PGP.

3.6.1 Producción de IAA.

Se sembraron 3 ml de NB suplementado con triptófano durante 72 horas en agitación continua a 28 °C, tras lo cual se centrifugaron 1,5 ml de dicho cultivo durante 5 minutos a 13000 rpm. Se añadieron 4 ml del reactivo de Salkowski a 1 ml del sobrenadante formado y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. La aparición de un color rojo indica que la prueba es positiva (Gordon y Weber, 1951). Se calculó la cantidad de ácido indol-3-acético (IAA) midiendo en un espectrofotómetro la absorbancia a 535 nm, utilizando como blanco la mezcla del control negativo con el reactivo de Salkowski.

Se realizó una curva patrón utilizando IAA (200 mg/l) como se muestra en la tabla 2. Tras incubar 20 minutos, se midieron las absorbancias de las distintas concentraciones de IAA. Con los datos obtenidos, se creó una recta de regresión y su respectiva fórmula usando Excel.

Tabla 2. Datos para realizar la curva patrón de la producción de IAA.

	Patrones (mg/l)									
	200	150	100	75	50	20	10	5	2	0
Volumen de IAA (200 mg/l) (ml)	1	0,75	0,5	0,375	0,25	0,1	0,05	0,025	0,01	0
Volumen de NB (ml)	0	0,25	0,5	0,625	0,75	0,9	0,95	0,975	0,99	1
Volumen de reactivo Salkowski (ml)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

3.6.2 Producción de sideróforos.

Se cultivaron las bacterias en 3 ml de TY y se incubaron a 28 °C durante 24 horas en agitación continua. Tras ese tiempo, se colocaron 100 µl de cada cultivo en un pocillo en placas con medio CAS, que fueron cubiertas con papel de plata e incubadas a 28 °C durante 7 días. La aparición de un halo de color naranja alrededor del pocillo indica que la bacteria produce sideróforos (Schwyn y Neilands, 1987). Para terminar, se midió el diámetro de los halos (mm).

3.6.3 Solubilización de fosfato.

Se cultivaron las bacterias en 3 ml de TY y se incubaron a 28 °C durante 24 horas en agitación continua. A continuación, se depositaron 100 µl de cada cultivo en un pocillo en placas con medio NBRIP y se incubaron a 28 °C durante 7 días. La aparición de un halo transparente alrededor del pocillo indica que la bacteria solubiliza fosfatos (Pikovskaya, 1948). Para terminar, se midió el diámetro de los halos (mm).

3.6.4 Fijación de nitrógeno.

Se sembraron las bacterias en placas con medio NFB y se incubaron a 28 °C durante 7 días. La aparición de crecimiento indica que la bacteria podría fijar nitrógeno (Tak et al., 2020).

3.6.5 Formación de biopelículas.

Se incubaron las bacterias en 3 ml de medio TY a 28 °C durante 24 horas en agitación constante. Tras ese tiempo, se transfirieron 20 µl de los cultivos a pocillos de una placa de microtitulación con 96 pocillos. Se realizaron 4 réplicas de cada cultivo y se añadió medio sin inocular como control negativo. Estas placas se incubaron a 28 °C durante 4 días selladas con parafilm. Después, se descartó el medio líquido presente en los pocillos, se lavaron 5 veces usando agua destilada y se tiñeron con 200 µl de cristal violeta al 0,01% durante 20 minutos. Para finalizar, los pocillos se lavaron de nuevo 3 veces con agua destilada y se añadió sobre ellos 100 µl de ácido acético al 33% disuelto en etanol al 95%. Se midió la absorbancia de los pocillos a 570 nm/595 nm utilizando un lector de microplacas ASYS UVM-340 (del Castillo et al., 2012).

3.6.6 Presencia del gen de la enzima ACC desaminasa.

Para determinar la presencia de la enzima ACC desaminasa se recurrió a la técnica de PCR con el fin de buscar el gen que codifica a dicha enzima en las bacterias aisladas siguiendo lo descrito en Zhengyi et al, 2015. Se recurrió a esta técnica por problemas de suministro del reactivo necesario para realizar el ensayo de esta actividad. Para ello, se utilizaron como cebadores *acdSf3* y *acdSr3* (tabla 1), y la enzima i-Taq polimerasa (Maxime PCR PreMix Kit, Intron Biotechnology) con las siguientes condiciones de PCR: desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 20 segundos, alineamiento a 53 °C durante 10 segundos y extensión a 72 °C durante 50 segundos, seguido de una extensión final a 75 °C durante 5 minutos. Tras la realización de la PCR, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con RedSafe™ utilizando 5 µl de los productos obtenidos en la etapa anterior. Se añadió también la misma cantidad de ADN de la bacteria *Variovorax paradoxus*, que presenta esta actividad enzimática, como banda control. Dicho gel fue sometido a una corriente eléctrica de 100V durante 30 minutos y revelado por exposición a radiación UV. Finalmente, los restos de los productos de la PCR se purificaron utilizando la enzima ExoSAP-IT (Affymetrix USB) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se enviaron para su secuenciación a la empresa StabVida (Portugal). Las secuencias obtenidas fueron introducidas en el buscador BLAST (NCBI) para comprobar si las bandas amplificadas correspondían al gen de la enzima ACC desaminasa.

En la determinación de las actividades enzimáticas y las propiedades PGP se utilizaron como controles positivos y negativos bacterias de la colección del laboratorio BIO-181.

3.7 Determinación de los tratamientos de inoculación.

Para la formación de los diferentes tratamientos de inoculación en los siguientes experimentos en plantas, se escogieron las mejores cepas bacterianas considerando la tolerancia a los metales, la presencia de propiedades PGP y las actividades enzimáticas. Se formó un consorcio (Csc) compuesto por las bacterias BN4, BN8, BN10 y BN12. Además, se agruparon por parejas (rizobio y no rizobio): BN4+BN10, BN4+BN12, BN8+BN10 y BN8+BN12. Cada bacteria fue ensayada también individualmente y se incluyó una bandeja de macetas que fueron regadas con agua estéril a modo de control

negativo (tabla 3). Cada tratamiento constó de una bandeja con ocho macetas con dos semillas cada una, es decir, 16 plantas por tratamiento. En total, se utilizaron 9 bandejas, 72 macetas y 144 semillas.

Tabla 3. Tabla de todos los tratamientos ensayados. BN: bacteria del nódulo.

Tratamiento	Bacterias
C-	No inoculación
BN4	Inoculación con <i>Pseudomonas gessardii</i>
BN8	Inoculación con <i>Pseudomonas thivervalensis</i>
BN10	Inoculación con <i>Ensifer meliloti</i>
BN12	Inoculación con <i>Ensifer mayense</i>
BN4+BN10	Inoculación con <i>P. gessardii</i> y <i>E. meliloti</i>
BN4+BN12	Inoculación con <i>P. gessardii</i> y <i>E. mayense</i>
BN8+BN10	Inoculación con <i>P. thivervalensis</i> y <i>E. meliloti</i>
BN8+BN12	Inoculación con <i>P. thivervalensis</i> y <i>E. mayense</i>
Csc	Inoculación con <i>P. gessardii</i> , <i>P. thivervalensis</i> , <i>E. meliloti</i> y <i>E. mayense</i>

Para saber que no había incompatibilidades entre las bacterias a la hora de inocular, se realizó un ensayo de convivencia entre las distintas especies. Para ello, se cultivaron 3 ml de los distintos cultivos bacterianos (BN4, BN8, BN10 y BN12) por separado en medio TY líquido durante 24 h a 28 °C en agitación. Al día siguiente, se añadieron 100 µl de cada cultivo a un matraz con 50 ml de TY líquido, que se incubó durante 24 h a 28 °C en agitación constante. Pasado ese tiempo, se realizaron diluciones y se sembraron en placas de TY las diluciones 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} y 10^{-11} . Estas placas se incubaron 24 h a 28 °C para comprobar el crecimiento de las bacterias. El crecimiento de las distintas colonias confirmó que se podían utilizar agrupadas.

3.8 Inoculación de plantas de *Medicago sativa*.

3.8.1 Germinación de las semillas.

Se desinfectaron las semillas antes de proceder a su germinación. Para ello, se lavaron durante dos minutos con etanol al 70% (v/v) en agitación y se expusieron a hipoclorito sódico al 3% (v/v) durante 20 minutos. Finalmente, se lavaron en repetidas ocasiones con agua estéril y se colocaron en placas de agar agua 0,9%. Las placas fueron

tapadas con papel metálico y puestas en zonas sin iluminación durante tres días para favorecer la germinación. Pasado ese tiempo, se colocaron en las macetas.

3.8.2 Preparación de los inóculos bacterianos.

Para la inoculación de las plantas de *M. sativa*, las cepas seleccionadas se incubaron en diferentes matraces con 50 ml de TY durante 18-24 horas a 28 °C en agitación continua. Tras ese tiempo, los cultivos se centrifugaron durante 10 minutos a 8000 rpm y los sedimentos fueron lavados con 50 ml de solución salina estéril al 0,9% (p/v). Después se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones y el sedimento formado se resuspendió en 5 ml de solución salina estéril al 0,9% (p/v). Los cultivos de las bacterias que formaban el mismo tratamiento se mezclaron en un tubo Falcon de 50 ml que fueron llevados a un volumen total de 400 ml tras la adición de agua estéril.

3.8.3 Siembra y riego de las macetas.

Para la siembra, se utilizó suelo recogido de las marismas del Odiel previamente esterilizado. Este se mezcló con perlita y arena, también esterilizadas, para eliminar cualquier microorganismo que pudiera alterar los resultados. Además, durante todo el proceso se utilizó agua estéril para regar por el mismo motivo. Se colocaron dos semillas en cada maceta, haciendo orificios de 1-2 cm de profundidad y se mantuvieron en las mismas condiciones de invernadero durante cuatro meses (figura 6).

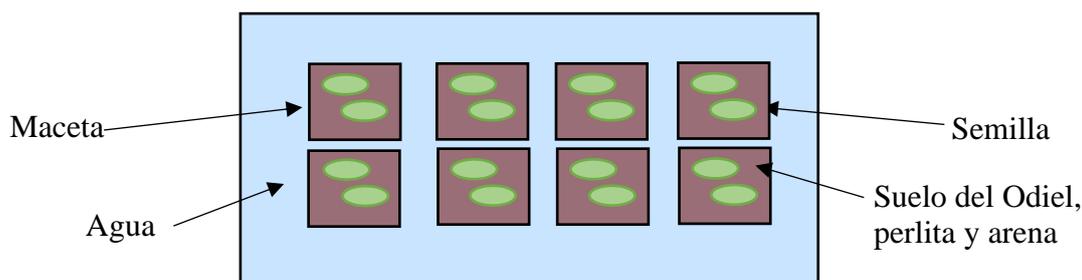


Figura 6. Representación gráfica de una bandeja (Elaboración propia).

Durante ese tiempo, se inocularon las plantas cada semana con 50 ml del inóculo correspondiente a cada tratamiento, regando con agua entre inoculaciones. Las plantas no inoculadas se regaron con 50 ml de agua estéril por maceta. Las plantas estuvieron inundadas todo el tiempo con agua, dejando 1 cm de profundidad.

3.9 Medición parámetros obtenidos de las plantas.

Pasados los cuatro meses de cultivo, se procedió a la retirada de las plantas para el análisis de los resultados obtenidos. Los parámetros determinados fueron la longitud de las plantas, el número de hojas y nódulos y el peso seco. Para determinar el peso seco, las plantas se secaron durante una semana en la estufa a 50 °C. Tras ese tiempo, se determinó su peso utilizando una balanza de precisión. Se pesaron por separado parte aérea y raíces.

3.9.1 Análisis estadístico de los datos.

Para el análisis de estadístico de los datos se recurrió al programa informático “Statistica” versión 6.0 (Statsoft Inc.). Primero, se probó la normalidad de los datos utilizando el test de Kolmogorov-Smirnov. Las comparaciones entre las medias en los diferentes tratamientos se hicieron usando el ANOVA de una variable. Las diferencias significativas fueron obtenidas con el test de Tukey.

4. Resultados y discusión.

4.1 Aislamiento de los endófitos.

De acuerdo con la morfología de las colonias y la tinción de Gram, se aislaron 13 bacterias cultivables de los nódulos (nombradas como BN), siendo un 92% de ellas bacterias Gram negativa (tabla 4).

Tabla 4. Morfología de las bacterias aisladas. G-: Gram negativa, G+: Gram positiva, BN: bacteria del nódulo.

Bacteria	Morfología
BN1	Bacilos G-
BN2	Bacilos G-
BN3	Bacilos G-
BN4	Bacilos G-
BN5	Bacilos G-
BN6	Bacilos G-
BN7	Bacilos G-
BN8	Bacilos G-
BN9	Bacilos G-

BN10	Bacilos G-
BN11	Bacilos G+
BN12	Bacilos G-
BN13	Bacilos G-

4.2 Identificación de las bacterias.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de las propiedades PGP y las actividades enzimáticas, se envió a secuenciar el ADN de las bacterias que reunían mayor número de características estudiadas, siendo estas las cepas BN4, BN8, BN10 y BN12 (tabla 5).

Tabla 5. Datos obtenidos de la identificación de las bacterias con mejores características utilizando la base de datos EzBioCloud. BN: bacteria del nódulo.

Bacterias	Especies relacionadas	Fragmento secuenciado (pb)	Identidad (%)
BN4	<i>Pseudomonas gessardii</i>	1474	97,39
BN8	<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	1459	98,31
BN10	<i>Ensifer meliloti</i>	1301	98,83
BN12	<i>Ensifer mayense</i>	1430	91,30

Los bajos porcentajes de identidad obtenidos parecen sugerir que las bacterias aisladas podrían ser especies nuevas. Para que una especie se considere nueva debe tener un porcentaje de identidad menor del 98,7%; si es mayor o igual habría que hacer comparaciones con los genomas completos (Chun et al., 2018).

4.3 Tolerancia a metales.

Se observó que las bacterias toleraron mayores concentraciones de arsénico que de los demás metales, siendo el cadmio el metal con menor concentración tolerada en placa. En el caso del cadmio, las concentraciones fueron desde 0,1 mM hasta 1,9 mM. En cuanto al arsénico, se observaron variaciones mucho mayores, siendo la mayor concentración de arsénico soportada de 17,4 mM y la menor de 1 mM, aunque la bacteria BN12 no mostró la capacidad de tolerar ninguna de las concentraciones de As a las que se la expuso. Los valores de concentración de cobre oscilaron entre 1,4 mM y 4,4 mM.

En lo que se refiere a los valores de concentración de zinc, se obtuvieron datos desde 1,4 mM a 6 mM (tabla 6, figura 7).

Tabla 6. Tabla con los datos de la tolerancia a los metales ensayados de las bacterias aisladas. BN: bacteria del nódulo.

Bacteria/Metal	Cd (mM)	As (mM)	Cu (mM)	Zn (mM)
BN1	1,8	2,9	3,4	3,9
BN2	0,6	8	3,8	6
BN3	0,6	8	4,4	6
BN4	0,7	1	3	1,9
BN5	0,9	2,9	3,7	6
BN6	1,9	17,4	3,9	3,9
BN7	1,4	8	4,4	5,2
BN8	0,4	2,5	1,9	1,8
BN9	0,9	8	1,9	5,2
BN10	0,4	0,4	1,4	2,5
BN11	0,2	2,9	1,9	1,9
BN12	0,1	0	1,8	1,4
BN13	0,9	8	3,6	3,9

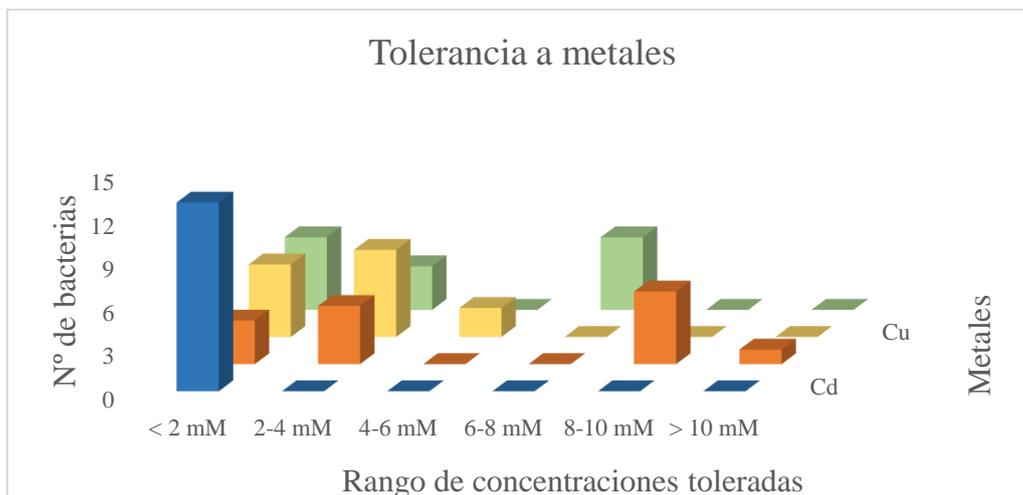


Figura 7. Diagrama de barras de la tolerancia a metales de las bacterias aisladas.

4.4 Actividades enzimáticas.

Se observó que un 62% de las bacterias aisladas poseía enzimas capaces de degradar la celulosa y un 8%, enzimas pectinasas. Ambas enzimas tienen un papel muy

importante en la germinación de las semillas (Navarro-Torre et al., 2016), que se ve complementado en el caso de las pectinasas por su acción defensiva frente a fitopatógenos (Soriano-Lasheras, 2004). En el caso de la enzima celulasa, su efecto beneficioso para la nodulación se observa en la infección primaria, donde ejerce una función fundamental al degradar la pared del vegetal y favorecer la formación del cordón de infección (Robledo et al., 2008). Además, un 38% y un 15% presentaban enzimas proteasas y ADNasas, respectivamente. Estas enzimas participan también en la defensa de la planta frente a microorganismos invasores (Kim et al., 2009; Park et al., 2010). Otras enzimas como amilasas, quitinasas y lipasas no fueron encontradas en las bacterias estudiadas (tabla 7).

Cabe mencionar que los resultados positivos de las actividades enzimáticas fueron escasos, ya que el máximo número de enzimas encontrados en una misma bacteria fue dos, siendo siete el número total de enzimas estudiadas. Aunque un 84% de las bacterias presentaba alguna enzima estudiada, más de la mitad de ellas mostró una sola actividad.

Tabla 7. Propiedades enzimáticas de las bacterias aisladas (+: presencia de la enzima; -: ausencia de la enzima). BN: bacteria del nódulo.

Cepa	ADNasa	Amilasa	Celulasa	Pectinasa	Proteasa	Quitinasa	Lipasa
BN1	-	-	-	-	-	-	-
BN2	-	-	+	+	-	-	-
BN3	-	-	+	-	-	-	-
BN4	-	-	-	-	+	-	-
BN5	-	-	+	-	-	-	-
BN6	-	-	-	-	-	-	-
BN7	-	-	+	-	+	-	-
BN8	-	-	+	-	+	-	-
BN9	-	-	+	-	-	-	-
BN10	+	-	+	-	-	-	-
BN11	-	-	-	-	+	-	-
BN12	+	-	+	-	-	-	-
BN13	-	-	-	-	+	-	-

Al finalizar los ensayos de las actividades enzimáticas se observó que las bacterias BN2, BN7, BN8, BN10 y BN12 presentaban el mayor número de enzimas estudiadas.

Todas estas bacterias presentaban actividad proteasa. Además, BN2 mostró actividad pectinasa; BN7 y BN8, proteasa; y BN10 y BN12, ADNasa (figura 8).

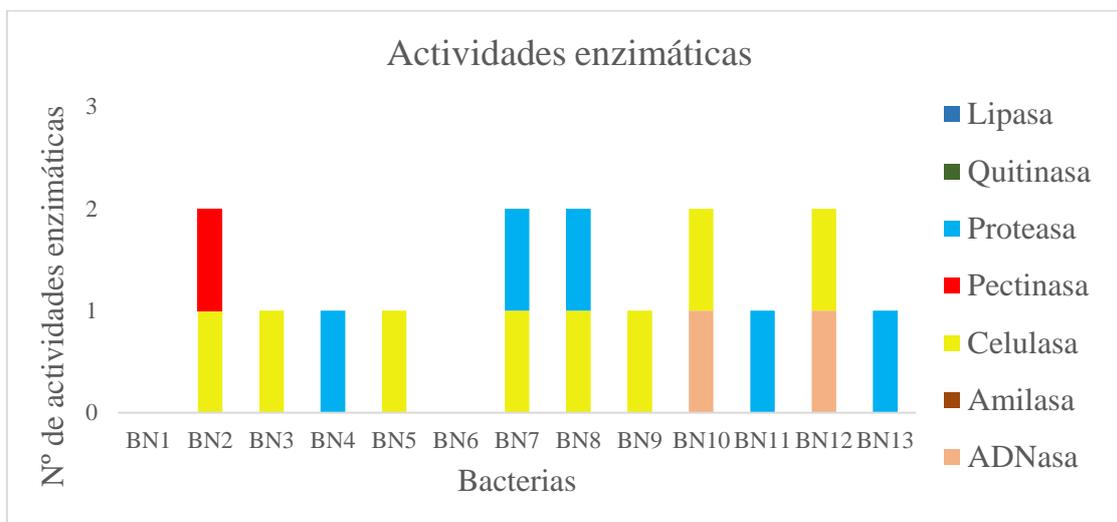


Figura 8. Diagrama de barras de las actividades enzimáticas de las bacterias aisladas.

Los resultados de los ensayos de las diferentes bacterias se vieron reforzados por otros estudios. La actividad proteolítica de la bacteria *Pseudomonas gessardi* había sido descrita anteriormente en Mehdi et al. (2020), en donde se afirmaba que se trataba de una de las bacterias más proteolítica aislada en leche cruda de vaca, resistente a altas temperaturas, y una de las principales responsables de la descomposición de este alimento.

4.5 Propiedades PGP.

Se observó que todas las bacterias producían sideróforos y fijaban nitrógeno, mientras que un 92% de ellas formaban biopelículas, un 85% auxinas y un 77% solubilizaba fosfatos. Finalmente, en un 38% de estos microorganismos se encontró presente el gen que codifica la enzima ACC desaminasa, enzima que podría reducir la cantidad de etileno producido por la planta en situaciones de estrés y permitir el crecimiento de esta en dichas condiciones (Glick, 2014). La fijación de nitrógeno parece consistente con el hecho de que las bacterias estudiadas fueron aisladas de nódulos, en los cuales se encuentran bacterias con esta propiedad. La capacidad de producir sideróforos se considera un aspecto positivo debido a la función quelante de hierro de estos compuestos, lo que permite que la planta obtenga este metal, responsable del correcto funcionamiento fisiológico de ella (Afzal et al., 2019). La producción de biopelículas podría reducir la fitotoxicidad al secuestrar metales. De esta forma, se

reducirá la cantidad de estos iones que pasan al tallo (Das et al., 2012). La producción de auxinas, compuestos implicados en la división celular, puede tener también un papel relevante en el crecimiento de la raíz y en la formación de las raíces laterales (Ljung, 2013; Remans et al., 2008; Zhao, 2010). La solubilización de fosfatos es una propiedad importante ya que hace que la disponibilidad de este elemento aumente (Hameeda et al., 2008) (tabla 8).

Tabla 8. Propiedades PGP de las bacterias aisladas. (+: presencia de la propiedad; -: ausencia de la propiedad). BN: bacteria del nódulo.

Cepa	Solubil. Fosfatos (diámetro del halo en mm)	Produc. Sideróforos (diámetro del halo en mm)	Produc. Auxinas (mg/l)	Fijación Nitrógeno	Biopelículas	ACC Desam.
BN1	-	13	-	+	+	+
BN2	12	35	7,9	+	+	-
BN3	10	50	6,7	+	+	-
BN4	11	73	-	+	+	+
BN5	12	40	2,4	+	+	-
BN6	-	15	-	+	+	+
BN7	-	25	1,5	+	+	-
BN8	12	44	16,8	+	+	+
BN9	12	39	5,0	+	+	-
BN10	15	13	0,3	+	+	-
BN11	17	20	15,1	+	+	+
BN12	14	10,2	-	+	+	-
BN13	11	42	14,4	+	+	-

Al finalizar los ensayos de las propiedades PGP se observó que las bacterias BN8 y BN11 presentaban todas las propiedades estudiadas. También se concluyó que todas las bacterias presentaban al menos cuatro propiedades y un 80% de ellas presentaba cinco o más (figura 9).

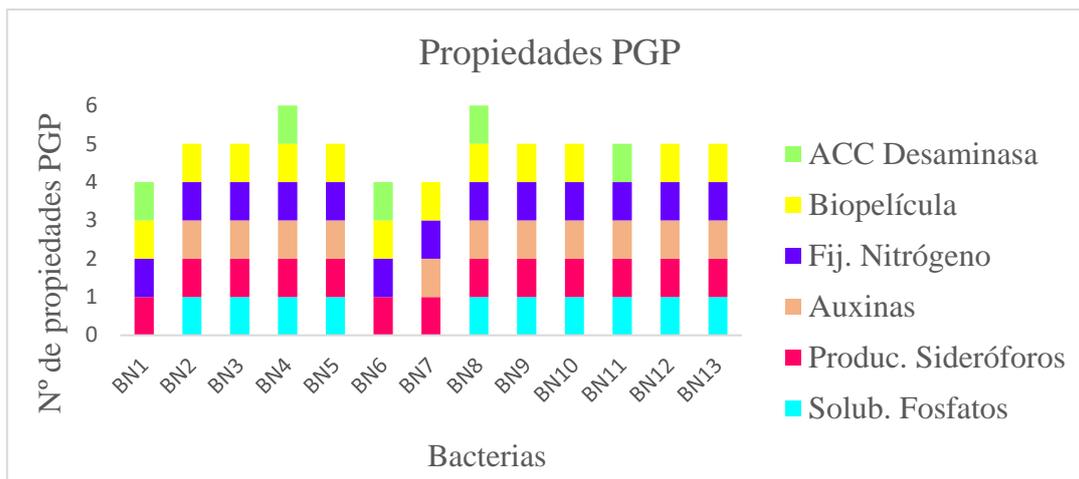


Figura 9. Diagrama de barras de las propiedades PGP de las bacterias aisladas.

4.6 Inoculación de semillas de *Medicago sativa*.

4.6.1 Efecto de las bacterias seleccionadas en las plantas.

Tras la inoculación de las semillas durante cuatro meses, se procedió a determinar el tamaño y el peso seco de las plantas (figura 10 y figura 13).

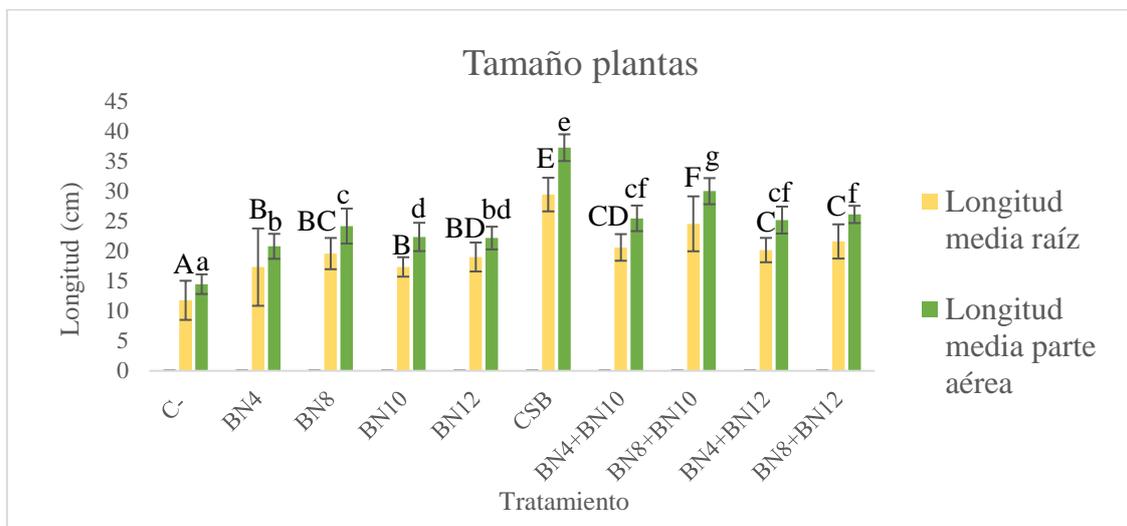


Figura 10. Gráfico de barras del tamaño medio de las plantas según el tratamiento aplicado. Los valores se representan como la media \pm desviación estándar, $n=16$. Las diferentes letras (minúsculas para la parte aérea, mayúsculas para la raíz) indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

El tamaño de las plantas se vio afectado positivamente por los distintos tratamientos. El mayor crecimiento se observó en el tratamiento con el consorcio (figura 10 y 11), seguido del tratamiento formado por BN8+BN10. El resto de las parejas

aumentaron el peso de la planta, pero no mostraron diferencias significativas entre ellas. De forma individual, los mejores datos se obtuvieron en la inoculación con BN8 (figura 10 y 12).



Figura 11. Comparación de tamaño entre C- (maceta de la izquierda) y Csc (maceta de la derecha).



Figura 12. Comparación de tamaño entre C- (maceta de la izquierda) y BN8 (maceta de la derecha).

En cuanto al peso de las plantas, todas las inoculaciones tuvieron un efecto positivo (figura 13). Sin embargo, el mayor aumento de peso, tanto en la raíz como en la parte aérea, se observó en las plantas inoculadas con el consorcio; seguidas de las tratadas con la pareja BN8+BN10. Las parejas restantes mostraron un efecto similar en el peso de las plantas, siendo las diferencias no significativas entre ellas. Se observó, de nuevo, que la bacteria BN8 era el tratamiento individual con mejores efectos sobre las plantas, sin diferencias significativas con las parejas BN4+BN10 y BN8+BN12 en cuanto al aumento de peso de la parte aérea, aunque sí en el caso de la raíz.

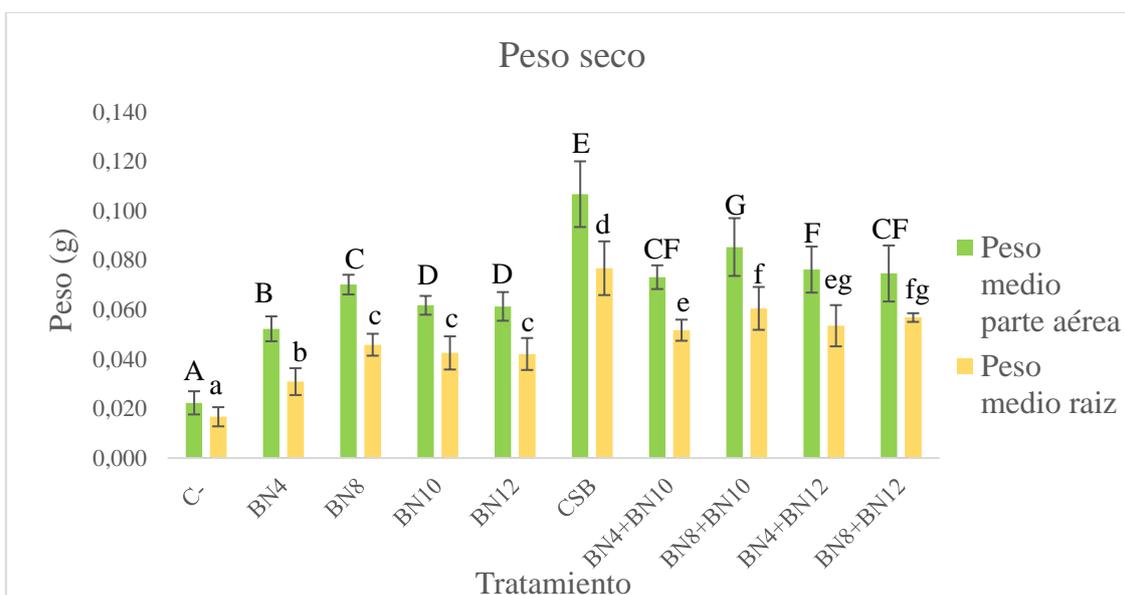


Figura 13. Diagrama de barras del peso medio de las plantas según el tratamiento aplicado. Los valores se representan como la media \pm desviación estándar, $n=16$. Las diferentes letras (minúsculas para raíz, mayúsculas para parte aérea) indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

4.6.2 Recuento del número de hojas y nódulos.

Los resultados obtenidos del recuento del número de hojas mostraron un mayor efecto positivo del consorcio (figura 14). La pareja formada por BN8+BN10 fue, de nuevo, el segundo tratamiento con mejores resultados; y la bacteria BN8 la que mayores efectos mostró inoculada individualmente. Al igual que ocurría en el caso anterior, las diferencias entre el efecto de los dos rizobios no fue significativamente diferente y el aumento del número de hojas fue similar en ambos.

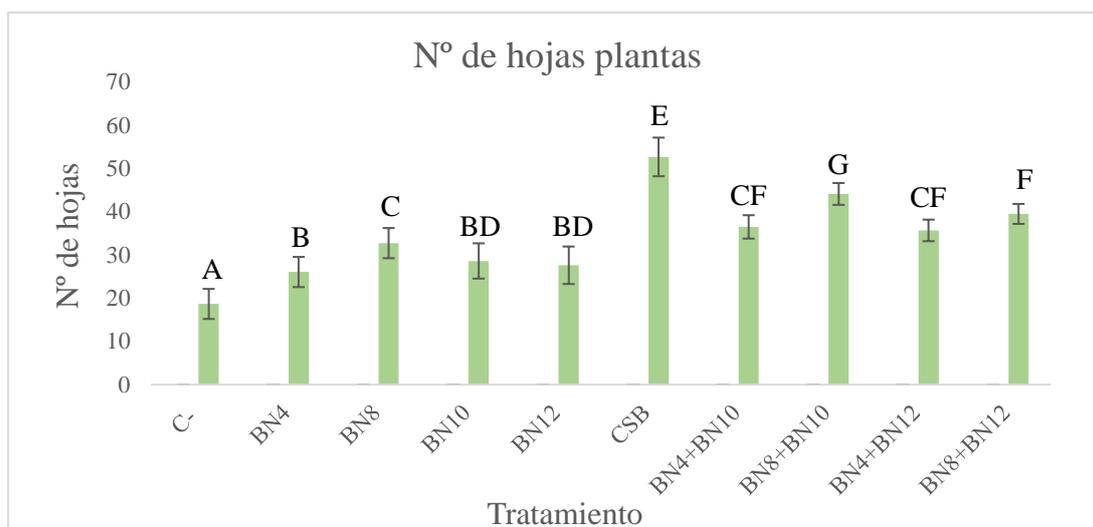


Figura 14. Gráfico de barras del número de hojas de las plantas según el tratamiento aplicado. Los valores se representan como la media \pm desviación estándar, $n=16$. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Al igual que en los anteriores casos, se observó un efecto beneficioso de las inoculaciones en el recuento de nódulos (figura 15). El mayor número de nódulos se observó en el tratamiento del consorcio, lo que refuerza la hipótesis de que la presencia de endófitos con propiedades PGP favorece la nodulación de las plantas. Tal y como ocurrió en el recuento de hojas, los efectos de las dos parejas con mejores resultados (BN8+BN10 y BN8+BN12) fueron significativamente diferentes entre ellos y con el resto de los tratamientos. La inoculación de las plantas con las bacterias BN4 y BN8 no produjo nódulos, lo cual es consistente con el hecho de que se trata de bacterias no rizobios. Podría decirse que, según los resultados, la bacteria BN8 estimulaba en mayor medida la nodulación de las plantas, por lo que la presencia de la enzima celulasa, única diferencia encontrada en los ensayos entre ambos no rizobios, es especialmente relevante en la formación de nódulos (figura 16).

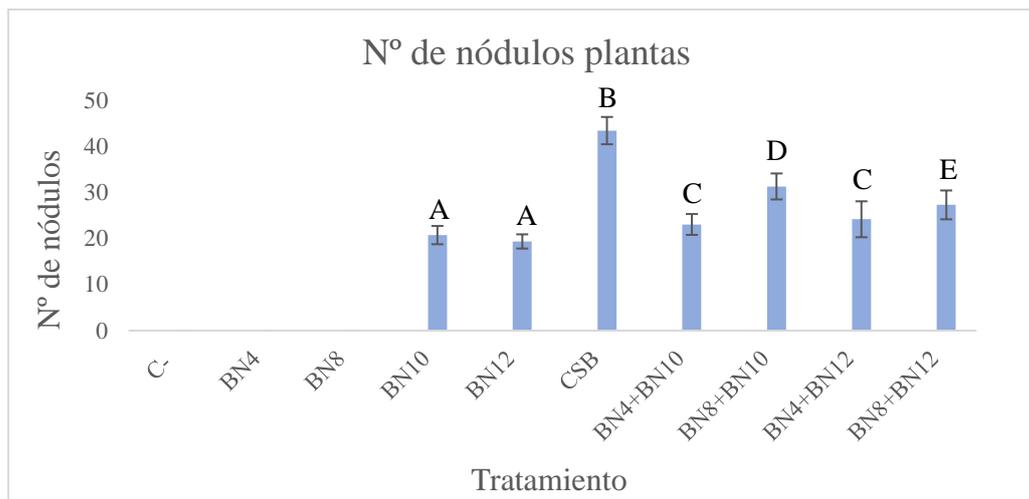


Figura 15. Gráfico de barras del número de nódulos de las plantas según el tratamiento aplicado. Los valores se representan como la media \pm desviación estándar, $n=16$. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$).



Figura 16. Foto al microscopio de los nódulos de las plantas inoculadas con Csc.

En resumen, los mejores resultados fueron los obtenidos en las plantas tratadas con el consorcio, aunque de manera individual y por parejas, destacaba la bacteria BN8. Las parejas que incluían a este no rizobio mostraban mejores resultados al ser comparadas con las demás.

5. Conclusiones.

1. La diversidad de rizobios encontrada fue escasa, siendo las especies aisladas de géneros ampliamente descritos como bacterias rizosféricas.
2. Dentro del nódulo existen bacterias con propiedades PGP que pueden ser interesantes como biofertilizantes o como inoculantes.

3. La actividad enzimática celulasa parece jugar un papel importante en la nodulación.
4. La inoculación con un consorcio de PGPB es mejor que la inoculación de manera individual. En todos los casos, la inoculación con bacterias mostró resultados positivos para las plantas.
5. Los nódulos de las leguminosas que crecen en suelos contaminados podrían ser fuente de especies nuevas de bacterias, teniendo en cuenta el bajo porcentaje de identidad obtenido en la identificación de las bacterias inoculadas.

6. Bibliografía.

1. Afzal I, Shinwari ZK, Sikandar S, Shahzad S. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological research*. 2019; 221(1): p. 36–49.
2. Alam MS, Cui ZJ, Yamagishi T, Ishii R. Grain yield and related physiological characteristics of rice plants *Oryza sativa* L. inoculated with free-living rhizobacteria. *Plant Production Science*. 2001; 4(2): p. 125-130.
3. Barton NH, Briggs D, Eisen J, Goldstein D, Patel N. *Evolution*. Barton NH, editor. New York: Cold Spring Laboratory Press; 2007.
4. Bauer WD. Infection of legumes by rhizobia. *Annual Review of Plant Physiology*. 2003; 32(1): p. 407-449.
5. Brevik EC. *Soils and human health: An overview*. Brevik EC, Burgess CB, editors. Florida: CRC Press; 2013.
6. Broughton W. Roses by other names: Taxonomy of the *Rhizobiaceae*. *Journal of Bacteriology*. 2003; 185(10): p. 2975-2979.
7. Callaham DA, Torrey JG. The structural basis of infection of hair root hairs *Trifolium repens* by *Rhizobium*. *Canadian Journal of Botany*. 2011; 59(9): p. 1647-1664.
8. Carrasco JA, Armario P, Pajuelo E, Burgos A, Caviedes MA, López R, et al. Isolation and characterization of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcóllar pyrite mine. *Soil Biology and Biochemistry*. 2009; 37(6): p. 1131-1140.
9. CCICED. *Special Policy Study on Soil Pollution Management*. China: Council for International Cooperation on Environment and Development; 2015.

10. Chaudhry Q, Blom-Zandstra M, Gupta SK, Joner E. Utilising the Synergy between Plants and Rhizosphere Microorganisms to Enhance Breakdown of Organic Pollutants in the Environment (15 pp). Environmental Science and Pollution Research - International. 2005; 12(1): p. 34-48.
11. Chun J, Lee JH, Jung Y, Kim M, Kim S, Kim BK. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequence. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007; 57(1): p. 2259–2261.
12. Chun J, Oren A, Ventosa A, Christesen H, Ruiz-Arahal D, da Costa MS, et al. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. Int J Syst Evol Microbiol. 2018; 68(1): p. 461-466.
13. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Portugal: Conselho Nacional do Meio Ambiente; 2009. Report No.: 249.
14. Das N, Geetanjali-Basak LV, Salam JA, Abigail EA. Application of biofilms on remediation of pollutants – an overview. Journal of Microbiology and Biotechnology Research. 2012; 2(1): p. 783–790.
15. del Castillo I, Hernández P, Lafuente A, Rodríguez-Llorente ID, Caviedes MA, Pajuelo E. Self-bioremediation of cork-processing wastewaters by (chloro)phenol-degrading bacteria immobilized onto residual cork particles. Water Research. 2012; 46(6): p. 1723-1734.
16. Dudley ME, Jacobs TW, Long SR. Microscopic studies of cell division induced in alfalfa roots by *Rhizobium meliloti*. Planta. 1987; 171(1): p. 289-301.
17. Elbeltagy A, Nishioka K, Suzuki H, Sato T, Sato YI, Morisaki H, et al. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. Soil Science and Plant Nutrition. 2000; 43(3): p. 617-629.
18. FAO, ITPS. Status of the World's Soil Resources (SWSR) - Main Report. Roma: FAO and Intergovernmental Technical Panel on Soils; 2015.
19. FAO. World fertilizer trends and outlook to 2018. Roma: FAO; 2015.
20. Franche E, Lindstron K, Elmerich C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. Plant and Soil. 2009; 321(1): p. 35-59.
21. Frumin GT, Gildeeva IM. Eutrophication of water bodies - A global environmental problem. Russian Journal of General Chemistry. 2014; 84(13): p. 2483–2488.

22. Glick BR. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*. 2014; 169(1): p. 30–39.
23. Gordon SA, Weber RP. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology*. 1951; 26(1): p. 192–195.
24. Graham PH, Vance CP. Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiol*. 2003; 131(1): p. 872-877.
25. Guefrachi I, Rejili M, Mahdhi M, Marte M. Assessing genotypic diversity and symbiotic efficiency of five rhizobial legume interactions under cadmium stress for soil phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation*. 2013; 15(10): p. 938-951.
26. Hameeda B, Harini G, Rupela OP, Wani SP, Reddy G. Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiological Research*. 2008; 163(2): p. 234–42.
27. Harley JP, Prescott LM. *Laboratory Exercises in Microbiology*. 5th ed. Nueva York: McGraw-Hill; 2002.
28. Hosford M. Human health toxicological assessment of contaminants in soil: using science to create a better place. Bristol: Environment Agency, Science; 2008. Report No.: SC050021/SR2.
29. Hossain MF, White SK, Elahi SF, Sultana N, Choudhury MHK, Alam QK, et al. The efficiency of nitrogen fertiliser for rice in Bangladeshi farmers' fields. *Field Crops Research*. 2005; 93(1): p. 94–107.
30. Kemp DD. *The environment dictionary*. 1st ed. Nueva York: Routledge; 1998.
31. Kijne JW. The *Rhizobium* infection process. In Stacey G, Burris R, Evans H, editors. *Biological nitrogen fixation*. New York: Chapman and Hall; 1992. p. 349-398.
32. Kim JY, Park SC, Hwang I, Cheong H, Nah JW, Hahm KS, et al. Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2009; 10(6): p. 2860–2872.
33. Kuiper I, Lagendijk IL, Bloemberg GV, Lugtenberg BJ. Rhizoremediation: A beneficial plant-microbe interaction. *The American Phytopathological Society*. 2004; 17(1): p. 6-15.
34. Ljung K. Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development*. 2013; 140(5): p. 943-950.
35. McBride MB. *Environmental chemistry of soils*. 1st ed. Nueva York: Oxford University Press; 1994.

36. McLaughlin MJ, Parker DR, Clarke JM. Metals and micronutrients – food safety issues. *Field Crops Research*. 1999; 60(1): p. 143–163.
37. Mehdi Z, Hooriyeh M, Darioush G, Mahdi PB. Identification of *Pseudomonas jessenii* and *Pseudomonas gessardii* as the most proteolytic *Pseudomonas* isolates in Iranian raw milk and their impact on stability of sterilized milk during storage. *Journal of Dairy Research*. 2020; 87(3): p. 1-7.
38. Mesa J, Mateos-Naranjo E, Caviedes MA, Redondo-Gómez S, Pajuelo E, Rodríguez-Llorente ID. Endophytic cultivable bacteria of the metal bioaccumulator *Spartina maritima* improve plant growth but not metal uptake in polluted marshes soils. *Frontiers in Microbiology*. 2015; 6(1450).
39. MINAM. Criterios para la Gestión de Sitios Contaminados. Perú: Ministerio de Ambiente, Sistema Nacional de Información Ambiental; 2017. Report No.: 12.
40. Mithofer A, Schulze B, Boland W. Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Letters*. 2004; 566(1-3): p. 1-5.
41. MMA. Guía Metodológica para la Gestión de Suelos con Potencial Presencia del Contaminantes. Chile: Ministerio del Medio Ambiente; 2013. Report No.: 406.
42. Navarro-Torre S, Mateos-Naranjo E, Caviedes MA, Pajuelo E, Rodríguez-Llorente ID. Isolation of plant-growth promoting and metal resistant cultivable bacteria from *Arthrocnemum macrostachyum* in the Odiel marshes with potential use in phytoremediation. *Marine Pollution Bulletin*. 2016; 110(1): p. 133-142.
43. Noguez-Inesta A, López-Sánchez AS, Carrillo-González R, González-Chávez MCA. Uso de leguminosas (*Fabaceae*) en fitorremediación. *Agroproductividad*. 2017; 10(4): p. 57-62.
44. Oldeman LR. World map on status of human-induced soil degradation. Países Bajos: ISRIC, UNEP; 1991.
45. Pajuelo E, Carrasco JA, Romero LC, Chamber MA, Gotor C. Evaluation of the metal phytoextraction potential of crop legumes. Regulation of the expression of O-acetylserine (thiol)lyase under metal stress. *Plant Biology*. 2007; 9(1): p. 672-681.
46. Park KH, Lee O, Jung HI, Jeong JH, Jeon YD, Hwang D, et al. Rapid solubilization of insoluble phosphate by a novel environmental stress-tolerant *Burkholderia vietnamiensis* M6 isolated from ginseng rhizospheric soil. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010; 86(3): p. 947-955.
47. Parlamento Europeo y del Consejo. Reglamento (CE) p3. Bruselas: Parlamento Europeo y del Consejo; 2003.

48. Pikovskaya RI. Mobilization of phosphorous in soil connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiology*. 1948; 17(1): p. 362-370.
49. Remans R, Beebe S, Blair M, Manrique G, Tovar E, Rao IM, et al. Physiological and genetic analysis of root responsiveness to auxin-producing plant growth growth-promoting bacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant and Soil*. 2008; 302(1): p. 149–161.
50. Robledo M, Jiménez-Zurdo JI, Velázquez E, Trujillo ME, Zurdo-Piñeiro JL, Ramírez-Bahena MH, et al. *Rhizobium* cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105(19): p. 7064-7069.
51. Rodríguez-Eugenio N, McLaughlin M, Pennock D. La contaminación del suelo: una realidad oculta. Roma: FAO; 2019.
52. Rodríguez-Llorente, I.D. Análisis de la expresión del gen de la poligalacturonasa de alfalfa MsPG3 en leguminosas transgénicas. [Tesis doctoral]. Sevilla: Universidad de Sevilla; 2001.
53. Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*. 1987; 160(1): p. 47–56.
54. Scullion J. Remediating polluted soils. *Naturwissenschaften*. 2006; 93(2): p. 51–65.
55. Soriano-Lasheras, M. Análisis de sistemas pectinolíticos bacterianos. Aislamiento y caracterización de las pectinasas PelA de *Paenibacillus* sp. BP-23 e YvpA de *Bacillus subtilis*. [Tesis doctoral]. Barcelona: Universitat de Barcelona; 2004.
56. Srivastava S, Tripathi RD, Dwivedi UN. Synthesis of phytochelatins and modulation of antioxidants in response to cadmium stress in *Cuscuta reflexa*—an angiospermic parasite. *Journal of Plant Physiology*. 2004; 161(6): p. 665–674.
57. Steenhoudt O, Vanderleyden J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*. 2000; 24(4): p. 487-506.
58. Stewart WM, Dibb DW, Johnston AE, Smyth TJ. The Contribution of Commercial Fertilizer Nutrients to Food Production. *Agronomy Journal*. 2005; 97(1): p. 1-6.
59. Tak N, Bissa G, Gehlot HS. Methods for Isolation and Characterization of Nitrogen-Fixing Legume-Nodulating Bacteria. In Gupta KJ, editor. *Nitrogen Metabolism in Plants*. 1st ed. Nueva York: Springer; 2020. p. 134–141.
60. Tchounwou P, Yedjou C, AK P, Sutton D. Heavy metal toxicity and the environment. *Experientia supplementum*. 2012; 101(1): p. 133-164.

61. Tilman D, Cassman KG, Matson PA, Naylor R, Polasky S. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*. 2002; 418(1): p. 671–677.
62. Turgeon BG, Bauer WD. Ultrastructure of infection-thread development during the infection of soybean by *Rhizobium japonicum*. *Planta*. 1985; 163(1): p. 328-349.
63. Wang D, Yang S, Tang F, Zhu H. Symbiosis specificity in the legume-rhizobial mutualism. *Cellular Microbiology*. 2012; 14(3): p. 334-342.
64. Yaron B, Dror I, Berkowitz B. *Soil-Subsurface Chang*. 1st ed. Heidelberg: Springer; 2012.
65. Zhao Y. Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual Review of Plant Biology*. 2010; 61(1): p. 49–64.
66. Zhengyi L, Siping C, Shuting Y, Mingyue C, Li L, Yuanyuan L, et al. Differentiation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase from its homologs is the key for identifying bacteria containing ACC deaminase. *FEMS Microbiology Ecology*. 2015; 91(10).
67. Zhu JH, Li XL, Christie P, Li JL.. Environmental implications of low nitrogen use efficiency in excessively fertilized hot pepper (*Capsicum frutescens* L.) cropping systems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 2005; 111(1-4): p. 70–80.
68. Zouboulis AI, Moussas PA, Nriagu E. Groundwater and Soil Pollution: Bioremediation. In Nriagu JO, editor. *Encyclopedia of Environmental Health*. Amsterdam: Elsevier; 2011. p. 1037–1044.