

## Análisis funcional comparativo de fitobacterias productoras de ácido indolacético aisladas de plantas *Lemna gibba* de la zona chinampera de Xochimilco, México

### Isolated phyto-bacteria producing indole acetic acid from *Lemna gibba* plants and their ecological role in a water channel of chinampera zone of Lake Xochimilco, Mexico

Orlando Ortega-Acosta<sup>1</sup>, Eugenia López-López<sup>2</sup>, Aída Verónica Rodríguez-Tovar<sup>3</sup>, Leonor Angélica Guerrero-Zúñiga<sup>4</sup> y Angélica María Rodríguez-Dorantes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Fisiología Vegetal, Departamento de Botánica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Prol. de Carpio y Plan de Ayala, Col. Sto. Tomás, CDMX, 11340. México

<sup>2</sup>Laboratorio de Evaluación de la Salud de los Ecosistemas Acuáticos, Departamento de Zoología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. CDMX, 11340. México

<sup>3</sup>Laboratorio de Micología, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional (IPN). CDMX, 11340. México

<sup>4</sup>Instituto Mexicano del Petróleo. Eje Central Lázaro Cárdenas Norte 152, San Bartolo Atepehuacan, CDMX, 07730. México  
e-mail: rodorantes@yahoo.com.mx

**Recibido:** 21 de abril de 2016.

**Aceptado:** 22 de marzo de 2017.

Ortega-Acosta O., E. López-López, A. V. Rodríguez-Tovar, L. A. Guerrero-Zúñiga y A. M. Rodríguez-Dorantes. 2017. Análisis funcional comparativo de fitobacterias productoras de ácido indolacético aisladas de plantas *Lemna gibba* de la zona chinampera de Xochimilco, México. *Hidrobiológica* 27 (2): 153-161. DOI: 10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2017v27n2/Rodríguez

## RESUMEN

**Antecedentes.** Los endófitos bacterianos que habitan dentro de las plantas sin causar daño y promueven su crecimiento y desarrollo se han considerado herramientas útiles para la restauración de los ecosistemas. **Objetivos.** En el presente estudio se caracterizaron fitobacterias endófitas aisladas de plantas de *Lemna gibba*, colectadas en la zona chinampera de los canales de Xochimilco en dos temporadas, con base en la comparación de su producción de ácido indolacético. **Métodos.** Se evaluaron 12 fitobacterias en total; ocho aisladas de las plantas *L. gibba* colectadas en la temporada de sequía pertenecientes a los géneros *Achromobacter*, *Bacillus*, *Deinococcus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas* y *Rahnella*. Las variedades restantes (pertenecientes al género *Serratia*) se obtuvieron de plantas colectadas en la temporada de lluvias. **Resultados.** De acuerdo con la producción de ácido indolacético, de las fitobacterias colectadas en la temporada de sequía, cuatro se clasificaron como bajas productoras y cuatro como altas productoras. Por otra parte, todos los organismos que se recolectaron en la temporada de lluvias se clasificaron como altos productores. **Conclusiones.** La presencia de fitobacterias endófitas altas productoras de ácido indolacético en *Lemna gibba* sugiere que son promotoras potenciales del desarrollo de dichas plantas y también que actúan como bioinoculantes potenciales.

**Palabras clave:** Ácido indolacético, fitobacterias, *Lemna gibba*.

## ABSTRACT

**Background.** Bacteria endophytes, harmless symbiotic organisms that promote plant growth and development, have been considered useful tools for ecosystem restoration. **Goals.** The present study characterized bacteria endophytes isolated from *Lemna gibba* plants (collected in the "chinampera area" of Xochimilco canals over two seasons) according to the amount of indole acetic acid production. **Methods.** Twelve phyto-bacteria species were found; eight in plants collected through the drought season belonging to the genera *Achromobacter*, *Bacillus*, *Deinococcus*, *Enterococcus*, and four in plants collected during the rainy season of the genus *Serratia*. **Results.** According to their indole acetic acid production, four of the phyto-bacteria isolated from plants collected in the dry season were characterized as low producers and four as high producers. All the organisms obtained from plants gathered during the rainy season were classified as high producers. **Conclusions.** The presence of endophytic bacteria producing large amounts of indole acetic acid in *Lemna gibba* plants suggests that these organisms could promote plant development and act as potential bioinoculants.

**Key words:** Indole Acetic Acid, phyto-bacteria, *Lemna gibba*.

## INTRODUCCIÓN

El sistema lacustre de Xochimilco localizado en la Ciudad de México es una región de gran tradición en México, no obstante, la mayoría de los canales de este sistema presentan una reducción drástica en sus niveles de agua debido a que se recargan con aguas tratadas (Mazari-Hiriart *et al.*, 2000) o a que se usa el agua para el riego agrícola (An, 2004). Dada la abundancia de diferentes plantas acuáticas flotantes que se distribuyen en los canales, se han considerado como herramienta para tratar aguas contaminadas, ya que muestran una alta tasa de propagación y absorción de contaminantes, por lo que son una alternativa viable para la salud de los canales (Abbis & Mandi, 1999). Entre estas plantas destacan las pertenecientes a la familia *Lemnaceae*, las cuales crecen sobre superficies de aguas tranquilas (Landolt, 1987). En ésta familia se ubica *Lemna gibba* Linnaeus, que ha resultado un excelente modelo experimental debido a que su manejo es fácil, se encuentra ampliamente distribuida en México, es de alta productividad, tolerante a condiciones naturales adversas y tiene un ciclo de vida corto. Por ello, es una especie que se utiliza frecuentemente para pruebas de toxicidad en el monitoreo de ecosistemas acuáticos y se ha considerado como un bioindicador (Wang, 1990). En la actualidad, los estudios se han enfocado en los microorganismos endófitos de plantas asociadas a la restauración de ecosistemas, que habitan en espacios intracelulares, intercelulares o en el tejido vascular de las plantas, sin causarles daño, promoviendo su crecimiento y desarrollo (Hallmann, 1997; Reiter & Sessitsch, 2006; Dibut *et al.*, 2009; Dimkpa *et al.*, 2009). El análisis de la diversidad funcional de las fitobacterias con relación a sus atributos promotores del crecimiento vegetal, ha permitido caracterizar a estos microorganismos gracias al papel que desempeñan no solamente en la interacción con las plantas, sino también por su relación con el ecosistema. Uno de sus atributos más estudiados por su importancia es el que se refiere de manera directa a la promoción del crecimiento vegetal, mediado por la producción de fitohormonas, en particular la principal auxina el ácido indolacético (AIA), que controla una variedad de procesos importantes que incluyen el alargamiento, la división celular y la diferenciación tisular. Existen pocos estudios sobre el conjunto de interacciones entre las bacterias endófitas y las plantas acuáticas (Overbeek & Elsas, 2008), en particular destacan, los relacionados con la rizósfera de estas últimas y están orientados a su uso potencial para la remediación a través de la interacción planta acuática-microorganismos (Stout & Nusslein 2005, 2010; Yamaga *et al.*, 2010).

El objetivo de este estudio fue aislar y describir a las fitobacterias endófitas productoras de ácido indolacético aisladas de plantas de *L. gibba*, colectadas en la zona chinampera de los canales de Xochimilco y determinar su potencial como productoras de esta fitohormona.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Ubicación del sitio de estudio.** El área de estudio se localiza dentro del sistema lacustre de Xochimilco, entre las coordenadas 19° 15' 11" y 19° 19' 15" N y 99° 00' 58" y 99° 07' 08" O, con una altitud promedio de 2,240 msnm y una superficie de 2,657 ha. Los canales seleccionados para el estudio se ubican dentro de la zona agrícola o chinampera caracterizada particularmente por el desarrollo agrícola, el cultivo de hortalizas, plantas de ornato y flores.

**Aislamiento de fitobacterias endófitas de *Lemna gibba*.** La colecta de plantas de *L. gibba* se realizó en dos épocas: temporada de sequía, en el mes de mayo, y de lluvias, en el mes de agosto, en el año 2013. Se marcaron tres puntos a lo largo del canal seleccionado en la zona agrícola, donde se tomaron muestras superficiales de agua en recipientes de plástico de 500 mL preparados conforme al método estándar APHA (2005), que se transportaron al laboratorio en obscuridad y refrigeración a 4 °C, para la determinación de los parámetros químicos siguientes: contenido de nitrógeno total (NT mg/L), nitritos (NO<sub>2</sub> mg/L), nitratos (NO<sub>3</sub> mg/L), nitrógeno amoniacal (NH<sub>3</sub> mg/L), ortofosfatos (PO<sub>4</sub> mg/L) y fósforo total (PT mg/L). Estos análisis se hicieron por duplicado, empleando las técnicas respectivas del equipo HACH DRL/2500.

También se colectaron en cada sitio tres muestras de 100 g de biomasa de plantas de *L. gibba*, con ayuda de una red de 60 cm de largo x 25 micras de diámetro de malla, que se colocaron en bolsas herméticas y trasladaron en frío al laboratorio para el aislamiento de sus fitobacterias endófitas. Se tomaron 10 g de la biomasa total de plantas, la cual se desinfectó con hipoclorito de sodio al 10% durante varios segundos y con varios enjuagues consecutivos con agua destilada estéril; después se sometió a un molido en mortero aséptico al que se le agregaron 10 mL de agua destilada estéril, para conseguir una suspensión del material biológico, la cual se vertió en botellas con 90 mL de agua destilada estéril. Las suspensiones resultantes se evaluaron de acuerdo con el método de dilución en placa, considerando diluciones de 10<sup>-1</sup> y 10<sup>-2</sup> en medio de agar nutritivo (AN); se inocularon 0.2 mL de cada dilución por extensión en placa por triplicado. Las placas se incubaron por 24 horas a 28 °C. Se seleccionaron aquellas colonias con morfología colonial diferente de las que se resemebraron por estría cruzada en placas con medio AN para su aislamiento, conservación y posterior caracterización microscópica. Su identificación se realizó a través de la determinación de sus secuencias del gen 16S rDNA, empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR: Polimerase Chain Reaction), para ello se efectuaron resiembras de las fitobacterias aisladas de forma masiva en medio AN, se incubaron de 24 a 48 horas a 28 °C hasta obtener el crecimiento adecuado de biomasa microbiana, se recuperó la biomasa con ayuda de una asa microbiológica, se depositó en un mortero estéril al que se le adicionó N<sub>2</sub> líquido, se maceró hasta lograr un polvo fino y se extrajo su DNA con el método de Allers & Lichen (2000), se agregaron 1 o 2 mL de CTAB (CTAB al 2%, EDTA, Trizma base 200 mM pH 8.0, NaCl 2M y polivinilpirrolidona 0.5%) y se mezcló hasta conseguir una suspensión homogénea. Se separó la suspensión en tubos Eppendorf de 1.5 mL (0.5 mL en cada uno) y se incubaron a 65 °C por una hora, después 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se les adicionó 500 µL de la mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1); se agitaron en vórtex hasta formar una emulsión y centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Se transfirió la fase acuosa a tubos Eppendorf nuevos y se les añadió 500 µL de isopropanol concentrado para favorecer la precipitación del DNA; se mezclaron por inversión y se incubaron a -20 °C toda la noche para recuperar el DNA por centrifugación a 13,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.

Finalmente, se lavó la pastilla de DNA con 1000 µL de etanol al 70% dos veces, se centrifugó en frío, se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla. El DNA obtenido se resuspendió en 50 µL de agua desionizada estéril y se incubó a -20 °C para realizar la amplificación del gen 16S rDNA por PCR. Del DNA genómico purificado, se amplificó

el gen ribosomal 16S rDNA, utilizando los cebadores universales fD1 y rD1 diseñados por Weisburg *et al.* (1991). La mezcla de PCR contuvo 1.23  $\mu$ L del iniciador Fw (fD1), 1.05  $\mu$ L del iniciador (rD1), 1.5  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 0.5  $\mu$ L de dNTP's 200  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ L de 5 unidades de Taq DNA polimerasa, 2.5  $\mu$ L de regulador 1X, 16.72  $\mu$ L de agua estéril y finalmente 1  $\mu$ L de DNA diluido 1:10. La PCR se llevó a cabo según el método de Allers & Lichten (2000) utilizando un termociclador. La temperatura inicial fue de 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C durante 1 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 3 min y por último a 72°C durante 10 min. La purificación de los amplificadores del gen ribosomal 16S rDNA se hizo con el empleo del Kit Comercial de la marca Zymo Research, agregando en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, 50  $\mu$ L del producto de PCR y 100  $\mu$ L del DNA Binding Buffer; la mezcla se agitó suavemente en vórtex y se transfirió a la columna de purificación colocada previamente en el tubo colector, se centrifugó a 13,000 rpm por un minuto; se decantó el sobrenadante y al precipitado se le adicionaron 200  $\mu$ L de Wash Buffer. Se centrifugó a 10,000 rpm por un minuto y el paso anterior se ejecutó 2 veces más para finalmente adicionar 10  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O desionizada directamente a la matriz de la columna.

El eluido se colocó en un tubo Eppendorf nuevo para coleccionar las muestras finales y por último se centrifugaron durante un minuto a 10,000 rpm. Los productos de la PCR se verificaron por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1% (w/v) teñido con bromuro de etidio. Los productos de la amplificación del gen 16S rDNA de las fitobacterias aisladas se purificaron y secuenciaron en la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la FES-Iztacala (UNAM) y las secuencias se compararon para elaborar su homología molecular con secuencias de la base de datos genómicos utilizando el análisis BLAST (Basic Logical Alignment Search Tool, BLAST at NCBI).

**Evaluación de producción de fitohormonas.** Para la evaluación de la producción de fitohormonas por las fitobacterias endófitas aisladas de las plantas de *L. gibba*, se empleó la técnica de la producción *in vitro* de ácido indolacético (AIA), a través de la detección fotocolorimétrica de éste con la adición del reactivo de Salkowski, como sigue: se emplearon tubos de ensayo con tapón de algodón de 20 mL de capacidad con 4.9 mL de caldo nutritivo con la adición de L-triptófano en las concentraciones de 1, 2 y 5 mg/L y se utilizó como testigo una serie de tubos con caldo nutritivo sin L-triptófano. Todos los tubos se inocularon con 0.2 mL de un inóculo de cada fitobacteria aislada con concentración de  $5 \times 10^7$  células/mL, determinado por turbidez con el empleo de un fotocolorímetro Klett Summerson con filtro azul 42. Los tubos se incubaron por 4 días a 28 °C y después se cuantificó el contenido de auxinas

como equivalentes de AIA por análisis espectral, mezclando 1 mL del medio de los cultivos fitobacterianos con 1 mL de reactivo de Salkowski (2% (w/v) de FeCl<sub>3</sub> 0.5M disuelto en ácido perclórico al 35%). Se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos para el desarrollo de una coloración rosada, la cual indica la producción de AIA, se cuantificó leyendo su absorbancia a 535 nm e interpolando en una curva tipo de AIA. La caracterización de las bacterias productoras de AIA *in vitro* se estableció, según lo descrito por Khalid *et al.* (2004), en tres grupos principales: las bajas productoras (de 1 a 10  $\mu$ g/mL), las medianas productoras (de 11 a 20  $\mu$ g/mL) y las altas productoras (de 21 a 30  $\mu$ g/mL de AIA).

**Análisis de datos.** Para los datos químicos del agua y la comparación de la producción de AIA se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y pruebas de Tukey usando el paquete estadístico Sigma Plot 11.0. El estudio de los datos, de acuerdo con la categorización de la producción de AIA de las fitobacterias endófitas, se llevó a cabo por medio de un análisis numérico comparativo con el programa NTS y S-PC versión 2.11T (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) para la aplicación de un índice de distancia. Una vez obtenidos los valores de distancia del coeficiente aplicado, se construyó el fenograma respectivo utilizando el método de agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair Group Method of Arithmetic Averages) y se estableció la veracidad y confianza del fenograma construido a través del coeficiente de correlación producto-momento de Pearson. Finalmente, para evaluar la asociación entre las variables químicas y biológicas resultantes, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) que incluyó ambas temporadas con base en la correlación de Pearson (Kebede & Kebede, 2012), para lo cual se empleó el paquete estadístico XLSTAT-Pro 2009.

## RESULTADOS

Los valores promedio de cada uno de los seis parámetros químicos analizados, que reflejaron las características del agua en el canal ubicado en la zona chinampera en las temporadas de sequía y lluvias, se presentan en la Tabla 1. Los valores del contenido de nitrógeno total medido y la concentración de nitratos fueron mayores en las muestras de agua del mes de agosto (temporada de lluvias), mientras que los contenidos de nitritos y nitrógeno amoniacal no mostraron diferencias significativas en ambas temporadas ( $p < 0.05$ ). La concentración de fósforo total fue contrastante con los resultados de la del nitrógeno durante las temporadas de estudio, donde los valores totales de este elemento, así como la concentración de ortofosfatos medidos en las muestras de agua, resultaron mayores en la temporada de sequía.

Tabla 1. Contenido de nitrógeno y fósforo en las muestras de agua colectadas del canal seleccionado de la zona chinampera en el lago de Xochimilco, México. No se presentaron diferencias estadísticas significativas ( $n=3$ ,  $p < 0.05$ ).

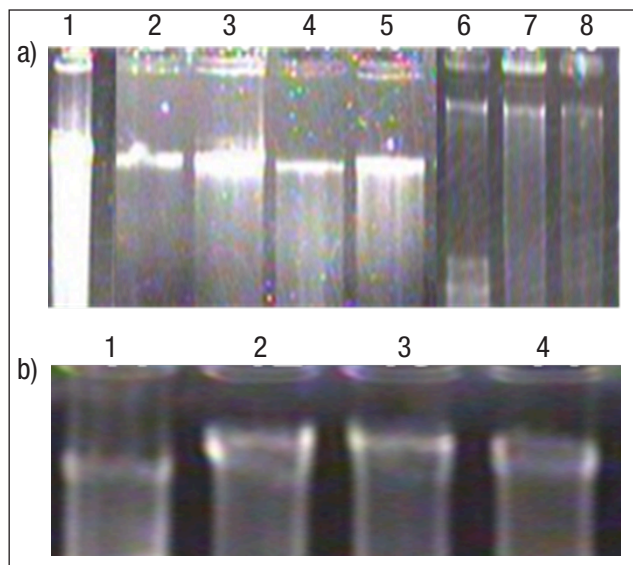
Parámetros	Temporada	
	Secas (mayo de 2013)	Lluvias (agosto de 2013)
Nitrógeno Total (mg/L)	1.350±0.495	2.093±2.393
Nitratos (mg/L)	0.150±0.070	0.590±0.877
Nitritos (mg/L)	0.073±0.002	0.045±0.354
Nitrógeno Amoniacal (mg/L)	0.980±0.001	0.925±0.077
Ortofosfatos (mg/L)	5.430±0.155	2.730±2.690
Fósforo total (mg/L)	6.975±0.063	3.603±3.485

Se aislaron un total de 12 fitobacterias endófitas de las plantas de *L. gibba* (Tabla 2); 8 de ellas se aislaron de las plantas colectadas en la temporada de sequía y 4 de ellas de las plantas colectadas en la temporada de lluvias.

El electroferograma del DNA genómico muestra que se obtuvieron altas concentraciones de DNA (3,500 ng/μL) de las fitobacterias aisladas de las plantas colectadas en la temporada de secas, contrariamente a lo encontrado de las fitobacterias aisladas de las plantas colectadas en la temporada de lluvias, donde las concentraciones de DNA fueron más bajas (Figs.1a-1b).

La amplificación del gen 16S rDNA generó una banda única de aproximadamente 1.5 Kb, lo que muestra que los iniciadores fueron específicos para la región del gen 16S rDNA (Figs. 2a-2b). De los aislados de las plantas de *L. gibba* colectadas en ambas temporadas, las bandas se extrajeron de los geles y se procedió a elaborar su secuenciación y posterior análisis bioinformático. Para la selección de los posibles géneros o especies se revisó literatura para cotejar la morfología colonial y microscópica de los aislados. Las secuencias elegidas fueron aquellas que tuvieron un mayor porcentaje de similitud, comparadas con las secuencias del Gen Bank, para así tener una mejor exactitud posible para la identificación de las fitobacterias aisladas: *Achromobacter* spp. CH-MA-1, *Deinococcus* spp. CH-MA-2, *Enterococcus faecium* CH-MA-3, *Achromobacter* spp. CH-MA-4, *Pseudomonas* spp. CH-MA-5, *Bacillus pumilus* CH-MA-6, *Rahnella aquatilis* CH-MA-7, *Enterobacter* spp. CH-MA-8, de las plantas colectadas en la temporada de sequía y *Serratia* spp. CH-AG-1, *Serratia* spp. CH-AG-2, *Serratia* spp. CH-AG-3 y *Serratia* spp. CH-AG-4, de las plantas colectadas en la temporada de lluvia.

La producción de AIA *in vitro*, obtenida de las fitobacterias endófitas aisladas, permitió caracterizarlas según la clasificación de Khalid *et al.* (2004), como altas productoras de AIA (25 a 76μg/mL)



Figuras 1a-b. Electroferogramas del DNA genómico obtenido de los diferentes aislamientos provenientes de plantas de *Lemna gibba*: a) Aislamientos de plantas recolectadas en la temporada de secas: 1 = CH-MA-1; 2 = CH-MA-2; 3 = CH-MA-3; 4 = CH-MA-4; 5 = CH-MA-5; 6 = CH-MA-6; 7 = CH-MA-7; 8 = CH-MA-8. b) Aislamientos de plantas recolectadas en la temporada de lluvias: 1 = CH-AG-1; 2 = CH-AG-2; 3 = CH-AG-3; 4 = CH-AG-4.

a las fitobacterias: *Achromobacter* spp. CH-MA-4, *Pseudomonas* spp. CH-MA-5, *Rahnella aquatilis* CH-MA-7 y *Enterobacter* spp. CH-MA-8; y como bajas productoras de AIA (0.6 a 8μg/mL) a las fitobacterias: *Achromobacter* spp. CH-MA-1, *Deinococcus* spp. CH-MA-2, *Enterococcus faecium* Orla-Jensen 1919 Schleifer & Kilpper-Bälz 1984 CH-MA-3 y *Bacillus pumilus* CH-MA-6, provenientes de las plantas colectadas en la temporada de sequía. Todas las fitobacterias endófitas aisladas en la temporada de lluvias fueron clasificadas como altas productoras de AIA (24 a 51 μg/mL) (Tabla 2).

En cuanto a la comparación en la producción de AIA, considerando las distintas concentraciones de triptófano y el testigo para cada una de las fitobacterias aisladas resultó que de las 4 fitobacterias que se clasificaron como altas productoras de AIA, sólo la fitobacteria *Enterobacter* spp. CH-MA-8 presentó mayor producción sin la adición de triptófano; la concentración de 1 mg/L de triptófano potenció la producción de AIA en la fitobacteria *Achromobacter* spp. CH-MA-4; la concentración de 2 mg/L de triptófano incrementó la producción de AIA en la fitobacteria *Pseudomonas* spp. CH-MA-5 y solamente la fitobacteria aislada *Rahnella aquatilis* CH-MA-7 mostró una alta producción de AIA con la adición de 5 mg/L de triptófano. Para la temporada de lluvias, no se encontraron diferencias significativas de producción de AIA bajo las distintas concentraciones de triptófano para cada aislado.

La Fig.3 expone la agrupación de las fitobacterias endófitas a través de un fenograma que muestra tres grupos bien definidos de manera inicial; el grupo I incluye a *Enterobacter* spp. CH-MA-8, aislada de las plantas colectadas en la temporada de sequía, que fue clasificada como la más alta productora de AIA con 76.84 μg/mL. El grupo II, subdividido por un grupo IIa representado por *Achromobacter* spp. CH-MA-1, *Deinococcus* spp. CH-MA-2, *Enterococcus faecium* CH-MA-3 y *Bacillus pumilus* CH-MA-6, incluye las fitobacterias aisladas de las plantas de la temporada de sequía y fueron clasificadas como las productoras de AIA más bajas. Finalmente, el grupo III, que está subdividido en dos grupos: el grupo IIIa, que agrupó a las medianas productoras de AIA cuya producción fue entre 24.45 y 35.46 μg/mL, estuvo conformado por *Achromobacter* spp. CH-MA-4 y *Rahnella aquatilis* CH-MA-7 aisladas de las plantas colectadas en la temporada de sequía y *Serratia* spp. CH-AG-2 de plantas colectadas en la temporada de lluvia. El grupo IIIb, constituido por las fitobacterias clasificadas como las más altas productoras de AIA, incluyó a *Pseudomonas* spp. CH-MA-5 y *Enterobacter* spp. CH-MA-8 de las plantas colectadas en la temporada de sequía y las cepas *Serratia* spp. CH-AG-1, *Serratia* spp. CH-AG-3 y *Serratia* spp. CH-AG-4 aisladas de plantas colectadas en la temporada de lluvia; en éste grupo se determinaron concentraciones entre 43.43 a 76.84 μg/mL.

## DISCUSIÓN

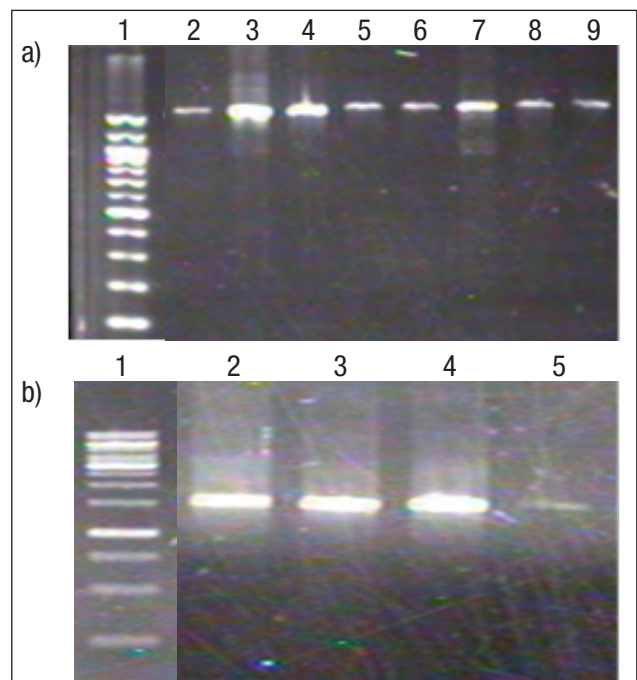
El interés por emplear estas especies de *Lemna* para la fitoremediación acuática ha aumentado, pero en particular, se han realizado estudios sobre las comunidades microbianas asociadas con estas plantas, que abordan la absorción o inmovilización de metales pesados (Stout & Nüsslen 2005; Vogel *et al.*, 2006; Stout & Nüsslen, 2010), ejemplo de ello es la caracterización de la microflora arsénico resistente asociada a la superficie de plantas de *Lemna gibba* y *Lemna minor* L. Griff. 1851, en las cuales Mkandawire *et al.* (2004) determinaron seis grupos fisiológicos: oligótrofos, fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fósforo, bacterias amonificantes, nitrificantes y desnitrificantes; encontraron

Tabla 2. Fitobacterias endófitas aisladas de plantas de *Lemna gibba* y su producción de (ácido indolacético) AIA. Las diferentes letras muestran las diferencias estadísticas significativas entre ambas temporadas (n = 3, p < 0.001).

	Fitobacterias endófitas	% Homología molecular	Testigo	Producción de AIA (µg/mL)			Clasificación
				Trp (1mg/L)	Trp (2mg/L)	Trp (5mg/L)	
Aislamientos de plantas en época de secas	<i>Achromobacter</i> spp. CH-MA-1	95	8.16 ± 0.9 <sup>a,b,c</sup>	8.55±1.3 <sup>a,b,c</sup>	8.44± 0.9 <sup>a,b,c</sup>	7.7±1.5 <sup>a,b,c</sup>	Baja
	<i>Deinococcus</i> spp. CH-MA-2	92	0.64 ± 0.7 <sup>b,c</sup>	1.6 ± 0.7 <sup>b,c</sup>	1.14 ± 0.7 <sup>b,c</sup>	2.62±2.1 <sup>b,c</sup>	Baja
	<i>Enterococcus faecium</i> CH-MA-3	95	4.66 ± 0.5 <sup>b,c</sup>	5.02± 1.1 <sup>b,c</sup>	4.35± 0.2 <sup>b,c</sup>	4.53±2.0 <sup>b,c</sup>	Baja
	<i>Achromobacter</i> spp. CH-MA-4	97	25.26 ± 3.9 <sup>a,c</sup>	28.58 ± 6.6 <sup>a,c</sup>	22.97±5.9 <sup>a,c</sup>	24.95± 3.6 <sup>a,c</sup>	Alta
	<i>Pseudomonas</i> spp. CH-MA-5	96	43.43 ± 3.7 <sup>b,c</sup>	49.07± 3.4 <sup>b,c</sup>	49.68±4.4 <sup>b,c</sup>	35.46±24.9 <sup>b,c</sup>	Alta
	<i>Bacillus pumilus</i> CH-MA-6	96	3.29 ± 1.2 <sup>b,c</sup>	20.26±4.2 <sup>b,c</sup>	13.38±4.7 <sup>b,c</sup>	6.75±4.7 <sup>b,c</sup>	Baja
	<i>Rahnella aquatilis</i> CH-MA-7	95	35.46 ± 1.6 <sup>a,b</sup>	41.46 ±5.3 <sup>a,b</sup>	51.4 ±4.7 <sup>a,b</sup>	66.82±26.4 <sup>a,b</sup>	Alta
	<i>Enterobacter</i> spp. CH-MA-8	94	76.8± 28.6 <sup>a,b,c</sup>	74.0± 24.1 <sup>a,b,c</sup>	56.9± 23.9 <sup>a,b,c</sup>	74.29± 20.1 <sup>a,b,c</sup>	Alta
Aislamientos de plantas en lluvias	<i>Serratia</i> spp. CH-AG-1	85	47.13 ± 4.2 <sup>a,c</sup>	47.31± 4.6 <sup>a,c</sup>	42.58±2.3 <sup>a,c</sup>	42.09±0.9 <sup>a,c</sup>	Alta
	<i>Serratia</i> spp. CH-AG-2	97	24.45 ± 0.3 <sup>a,c</sup>	22.41±1.9 <sup>a,c</sup>	22.8±1.0 <sup>a,c</sup>	23.54± 0.8 <sup>a,c</sup>	Alta
	<i>Serratia</i> spp. CH-AG-3	99	47.17 ± 3.0 <sup>a,c</sup>	47.03±1.8 <sup>a,c</sup>	49.92±4.7 <sup>a,c</sup>	54.58±1.9 <sup>a,c</sup>	Alta
	<i>Serratia</i> spp. CH-AG-4	95	50.98 ± 5.0 <sup>a,c</sup>	49.43±2.9 <sup>a,c</sup>	48.05±1.6 <sup>a,c</sup>	52.92±3.5 <sup>a,c</sup>	Alta

Trp = triptófano

también que la mayoría de las bacterias resistentes al arsénico fueron Gram negativas y del género *Pseudomonas*. En especial, y vinculado como antecedente a este trabajo, se tiene el reporte de Idris *et al.* (2007), quienes aislaron de *Lemna minor* a la fitobacteria *Bacillus amyloliquefasciens* Priest *et al.* F2B42, que produce y secreta cantidades significativas de AIA (29.3 ng/mL). En este estudio, la caracterización de las fitobacterias endófitas aisladas de las plantas de *L. gibba* como productoras de AIA mostró que se obtuvo un alto porcentaje de altas productoras (67%), considerando los aislamientos de las plantas colectadas en ambas temporadas; pero los aislamientos de las plantas colectadas en la temporada de lluvias representaron el 100% de bacterias altas productoras. La fitobacteria endófitas *Enterobacter* spp. CH-MA-8 manifestó una producción total de 77 µg/mL de AIA, mayor a lo reportado por Vivas *et al.* (2006) y Zaidi *et al.* (2006) para *Bacillus* ssp. y *Enterobacter* ssp., géneros reportados como altos productores con 55 µg/mL de AIA producido. Las fitobacterias endófitas aisladas del género *Serratia* alcanzaron valores superiores a los mencionados por Rojas *et al.* (2010), cuyos aislamientos reportan una producción de 35 µg/mL. Esta diversidad y productividad de AIA pudiera responder también a la interacción particular que se establece entre estas fitobacterias y su planta "hospedero", como lo reportan Idris *et al.* (2007). Estos autores indican que la fitobacteria *B. amyloliquefasciens* F2B42, que posee la habilidad para colonizar las raíces de plantas de *Lemna minor* ST, sugiere que ésta depende en cierto grado de la capacidad de la fitobacteria para sintetizar AIA. Leubuh *et al.* (1977) han propuesto que la síntesis bacteriana de AIA contribuye a potenciar la competencia en la rizósfera al eliminar los compuestos análogos presentes en la superficie de las plantas hospedero. Lambrecht *et al.* (2000) mencionan que esta competencia puede darse por la estimulación generada por



Figuras 2a-b. Electroferogramas de los productos de amplificación del gen 16S rDNA de los diferentes aislamientos de fitobacterias de plantas de *Lemna gibba*. **a) Aislamientos de plantas recolectadas en la temporada de secas:** 1 = Marcador de Peso Molecular (1Kb); 2 = CH-MA-1; 3 = CH-MA-2; 4 = CH-MA-3; 5 = CH-MA-4; 6 = CH-MA-5; 7 = CH-MA-6; 8 = CH-MA-7; 9 = CH-MA-8. **b) Aislamientos de plantas recolectadas en la temporada de lluvias:** 1 = Marcador de Peso Molecular (1Kb); 2 = CH-AG-1; 3 = CH-AG-2; 4 = CH-AG-3; 5 = CH-AG-4.

la liberación de exudados por parte de la planta; mientras que Yamada (1993) lo asoció a la regulación en las defensas de la planta y Robinette y Matthys (1990) a la inhibición en la respuesta de hipersensibilidad en plantas infectadas.

Algunos autores mencionan que la diversidad funcional se puede expresar a través de un análisis fenético basado en las similitudes entre los atributos funcionales evaluados (Petchey & Gaston, 2009; Cianciaruso *et al.*, 2009). La comparación fenética de los aislados, de acuerdo con la producción de AIA en ambas temporadas, mostró que hay diferencias entre las fitobacterias aisladas.

El ACP de la figura 4, que asoció los seis parámetros químicos medidos en las muestras de agua con la producción de AIA medida en las fitobacterias endófitas aisladas de las plantas de *L. gibba*, muestra que los valores de los dos primeros componentes representaron el 100% de la varianza total ( $F1 = 89.08\%$ ;  $F2 = 10.92\%$ ); en este caso se observó que existe una asociación entre los valores de nitrógeno amoniacal, ortofosfatos, nitritos y fósforo total en las muestras de la temporada de sequía consistente con el aislamiento de fitobacterias en la misma colecta, caracterizadas por su alta producción de AIA. Las muestras de la temporada de lluvia se caracterizaron por una particular asociación entre el nitrógeno total, nitratos y la presencia del género *Serratia*. En el primer componente se asociaron todos los aislados con mayor producción de AIA de las plantas colectadas en la temporada de lluvias, con una relación positiva. Para el segundo componente, se asociaron todos los aislados de las plantas colectadas en la temporada de sequía,

con una relación positiva, aquellos que fueron más productores de AIA y de forma negativa, los de menor producción.

La evaluación de los parámetros químicos evidenció que las muestras de agua del canal lo definen como un sitio con un cierto grado de eutrofización, repartido en el contenido de nitrógeno total alto en la temporada de lluvias y de fósforo total alto en la temporada de sequía. Aunque estos valores son datos puntuales, se puede notar que éstos se han incrementado con el tiempo, al compararse con los datos recolectados por López-López *et al.* (2006) para esta zona, que reportan un contenido de nitrógeno total de 1 mg/L, de nitratos de 0.016 mg/L, de nitrógeno amoniacal de 0.06 mg/L y de fósforo total de 4.7 mg/L. Estos datos sugieren que los valores altos podrían originarse por el uso de fertilizantes nitrogenados y fosforados por las actividades agrícolas desarrolladas en el área, lo que contribuiría al incremento en la concentración de estos nutrientes en Xochimilco; un proceso observado en otros sistemas acuáticos como lo mencionan Chapman y Kimstach (1992).

Esta asociación entre los altos productores de AIA y las altas concentraciones de N y P cuantificadas tiene su relación en lo establecido por algunos autores de acuerdo con su comportamiento en ecosistemas con este grado de eutrofización, donde las especies de *Lemna* prefieren el nitrógeno en forma amoniacal y preferentemente remueven el amonio, aun en concentraciones altas de nitrógeno; Lüönd (1980) demostró tasas elevadas de crecimiento de *Lemna* obtenidas cuando el nitrógeno está presente en forma de amonio más que de nitrato. En el caso del fósforo, este elemento es esencial para el crecimiento rápido

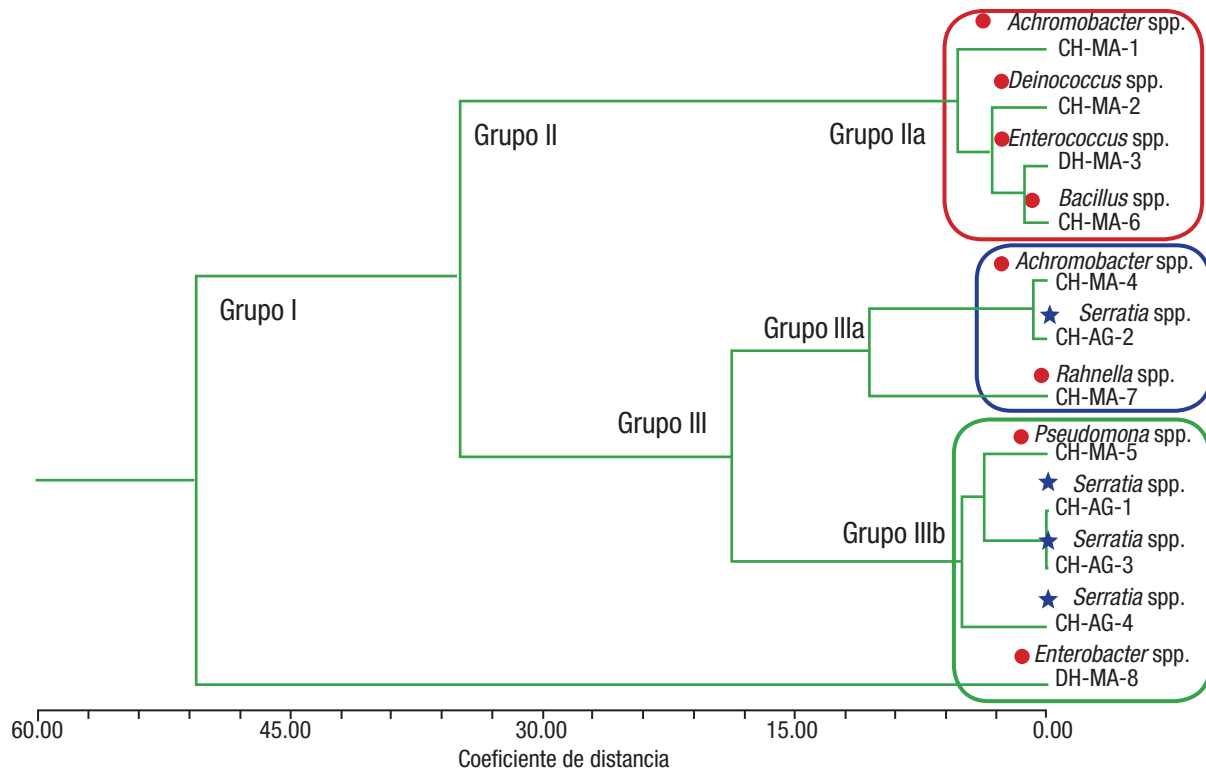


Figura 3. Fenograma comparativo del agrupamiento de las fitobacterias endófitas aisladas de *Lemna gibba*. ★ = Fitobacterias aisladas de plantas colectadas en la temporada de sequía. ● = Fitobacterias aisladas de plantas colectadas en temporada de lluvias ( $r = 0.83$ ).

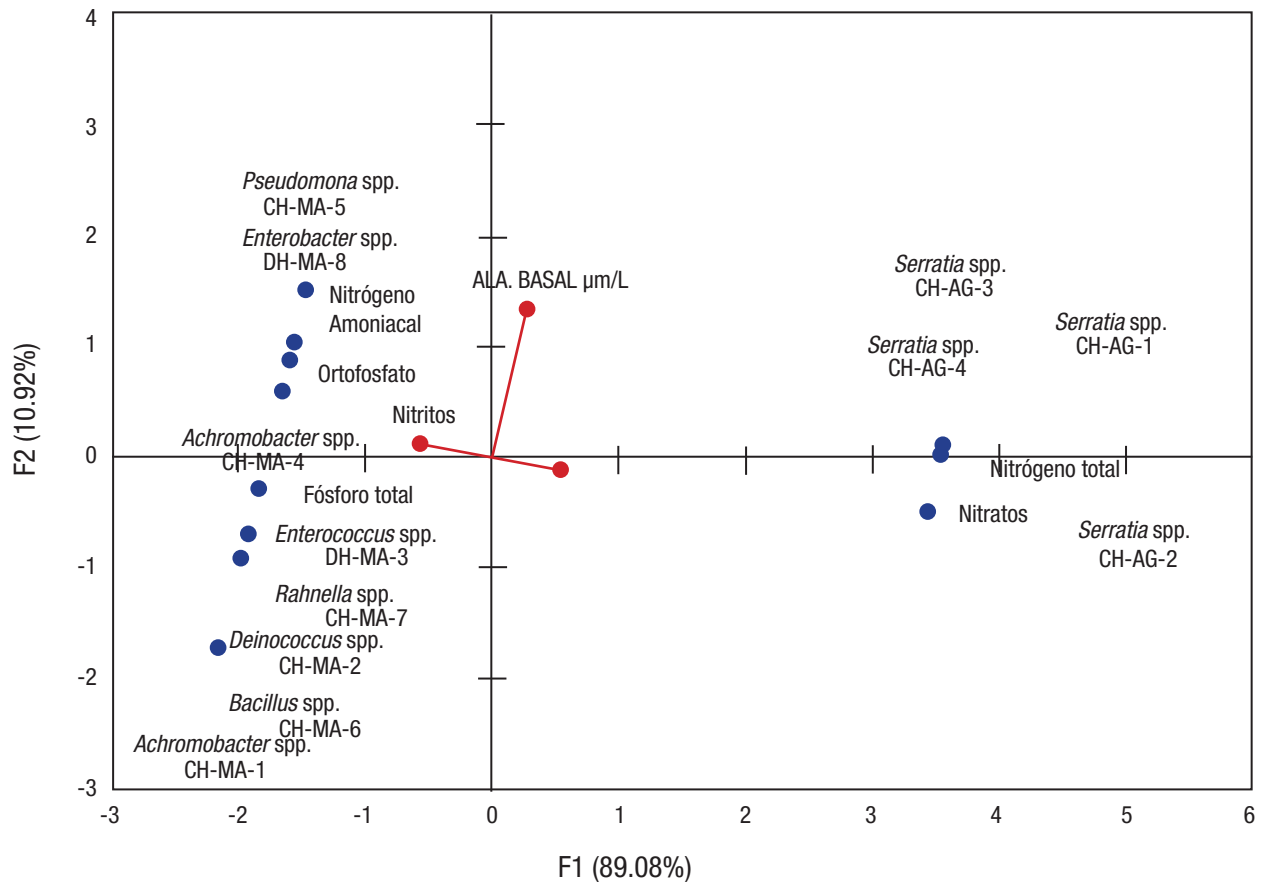


Figura 4. Análisis de componentes principales (ACP) que muestra la relación entre los parámetros químicos medidos de la calidad del agua del canal de Xochimilco, México, seleccionados de la zona agrícola, con relación al atributo funcional de la producción de AIA (ácido indolacético) de las fitobacterias endófitas aisladas de plantas de *Lemna gibba* colectadas en dos temporadas (secas y lluvias).

de estas plantas y las aguas ricas en nutrientes se consideran como un buen reservorio, tanto de fósforo como de potasio. Se ha reportado también que la contribución indirecta de *L. gibba* a la remoción total de nutrientes, se da por medio de las biopelículas que integran algas y bacterias sobre la superficie de estas plantas, que contribuyen a la pérdida del 35 y 32% del nitrógeno y fósforo totales, respectivamente. Existen varios estudios realizados sobre la asociación entre *Lemna* y su microflora, los cuales se han enfocado principalmente en observaciones microscópicas y a la cuenta bacteriana sobre las superficies de estas plantas, así como estudios dependientes de cultivo (Mkandawide & Dudel, 2007). Otras áreas ampliamente estudiadas son las que se reportan sobre la remoción del exceso de nutrientes, particularmente de nitrógeno y fósforo empleando la asociación *Lemna*-microorganismos, para el tratamiento de aguas residuales. La zona Chinampera se considera como irregular por los valores contrastantes en los parámetros evaluados en ambas temporadas, asimismo, el ACP asoció ésta zona con el mayor número de fitobacterias aisladas con mayor producción de AIA.

Finalmente, los estudios relacionados con el análisis de la diversidad funcional en un ecosistema dan información sobre el papel que los organismos desempeñan. Esta investigación contribuye no solamente

al conocimiento de la diversidad de las fitobacterias endófitas de las plantas acuáticas, como fue el caso de los aislados identificados en las plantas de *Lemna gibba* colectadas en un canal de la zona agrícola del sistema lacustre de Xochimilco; sino también a la caracterización de uno de sus atributos funcionales de la promoción del crecimiento vegetal (la producción de fitohormonas); la existencia de fitobacterias endófitas clasificadas como altas productoras de ácido indolacético en las plantas de *Lemna gibba*, sugiere que en cierta medida podrían ser consideradas como bioinoculantes potenciales.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional por el apoyo financiero otorgado a los proyectos SIP (20131494 y 20141314) para la realización de este trabajo. Se agradece también el apoyo de la Comisión de Operaciones y Fomento de Actividades Académicas (COFAA-IPN), del EDI (Estímulo al Desempeño de Investigadores-IPN) y del Sistema Nacional de Investigadores (SNI-CONACyT).

## REFERENCIAS

- AN, Y. J. 2004. Soil ecotoxicity assessment using cadmium sensitive plants. *Environment Pollution* 127: 21-26. DOI: 10.1016/S0269-7491(03)00263-X
- ABBISY, M. & L. MANDI. 1999. Comparative study of wastewater purification efficiencies of two emergent helophytes: *Typha latifolia* and *Juncus subilagus* under arid climate. *Water Science and Technology* 39: 123-128. DOI: 10.1016/S0273-1223(99)00261-9
- ALLERS, T. & M. LICHEN. 2000. A method for preparing genomic DNA that restrains branch migration of Holiday junctions. *Nucleic Acids Research* 28: 26-36. DOI: 10.1093/nar/28.2.e6
- APHA (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION). 2005. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Health Association, Washington D. C., USA. B. P.
- CHAPMAN, D. & V. KIMSTACH. 1992. *Assessments a guide the use of biota, sediments and water in environmental monitoring*. University Press, Great Britain. DOI: 10.4324/9780203476710
- CIANCARUSO, M. V., M. A. BATALHA, K. J. GASTON & O. L. PETCHEY. 2009. Including intraspecific variability in functional diversity. *Ecology* 90: 81-89. DOI: 10.1890/07-1864.1
- DIMKPA, C., T. WEINAND & F. ASH. 2009. Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant Cell and Environment* 32: 1682-1694. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2009.02028.x
- DIBUT, B., R. MARTÍNEZ-VIERA, M. ORTEGA, Y. RÍOS, G. TEJEDA, L. PLANAS & J. RODRÍGUEZ. 2009. Situación actual y perspectivas de las relaciones endófitas plantas-bacteria. Estudio de caso *Gluconacetobacter diazotrophicus* cultivos de importancia económica. *Cultivos Tropicales* 30:16-23.
- HALLMANN, J. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 895-914. DOI: 10.1139/m97-131
- IDRIS, E. E. S., D. J. IGLESIAS, M. TALON & R. BORRIS. 2007. Tryptophan-dependent production of Indole-3-Acetic Acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 619-626. DOI: 10.1094/MPMI-20-6-0619
- KEBEDE, Y. K. & T. KEBEDEE. 2012. Application of principal component analysis in surface water quality monitoring. In: Sanguansat, P. (Ed.). *Application of Principal Component Analysis in Surface Water Quality Monitoring, Principal Component Analysis - Engineering Applications*. InTech, Open Science, China, pp. 83-100. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/principalcomponent-analysis-engineering-applications/application-of-principal-component-analysis-in-surface-waterquality-monitoring>
- KHALID, A., M. ARSHAD & Z. A. ZAHIR. 2004. Screening plant-growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology* 96: 473-480. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.02161.x
- LAMBRECHT, M., Y. OKON, A. VANDE BROEK & J. VANDERLEYDEN. 2000. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signaling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends in Microbiology* 8: 298-300. DOI: 10.1016/S0966-842X(00)01732-7
- LANDOLT, E. 1987. Biosystematic investigations in the family of duckweed (Lemnaceae) Veröff. *Bulletin of the Geobotanical Institute ETH* 4: 131-133.
- LEBUHN, M., T. HEULIN & A. HARTMANN. 1997. Production of auxin and other indolic and phenolic compounds by *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from different proximity to plant roots. *FEMS Microbiology Ecology* 22: 325-334. DOI: 10.1111/j.1574-6941.1997.tb00384.x
- LÓPEZ-LÓPEZ E., J. E. SEDEÑO-DÍAZ & L. F. PEROZZI. 2006. Lipid peroxidation and acetylcholinesterase activity as biomarkers in the black sailfui goodeid, *Girardinichthys viviparous* (Bustamante) exposed to water from Lake Xochimilco (Mexico). *Aquatic Ecosystem Health and Management* 9: 379-385. DOI: 10.1080/14634980600886871
- LÜND, A. 1980. Effects of nitrogen and phosphorus upon the growth of some Lemnaceae. In: Landolt, E. (Ed.). *Biosystematic investigations in the family of duckweeds (Lemnaceae)*. Zurich, Veröffentlichungen des Geobotanisches Institut der Edg. pp. 118-141.
- MAZARI-HIRIART, M., E. CIFUENTES, E. VELÁZQUEZ & J. CALVA. 2000. Microbiological groundwater quality and health indicators in México City. *Urban Ecosystems* 4: 91-103. DOI: 10.1023/A:1011334326405
- MKANDAWIRE, M., B. TAUERT & E. G. DUDEL. 2004. Capacity of *Lemna gibba* L. (duckweed) for uranium and arsenic phytoremediation in mine tailing waters. *International Journal of Phytoremediation* 6: 347-362. DOI: 10.1080/16226510490888884
- MKANDAWIRE, M. & E. G. DUDEL. 2007. Are *Lemna* spp. effective phytoremediation agents? *Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability* 1: 56-71.
- OVERBEEK, V. L. & V. J. D. ELSAS. 2008. Effects of plant genotype and growth stage on the structure of bacterial communities associated with potato (*Solanum tuberosum* L.). *FEMS Microbiology Ecology* 64: 283-296. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2008.00469.x
- PETCHEY, O. L. & K. J. GASTON. 2009. Dendrograms and measures of functional diversity: a second instalment. *Oikos* 118: 1118-1120. DOI: 10.1111/j.1600-0706.2009.17403.x
- REITER, B. & A. SESSITSCH. 2006. The bacterial microflora in association with the wild flower *Crocus albiflorus*. *Canadian Journal of Microbiology* 52:1-10.
- ROBINETTE, D. & A. G. MATTHYSSE. 1990. Inhibition by *Agrobacterium tumefaciens* and *Pseudomonas savastanoi* of development of the hypersensitive response elicited by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Journal of Bacteriology* 172: 5742-5749. DOI: 10.1128/jb.172.10.5742-5749.1990
- ROJAS, C. A., D. A. RODRÍGUEZ, V. S. MONTES, J. S. PÉREZ, T. A. RODRÍGUEZ & Z. L. A. GUERRERO. 2010. Evaluación de la promoción del crecimiento de *Cynodon dactylon* L. por rizobacterias productoras de fitohormonas aisladas de un suelo contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo. *Polibotánica* 22: 131-147.
- STOUT, L. M. & K. NÜSSLEIN. 2005. Shifts in rhizoplane communities of aquatic plants after cadmium exposure. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 2484-2492. DOI: 10.1128/AEM.71.5.2484-2492.2005



- STOUT, L. & K. NÜSSLEIN. 2010. Biotechnological potential of aquatic plant-microbe interactions. *Current Opinion in Biotechnology* 21:339-345. DOI: 10.1016/j.copbio.2010.04.004
- VIVAS, A., B. BIRO, J. M. RUIZ-LOZANO, J. M. BAREA & R. AZCÓN. 2006. Two bacterial strains isolated from a Zn-polluted soil enhance plant growth and mycorrhizal efficiency under Zn toxicity. *Chemosphere* 52: 1523-1533. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2005.06.053
- VOGEL, K., Y. V. LYUBUN, M. P. CHERNYSHOVA, M. MKANDAWIRE, E. E. FEDOROV & E. G. DUDEL. 2006. *Arsenic resistant microflora associated with Lemna sp. in abandoned uranium mine in eastern Germany*. Proceeding of Chemical Ecological Interactions in Aquatic Ecosystems Gfö, Bremen.
- WANG, W. 1990. Literature review on duckweed toxicity testing. *Environmental Research* 52: 7-22. DOI: 10.1016/S0013-9351(05)80147-1
- WEISBURG, W. G., S. M. BARNES, D. A. PELLETIER & D. J. LANE. 1991. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173: 697-703. DOI: 10.1128/jb.173.2.697-703.1991
- YAMADA, T. 1993. Role of auxin in plant-disease development. *Annual Review of Phytopathology* 31: 253-273. DOI: 0.1146/annurev.py.31.090193.001345
- YAMAGA, F., W. KENJI & M. MASAOKI. 2010. Sustainable biodegradation of phenol by *Acinetobacter calcoaceticus* P23 isolated from the rhizosphere of duckweed *Lemna aoukikusa*. *Japan Environmental Science Technology* 44: 6470-6474. DOI: 10.1021/es1007017
- ZAIDI, S., S. USMANI, B. R. SINGH & J. MUSARRAT. 2006. Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*. *Chemosphere* 64: 991-997. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2005.12.057