



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA
PROGRAMAS MULTIDISCIPLINARIOS DE POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES

“Evaluación de *Pseudomonas* endófitas de la raíz de *Typha latifolia* en la fitoextracción de Cd (II)”

PRESENTA:

BQ. CLAUDIA ESTHELA MOCTEZUMA GRANADOS

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. CANDY CARRANZA ÁLVAREZ

ASESORES:

DR. ALEJANDRO HERNÁNDEZ MORALES

DR. ROBERTO BRIONES GALLARDO

San Luis Potosí, S.L.P., 7 de marzo de 2017.

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

PROYECTO REALIZADO EN:

**Laboratorio de Ciencias Ambientales de la Unidad Académica
Multidisciplinaria Zona Huasteca (UAMZH). Universidad Autónoma de San
Luis Potosí (UASLP), México.**

CON FINANCIAMIENTO DE:

**Fondo de Apoyos Complementarios para la Adquisición de Equipo Científico 2013-
CONACYT No. 205822**

A TRAVÉS DEL PROYECTO DENOMINADO:

**“Evaluación de los factores fisicoquímicos y biológicos que influyen en la
fitoextracción de plomo (Pb) y cadmio (Cd) por *Typha latifolia* (Espadaña)”**

AGRADEZCO A CONACyT EL OTORGAMIENTO DE LA BECA-TESIS

Becario No. 332537

**LA MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES RECIBE APOYO ATRAVÉS
DEL PROGRAMA NACIONAL DE POSGRADOS DE CALIDAD (PNPC)**

DEDICATORIA

Agradeciendo primeramente a Dios por la oportunidad brindada, con todo mi amor para mis padres Clara y Leonardo, mi familia, mis amig@s, mi clau, compañeros y amigos del Laboratorio de Ciencias Ambientales (todos), chic@s de servicio social, profesores que estuvieron apoyándome y al pendiente de los avances durante mi trayecto en esta etapa de grandes retos y aprendizajes, a mis hermanos por presionarme y preguntar a cada rato ¿para cuándo? y muy especialmente a quienes me dirigieron y asesoraron en este proyecto (Dra. Candy, Dr. Alejandro, Dr. Roberto); gracias por su apoyo incondicional, paciencia y por alentarme día a día a lograr mucho más y por supuesto al Dr. Ramiro por sus puntuales apreciaciones en la revisión de tesis; así como a cada persona que se acercó a brindarme su apoyo y contribuir con un granito de arena hasta la culminación de este proyecto.

Disculpen por no escribir nombres, pero no quiero fallarles en caso de que olvidase algun@ (el estrés, ya saben), sin embargo, los llevo en mi corazón... infinitas gracias a todos!!

RESUMEN

Las plantas de *Typha latifolia* (Espadaña) tienen la capacidad de remover y acumular metales como Pb, Cr, Mn y Cd. En estudios recientes, se han aislado y caracterizado bacterias de la raíz de *T. latifolia* tolerantes a elevadas concentraciones de Cd y con características de promoción de crecimiento vegetal. Sin embargo, no se ha evaluado el efecto de estos aislados bacterianos en plantas de *T. latifolia*, así como las interacciones de esta especie vegetal con las BPCV, los mecanismos de promoción de crecimiento vegetal y su relación en los procesos de fitoextracción. Por lo anterior, se evaluó el efecto de aislados endófitos del género *Pseudomonas* (GRC140 y GRC093) en la fitoextracción de Cd (II) por plántulas de *T. latifolia*. Para ello, se estableció el cultivo *in vitro* de *T. latifolia* a partir de semillas de plantas no expuestas a contaminantes, inicialmente se establecieron las condiciones de cultivo para semillas de *T. latifolia* evaluando dos tratamientos de asepsia (A y B). Con el tratamiento B, se logró la germinación de plántulas de Espadaña libres de contaminantes con una altura de 12-14 cm aproximadamente y con adecuada raíz (5 cm). Además, se evaluó el efecto de la concentración del metal sobre la germinación de las semillas de *T. latifolia*, encontrando que a mayor concentración del metal mayor inhibición de la germinación. Posteriormente, se expusieron las plántulas (n=2) en solución Hoagland con 5, 10, 25, 50, 75 y 100 ppm de cadmio (II) a un pH de 6.0 y una fuerza iónica 0.05 M, en presencia y ausencia de los aislados bacterianos GRC140 y GRC093 durante 10 días, evaluando el porcentaje de remoción y la acumulación del metal en el tejido vegetal de las plántulas de Espadaña. Se encontró que cuando se inocula el aislado GRC140 el porcentaje de metal removido fue mayor al 50%, en la concentración de 75 ppm respecto al control, mientras que para GRC093 fue del 20% en la concentración de 25 ppm; en cuanto a la acumulación en el tejido vegetal, se observó que la concentración de cadmio fue mayor principalmente en el tejido radicular de *T. latifolia* cuando se inoculó el aislado bacteriano (GRC140) en las concentraciones de 5 y 10 ppm, mientras que para GRC093; las concentraciones mayormente acumuladas en el tejido radicular fueron 5, 10 y 75 ppm, sugiriendo que los aislados endófitos del género *Pseudomonas* ejercen cierto efecto favorecedor en la eficiencia de fitoextracción de Cd (II).

ÍNDICE

CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes.....	4
1.2 Planteamiento del problema	5
1.3 Justificación	6
1.4 Objetivos e Hipótesis	7
1.4.1 Objetivo General.....	7
1.4.2 Objetivos Específicos.....	7
1.4.3 Hipótesis.....	8
CAPÍTULO II.....	9
MARCO TEÓRICO	9
2.1 Metales pesados y su impacto ambiental.....	9
2.2 Contaminación ambiental por cadmio	10
2.2.1 Efectos del Cadmio en la salud humana	11
2.3 Tecnologías de remediación de sitios contaminados	11
2.4 Estrategias de fitorremediación.....	13
2.5 Especies vegetales que favorecen la acumulación de metales pesados.....	13
2.6 Fitotoxicidad por metales pesados.....	15
2.7 Respuestas de las plantas y tipos de estrés por metales pesados.....	15
2.8 Mecanismos de detoxificación de metales pesados por las plantas	17
2.9 Bacterias endófitas y su potencial biotecnológico	22
2.10 Uso de bacterias endófitas en la fitorremediación	23
2.11 Descripción de <i>Typha latifolia</i> (Espadaña)	25
2.12 Cultivo de tejidos vegetales	27
2.12.1 Ventajas del CTV	27
CAPÍTULO III.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1 Obtención del material vegetal.....	31
3.2 Lavado y esterilización de material empleado.....	31
3.3 Preparación de medios de cultivo	32
3.4 Establecimiento del cultivo in vitro de <i>T. latifolia</i>	32
3.5 Cultivo y crecimiento de aislados bacterianos.....	33
3.6 Efecto del Cd (II) en la germinación de semillas de <i>T. latifolia</i>	33

3.7 Efecto de la inoculación de <i>Pseudomonas</i> tolerantes a Cd (II) en el proceso de fitoextracción	34
3.8 Evaluación de los parámetros de fitotoxicidad en la fitoextracción de Cd (II) en plantas con y sin aislados bacterianos	35
3.9 Índice de crecimiento en plantas de <i>T. latifolia</i> expuestas a diferentes concentraciones de cadmio (II).....	35
3.10 Cuantificación de clorofila	35
3.11 Digestión ácida del tejido radicular y aéreo de <i>T. latifolia</i>	36
3.12 Digestión del medio de cultivo (Hoagland)	36
3.13 Elaboración de la curva estándar de Cd total por Espectrofotometría de absorción atómica	37
3.14 Análisis estadístico	38
CAPÍTULO IV	39
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
4.1 Determinación de las condiciones de pH que influyen en la fitoextracción de diferentes concentraciones de Cd (II) por plantas de <i>Typha latifolia</i>	39
4.2 Evaluación del efecto de la concentración de Cd (II) en la germinación de semillas de <i>T. latifolia</i>	40
4.3 Establecimiento del cultivo in vitro de <i>T. latifolia</i>	43
4.4 Evaluación del efecto de los aislados bacterianos del género <i>Pseudomonas</i> tolerantes a metales pesados en el incremento de la fitoextracción de distintas concentraciones de Cd (II) por plántulas in vitro de <i>T. latifolia</i>	49
4.5 Aspecto e Índice de Crecimiento de <i>T. latifolia</i> con y sin adición de <i>Pseudomonas</i> endófitas, durante el proceso de fitoextracción de Cd (II).	51
4.6 Efecto del Cd (II) en el contenido de clorofila	56
4.7 Efecto del pH durante el proceso de fitoextracción	58
4.8 Evaluación del proceso de fitoextracción de Cd (II) por <i>T. latifolia</i>	60
4.8.1 Remoción de Cd (II) por <i>T. latifolia</i> con y sin adición de <i>Pseudomonas</i> endófitas ...	60
4.8.2 Evaluación del contenido de Cd (II) acumulado en el tejido vegetal de <i>T. latifolia</i> en el proceso de fitoextracción	65
CAPÍTULO V	70
CONCLUSIONES	70
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
Anexo 1	86
Anexo 2	88

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Typha latifolia (Espadaña) es una planta de la familia *Typhaceae* orden de las *Typhales* y subclase *Commelinidae*. Esta especie vegetal es considerada una planta cosmopolita, perenne, rizomatosa, de 1-3 metros de altura, de tallos cilíndricos, hojas basales, lineares, de más de 15 mm de anchura (Ye *et al.*, 2001). Generalmente, es capaz de producir 2.9 kg/m² de biomasa ya que posee altas velocidades de crecimiento y reproducción (Kaene *et al.*, 1999). Se localiza principalmente en suelos inundados, en orillas de cursos de agua, charcas y canales. Debido a su alta producción de biomasa y rápido crecimiento, esta especie vegetal es utilizada en los procesos de fitorremediación. (Ye *et al.*, 2001).

Se ha descrito que las plantas adultas de *T. latifolia* tienen la capacidad de remover y acumular 37 mg de Pb por kg de peso, 110 mg Cr /kg, 1651 mg Mn /kg y 669 mg Fe/kg, cuando se evaluó en condiciones *in situ* (Carranza, 2005). Además, las plantas de Espadaña propagadas en condiciones de invernadero presentaron la capacidad de remover 0.35, 0.81 y 1.24 ppm de Cd cuando fueron expuestas a 0.85, 1.73 y 2.55 ppm del metal, respectivamente (Pecina-Martínez, 2008).

Otros estudios demostraron que las plantas de *T. latifolia* y *Ceratophyllum demersum*, al ser expuestas a concentraciones de 5, 10, 20, 50 y 100 ppm de Pb (II), acumularon predominantemente el metal en la raíz (Saydideger *et al.*, 2004). De manera similar, se ha reportado que conforme la concentración del metal incrementa en la solución, mayor es la internalización en la planta, la cual predomina en el tejido radicular (Alonso *et al.*, 2009).

Recientemente, Leura y cols. (2013), evaluaron la remoción de Cd (II) por espadaña y se encontró una eficiencia de 38% y 41% de remoción cuando fue expuesta a concentraciones de 5 y 7.5 ppm, respectivamente. Además, cuando la planta es expuesta a 20 ppm de Cd (II), la eficiencia de la remoción aumentó al 55%, es decir que, al aumentar la concentración del Cd, aumenta la eficiencia de remoción, pero también aumentan los efectos fitotóxicos en las plantas por la exposición a altas concentraciones de metales (Alonso *et al.*, 2009; Leura *et al.*, 2013).

En condiciones naturales, las plantas han desarrollado diversos mecanismos para reducir la toxicidad por la exposición a metales pesados. Algunas, por ejemplo, establecen interacciones simbióticas con microorganismos presentes en la rizósfera, entre los que se encuentran las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) (Zhuang *et al.*, 2007). Estas bacterias toman sus nutrientes principalmente de los exudados de la raíz y desarrollan algunas actividades como la solubilización de fosfato, producción de sideróforos, ácido indol acético (AIA), 1-Aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa que favorecen el crecimiento de la planta y supervivencia a las condiciones de estrés a las que son sometidas (Sarabia-Ochoa *et al.*, 2010).

Se han realizado estudios para la identificación de bacterias endófitas con la capacidad de promover el crecimiento, en plantas del género *Typha*. Dichos estudios demuestran que *Klebsiella oxytoca* GR-3 es una bacteria endófitas de las raíces de *T. australis* con la capacidad de solubilizar fosfato, fijar nitrógeno y producir ácido indol acético, lo que favorece el proceso de fitorremediación de la planta hospedera (Jha y Kumar, 2007). Por otra parte, estudios sobre la diversidad bacteriana de la raíz de *T. angustifolia* han identificado molecularmente microorganismos endófitos, de los cuales dominan los géneros: *Rhodofera*, *Pelomonas*, *Uliginosibacterium*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Rhizobium*, *Sulfurospirillum*, *Ilyobacter* y *Bacteroides* (Li *et al.*, 2011). Respecto a *T. latifolia* (Espadaña), se ha cultivado junto con *Phragmites australis* en humedales para el tratamiento de residuos industriales y se ha observado la diversidad bacteriana asociados a *T. angustifolia* (Calheiros *et al.*, 2009).

En estudios recientes, Rolón (2015), aisló y caracterizó bacterias de la raíz de *T. latifolia* tolerantes a elevadas concentraciones de Cd (500-750 ppm), con características de promoción de crecimiento vegetal como solubilización de fosfatos, producción de sideróforos, ACC desaminasa y ácido indol acético (Rolón, 2015). En dicho estudio, se estableció un modelo para evaluar el efecto de cuatro aislados obtenidos, del género *Pseudomonas* de la raíz de *T. latifolia* en la protección de semillas de *Cucumis sativus* L. (pepino) expuestas a 50 ppm de Cd (II), demostrando que dichos aislados promueven el crecimiento del sistema radicular, permitiendo la elongación de la raíz primaria y emergencia de raíces laterales de las plántulas de

pepino expuestas (Rolón, 2015). Sin embargo, no se ha evaluado el efecto de estos aislados bacterianos en plantas de *T. latifolia*, Por ello, es importante estudiar la interacción planta-bacteria y evaluar si favorecen o no el proceso de fitoextracción.

1.1 Antecedentes

Se ha demostrado que las bacterias endófitas son fundamentales para la supervivencia de las plantas, ya que las ayudan a controlar ataques de patógenos, insectos y nemátodos (Hallmann *et al.*, 1998) a través del fortalecimiento del sistema de resistencia (ISR) de las plantas (Kloepper *et al.*, 2006). Además, se han encontrado que las bacterias endófitas favorecen el proceso de germinación de semillas, y estimulan el crecimiento de las plántulas favoreciendo su establecimiento de manera más rápida en ambientes adversos (Bent, 1998).

Algunas bacterias endófitas son capaces de colonizar los órganos reproductores de las plantas, por ejemplo, flores, frutos y semillas (Stone *et al.*, 2000). Además, debido a la movilización de nutrientes en los suelos, llegan a producir numerosos reguladores del crecimiento vegetal, actuando como protección de plantas a fitopatógenos por el control o inhibición de estos, mejorando las condiciones del suelo, los procesos de biorremediación de suelos contaminados por el secuestro de metales pesados tóxicos y compuestos xenobióticos dentro los tejidos vegetales (Ahemad, 2012). Por otra parte, las bacterias endófitas asociadas a especies vegetales hiperacumuladoras favorecen la eficiencia del proceso de fitorremediación y aumentan la producción de biomasa vegetal mediante tres mecanismos: (1) incremento de la superficie de la raíz y la producción de pelos radiculares, (2) incremento de la disponibilidad de los metales, (3) Incremento en la transferencia de metales solubles desde la rizósfera hasta los diferentes tejidos de la planta (Weyens *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2011). Estas bacterias pueden promover el crecimiento vegetal y jugar un papel importante durante el proceso de remoción y extracción del metal. Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal producen fitohormonas como el ácido indol acético (AIA) que suprime el estrés en las plantas por la actividad ACC desaminasa. Además, mejoran el estado nutricional de la planta debido a la presencia de actividades como la fijación de N₂, solubilización de PO₄³⁻ y la producción de sideróforos (Sessitsch *et al.*, 2013).

1.2 Planteamiento del problema

Los aislados endófitos de *Typha latifolia*, del género *Pseudomonas* que exhiben actividades de promoción del crecimiento en plantas de pepino, podrían favorecer el proceso de fitoextracción cuando son inoculadas en plántulas de *T. latifolia*.

1.3 Justificación

Typha latifolia es una especie vegetal considerada como hiperacumuladora de algunos metales pesados por lo que ha sido ampliamente estudiada en procesos de fitoextracción. Se ha observado que cuando la especie vegetal es expuesta durante un periodo de 10 días en concentraciones de Cd (20-85 ppm), la planta presenta signos de fitotoxicidad como clorosis, marchitamiento y deshidratación a partir del sexto día, por lo que es importante realizar el estudio de las interacciones planta-microorganismo a través de bacterias del género *Pseudomonas*, aisladas (de la raíz de *T. latifolia*), tolerantes a cadmio (II) que pudieran favorecer la promoción de crecimiento, la tolerancia de la planta a elevadas concentraciones de Cd (II), mejorando así, la eficiencia de fitoextracción.

1.4 Objetivos e Hipótesis

1.4.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de bacterias endófitas del género *Pseudomonas* tolerantes a metales pesados en la fitoextracción de Cd (II) por *Typha latifolia* (Espadaña).

1.4.2 Objetivos Específicos

1. Determinar las condiciones de pH para la evaluación de la fitoextracción de diferentes concentraciones de Cd (II) por plantas de *Typha latifolia*.
2. Evaluar el efecto de la concentración de Cd (II) en la germinación de semillas de *T. latifolia*.
3. Establecer el cultivo *in vitro* de *T. latifolia* a partir de semillas de plantas no expuestas a contaminantes.
4. Evaluar el efecto de los aislados bacterianos del género *Pseudomonas* tolerantes a metales pesados en el incremento de la fitoextracción de distintas concentraciones de Cd (II) por plántulas *in vitro* de *T. latifolia*.
5. Determinar los parámetros de fitotoxicidad que participan durante la fitoextracción de Cd (II) en plantas asociadas a bacterias tolerantes y plantas libres de bacterias.

1.4.3 Hipótesis

Typha latifolia (Espadaña) se asocia con los aislados bacterianos endófitos, del género *Pseudomonas* mediante interacciones simbióticas que favorecen la promoción de crecimiento radicular, le confieren tolerancia a Cd (II), y favorecen la fitoextracción.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Metales pesados y su impacto ambiental

El término metal pesado es ampliamente utilizado en materia de contaminación ambiental; una de las definiciones químicas más aceptada los define como elementos con una densidad mayor o igual a 5 g/cm³ (Cañizares, 2000). Aunque algunos son esenciales en el metabolismo de los seres vivos, como el cobalto, cobre, hierro, manganeso, molibdeno, vanadio, estroncio, y zinc, en concentraciones muy elevadas éstos son demasiado tóxicos inclusive a concentraciones muy bajas.

Además, tienden a persistir en el ambiente, dada su resistencia a la degradación química o biológica (Salomons y Förstner, 1995), constituyen un grupo de 65 elementos con características físicas, químicas y biológicas muy heterogéneas (Gadd, 1992). Por otra parte, se clasifican en esenciales y no esenciales. Los últimos no presentan función biológica y su presencia puede ser tóxica; mientras que los esenciales son requeridos por todos los organismos en cantidades trazas (Valls y De Lorenzo, 2002).

La distribución de los metales pesados se ve alterada por las actividades humanas y pueden convertirse en contaminantes altamente peligrosos. La liberación de efluentes industriales, emisiones vehiculares, actividades agrícolas, extracción de minerales y el refinamiento de productos mineros son consideradas las principales fuentes de contaminación por estos elementos en los ecosistemas terrestres, acuáticos y aéreos (Jing, He y Yang, 2007). A diferencia de los contaminantes orgánicos, el impacto ambiental de la contaminación por metales se acentúa por estos no ser biodegradables (Lasat, 2002). Su permanencia en los ecosistemas provoca diversos y agudos efectos en la biota (Cordero et al., 2005).

Valdez y Cabrera (1999) consideran a los metales pesados como un tema de interés; tanto en el campo ambiental, como en el de la salud pública. Los daños que causan son tan severos y en ocasiones tan ausentes de síntomas, que las autoridades ambientales y de salud de todo el mundo ponen mucha atención en minimizar la exposición de la población, en particular de la población infantil.

Desde el siglo XIX, la minería, la manufactura, y muchos otros procesos han sido contribuyentes principales para la contaminación por metales pesados extensiva del medio ambiente (Barlow *et al.*, 2000). Como un resultado al interés de las industrias para encontrar un método eficiente en base a costos y beneficios para remediar terrenos contaminados con metales se han implementado tecnologías basadas en la fitorremediación. La fitorremediación es el uso de plantas para remover o estabilizar un contaminante dañino en el ambiente. En la actualidad se ha demostrado que algunas plantas pueden acumular niveles altos de metales normalmente tóxicos en sus tejidos y aun así pueden sobrevivir (Barlow *et al.*, 2000).

Las plantas pueden ser comparadas con bombas conductoras solares que extraen y concentran elementos del ambiente. Ciertas plantas, conocidas como hiperacumuladoras de metales, pueden extraer 5% de metales del suelo. La eficiencia de una planta para que acumule algún metal del suelo depende de una gran cantidad de condiciones, como la concentración de metal en el suelo y su disponibilidad para la planta, las características físicas del suelo, la presencia de otros contaminantes, la tolerancia de la planta a la acumulación del metal y los parámetros estacionales (Gambale *et al.*, 2001).

2.2 Contaminación ambiental por cadmio

El cadmio se encuentra en forma regular junto con los minerales de zinc, cobre y plomo. Por lo tanto, la actividad volcánica es una razón natural para un aumento temporal del medio ambiente en concentraciones de cadmio. Se utiliza ampliamente en los procesos industriales, por ejemplo: como agente anticorrosivo, como estabilizador en productos de PVC, como pigmento de color, como absorbente de neutrones en las centrales nucleares, y en la fabricación de baterías de níquel-cadmio. Los fertilizantes fosfatados también muestran una gran carga de cadmio. A pesar de que algunos productos de cadmio pueden ser reciclados, una gran parte de la contaminación por este metal es causada por la descarga y la incineración de los residuos que lo contienen (Jarup, 2003).

2.2.1 Efectos del Cadmio en la salud humana

El cadmio presenta graves riesgos para la salud humana. Hoy en día no puede ser demostrado que este metal tiene función fisiológica en el cuerpo humano. Por lo tanto, ha aumentado su potencial como peligroso contaminante. Como se describió por primera vez por Friedrich Stromeyer (Göttingen, Alemania) en 1817, el cadmio puede provocar daños al riñón, hueso, e incluso en pulmones. En relación a este último, se ha asociado con algunos tipos de cánceres y edemas pulmonares (Klassen, 2001).

2.3 Tecnologías de remediación de sitios contaminados

En la actualidad, los avances tecnológicos para sanear ambientes contaminados con metales pesados han conllevado al desarrollo de alternativas que se basan en el empleo de organismos para restaurar daños provocados por acciones antropogénicas que alteran la estabilidad de los diferentes ecosistemas. En este sentido resalta la biorremediación, tecnologías que consisten en el uso de sistemas biológicos naturales o mejorados genéticamente para degradar, transformar o eliminar sustancias peligrosas orgánicas e inorgánicas presentes en los suelos, agua y aire. Estas tecnologías permiten que las concentraciones del contaminante sean no detectables o estén por debajo de los límites establecidos como aceptables por las Agencias de Control del Medio Ambiente, permitiendo la recuperación de los sitios contaminados y la protección del ambiente (Mallick, 2003; De Olivera, 2004; Audet y Charest, 2007).

Las tecnologías de remediación representan una alternativa atractiva para disminuir los niveles de contaminantes en sitios acuáticos o terrestres con el fin de evitar efectos adversos a los seres humanos y al ambiente (Matagi *et al.*, 1998). Pueden clasificarse con base en su principio de aplicación en:

- a) Tratamientos biológicos (biorremediación). se utiliza para describir una variedad de sistemas que utilizan organismos vivos (plantas, hongos y bacterias) para degradar, transformar o remover compuestos orgánicos tóxicos, productos metabólicos inocuos o menos tóxicos. Esta estrategia biológica depende de las actividades catabólicas de los organismos, y sus capacidades para utilizar los contaminantes como fuente de alimento y energía. Puede emplear organismos

propios del sitio contaminado (autóctonos) o de otros sitios (exógenos), puede realizarse *in situ* o *ex situ*, en condiciones aerobias o anaerobias. Los procesos de biorremediación se han usado con éxito para tratar suelos, lodos y sedimentos contaminados con hidrocarburos del petróleo (HTP), solventes (benceno y tolueno), explosivos (TNT), clorofenoles (PCP), pesticidas (2,4-D), conservadores de madera (creosota) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (Volke y Velasco, 2002).

- b) Biosorción. es la separación pasiva de metales y metaloides por interacciones con material biológico vivo o muerto y es, hasta ahora, el acercamiento más práctico y ampliamente usado para biorremediación de metales. Implica mecanismos físico-químicos por los que las especies metálicas son sorbidas y/o acomplejadas en biomasa o productos microbianos. Los procesos de biosorción son, esencialmente, pseudo-proceso de intercambio iónico, en los cuales los iones metálicos son intercambiados hacia componentes de carga opuesta unidos a la biomasa o a una resina. En general, depende del pH del líquido y de las características químicas del metal (Volke y Velasco, 2002).
- c) Tratamientos fisicoquímicos. Los tratamientos fisicoquímicos aprovechan las propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes o del medio contaminado para destruir, separar o contener la contaminación. Este tipo de tecnologías generalmente son efectivas en cuanto a costos y pueden concluirse en periodos cortos. Las tecnologías fisicoquímicas pueden realizarse *in situ* o *ex situ*. La mayoría se aplican *in situ*. Entre las tecnologías fisicoquímicas para tratamiento *in situ*, se encuentran la remediación electrocinética (RE), el lavado de suelos (LS), la extracción por solventes (ES), la extracción de vapores (EV) y la solidificación/estabilización (S/E) (Volke y Velasco, 2002).

2.4 Estrategias de fitorremediación

Una tecnología emergente en la restauración del medio ambiente es la fitorremediación, proceso que se refiere al uso de plantas para la remoción de contaminantes orgánicos e inorgánicos. Esta tecnología es una alternativa atractiva debido a que es llevada a cabo *in situ*, minimiza los costos y la exposición humana a los contaminantes (Salt *et al.*, 1998). La fitorremediación consiste en cuatro diferentes tecnologías con un mecanismo diferente de acción para la remediación de suelos, sedimentos o agua contaminada con metales pesados. El proceso de evasión o también denominado fitoestabilización, involucra la secreción de metabolitos al medio extracelular por parte de la planta a fin de formar complejos insolubles con los metales impidiendo de esta forma su absorción (Salt *et al.*, 1998). Por otro lado, el proceso de tolerancia de las plantas a los metales es más complejo e involucra los mecanismos denominados rizofiltración, fitodegradación, fitovolatilización y fitoacumulación. La rizofiltración involucra la absorción y acumulación selectiva del metal en la raíz, pero presenta la limitante de que la eliminación del metal del sitio requiere de la cosecha de la planta completa. En los procesos de fitodegradación y fitovolatilización el contaminante es transformado a otras formas químicas o volátiles como es el caso del mercurio, arsénico y selenio (Salt *et al.*, 1998).

Una limitante de estos procesos es la posible generación de formas con mayor grado de toxicidad y en el caso de la formación de compuestos volátiles, la reincorporación del contaminante al medio ambiente. Por último, la acumulación continua de metales en los tejidos aéreos de las plantas denominada fitoacumulación se presenta como una tecnología emergente en la restauración del medio ambiente y se basa en la capacidad que poseen algunas plantas de extraer y acumular metales en el tallo y en las hojas (Salt *et al.*, 1998).

2.5 Especies vegetales que favorecen la acumulación de metales pesados

Para crecer y completar su ciclo de vida, las plantas deben adquirir macronutrientes (N, P, K, S, Ca y Mg), y micronutrientes (Fe, Zn, Mn, Ni, Cu y Mo) en cantidades inferiores a 10 mg/Kg. Las plantas han desarrollado mecanismos específicos para remover, translocar y acumular estos nutrientes. Por ejemplo, el movimiento de

metales a través de membranas biológicas es mediado por proteínas con funciones de transporte. Estudios ecológicos han revelado la existencia de comunidades endémicas de plantas como es el caso de la familia *Thlaspi*, las cuales se han adaptado a crecer en sitios con cantidades elevadas de Zn, Cu y Ni (Lasat, 2000). En algunas especies como *Festuca rubra*, esta adaptación es lograda mediante la exclusión en la captación de metales por las raíces, estas plantas son conocidas como excludoras (Lasat, 2000). Un segundo grupo de plantas conocidas como acumuladoras han desarrollado mecanismos para la acumulación de altos niveles de metales mediante la formación de compuestos de coordinación con ácidos orgánicos (citrato, malato, oxalacetato), proteínas (metalotioneínas y fitoquelatinas) péptidos cortos (glutatión) y aminoácidos (prolina), confinando estos compuestos de coordinación en vacuolas y pared celular en donde no interfieren con la fisiología vegetal (De la Rosa *et al.*, 2004).

En general, el mecanismo de captación de metales es selectivo, las plantas pueden aceptar algunos iones, pero rechazar otros. La selección de captar un ion depende de la estructura y propiedades de los transportadores de membrana. Estas características permiten a los transportadores reconocer y llevar a cabo el transporte de iones específicos a través de la membrana. Por ejemplo, algunos transportadores median el transporte de cationes divalentes, pero no reconocen a cationes mono o trivalentes. Por otra parte, un tercer grupo de plantas conocidas como indicadoras presentan una pobre capacidad de captación y transporte de metales pesados, sin embargo, la cantidad de metales encontrados en sus tejidos es indicativa de los niveles de metales en el suelo (Baker y Walker, 1990).

Existe una gran variedad de especies hiperacumuladoras como *Arabidopsis halleri* (Ernst, 1968), *Thlaspi caerulescens* (Mádico *et al.*, 1982), *Melastoma malabathricum* (Watanabe *et al.*, 1998), entre otras, que cumplen con una elevada velocidad de crecimiento. Sin embargo, hay especies que acumulan bajas concentraciones de metal y producen elevada biomasa como *Cannabis sativa* (Ostwald, 2000), *Typha sp.* (Horne, 2000), *Brassica juncea* (Bañuelos *et al.*, 1997), las cuales también pueden ser utilizadas en los procesos de fitorremediación.

2.6 Fitotoxicidad por metales pesados

Algunos metales pesados como Fe, Cu, Mn y Zn entre otros, son esenciales para el crecimiento y desarrollo normal de una planta debido a que forman parte de los constituyentes de enzimas y proteínas. Sin embargo, elevadas concentraciones de metales tanto esenciales como no esenciales se traducen en síntomas de toxicidad e inhibición en el crecimiento de las plantas (Lassat, 2000). Los síntomas de toxicidad observados en plantas son debido a la unión de metales a los grupos sulfhidrilo presente en proteínas, dando como resultado una alteración en su estructura y provocando una inhibición en su actividad. Además, el exceso de metales pesados causa estrés oxidativo, resultado de la formación de radicales libres y especies reactantes del oxígeno (Jones *et al.*, 1991). Otra razón de la toxicidad de los metales es debido a que remplazan a los metales esenciales presentes en pigmentos, enzimas o células, interrumpiendo de esta forma su función biológica (Jones *et al.*, 1991).

2.7 Respuestas de las plantas y tipos de estrés por metales pesados

La toxicidad de un ión metálico depende de la capacidad de interactuar con las moléculas de la célula, por lo tanto, el agente de toxicidad es el ión y no el metal, el cual no es soluble. Su peligro real depende de la concentración de iones solubles presentes en el sustrato y disponibles para la planta. Una razón por la que los metales son tóxicos es porque causan estrés oxidativo (Pilon-Smits & Pilon, 2002), el cual se define como aquel tipo especial de estado bioquímico de una célula o tejido, que puede ocurrir en plazos cortos o largos, en donde la generación de especies químicas oxidantes rebasa la capacidad de producción o la actividad de especies antioxidantes (Benavides *et al.*, 2002).

Algunas especies vegetales pueden crecer en ambientes contaminados porque han desarrollado una variedad de mecanismos que minimizan el exceso de metales a los cuales están expuestas. Estos mecanismos incluyen: inmovilización de los iones tóxicos en la pared celular; impedimento de la absorción a través de las capas del protoplasma; inducción al estrés proteico como protección a la toxicidad metálica (chaperoninas y metalotioneinas); compartimentalización y formación de compuestos ácidos orgánicos e inorgánicos (por el cual metal es transportado a la vacuola donde

se inactiva), derivados de fenoles y glucósidos en las vacuolas y retranslocación (bromofenoles, flavonoides, floroglucinol, ésteres gálicos y fluorotaninos) (Larcher, 1995; Andrade *et al.*, 2002).

En las plantas, el estrés por metales activa los sistemas antioxidantes, compuestos por radicales libres de moléculas de barrido tales como ascorbato y glutatión y las enzimas implicadas en su biosíntesis y reducción (Noctor y Foyer, 1994). Existen otras moléculas implicadas en la prevención del estrés oxidativo, como son las enzimas de superóxido dismutasas (SOD) (Bowler *et al.*, 1994; Inzé y Van Montague, 1995). La superproducción de cualquiera de estos componentes puede conducir a una alta tolerancia del estrés por metales.

La acumulación de metales pesados en plantas se lleva a cabo en dos fases: la fase activa de acumulación, corresponde a la etapa inicial y es la fase rápida del proceso. Se da cuando los metales son adsorbidos a la superficie por atracción electrostática a los sitios cargados negativamente. Y la fase pasiva, que es mucho más lenta, donde los iones metálicos son transportados a través de la membrana celular y dentro de los organelos intracelulares (Chong *et al.*, 2000; Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2001). La fase de acumulación activa es esencialmente independiente de los factores que afectan el metabolismo tales como temperatura, luz, pH y salinidad (Ospina *et al.*, 2005), por lo cual se realiza rápidamente. Un ejemplo de esto es la incorporación de Pb, que según Loaban y Harrison (1994) puede ser absorbido pasivamente por polisacáridos cargados en la pared celular y en la matriz intracelular.

Un ejemplo de respuestas de tolerancia al estrés en las plantas es el caso del estrés causado por metales pesados, donde los diferentes patrones de captación de los metales pueden estar relacionados a diferentes mecanismos de tolerancia (Baker y Walter, 2000). Entre estos mecanismos, se describen tres estrategias básicas que se asocian a tres diferentes modelos lineales:

- a) La estrategia de exclusión: cuando los valores de concentración de metal para las plantas están por encima del rango de concentraciones del metal en el medio, sugiriendo que las concentraciones se mantienen a un nivel bajo,

constante, hasta que se alcanza una concentración crítica en el medio, que es cuando ocurre la toxicidad (Baker y Walter, 2000).

- b) La estrategia de acumulador: cuando los metales se concentran activamente dentro de los tejidos de la planta, por encima del rango de concentración del medio, implicando una fisiología altamente especializada (Baker y Walter, 2000).
- c) La estrategia de indicador: cuando la captación de metales y el transporte al interior de la planta son regulados, u ocurre la acumulación pasiva, de modo que las concentraciones internas reflejen exactamente las concentraciones externas; a esta última estrategia corresponden los modelos lineales altamente correlacionados (Baker y Walter, 2000).

2.8 Mecanismos de detoxificación de metales pesados por las plantas

Cuando el contenido de metales pesados en el suelo alcanza niveles que rebasan los límites máximos permitidos causan efectos inmediatos como inhibición del crecimiento normal y el desarrollo de las plantas, y un disturbio funcional en otros componentes del ambiente, así como la disminución de las poblaciones microbianas del suelo, el término que se usa o se emplea es "polución de suelos" (Navarro *et al.*, 2007).

Algunas plantas son capaces de acumular cantidades excesivas de metales pesados, y se les conoce con el término "hiperacumuladoras". Éstas, generalmente tienen poca biomasa debido a que ellas utilizan más energía en los mecanismos necesarios para adaptarse a las altas concentraciones de metal en sus tejidos. La capacidad de las plantas para bioacumular metales y otros posibles contaminantes varía según la especie vegetal y la naturaleza de los contaminantes. Estas diferencias en la absorción de metales, pueden ser atribuidas precisamente a la capacidad de retención del metal en cuestión, por el suelo de cultivo y a la interacción planta-raíz-metal. Las plantas hiperacumuladoras pueden superar 100 o más veces los valores normales de metales acumulados (Navarro *et al.*, 2007).

Existen diferentes aspectos de interacción planta-metal relacionados con tolerancia y detoxificación, entre los cuales se pueden describir los siguientes (Figura 1):

Micorrizas: Son ciertos hongos del suelo que se encuentran en asociación simbiótica con las raíces de las plantas (la mayoría). La propia palabra define la simbiosis entre un hongo (*mycos*) y las raíces (*rhizos*) de una planta. La asociación física se produce porque las raíces de las plantas se unen con las hifas de determinados hongos. De esta manera, la simbiosis proporciona por parte del hongo nutrientes minerales y agua (suelo), y por parte de la planta, sustratos energéticos y carbohidratos (fotosíntesis). Las plantas micorrizadas presentan una mayor tolerancia a los metales pesados gracias, en parte, a la capacidad para inmovilizar los metales en la raíz, impidiendo que éstos pasen a la parte aérea de la planta. Una primera barrera a la entrada de metales pesados la constituiría la pared celular del hongo, que tiene una gran capacidad de absorber cationes sobre su superficie, puesto que ésta se encuentra cargada negativamente. Además, el hongo restringe el movimiento del metal a las raíces de la planta. Para ello se sirve de diversos mecanismos que varían según la especie del hongo. Sin embargo, se ha observado también una intensa actividad de translocación y absorción de metales pesados en algunas especies por efecto de las micorrizas, evidenciando que funcionan en ambos sentidos, impidiendo la entrada de metales pesados y favoreciendo su acumulación, y, por tanto, procurando una alternativa de utilización en fitorremediación. En cualquier caso, los procesos esquematizados, en que participan las micorrizas son: -absorción/adsorción de metales pesados en el hongo, reducción del acceso de los metales pesados al apoplasto por hidrofobia y quelación de los metales pesados con exudados del hongo (Navarro *et al.*, 2007).

- Pared celular y exudados de raíz: La raíz constituye el tejido de entrada principal de metales pesados en la planta. Hasta allí los metales pesados pueden llegar, fundamentalmente, por un proceso de difusión en el medio, mediante un flujo masivo y por intercambio catiónico. La raíz posee cargas negativas en sus células, debido en gran medida a la presencia de grupos carboxilo del ácido

péctico. Las cargas negativas de estas células de la rizodermis interaccionan con las positivas de los metales pesados presentes en el suelo, creando un equilibrio dinámico que facilita la entrada hacia el interior celular. De esta forma, los cationes entran por la pared celular, que además es hidrofílica, lo que facilita el transporte iónico. Una vez unidas las cargas positivas a las negativas de la pared celular, los metales pesados se transportan, por vía apoplásica y simplástica (Navarro *et al.*, 2007).

Por ejemplo, se ha observado que los exudados favorecen la absorción de Fe en suelo deficientes en el mismo. La exudación de mucílagos que forman una capa externa a la raíz (mucigel), también favorece la complejación de metales pesados como el Cd, Cu y Pb (Navarro *et al.*, 2007).

- Membrana plasmática: La membrana plasmática se ve rápidamente afectada por metales pesados. Sobre ella se reproducen efectos específicos según el metal, promoviendo daños mediante varios mecanismos. Por ejemplo, se sabe que el Cu y el Cd alternan la composición de los lípidos de membrana y provocan la fuga de solutos de la célula (Navarro *et al.*, 2007).

Sin embargo, la membrana plasmática puede estar involucrada en la tolerancia a metales pesados reduciendo la captación o estimulando las bombas de flujo de metales que promueven la entrada al citosol. Se sabe que las plantas tolerantes protegen la membrana. Básicamente, mediante mecanismos de reparación que mantienen la integridad de la membrana plasmática, utilizando mecanismos de protección (proteínas de choque térmico, metalotioneinas, entre otros), mejorando los mecanismos de homeostasis de metal, promoviendo un influjo reducido a través de la membrana plasmática y promoviendo un eflujo selectivo (metabólicamente, es decir energéticamente, más conveniente que los mecanismos específicos de influjo y restricción) (Navarro *et al.*, 2007).

Por lo que las proteínas pueden acumular y/o tolerar metales pesados como Fe, Cu, Mn, Zn y Mg (Navarro *et al.*, 2007).

- Quelación: Es el secuestro de los metales contaminantes mediante la unión a ligandos específicos (principalmente peptídicos) producidos por la propia planta. El metal se rodea de los ligandos formando un complejo. Los ligandos

simples, como el agua, sólo forman un enlace con el átomo central, y se llaman monodentados o monocoordinados. La planta utiliza este mecanismo de complejación en el interior de la célula para detoxificar (amortiguar) los metales pesados, uniendo a ellos ligandos para formar complejos. De esta manera, el metal queda inmerso en una interacción química que le mantiene en equilibrio electrónico (complejado), pero que no lo deja fuera del metabolismo, no se ha eliminado del citoplasma de la célula y, por consiguiente, sigue siendo potencialmente tóxico. Los metales pesados muestran gran afinidad por determinados grupos funcionales como principales ligandos, como grupos sulfhidrilo, radicales amino, fosfato, carboxilo e hidroxilo. Los ligandos que utiliza son básicamente aminoácidos y ácidos orgánicos, y más específicamente, dos clases de péptidos: fitoquelatinas y metalotioneinas. Entre los aminoácidos y los ácidos orgánicos se encuentran los ácidos cítrico y málico, las histidinas, así como la cisteína (Navarro *et al.*, 2007).

- Metalotioneinas (MTs): Fueron las primeras proteínas identificadas (en mamíferos) como transportados de Cd. Son polipéptidos de unos 70-75 aminoácidos con un alto contenido de cisteínas, aminoácido capaz de formar complejos con cationes mediante el grupo sulfhidrilo que posee como radical. Se cree que son las responsables esenciales de la quelación de metales pesados en el citoplasma de las células de mamíferos y bacterias, pero se piensa también que no son proteínas tan decisivas en el proceso de quelación de metales pesados en plantas (Navarro *et al.*, 2007).
- Fitoquelatinas (PCs): Son ligandos de alta afinidad que complejan metales pesados. Se identificaron después que las MTs. Se piensa que las fitoquelatinas pueden desempeñar en plantas el papel equivalente al que las metaloteinas desempeñan en mamíferos y bacterias. Las fitoquelatinas se inducen rápidamente en plantas por tratamiento con metales pesados. Su disminución provoca una mayor sensibilidad a metales pesados, por tanto, su papel en la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas es crítico.

El glutati6n es el sustrato para la biosíntesis de las PCs. Además de que ayuda a la tolerancia y acumulación de Cd, también es importante para la acumulación

de metales como Zn, Cr, Cu y Pb. Es importante señalar que el Cd es un efector positivo de la síntesis de fitoquelatinas (Navarro *et al.*, 2007).

Las PCs se sintetizan en el citosol, donde se unen a compuestos metálicos formando complejos. Sin embargo, técnicas de HPLC y rayos X detectan mayores concentraciones de metal y PCs en el interior de la vacuola, por lo que se deduce que el transporte y acumulación en su interior están implicados en tolerancia y detoxificación. En consecuencia, parece ser que el paso final en el proceso de detoxificación, esto es, desde la movilización del metal del suelo a las raíces hasta llegar al interior de las células tanto de la raíz como de las hojas, es la compartimentalización vacuolar (Navarro *et al.*, 2007).

- **Compartimentalización vacuolar:** El eflujo de iones y el transporte al interior de la vacuola constituyen dos maneras diferentes de conseguir el mismo objetivo: reducir la concentración de metales tóxicos en el citoplasma. La diferencia entre ambos, es que mientras en el primer caso no es una garantía de que el problema de la toxicidad esté resuelto, en el segundo caso sí lo es. Además del bien documentado proceso de acumulación, de los complejos PCs-Cd en vacuola, hay evidencias de acumulación de otros metales, involucrando diferentes sistemas de transporte desde el tonoplasto como Zn, Ni, Pb, Mn o Co (Navarro *et al.*, 2007).
- **Biotransformación:** Al conjunto de cambios metabólicos por medio de los cuales los tejidos incrementan la polaridad de un tóxico, o a la transformación química de un compuesto en el organismo, se le denomina biotransformación. Para reducir la respuesta tóxica de una sustancia en un organismo hay que disminuir la cantidad de sustancia de forma activa (tóxica) y el tiempo de permanencia de la misma en el sitio de acción. Esto se logra incrementando la polaridad ya que ello aumenta la difusibilidad del tóxico y por tanto puede incrementar la velocidad de excreción (Navarro *et al.*, 2007).

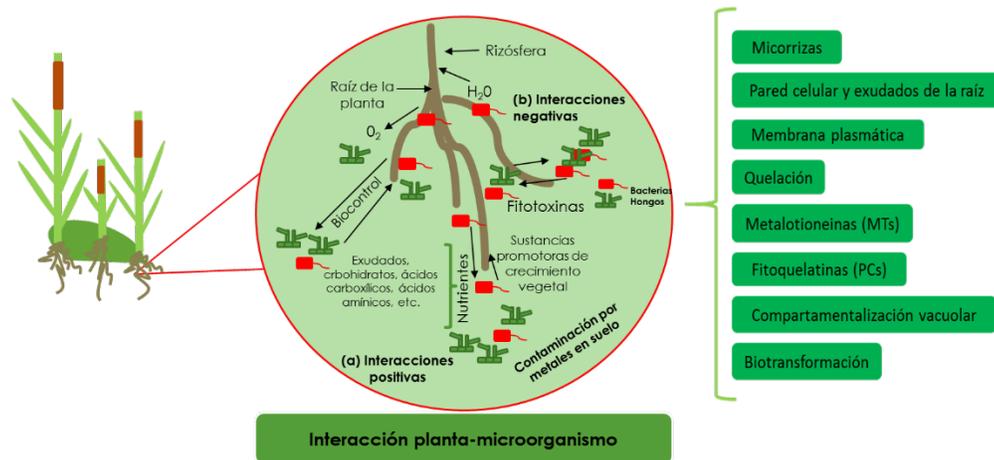


Figura 1. Aspectos de interacción planta-metal relacionados con tolerancia y detoxificación de metales pesados (Basada en Virgen, 2016 y modificada por Moctezuma, 2017).

2.9 Bacterias endófitas y su potencial biotecnológico

Las bacterias endófitas son llamadas así debido a que hacen vida naturalmente en los tejidos internos de las plantas, llevando a cabo la colonización de los espacios intracelulares sin generar ningún efecto negativo para la planta que las hospeda. Prácticamente todas las plantas están colonizadas por una diversidad de bacterias endófitas. Estas bacterias pueden ser detectadas en un momento particular dentro de los tejidos de plantas aparentemente sanos (Schulz y Boyle, 2006). La mayoría de las endófitas colonizan diferentes compartimentos de la planta como apoplasto, incluyendo los espacios intercelulares de las paredes de las células y vasos del xilema. Se ha demostrado que las bacterias endófitas se encuentran asociadas a diferentes tejidos de plantas leñosas, incluidas gimnospermas y angiospermas (Chanway, 1998).

Algunos estudios demuestran que las bacterias endófitas pueden llegar a ser fundamentales para la supervivencia de las plantas, ya que las ayudan a controlar ataques patógenos, insectos y nemátodos (Hallmann *et al.*, 1998) debido a que tienen la capacidad de identificar la presencia de estos organismos de manera rápida y contribuyen al desencadenamiento del fenómeno de inducción del sistema de resistencia (ISR) de las plantas (Kloepper *et al.*, 2006).

Por otra parte, se ha encontrado que las bacterias endófitas favorecen el proceso de germinación de semillas y estimulan el crecimiento de las plántulas a establecerse de manera más rápida en ambientes adversos (Bent, 1998). Algunas bacterias son capaces de colonizar los órganos reproductores de las plantas, por

ejemplo, flores, frutos y semillas (Stone *et al.*, 2000), y pueden llegar a formar infecciones discretas dentro de los tejidos de plantas sanas para todo o casi todo su ciclo vida (Limsuwan *et al.*, 2009). Además, llegan a producir numerosos reguladores del crecimiento vegetal, actuando como protección de plantas a fitopatógenos por el control o inhibición de estos, mejorando la estructura del suelo, los procesos de biorremediación de suelos contaminados por el secuestro de metales pesados tóxicos y compuestos xenobióticos dentro los tejidos vegetales (Ahemad, 2012).

Los beneficios descritos, se posibilitan gracias a la capacidad de las bacterias para sintetizar sustancias metabólicas como antibióticos y fungicidas, al igual que otros metabolitos secundarios que incluyen compuestos anticarcinogénicos, compuestos volátiles orgánicos, antivirales y agentes inmunosupresores (Lodewyckx *et al.*, 2002). También, se han encontrado bacterias endófitas resistentes a metales pesados, capaces de degradar compuestos orgánicos complejos y herbicidas (Ryan *et al.*, 2008; Germaine *et al.*, 2008).

Borges *et al.*, (2009) sugieren que los microorganismos endófitos pueden haber desarrollado un sistema genético que les permite transferir información entre ellas y la planta hospedera. Algunos endófitos son capaces de sintetizar sustancias biológicamente activas similares a los metabolitos secundarios producidos por la planta hospedera (Wang y Dai, 2011). Dichas propiedades pueden ser ampliamente utilizadas en el área biotecnológica, garantizando beneficios. Los microorganismos endófitos asociados a especies vegetales han sido reportados como productores de una diversidad de compuestos bioactivos con múltiples usos (Strobel, 2003).

2.10 Uso de bacterias endófitas en la fitorremediación

Las bacterias endófitas asociadas a especies vegetales hiperacumuladoras favorecen la eficiencia del proceso de fitorremediación y aumentan la producción de biomasa vegetal mediante tres mecanismos: (1) incremento de la superficie de la raíz y la producción de pelos radiculares, (2) incremento de la disponibilidad de los metales, (3) Incremento en la transferencia de metales solubles desde la rizósfera hasta los diferentes tejidos de la planta (Weyens *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2011).

Por otra parte, estas bacterias endófitas pueden promover el crecimiento vegetal y jugar un papel importante durante el proceso de remoción y extracción del metal. Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal producen fitohormonas como el ácido indolacético (AIA) que suprime el estrés en las plantas por la producción de etileno (debido a la ACC desaminasa). Además, mejoran el estado nutricional de la planta debido a la presencia de actividades como la fijación de N₂, solubilización de PO₄⁻ y la producción de sideróforos (Sessitsch *et al.*, 2013).

Las bacterias endófitas interactúan estrechamente con su huésped dentro de los tejidos internos de plantas, en comparación con los microorganismos de la rizósfera y la filósfera (Weyens *et al.*, 2009). Las interacciones entre endófitos y plantas hiperacumuladoras ha tenido mucho interés en los últimos años para el estudio de la composición de las comunidades bacterianas que viven en un nicho con impactado por la presencia de metales pesados y la posible aplicación de procesos biotecnológicos en la biorremediación (Idris *et al.*, 2004; Barzanti *et al.*, 2007; Mengoni *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2010).

Con base a lo anterior, algunas bacterias endófitas asociadas a la especie vegetal del género *Populus* han sido caracterizadas por su uso potencial en proceso de fitorremediación (Moore *et al.*, 2006), un ejemplo es el uso de *Burkholderia cepacia* G4 que incrementa la tolerancia de las plantas al tolueno (Van Der Lelie, 2005) y de *Methylobacterium populum sp nov. BJ001* como participante de la biodegradación de compuestos, tales como: 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina (HMX) y octahidro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine (RDX) (Van *et al.*, 2004).

Madhaiyan *et al.*, (2007), demostró que la bacteria *Burkholderia sp* reduce la acumulación de cadmio y plomo en raíces y brotes en plántulas de tomate como también del metal que está disponible en el suelo y estos es debido a la absorción y bioacumulación del metal por parte de la bacteria. Estudios realizados por Zhang *et al.* 2011, confirmaron que las bacterias endófitas resisten a diferentes concentraciones de plomo y producen la enzima ACC deaminasa en la especie vegetal *Allysum serpyllifolium*, la cual confieren tolerancia al metal dentro de la planta mediante la

síntesis del etileno endógeno producido por la planta debido al estrés ocasionado por el metal.

De esta manera, mediante las asociaciones planta-bacteria se ha reportado el aceleramiento en la fitoremediación de suelos contaminados con metales pesados, principalmente debido a la promoción de crecimiento de las plantas y la aceleración de los procesos de fitoextracción (Grandlic *et al.*, 2008; Kuffner *et al.*, 2008; Kidd *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2011, 2009; Compant *et al.*, 2010; Dary *et al.*, 2010).

2.11 Descripción de *Typha latifolia* (Espadaña)

Typha latifolia (Espadaña) es una planta que cumple con las características necesarias para ser empleada en las técnicas de fitoextracción. Pertenece a la familia *Typhaceae* orden de las *Typhales* y subclase *Commelinidae*. Es una planta cosmopolita, perenne, rizomatosa, de 1-3 metros de altura. Sus tallos son cilíndricos y tiene hojas basales, lineares, de más de 15 mm de anchura. Las flores son unisexuales dispuestas en un espádice compacto con aspecto de puro. Las femeninas tienen la parte inferior más ancha y de color oscuro o negro, y las masculinas en la parte superior son más estrechas y amarillentas. Ambas partes de la inflorescencia aparecen normalmente contiguas, sin dejar espacio entre ellas. La floración ocurre entre junio y agosto, el fruto de *Typha latifolia* es de color castaño oscuro, cilíndrico de superficie aterciopelada (Figura 1) (Ye *et al.*, 2001).

Esta especie vegetal, generalmente es capaz de producir 2.9 Kg/m² de biomasa ya que posee altas velocidades de crecimiento y reproducción (Kaene *et al.*, 1999). Se localiza principalmente en suelos inundados en orillas de cursos de agua, charcas y canales. Normalmente, *Typha latifolia*, no es una planta que se emplee para consumo humano, sin embargo, en algunos lugares de Australia, China y América, las hojas jóvenes se utilizan como condimentos; los brotes se comen crudos o cocidos. Actualmente, su resistencia a medios anóxicos y con altos grados de contaminación ha inducido su aplicación en el campo de la fitoremediación, en particular en sistemas de aguas residuales como los humedales artificiales y sistemas de filtros de macrofitas en flotación (Simpson, 2005).

Carranza-Álvarez (2005) determinó que *T. latifolia* tiene la capacidad de acumular 37 mg de Pb por Kg de peso, 110 mg Cr /Kg, 1651 mg Mn /Kg y 669 mg Fe/Kg. Por otra parte, Pecina-Martínez (2008) reportó que plantas de espadaña propagadas en condiciones de invernadero presentaron la capacidad de remover 0.35, 0.81 y 1.24 ppm de cadmio cuando fueron expuestas a 0.85, 1.73 y 2.55 ppm del metal respectivamente. Además de remover 0.0935, 0.1505, 0.29 y 0.349 mg de cromo (VI) cuando se sometieron a tratamiento con 0.154, 0.309, 0.637 y 1.176 mg de cromo respectivamente.

Así también Pavanelli-Gazzoni (2009) demostraron que la contaminación del suelo y agua con petróleo no afecta el desarrollo de la espadaña. Mediante espectroscopia de fluorescencia y cromatografía de gases comprobaron la contribución de un cultivo de *Typha latifolia* en suelos contaminados por petróleo para eliminar hidrocarburos totales de este, como lo son fluoreno, fluoranteno, benzo-[a]-antraceno y benzo-[b]-fluoranteno, aunque no fue posible definir si hubo absorción de contaminantes o degradación por la planta.

Además, Velázquez *et al.* (2008), mostraron que la captación del Cd²⁺ por raíces de *Typha latifolia*, tiene lugar por un intercambio de protones, eliminándose dos protones por M^{z+} acumulado. Además de que la captación es independiente del estado de la raíz. Sin embargo, indicaron que la captación de Pb²⁺ tiene lugar por un mecanismo diferente, además de que la captación de este metal cambia dependiendo si la exposición se realiza con la planta "viva" o "inerte".

Sassmaz *et al.*, (2008) estudiaron la absorción de metales de *Typha latifolia* y la transferencia de estos de las raíces a las partes de la planta en un lago de Elazig, Turquía, demostrando así que *T. latifolia* podría ser considerado como un bioindicador o un bioacumulador para sedimentos y agua contaminados por metales.

Por otra parte, se han realizado estudios de remoción de compuestos orgánicos como el 2,4-Diclorofenol en solución por plantas de *T. latifolia* (Rodríguez-Hernández, 2009), en los cuales se determinó una tolerancia a 10 mg/L del compuesto. Es importante mencionar que todos estos estudios se han realizado con plantas completas en condiciones de vivero o hidroponía, sin embargo, para poder entender

los mecanismos de interacción planta-bacteria, es fundamental contar con plantas libres de patógenos y en condiciones controladas. Esto puede lograrse a través de una técnica biotecnológica denominada cultivo de tejidos vegetales.

2.12 Cultivo de tejidos vegetales

El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) se define como el conjunto de técnicas que permite el establecimiento, mantenimiento y desarrollo de cualquier parte de una planta, desde una célula hasta un organismo completo, bajo condiciones artificiales, axénicas y controladas, ejerciendo así, un control relativo sobre los procesos morfogénéticos, fisiológicos y bioquímicos que se llevan a cabo en los tejidos bajo estudio (Abdelnour y Vincent, 1994; Pérez et al., 1999).

El CTV se basa en la teoría de la totipotencia implícita en la teoría celular de Schleiden y Schwann, emitida en 1838 y 1839. Esta teoría establece que la célula es una entidad autónoma y totipotente la cual, al ser separada de un organismo multicelular y cultivada bajo condiciones asépticas en presencia de una dieta balanceada de nutrientes y hormonas, esta célula puede crecer, dividirse, diferenciarse y organizarse en tejidos y órganos regenerando así, una planta completa (Abdelnour y Vincent, 1994; Hernández y Martínez, 2011).

Es por ello, que el CTV es una herramienta invaluable para la resolución de problemas básicos y aplicados en la biología vegetal, ya que por una parte ofrece una serie de sistemas modelo ideales para la investigación fisiológica, bioquímica, genética y estructural, y por otro lado tiene una aplicación práctica en la clonación, conservación y manipulación *in vitro* de cualquier material vegetal (Pérez et al., 1999). Una herramienta del CTV es la micropropagación, a través de la cual se pueden propagar cientos de plantas en un corto periodo de tiempo.

2.12.1 Ventajas del CTV

Con el CTV se puede inducir la multiplicación asexual, *in vitro* de plantas a partir de un explante como el meristemo, callo, células de suspensión, etc. (García et al., 2004). Esta técnica debido a sus importantes ventajas sobre los métodos tradicionales de propagación ha logrado una rápida aceptación en la industria y se está aplicando tanto

en especies hortícolas como en ornamentales. Entre las ventajas que tiene esta técnica biotecnológica se puede citar: a) se trata de un sistema de propagación clonal, es decir, que mantiene todas las características genotípicas del material vegetal seleccionado; b) posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en un tiempo relativamente corto; c) mayor control sanitario del material que se propaga es decir, obtención de plantas libres de bacterias, hongos e incluso libres de virus; d) facilidad de transportar el material *in vitro*; y f) posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual existen pocos individuos (Abdelnour y Vincent, 1994; Pérez *et al.*, 1999).

El CTV de cualquier especie vegetal consta de varias etapas básicas, las cuales son fundamentales para su éxito. A continuación, se describen dichas etapas:



Figura 2. Etapas del cultivo de tejido vegetal (CTV).

Etapa 0. Selección de la planta madre. Se trata de una etapa preparativa, en la cual se seleccionan y acondicionan las plantas madre que serán utilizadas para iniciar los

cultivos *in vitro*. Para obtener explantes sanos y con un grado de desarrollo adecuado, es necesario partir de una planta élite con características deseables superiores al promedio. Además, de elegir correctamente el material vegetal es necesario efectuarle ciertos pretratamientos que disminuyan la probabilidad de contaminación microbiana, el primero consiste en trasladarla a un ambiente higiénico y sanearla con fungicidas o bien, cambiar el estado fisiológico de la planta mediante cambios en la temperatura, iluminación, fotoperíodo, fertilización, aplicación de reguladores de crecimiento o podas severas para su rejuvenecimiento.

Etapa I. Establecimiento de los cultivos axénicos. Esta etapa consiste en la elección del explante y la esterilización del mismo para establecer cultivos viables y axénicos. El éxito de esta etapa está determinado por la edad de la planta donante, la edad fisiológica, el estado de desarrollo y el tamaño del explante. Los principales procesos a controlar en esta etapa son la desinfección del material vegetal seleccionado y el establecimiento del cultivo inicial o primario. En esta etapa se induce el desarrollo de células meristemáticas o no meristemáticas para dar lugar a embriones somáticos o brotes adventicios.

Etapa II. Selección del medio de cultivo. Los requerimientos nutricionales básicos de los tejidos vegetales cultivados *in vitro* son muy similares a los utilizados por las plantas completas (Chawla, 2002). Algunos de los nutrientes que requieren los tejidos vegetales para su crecimiento y morfogénesis son compuestos orgánicos e inorgánicos, vitaminas, fitohormonas (reguladores de crecimiento) y otras sustancias complejas (Razdan, 2003; Chawla, 2002). Por lo tanto, la elección del medio de cultivo y la mezcla de nutrientes adecuada determina en gran medida el éxito o el fracaso de los cultivos *in vitro* (Pérez *et al.*, 1999; Mather y Roberts, 1998).

En la actualidad, se han desarrollado una gran cantidad de medios de cultivo diferentes que cumplen con los requerimientos nutricionales necesarios para los tejidos vegetales cultivados *in vitro*. Los medios de cultivo más utilizados para la regeneración de plantas *in vitro* son el MS (Murashige y Skoog 1962), el LS (Linsmaier y Skoog 1965) y el medio

B5 (Gamborg 1968). Otros medios que se utilizan frecuentemente son el NN (Nitsch y Nitsch 1969) y el N6 (Chu 1978) (Pérez *et al.*, 1999).

Etapa III. Multiplicación del tejido. En esta etapa es donde se multiplica el número de brotes nuevos a partir de cantidades mínimas de tejido. Existen tres vías para la multiplicación *in vitro*: la organogénesis, la embriogénesis somática y la multiplicación por yemas, ápices y meristemas.

Etapa IV. Elongación y Enraizamiento. En esta etapa se pretende que los brotes obtenidos formen su sistema radical al mismo tiempo que se elonguen para facilitar su manipulación y hacer más probable su adaptación a las condiciones ambientales externas.

Etapa V. Adaptación al medio externo. En esta etapa, las plántulas obtenidas del CTV salen del medio estéril y rico en nutrientes para iniciar su desarrollo en el medio ambiente. Esta etapa es la más compleja en el proceso de micropropagación ya que ocurren pérdidas de las plantas obtenidas debido a que no pueden tolerar el cambio de temperatura y humedad (Roca y Mroginski, 1991; Pérez *et al.*, 1999; Levitus *et al.*, 2010; Tiza, 2010; Zerón, 2015).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Obtención del material vegetal

Con la finalidad de obtener el material vegetal de interés, se colectaron semillas de *Typha latifolia*, provenientes de la inflorescencia de la especie vegetal de plantas adultas ubicadas en humedal natural, aparentemente no contaminado, situado en San Vicente Tancuayalab, municipio del estado de San Luis Potosí, México (21 ° 43 '0 "N, 98 ° 35' 30" O). Las semillas fueron identificadas y transportadas en bolsas de papel al Laboratorio de Investigación en Ciencias Ambientales de la UAMZH de la UASLP. Una vez disponiendo de las semillas, éstas se sometieron a un proceso de asepsia para iniciar con el cultivo de tejidos vegetales de esta especie vegetal. Para ello, se probaron dos tratamientos (A y B) con distintos agentes químicos (**Ver anexo 1**).

3.2 Lavado y esterilización de material empleado

Se utilizaron frascos de cultivo de vidrio de diferentes capacidades (100, 200 y 500 mL), los cuales se lavaron con agua y jabón, enseguida se enjuagaron con agua corriente, y se desinfectaron sumergiéndolos durante 24 horas en solución de hipoclorito de sodio comercial al 20%. Posteriormente, se enjuagaron con agua corriente y después con agua destilada y fueron sometidos a un periodo de secado y esterilización en la estufa de convección (Lindberg/Blue, Ashville, NC, USA) a 200°C por 20 minutos.

Finalmente, todo el material empleado (pinzas metálicas, vasos de precipitado, agua destilada, palillos de madera, asa bacteriológica) se esterilizaron en la autoclave (Felisa, modelo FE-399. Serie 1311120) a 121°C, durante 15 minutos. Los frascos se resguardaron del polvo en bolsas de plástico hasta su uso.

Todo el material de vidrio, polipropileno y polietileno de alta densidad (HDPE) empleado para el análisis de metales se lavó con agua desionizada y posteriormente se sumergió en HNO₃ (CAS: 7697-37-2, CTR Scientific, México) al 10% v/v durante 24 h. Finalmente, el material se enjuagó con agua desionizada y se secó a temperatura ambiente al abrigo del polvo.

3.3 Preparación de medios de cultivo

Para el cultivo *in vitro* de *T. latifolia*, se empleó el medio de cultivo comercial Murashige–Skoog (MS; Murashige & Skoog 1962, Phytotechnology®), el cual se preparó disolviendo 4.43 g del medio, y se enriqueció con 3% de sacarosa comercial, por litro de solución preparada. El pH se ajustó a 5.7 – 6.8 con NaOH o HCl 1 N por medio de un potenciómetro. Para la preparación del medio semisólido se añadieron 4.4 g de Phytigel por litro de medio basal y, finalmente se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Respecto a la evaluación de la remoción de Cd (II) por *T. latifolia* se empleó el medio Hoagland (No. 2 Basal Salt Mixture, Lote # SUMM2242V, SIGMA Life Science), el cual se preparó disolviendo 16 g del medio por litro de solución, ajustado a un pH de 6.0 y una fuerza iónica de 0.05 M con NaNO₃ (A.C.S. Fermont).

Para garantizar la viabilidad de los aislados bacterianos se preparó medio de cultivo Luria Bertani (LB) a un quinto de concentración, de manera que se utilizaron 5 g por cada litro de solución. Los aislados GRC093 y GRC140 fueron resembrados y posteriormente se evaluó el efecto de estos en el proceso de fitoextracción.

De la misma manera, se prepararon medios de cultivo LB, adicionados con diferentes concentraciones de Cd (II), desde 5-100 ppm, evidenciando la capacidad de tolerancia al metal (**Ver anexo 2**).

3.4 Establecimiento del cultivo *in vitro* de *T. latifolia*

Para establecer el cultivo *in vitro* *T. latifolia* y contar con plántulas para los experimentos del efecto de los aislados bacterianos sobre la remoción de Cd (II), se utilizaron semillas como explantes. Para ello, se probaron los distintos tratamientos de asepsia descritos en el Anexo 1.

Una vez obtenido el protocolo de asepsia, se procedió a establecer el cultivo *in vitro* de *T. latifolia* en condiciones controladas. En la campana de flujo laminar con luz UV (ESCO Laminar Flow Cabinet), las semillas colocadas en agua estéril se tomaron con pinzas de metal, y se sembraron (aproximadamente 100 semillas) sobre toda la superficie de medios de cultivo Murashige & Skoog- basal medium (MS). Al término de

la siembra en los frascos con medio de cultivo fueron tapados y sellados. Posteriormente, se etiquetaron y se colocaron en el cuarto de cultivo bajo condiciones controladas de temperatura y fotoperiodo (24 °C y 16 hrs luz/8 hrs de oscuridad). En cada siembra se contó con al menos 25 frascos como unidades experimentales, en las cuales se evaluó semanalmente, el porcentaje de germinación, oxidación y contaminación; así como la altura, número de hojas y raíces por cada plántula formada.

3.5 Cultivo y crecimiento de aislados bacterianos

Como aislados bacterianos se utilizaron *Pseudomonas* endófitas de la raíz de *Typha latifolia* previamente obtenidos por Rolón-Cárdenas, 2015. Para garantizar la viabilidad de los aislados bacterianos se preparó medio de cultivo Luria Bertani (LB) a un quinto de concentración, y se resembraron los aislados GRC093 y GRC140 para posteriormente evaluar el efecto de dichos aislados en el proceso de fitoextracción (**Ver anexo 2**). De la misma manera, se prepararon medios de cultivo LB, adicionados con diferentes concentraciones de Cd (II), desde 5-100 ppm, evidenciando la capacidad de tolerancia al metal.

3.6 Efecto del Cd (II) en la germinación de semillas de *T. latifolia*

Para llevar a cabo la evaluación del Cd (II) en la germinación de *T. latifolia* se sembraron 20 semillas previamente asépticas en frascos de vidrio tipo Gerber con medio de cultivo Murashige–Skoog (MS; Murashige & Skoog 1962, Phytotechnology®), suplementado con distintas concentraciones del metal (5, 10, 25, 50, 75 y 100 ppm).

Se contó con tres frascos por cada concentración evaluada. Las semillas sembradas se colocaron en la cámara ambiental (Prendo CA-6), en donde se evaluaron cada 24 horas durante un periodo 10 días para determinar el efecto de la concentración de Cd (II) sobre la germinación. Se evaluó el porcentaje de germinación, índice de crecimiento y longitud de la radícula de las plántulas utilizadas en cada tratamiento. Después del tiempo de evaluación, los frascos utilizados se colocaron en el cuarto de cultivo y se observó durante 20 días más. Este experimento se realizó por triplicado para verificar la confiabilidad de los resultados.

3.7 Efecto de la inoculación de *Pseudomonas* tolerantes a Cd (II) en el proceso de fitoextracción

Para evaluar el efecto de *Pseudomonas* endófitas de la raíz de *T. latifolia* en el proceso de fitoextracción de Cd (II), se diseñó un modelo experimental en el cual se utilizaron distintas concentraciones del metal.

A partir de una solución stock de 1000 ppm de Cd (como CdCl₂, Sigma) se prepararon 20 mL de solución Hoagland, adicionada con distintas concentraciones de Cd (5, 10, 25, 50, 75 y 100 ppm). Cada una de las soluciones se ajustó a un pH de 6.0 y una fuerza iónica 0.05 M, utilizando NaNO₃ (A.C.S. Fermont); una vez preparadas, las soluciones se colocaron en tubos de vidrio de 20 cm. En cada tubo se colocaron plántulas de *T. latifolia* de 12-14 cm de altura provenientes del cultivo *in vitro*. Cada tubo se tomó como una unidad experimental y se contó con tres repeticiones por cada concentración de cadmio. Las plántulas en estas condiciones de cultivo se mantuvieron durante 10 días en el cuarto de cultivo, y se tomaron muestras a partir del día 0, 5 y 10 de experimentación para evaluar la remoción del metal.

El mismo experimento fue realizado, pero con la adición de los aislados endófitos GRC93 y GRC140, considerando 1.5x10⁸ UFC/ml. Como soluciones control se utilizaron: control de solución de Cd (libre de planta), control planta (libre de la concentración del metal), control con la concentración del metal más el aislado bacteriano, pero sin la presencia de la planta y por último el control con la concentración del metal, adición del aislado bacteriano, medio Hoagland, pero sin la planta.

Al inicio y final del experimento se llevó a cabo el registro del pH, así como la forma y aspecto tanto de las hojas como de las raíces de las plantas. Además, se tomó un fragmento de tejido aéreo al inicio y final del experimento y se determinó la concentración de clorofila total. Al final del experimento, las plántulas fueron retiradas de las soluciones y se sometieron a un proceso de digestión ácida.

3.8 Evaluación de los parámetros de fitotoxicidad en la fitoextracción de Cd (II) en plantas con y sin aislados bacterianos

Los parámetros que se evaluaron para determinar la fitotoxicidad de las diferentes concentraciones del metal fueron el aspecto, el índice de crecimiento (IC) y el contenido de clorofila.

3.9 Índice de crecimiento en plantas de *T. latifolia* expuestas a diferentes concentraciones de cadmio (II)

Después de los 10 días de experimentación, las plantas se retiraron de las soluciones, y se midieron para determinar el índice de crecimiento. Esta determinación se realizó considerando la talla inicial y final de la planta al término de la exposición, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de Crecimiento} = \frac{\text{talla final}}{\text{talla inicial}}$$

3.10 Cuantificación de clorofila

A las plantas *T. latifolia* se les determinó la concentración de clorofila, por el método propuesto por Arnon (1949), solo en el caso del experimento final. Para ello se utilizó una sección de hoja de cada una de las plantas colectadas (1-2 mg de cada una). En un cuarto oscuro, las muestras de hojas fueron trituradas en un mortero, utilizando 8 mL de Acetona (CTR Scientific), el cual se colocó en una bandeja con hielo (condiciones frías) para evitar su evaporación; se trituró y posteriormente se filtró, utilizando una bomba de vacío y un matraz kitazato. La solución obtenida se colocó en un tubo Falcon de 15 ml, con la finalidad de obtener un volumen final de 10 ml, una vez que obtenido ese volumen se colocó en un tubo de ensaye, previamente etiquetado y cubierto con papel aluminio para evitar la exposición a la luz. Finalmente, se midió la absorbancia de cada solución filtrada mediante espectrofotometría UV-Visible (Thermo Fisher Scientific Aquamate Plus UV-Vis, Wisconsin, USA) a una longitud de onda de 652 nm, utilizando como blanco acetona.

Una vez que se determinó la absorbancia se calculó el porcentaje de clorofila contenida por cada gramo de la planta, mediante la fórmula correspondiente:

$$\text{mg clorofila en g muestra} = \frac{A (27.8)(\text{mL de extracción})}{(\text{g muestra}) (1000)}$$

Donde:

A es la absorbancia de la muestra

27.8: Coeficiente de Absorción (Suma de los coeficientes de Clorofila a y b)

1000: Factor de Dilución

mL de extracción: mililitros que se obtuvieron al extraer con acetona

g muestra: peso utilizado de la muestra

3.11 Digestión ácida del tejido radicular y aéreo de *T. latifolia*

Una vez finalizado el experimento, se aplicó un proceso de desorción de metales por tratamiento con EDTA (0.1 M). Las plántulas se seccionaron en raíz y tejido aéreo, y se sometieron a un proceso de secado durante 12 horas a 70° C en una estufa de convección (Lindberg/Blue, Ashville, NC, USA). El material seco fue triturado con ayuda de un mortero de porcelana (por el tamaño de la muestra) a fin de homogeneizar la muestra y se mantuvieron bajo el abrigo del polvo y la luz.

Posteriormente, el material vegetal seco y pulverizado se sometió a un proceso de digestión ácida asistida por microondas (closed-vessel, Multiwave PRO, Anton Paar, Austria). Para ello, se pesaron 3 mg de tejido vegetal y se colocaron en tubos fabricados de una combinación TFM y PTTE (liners) de 100 ml de capacidad, se adicionaron 7 ml de HNO₃ concentrado (CAS: 7697-37-2, CTR Scientific, México) y 1 ml de HCl concentrado (CAS 7647-01-0, Lote: 17799, Karal, México) y se montaron en el sistema de digestión asistida por microondas. Una vez digeridas las muestras, se ajustaron a un volumen de 15 ml con agua destilada y posteriormente se cuantificó el contenido de cadmio por Espectrofotometría de Absorción Atómica.

3.12 Digestión del medio de cultivo (Hoagland)

Con la finalidad de determinar el proceso de fitoextracción de Cd (II) por *T. latifolia*, además de cuantificar el metal en el tejido vegetal de la planta, se tomaron muestras de 3 ml del medio de cultivo (Hoagland), en frascos de plástico HPDE al día 0, 5 y 10

de experimentación de cada una de las concentraciones utilizadas, así como las soluciones control. Estas muestras fueron tomadas con micropipetas y bajo condiciones estériles, en la campana de flujo laminar con luz UV (ESCO Laminar Flow Cabinet). Una vez obtenidas las muestras, se tomaron 500 µl y se le adicionaron 2 ml de agua acidificada con HNO₃ concentrado (CAS: 7697-37-2, CTR Scientific, México) al 50%, en dilución (1:4) en tubos cónicos de 15 ml (CAPP Denmark. BluCapp Centrifuge Tubes). Posteriormente, se realizó la digestión ácida en la autoclave (Felisa, Modelo FE-399. Serie 1311120) a 121°C, durante 30 minutos, basado y modificado de CEN (2003).

Cabe mencionar que antes de definir la utilización de estos tubos, se realizaron distintas pruebas para definir el tipo de recipientes a utilizar, debido a que por el largo periodo a alta temperatura (121°C, durante 30 minutos), los frascos HPDE y tubos de la misma marca, pero de capacidad de 50 ml, no resistían este periodo de digestión ácida, ya que se deformaban después de digerir el medio de cultivo o presentaban rotura de la tapa y con ello la pérdida de muestra, por tanto no se pudieron utilizar para este procedimiento.

3.13 Elaboración de la curva estándar de Cd total por Espectrofotometría de absorción atómica

Se realizó la curva de calibración de cinco puntos, utilizando estándares de 0, 0.5, 1, 2.5, 5 y 7.5 mg/L de Cd, a partir de una solución stock grado absorción atómica certificada (Cadmium AA standard certified, Lote: 4402170, Ricca Chemical Company, Arligton, Texas, USA).

Los estándares utilizados fueron aforados a 100 ml (0, 0.5, 1, 5 y 7.5 ppm) y a 50 ml (2.5 ppm), utilizando micropipetas eppendorf (Research Plus, Lote: C127393P, Alemania) de 20-200 µl y 200-1000 µl de capacidad y matraces volumétricos certificados clase A de acuerdo al estándar ASTM E542 (No. 5680, Serie: CF22455, Juego maestro de pesas 96-080246 rastreado a CENAM/NIST, Pyrex, México).

El equipo de EAA se calibró y operó para el análisis a una longitud de onda de 228.8 nm. Se tomó como ajuste aceptable para validar la calibración un valor de

$R^2 \geq .995$ y un porcentaje de recuperación igual o mayor del 90 %. Como control analítico se leyó un estándar certificado de Cd (Cadmium AA standard certified, Lote: 4402170, Ricca Chemical Company, Arlington, Texas, USA) y blanco de análisis de HNO₃ al 30%, cada 50 muestras.

3.14 Análisis estadístico

Todos los valores obtenidos en la fitoextracción, daño fitotóxico, metal absorbido, así como los parámetros medidos en la propagación de las especies vegetales cultivadas *in vitro* fueron analizados con los programas estadísticos SIGMAPLOT y el software STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc., USA, 2007), realizando un Análisis de Varianza (ANOVA) para todos los datos obtenidos, así como para obtener las diferencias estadísticamente significativas.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación de las condiciones de pH que influyen en la fitoextracción de diferentes concentraciones de Cd (II) por plantas de *Typha latifolia*

Con la finalidad de establecer las condiciones fisicoquímicas ideales para evaluar el proceso de fitoextracción con Cd (II), se diseñó un experimento independiente en el cual se evaluaron diferentes pH y se determinó el valor óptimo en relación al metal y el medio de cultivo a trabajar (Cd y medio Hoagland, respectivamente).

Para ello, se prepararon soluciones con concentraciones de 5 y 10 ppm de Cadmio (II) a un volumen de 500 ml cada una, utilizando diferentes valores de pH (5.5, 5.7, 6.0 y 6.5), realizando dos réplicas del mismo por cada concentración. La exposición a dichos tratamientos fue de un periodo de 10 días.

Al finalizar el periodo de exposición, se determinó que el valor de pH óptimo fue de 6.0, ya que fue donde se observó menor daño fitotóxico en *T. latifolia* y se evidenció una respuesta favorable en la remoción de Cd (II), lo que permitió también una mayor cuantificación en el tejido radicular de la especie vegetal.

4.2 Evaluación del efecto de la concentración de Cd (II) en la germinación de semillas de *T. latifolia*

Se observó que las semillas de *T. latifolia* germinaron en las concentraciones de 5, 10 y 25 ppm, a partir de la concentración de 50 a 100 ppm ya no se presentaron indicios de germinación alguna (Figura 3). Respecto a las semillas que sí germinaron, solamente se visualizó elongación del embrión con una longitud de 0.5 cm. Lo anterior puede deberse a que las concentraciones mayores o igual a 25 ppm de Cd (II) resultaron tóxicas para la semilla de esta especie vegetal, lo cual incide directamente en la imposibilidad de desarrollo de dicho explante (Tabla 1).

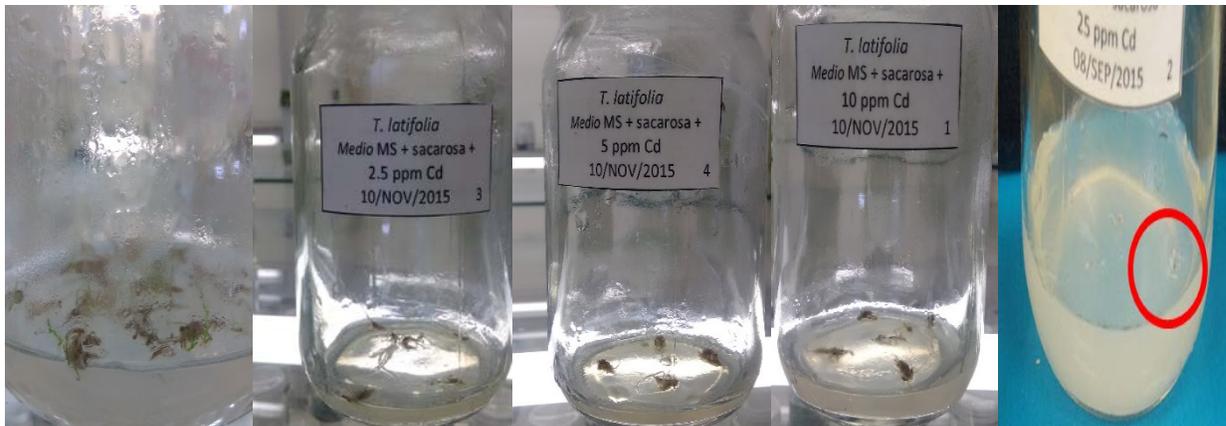


Figura 3. Semillas de *T. latifolia* expuestas a 5, 10 y 25 ppm de Cd (II).

Tabla 1. Evaluación del efecto del Cd en la germinación de semillas de *T. latifolia*

Concentración	Días de evaluación							
	5		10		15		20	
	long. raíz	long. hoja	long. raíz	long. hoja	long. raíz	long. hoja	long. raíz	long. hoja
control	0.5 cm	1 cm	0.7 cm	1.4 cm	1.5 cm	2 cm	2 mm	2.5 cm
5 ppm	0.5 cm	1 cm	0.8 cm	1.2 cm	1.5 cm	1.5 cm	1.6 mm	2.0 cm
10 ppm	0.3 cm	0.8 cm	0.7 cm	1.1 cm	1.2 cm	1.3 cm	1.5 mm	1.5 cm
25 ppm	0.5 cm	1 cm	0.9 cm	1.1 cm	1.2 cm	1.2 cm	1.5 mm	1.4 cm
50 ppm	0.1 cm	---	0.1 cm	---	0.1 cm	---	0.1 cm	---
75 ppm	---	---	---	---	---	---	---	---
100 ppm	---	---	---	---	---	---	---	---

La cubierta seminal o testa provee de cierta protección contra el estrés por metales antes de la germinación; la literatura sugiere que la germinación de las semillas se afecta por los metales de dos maneras: por su toxicidad general y por su inhibición en la absorción de agua. La mayoría de los trabajos reportados muestran que los tratamientos con metales ocasionan una reducción de la germinación dependiente de la concentración de éstos en muchas especies de plantas. Estudios derivados de la exposición de semillas a metales pesados y su relación con la germinación y el desarrollo de las plántulas, muestran que se presenta una variación inter e intraespecífica tanto en la germinación de las semillas, como en la respuesta de las plántulas al estrés por metales (Li *et al.*, 2005; Kranner y Colville, 2011).

Para este caso, las semillas contienen al embrión que es una nueva planta y éstas poseen dos funciones principales: la reproducción y la dispersión; por lo tanto, la formación de las semillas completa el proceso de la reproducción de las plantas y con su germinación, comienza la siguiente generación de plantas, lo cual se imposibilita o dificulta ante la exposición de éstas a diversas concentraciones del metal.

No obstante, el cadmio no es un elemento esencial para las plantas, pero se absorbe y se distribuye rápidamente a través del sistema vascular ocasionando en forma general una depresión del crecimiento de éstas e incluso su muerte. La toxicidad de este elemento en las plantas, presenta varios síntomas; con frecuencia altera los procesos fotosintéticos, la respiración y el metabolismo del nitrógeno; así como también reducen la absorción de agua y nutrientes esenciales (Clijsters y Van Assche, 1985; Barceló y Poschenrieder, 1990; Hart *et al.*, 1998; Ruiz *et al.*, 2009).

Dentro de los efectos que se han observado, están la inhibición de la germinación de semillas y el desarrollo de raíces (Kiran y Sahin, 2006). En varios tratamientos realizados a semillas con Cd se redujo la germinación total (Smiri *et al.*, 2010) y el crecimiento de las plántulas con una correlación negativa entre la concentración del metal y la germinación total. Las afectaciones de la semilla que se han observado en estos tratamientos son mayormente en el crecimiento radical, seguida del crecimiento de brotes y la germinación, siendo esta última afectada

significativamente sólo a concentraciones altas de Cd, causando altos niveles de estrés oxidativo (Schützendübel y Polle, 2002; Kranner y Colville, 2011).

Sin embargo, con concentraciones bajas de Cd se puede observar una ligera estimulación de la germinación que puede atribuirse a un exceso de producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y especies reactivas del nitrógeno (RNS), lo que estimula la germinación (Smiri *et al.*, 2010; Kranner y Colville, 2011).

En ese sentido, los resultados obtenidos en esta investigación, concuerdan con lo anteriormente mencionado, ya que se observó la germinación de semillas de *T. latifolia* en las concentraciones de 5 y 10 ppm.

Por otra parte, los mecanismos de las especies reactivas de oxígeno por metales pesados tales como plomo, cadmio y zinc es poco clara; una posible función de las peroxidasas en el tratamiento de metales pesados es su contribución en plantas acumuladoras de metales, tal es el caso de la especie acuática *Nymphaea* que emplea peroxidasas para producir polímeros fenólicos que atrapan cadmio y lo aíslan en forma de cristales de Ca-Cd en sus glándulas situadas sobre el lado acuático de las hojas (hidropotos) (Lavid *et al.*, 2001). No obstante, las peroxidasas claramente se inducen bajo la presencia de metales pesados y otros químicos tóxicos; sin embargo, éstas se han utilizado como enzimas para monitorear áreas industriales y densamente urbanizadas por su sensibilidad a la contaminación atmosférica, lo que puede clasificarlas como otro de los biomarcadores clásicos; esto se ha observado también con metales pesados presentes en el suelo (Cho y Park, 2000; Geebelen *et al.*, 2002).

La expresión de las peroxidasas da como resultado una defensa en las plantas; ya sea de forma pasiva, con la construcción de paredes celulares fuertes, o activa con la producción de especies reactivas de oxígeno contra el ataque de agentes bióticos (Passardi *et al.*, 2005).

Como un indicador de la fitotoxicidad de metales, varios autores han reportado diferentes índices para biomonitorear estos efectos, uno de ellos está basado en la germinación y desarrollo de las plántulas (Baki y Anderson, 1973; Mhatre y Chaphekar,

1982). La promoción de las raíces es uno de los principales marcadores con los que se mide el efecto benéfico de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (Glick *et al.*, 1995), las fitohormonas estimuladoras del crecimiento de plantas, producidas por este tipo de rizobacterias dentro de la zona radical, incrementan la densidad y longitud de los pelos radicales. El rápido establecimiento de las raíces; ya sea por elongación de las raíces primarias o por la proliferación de las raíces laterales y adventicias, resulta ventajoso para las plántulas conforme incrementan su habilidad de anclaje al suelo y con ello, esto también les permite la absorción de agua y nutrientes (Volkman y Bremer, 1998).

Por lo tanto, la capacidad para explotar las plantas en fitorremediación está restringida por el escaso conocimiento de los caminos metabólicos y los mecanismos de tolerancia de las plantas a los contaminantes (Doran, 2009).

De esta manera, en la presente investigación se evaluó el efecto de los aislados endófitos GR093 y GR140 (*Pseudomonas*) en el proceso de fitoextracción de Cd (II) por *T. latifolia*.

4.3 Establecimiento del cultivo *in vitro* de *T. latifolia*

Se seleccionaron como explantes, semillas previamente colectadas de un sitio no contaminado y que se tenían preservadas en bolsas de papel. Los explantes se lavaron con agua corriente y agua potable para eliminar el exceso de polvo, y luego se sometieron al proceso de asepsia.

Para la desinfección de los explantes, la primera estrategia fue utilizar los desinfectantes probados con anterioridad en el Laboratorio de Ciencias Ambientales como el Captan, nitrato de plata (AgNO_3), hipoclorito de sodio (NaClO). Estudios previos mostraron que una mezcla biocida con Captan y bactericín era muy eficiente para la desinfección de explantes de *Opuntía robusta* proveniente de campo (Astello-García, 2009).

Por otra parte, el NaOCl ha sido efectivo en el proceso de desinfección de explantes de diferentes especies forestales (Carranza-Álvarez 2010; Munguía y Castro, 2012; Zerón, 2014; Sánchez, 2016, Castillo, 2016). Además, el NaClO se ha

empleado en el proceso de desinfección de especies de cactáceas (Elias-Rocha *et al.*, 1999; Santos-Díaz *et al.*, 2001; Santos-Díaz *et al.*, 2003a; Santos-Díaz *et al.*, 2003b; Santos-Díaz *et al.*, 2006; Astello-García, 2009), especies herbáceas (Loredo-Carrillo, 2007) y raíces de plantas acuáticas (Santos-Díaz *et al.*, 2007).

Los explantes de *T. latifolia* se trataron con distintos agentes químicos, probándose dos tratamientos, que consistieron en aplicar cada uno de los agentes químicos en el orden en el que se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Establecimiento del protocolo de asepsia para las semillas de *T. latifolia*

Tratamientos	Agentes químicos	Tiempo (min)	Resultados
Tratamiento A	Captan 1% AgNO ₃ 0.5% Bacterín 5% NaClO al 10% Tween 20 al 1% Agua destilada estéril (3 lavados)	5	% germinación= 88.9 % oxidación= 33.3 % contaminación= 11.1
Tratamiento B	Captan 1% AgNO ₃ 0.5% Bacterín 5% NaClO al 10% Tween 20 al 1% Etanol 70% Agua destilada estéril (5 lavados)	5	% germinación= 100 % oxidación= 25.7 % contaminación=8.6

Los resultados mostraron que con el tratamiento A se obtuvo un 88.9 % de germinación, un 33.3 % de oxidación y un 11.1 % de contaminación caracterizada por levaduras, mientras que para el tratamiento A, se logró un 100% de germinación, y se redujo el porcentaje de oxidación a 25.7 % y la contaminación a un 8.4%.

El porcentaje de contaminación en los cultivos *in vitro* de *T. latifolia* de cada uno de los tratamientos de asepsia utilizados, se evaluó a partir del día 0, 15, 30, 45 y 60, esto con la finalidad de determinar cuál de los dos fue el más efectivo. En este sentido, el tratamiento más adecuado para la asepsia de las semillas de *T. latifolia*, fue el tratamiento B (Tabla 3), en donde se adicionó etanol en la última etapa de la asepsia,

lo que favoreció notablemente la eliminación de los patógenos que principalmente fueron hongos presentes en la semilla.

Se ha descrito que el etanol desnatura las proteínas de las bacterias, destruyendo la membrana celular. Su eficacia está basada en la presencia de agua, ello se debe a que estos compuestos acuosos penetran mejor en las células y bacterias permitiendo así daño a la membrana y rápida desnaturación de las proteínas, con la consiguiente interferencia con el metabolismo y lisis celular. Su acción es rápida, incluso desde los 15 segundos, aunque no tiene efecto persistente. Sus efectos biológicos de daño microbiano permanecen por varias horas (McDonell y Russell, 1999), lo que probablemente sucedió en este caso. De esta forma, las semillas se encontraban libres de contaminantes y fueron capaces de germinar en un 100%.

Tabla 3. Evaluación de los tratamientos de asepsia a los 15, 30, 45 y 60 días de cultivo de *T. latifolia*

TIEMPO	TRATAMIENTO A			TRATAMIENTO B		
	Tipo de contaminante (%)			Tipo de contaminante (%)		
	Bacterias	Levaduras	Hongos	Bacterias	Levaduras	Hongos
0 días	0	0	0	0	0	0
15 días	0	0	8.9	0	0	8.6
30 días	0	0	0	0	0	0
45 días	0	0	0	0	0	0
60 días	0	0	0	0	0	0

Dentro de las principales razones de evaluar parámetros de germinación, contaminación e incluso oxidación en lo que respecta a protocolos o metodologías de asepsia radica la importancia de establecer las condiciones adecuadas para el cultivo de tejidos vegetales, de manera que se logre la ausencia de cualquier organismo contaminante en el medio de cultivo que pudiera afectar los resultados o incluso exterminar el tejido vegetal cultivado.

En lo que respecta a la contaminación microbiana, es considerada uno de los problemas más frecuentes en lo que respecta a la micropropagación de especies

vegetales (Pérez *et al.*, 1999; Digonzelli *et al.*, 2005). Los hongos, incluyendo levaduras o bacterias, son considerados los principales contaminantes presentes en el cultivo de tejido vegetal, aunque no se descarta que los tejidos puedan contener virus, viroides o microplasmas (Pérez *et al.*, 1999).

Por lo tanto, el efecto que estos contaminantes resulta altamente dañino, ya que compiten directamente con el explante por los nutrientes presentes en el medio y producen daño directo e indirecto debido a la colonización de sus tejidos o la eliminación al medio de metabolitos tóxicos (Digonzelli *et al.*, 2005).

La mayoría de los microorganismos contaminantes crecen rápidamente bajo las condiciones en que se cultivan los tejidos vegetales, por lo que su presencia es claramente visible a los pocos días de haberse iniciado el cultivo; sin embargo, existe una pequeña parte de esos contaminantes que resultan de crecimiento lento, debido a que los nutrientes del medio no les resulta apropiado (crípticos o subliminales) y son los responsables en la mayoría de los casos del efecto halo alrededor de los explantes (Pérez *et al.*, 1999).

En ese sentido, la contaminación puede deberse: a) microorganismos que colonizan la superficie o interior del explante (endófitos) y b) fallas en los procedimientos de laboratorio (Digonzelli *et al.*, 2005). En el caso de esta investigación se atribuye el porcentaje de contaminación a fallas en el procedimiento realizado durante la manipulación y realización del protocolo de asepsia.

Otro de los parámetros que fueron evaluados durante la germinación de las semillas de *T. latifolia*, fue el porcentaje de oxidación. Dicha evaluación se llevó a cabo a partir del día 0, 15, 30 45 y 60 días de cultivo (Tabla 4). De acuerdo a los resultados obtenidos se observó que respecto al tratamiento A, fue visible la oxidación a partir de los 30 días de cultivo, mientras que para el tratamiento B el fenómeno se apreció a partir de los 45 días de cultivo, siendo el efecto más retardado y en menor grado, respecto al tratamiento A.

Tabla 4. Evaluación de la oxidación de las plántulas germinadas de *T. latifolia*

TIEMPO	TRATAMIENTO A				TRATAMIENTO B			
	Tipo de oxidación*				Tipo de oxidación			
	0	X	XX	XXX	0	X	XX	XXX
0 días	---	---	---	---	---	---	---	---
15 días	---	---	---	---	---	---	---	---
30 días	---	33.3	---	---	---	---	---	---
45 días	---	---	33.3	---	---	25.7	---	---
60 días	---	---	33.3	---	---	25.7	---	---

*Los valores de oxidación indican: 0= 0% de oxidación sobre el explante, X= 1-33% de oxidación sobre el explante, XX=34-66% de oxidación sobre el explante y XXX=67-100% de oxidación sobre el explante.

La oxidación es un fenómeno que se caracteriza por el oscurecimiento del tejido vegetal, que puede llevar incluso a la muerte celular. Es un proceso que resulta por la acción de enzimas tipo polifenoloxidasas y tirosinasas, que son liberadas o sintetizadas cuando los tejidos sufren alguna herida. Dichas enzimas actúan sobre los polifenoles y tirosina, oxidándolas a quinonas (sustancias fitotóxicas), que a su vez pueden polimerizarse, afectar las proteínas y en consecuencia inhiben el crecimiento y la viabilidad de los explantes (Read *et al.*, 1987).

En las células vegetales, éstos radicales libres se forman durante las reacciones redox de varias vías metabólicas; la incompleta reducción de oxígeno o la oxidación del agua en el cloroplasto o mitocondria, en la cadena de transferencia de electrones tanto de la fotosíntesis como de la respiración. También se pueden generar en otros organelos celulares, como los peroxisomas y lisosomas, a consecuencia de cortes realizados en los explantes (Azofeifa, 2009).

En lo que respecta al cultivo de tejidos *in vitro*, los procesos de oxidación son causados principalmente por el efecto del agente desinfectante aplicado durante la asepsia del explante, las heridas realizadas en el explante, composición del medio de cultivo, volumen y calidad del frasco de cultivo (Pérez *et al.*, 1999).

Sin duda alguna, los factores anteriormente mencionados pueden ser la causa principal de la oxidación que se presentó en algunos de las unidades experimentales

que fueron utilizadas, aunque se atribuye que comparando ambos tratamientos de asepsia probados (A y B), en el caso del Tratamiento A, los lavados con agua destilada estéril probablemente no fueron suficientes para retirar el exceso del último agente químico (Tween 20) al que se sometieron las semillas de *T. latifolia*, lo cual no permitió el crecimiento esperado, causando cierto daño al explante que posteriormente pudo afectar de manera que se inhibió el crecimiento y viabilidad de los explantes.

Una vez estandarizado el protocolo de asepsia fue posible la obtención de más de 175 plántulas de *T. latifolia* "libres de patógenos", cuando se implementó el tratamiento A, y 270 plántulas cuando se utilizó el tratamiento B (Tabla 5). Es importante mencionar que una vez estandarizado el protocolo de asepsia, las semillas utilizadas fueron capaces de germinar a partir del tercer día de haberse sembrado. Al cumplirse un periodo de 30-45 días las plántulas adquieren una altura de entre 12-14 cm y 5 cm tejido radicular, características fundamentales para poder ser utilizadas en la evaluación del proceso de fitoextracción con y sin adición de los aislados bacterianos (Figura 4).

Tabla 5. Plántulas de *T. latifolia* obtenidas por tratamiento de asepsia (A y B)

Tratamiento	No. de plantas	Total de plantas	No. de brotes	Total de brotes
A (35 unidades experimentales)	5	175	5	175
B (45 unidades experimentales)	6	270	6	270

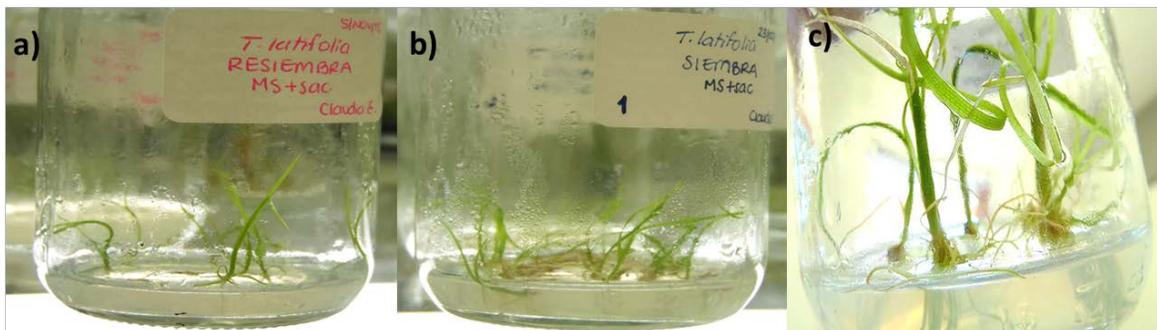


Figura 4. Morfología de las plántulas de *T. latifolia* a los a) 30, b) 45 y c) 60 días de germinación *in vitro*.

4.4 Evaluación del efecto de los aislados bacterianos del género *Pseudomonas* tolerantes a metales pesados en el incremento de la fitoextracción de distintas concentraciones de Cd (II) por plántulas *in vitro* de *T. latifolia*.

Se diseñó un modelo experimental para evaluar el efecto de *Pseudomonas* endófitas (GR140 Y GR093) en el incremento de la fitoextracción de Cd (II), utilizando plántulas *in vitro* de *T. latifolia*. Para ello, una vez obtenidas las plántulas de *T. latifolia*, se colocaron en tubos de ensaye de 20 cm de altura, en cada uno se preparó 20 ml de solución Hoagland, adicionado con diversas concentraciones de cadmio (0, 5, 10, 25, 50, 75 Y 100 ppm). Se prepararon dos bloques experimentales, uno sin y otro con la adición de los aislados bacterianos del género *Pseudomonas*, utilizando una planta por cada concentración utilizada y se realizó por triplicado (Figura 5).

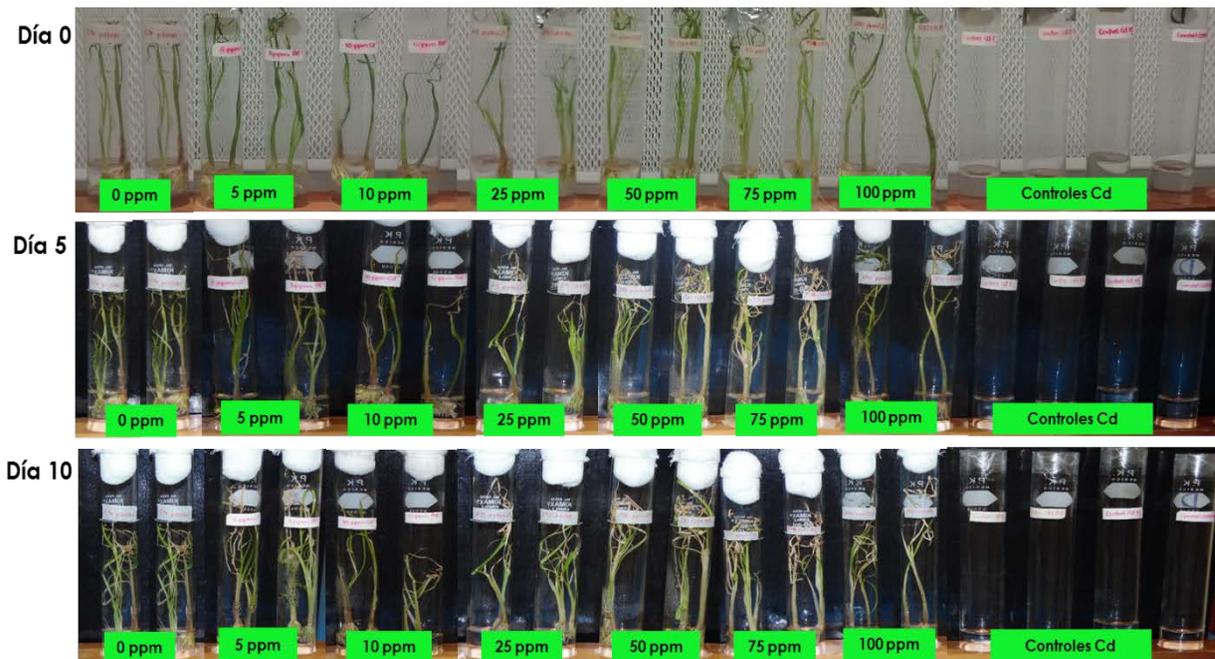


Figura 5. Diseño experimental para la evaluación del efecto de aislados bacterianos del género *Pseudomonas*, tolerantes a Cd (II).

Respecto a la adición de los aislados endófitos, primeramente, fue necesario establecer la curva de crecimiento bacteriano, por lo que se ajustó la suspensión bacteriana a un patrón de acuerdo a la escala de Mc Farland (0.5). Para ello, se tomó una muestra del aislado bacteriano del género *Pseudomonas* (GRC140 y GRC093) y se inoculó en tubos de ensaye con caldo LB a un quinto de concentración. Una vez

preparada y ajustada la suspensión bacteriana se realizó la respectiva curva de crecimiento bacteriano (Figura 6).

Curva de crecimiento bacteriano (GR140)

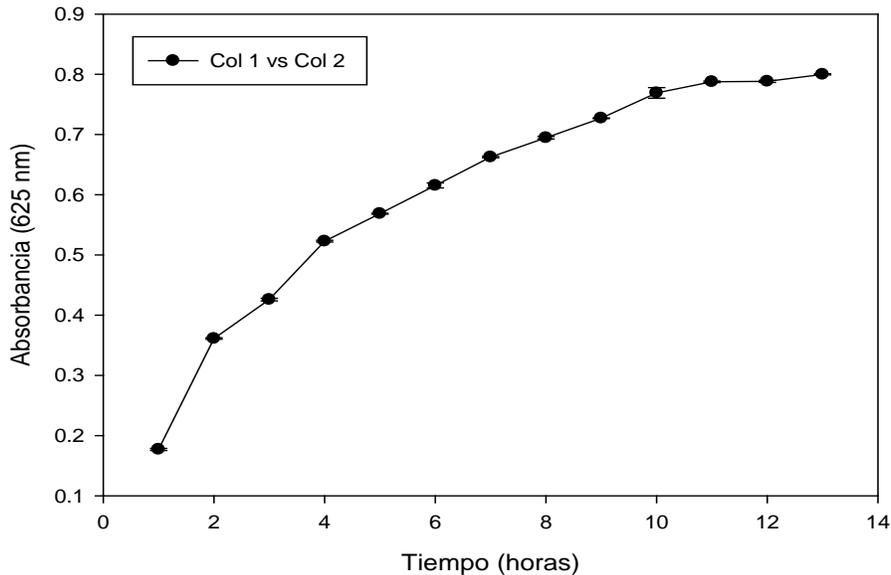


Figura 6. Curva de crecimiento bacteriano del aislado GRC140.

De acuerdo a la Figura 6, se observó que el aislado GRC140 mostró un incremento gradual de la absorbancia respecto al tiempo. En la fase de latencia (las primeras dos horas) existe un aparente reposo en el que las células sintetizan las enzimas necesarias para la actividad metabólica, mientras que se alcanzó la fase exponencial de las 2-10 horas de haberse iniciado el cultivo, evidenciando la velocidad máxima de crecimiento bacteriano. Posteriormente se llegó a la fase estacionaria en un lapso de 10-14 horas con una absorbancia de 0.8, siendo ésta donde se equilibran el número de células nuevas con el número de células que mueren.

En un sistema biológico se define al crecimiento como el aumento ordenado de las estructuras y los constituyentes celulares de un organismo. En lo que se refiere al crecimiento de células individuales, este consiste en el aumento del tamaño y peso de las células que precede a la división celular. Esta división trae aparejada un aumento en el número de células (proliferación de la población). Las bacterias se dividen por fisión binaria, a través de la una cual célula madre al alcanzar un determinado volumen

se divide dando dos células hijas. Este proceso consiste en la autoduplicación del material hereditario seguido de la repartición en las dos células hijas, las que se separan por estrangulamiento de la membrana celular y formación de la pared celular (Ranea, 2002).

De manera reciente, se ha demostrado que el crecimiento de algunas plantas se ve favorecido aún bajo condiciones de estrés por metales pesados, debido a la inoculación de microorganismos asociados con la protección, permitiendo la colonización bacteriana que favorece la absorción de nutrientes y aumento en la biomasa vegetal (Dimkpa *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2010; Maria *et al.*, 2011; Mastretta *et al.*, 2009).

Por otra parte, algunos estudios sugieren que la inoculación de microorganismos tolerantes a metales, podría tener un enfoque adecuado para la protección de las plantas, la fitostabilización de metales en suelos contaminados, biosorción microbiana, el mecanismo de bioacumulación, disminución en la concentración del metal; así como la translocación del metal en las mismas (Babu y Reddy, 2011; Vivas *et al.*, 2003).

En ese sentido, se diseñó un modelo experimental adecuado para poder determinar si existe efecto protector por *Pseudomonas* endófitas de la raíz de *T. latifolia* durante el proceso de fitoextracción de Cd (II).

4.5 Aspecto e Índice de Crecimiento de *T. latifolia* con y sin adición de *Pseudomonas* endófitas, durante el proceso de fitoextracción de Cd (II).

Se evaluó la apariencia y aspecto de éstas, con la finalidad de poder detectar las manifestaciones de toxicidad causada por la exposición de Cd (II) durante el proceso de fitoextracción.

Como se muestra en la Figura 7, se puede observar el aspecto de las plántulas desde el día 0, 5 y 10 de exposición a diversas concentraciones de Cd (II), mientras que en la Figura 8 se presenta la comparación del aspecto de las plántulas con y sin la adición de *Pseudomonas* endófitas GRC140, donde se observó una mayor elongación de raíz en aquellas plántulas donde se inoculó el aislado bacteriano,

principalmente en las concentraciones de 5 y 10 ppm de Cd (II). Dentro de los principales signos de toxicidad, se observó principalmente clorosis, marchitamiento y deshidratación en relación a la concentración a la que fue expuesta la especie vegetal, es decir que conforme más alta fue la concentración, la manifestación de toxicidad resultó más evidente, dichas características fueron notorias a partir del sexto día de exposición, resultados similares a estudios de fitoextracción donde se utilizan plantas colectadas en campo.



Figura 7. Aspecto de las plántulas de *T. latifolia* al día 0, 5 y 10 días de exposición a Cd (II). (A, B, C, respectivamente), sin la adición de aislados bacterianos.



Figura 8. Comparación del aspecto de las plántulas de *T. latifolia* expuestas a Cd (II) sin y con adición de *Pseudomonas* endófitas (a-f), (A-F) respectivamente.

En este sentido, la fitotoxicidad ocasionada por altas concentraciones de metales pesados, puede traer como resultado algunas manifestaciones como clorosis, crecimiento débil o lento de las plantas e incluso reducción en la captación de los nutrientes, así como desórdenes en su metabolismo (Chaudri *et al.*, 2000, Broos *et al.*, 2005, Dan *et al.*, 2008).

Por otra parte, algunos efectos tóxicos del cadmio sobre especies vegetales, interfieren en la entrada, transporte y utilización de agua y elementos esenciales (Ca, Mg, P y K), provocando desequilibrios nutricionales e hídricos en la planta (Poschenrieder *et al.*, 1989; Sandalio *et al.*, 2001; Singh y Tewari, 2003).

En el caso del bloque experimental cuando el aislado bacteriano fue inoculado, se observaron los mismos signos de estrés metálico (clorosis, marchitamiento y deshidratación) en todas las concentraciones de cadmio utilizadas, siendo un poco retardado en el caso de las soluciones control. Dicho efecto, también se manifestó cuando se evaluó el aislado GR093.

Respecto a la evaluación del Índice de Crecimiento (IC), se consideró la talla de las plántulas (tallo y raíz), obtenido mediante la fórmula presentada en el apartado 3.9. Como se puede observar, en la Figura 9 y 10, el IC fue positivo en el caso de todas las concentraciones, al igual que el tratamiento control, dado que el resultado fue mayor o igual a 1; lo que evidencia que aún en condiciones de estrés metálico, las plántulas expuestas a diversas concentraciones de Cd (II) continúan su crecimiento normal, respecto al control. Además, respecto al tejido de la plántula y considerando la adición de los aislados endófitos (GRC140 Y GRC93) tampoco se visualizó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

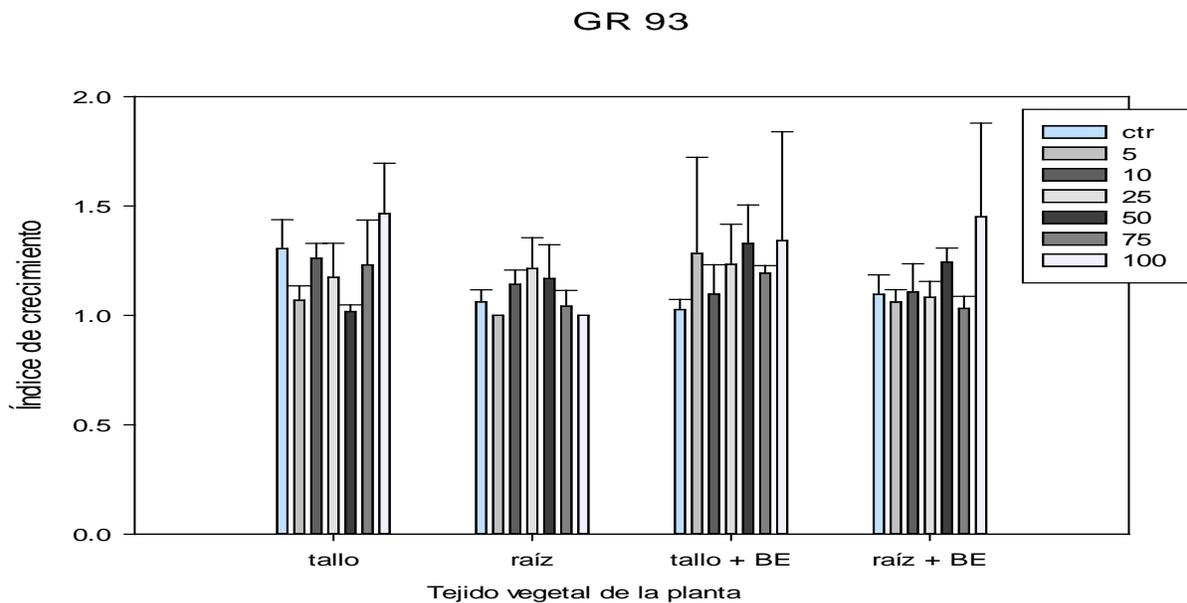


Figura 9. Determinación del índice de crecimiento en plántulas de *T. latifolia* expuestas a Cd (II) con y sin la adición de *Pseudomonas* endófitas (GR093).

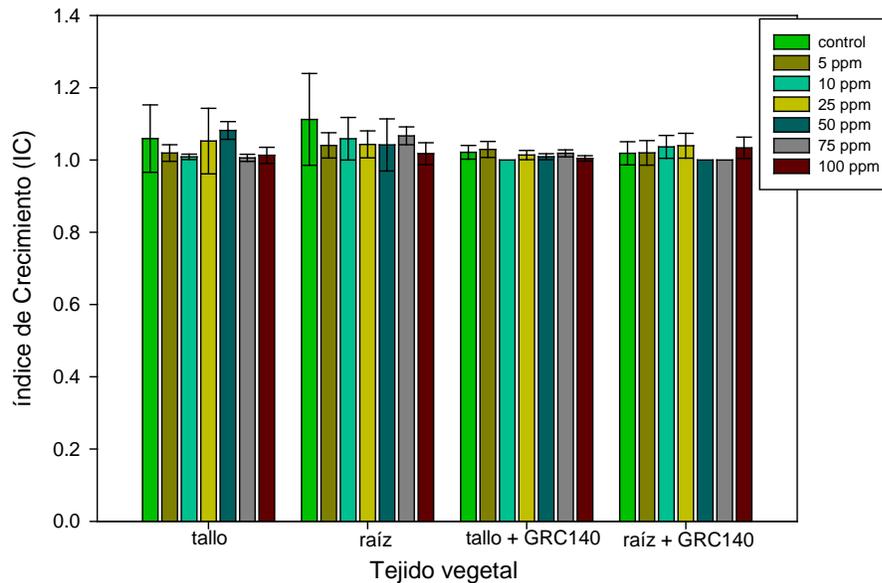


Figura 10. Determinación del índice de crecimiento en plántulas de *T. latifolia* expuestas a Cd (II) con y sin la adición de *Pseudomonas* endófitas (GR93).

Sin embargo, los mecanismos microbianos que benefician el crecimiento vegetal incluyen promoción directa o indirecta. En el caso de la promoción directa se manifiesta a través de un aumento de la disponibilidad y captación de nutrientes minerales o provisión de sustancias estimuladoras del crecimiento y la promoción indirecta se produce a través de la supresión de los microorganismos deletéreos de la rizósfera (Osti *et al.*, 2004).

Las Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (RPCV) pueden aumentar el crecimiento de la planta de diferentes maneras: por fijación asociativa del nitrógeno (Lara *et al.*, 2007), solubilización de fosfatos (Krishnaveni, 2010), estimulación de las funciones de las micorrizas (Garbaye, 1994), regulación de la producción de etileno en las raíces (Rajkumar *et al.*, 2009), liberación de fitohormonas (Karnwal, 2009) y por disminución de la toxicidad de metales pesados (Burd *et al.*, 1998).

4.6 Efecto del Cd (II) en el contenido de clorofila

Para complementar los resultados obtenidos hasta el momento y poner en evidencia el daño causado por el metal contaminante, también se determinó el contenido de clorofila inicial y final de cada una de las plántulas de *T. latifolia* expuestas a las diversas concentraciones de Cd (II), como señal de alarma ante la presencia de contaminantes químicos.

Los resultados se pueden observar en la Figura 11, donde se evidenció en todas las concentraciones utilizadas, incluyendo el control, el contenido de clorofila se observó disminuido, respecto al contenido inicial. Lo anterior puede deberse al estrés metálico al que se vio sometida cada una de las plantas durante el período de exposición. En cuanto a la disminución del pigmento fotosintético en las soluciones control, también puede deberse a las condiciones ambientales, tanto como experimentales.

Cuando las plantas se encuentran expuestas a diferentes concentraciones de metales pesados pueden manifestar una amplia variedad de efectos tóxicos. La inhibición de la síntesis de clorofila es un efecto tóxico común (Prasad, 2004).

Por otra parte, la disminución en el contenido de clorofila puede deberse a que los metales provocan cierto daño en el tejido vegetal por el estrés metálico, generando la liberación de la clorofila de la membrana de los tilacoides, provocando que sea degradada por una clorofilasa para evitar el daño celular o actividad fotodinámica (Song y Huang, 2005; Kariola *et al.*, 2005).

La clorofila es un parámetro de gran importancia para la determinación del daño fitotóxico que generan los metales, como el Cd (II); ya que es una molécula indispensable a través de la cual las especies vegetales obtienen la energía necesaria para sobrevivir.

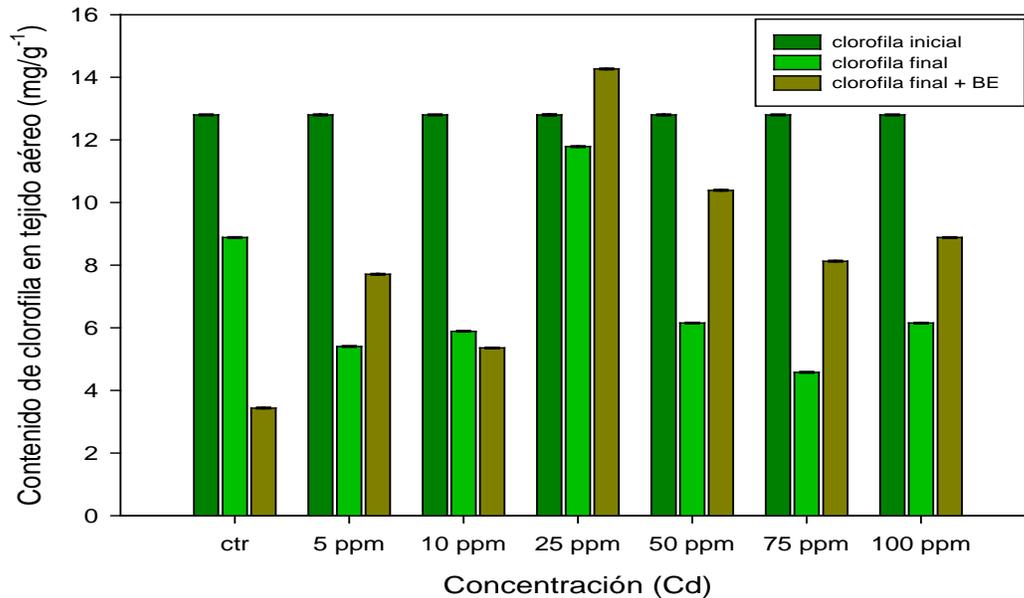


Figura 11. Determinación del contenido de clorofila inicial y final de las plántulas de *T. latifolia* expuestas a Cd (II), con y sin la adición de *Pseudomonas* endófitas.

En el interior de las plantas, el nitrógeno es el más móvil de los minerales, se redistribuye desde la parte basal hasta la parte aérea de la planta, mostrando clorosis en las hojas viejas (Vásquez *et al.*, 1995). En un estudio realizado con plantas de maíz expuestas a Cr (VI), es probable que la membrana celular haya sufrido daños irreversibles, posiblemente al alto poder de oxidación de acuerdo a la concentración del metal (Vásquez *et al.*, 1987). Debido a ello se presentó un daño a nivel enzimático, siendo las que participan en la asimilación de N-NO_3^- , las primeras en tener daños a nivel funcional. Existe una correlación positiva entre el decremento de la clorofila y la actividad de nitrato reductasa (NR) (Vajpayee *et al.*, 2000).

Raghuram y Sopory (1995), sugieren que la actividad de la NR es dependiente de la fotosíntesis o producción de fotoasimilados, para lo cual requiere generar reductantes fotosintéticos (NADH) y energía. *Nymphaea alba* L. mostró una reducción en la actividad de la NR en presencia de Cr (VI) debido probablemente a la inhibición de la biosíntesis de clorofila reduciendo la tasa fotosintética (Vajpayee *et al.*, 2000). Sin embargo, el nitrato juega un papel regulatorio en las plantas de maíz; ya que, la presencia de éste redirecciona el flujo del carbono de la síntesis de almidón hacia la

producción de aminoácidos y ácidos orgánicos como el malato. Las bajas cantidades de nitrato mantienen la dirección del flujo de carbono de manera directa, es decir, hacia la síntesis de carbohidratos (almidón y celulosa) (Buchanan et al. 2000).

Asimismo, Hartmut *et al.* (1990) señalan que las plantas expuestas a contaminación por plomo muestran una disminución en su tasa fotosintética que resulta del cambio en la ultraestructura del cloroplasto, síntesis de clorofila restringida (Sharma & Dubey, 2005) y la deficiencia de CO₂ como resultado de cierre estomático, lo que desencadena una inactivación del fotosistema II (Ibañez & Calderón, 2005).

La inhibición en la tasa fotosintética podría conllevar a un menor requerimiento de biosíntesis de clorofila, sumado al hecho que el plomo altera la absorción de algunos elementos esenciales como el magnesio (Kaur 2014) o sustituye a este elemento en cada molécula de clorofila (Haider *et al.*, 2006). Por otro lado, Drazkiewicz (1994) y Funamoto *et al.*, (2002) la atribuyen a la actividad de la clorofilasa, enzima encargada de hidrolizar las moléculas de clorofila en las plantas.

En este caso, se atribuyó que las concentraciones de Cd (II) utilizadas, pudieron haber provocado efectos similares a lo anteriormente mencionado.

4.7 Efecto del pH durante el proceso de fitoextracción

Por otra parte, también se determinó el pH inicial y final de cada una de las soluciones utilizadas durante el experimento y se observó que en aquellas donde se adicionó el aislado bacteriano (GR140 y GR093) favoreció el incremento del pH, acercándose un poco a un valor neutro. Sin embargo, se observó que el comportamiento de pH fue irregular cuando se adicionó el aislado GR093 (Figura 12).

El pH es un factor esencial, para que la mayoría de los metales tiendan a estar más disponibles en un pH ácido, excepto As, Mo, Se y Cr, los cuales tienden a estar más disponibles a pH alcalino. Es una variable importante para definir la movilidad del catión, debido a que en medios con pH moderadamente alto se produce la precipitación como hidróxidos. En medios muy alcalinos, pueden nuevamente pasar a la solución como hidroxicomplejos. La adsorción de los metales pesados está

fuertemente condicionada por el pH del suelo y, por tanto, también su biodisponibilidad de sus compuestos (Alloway, 1995).

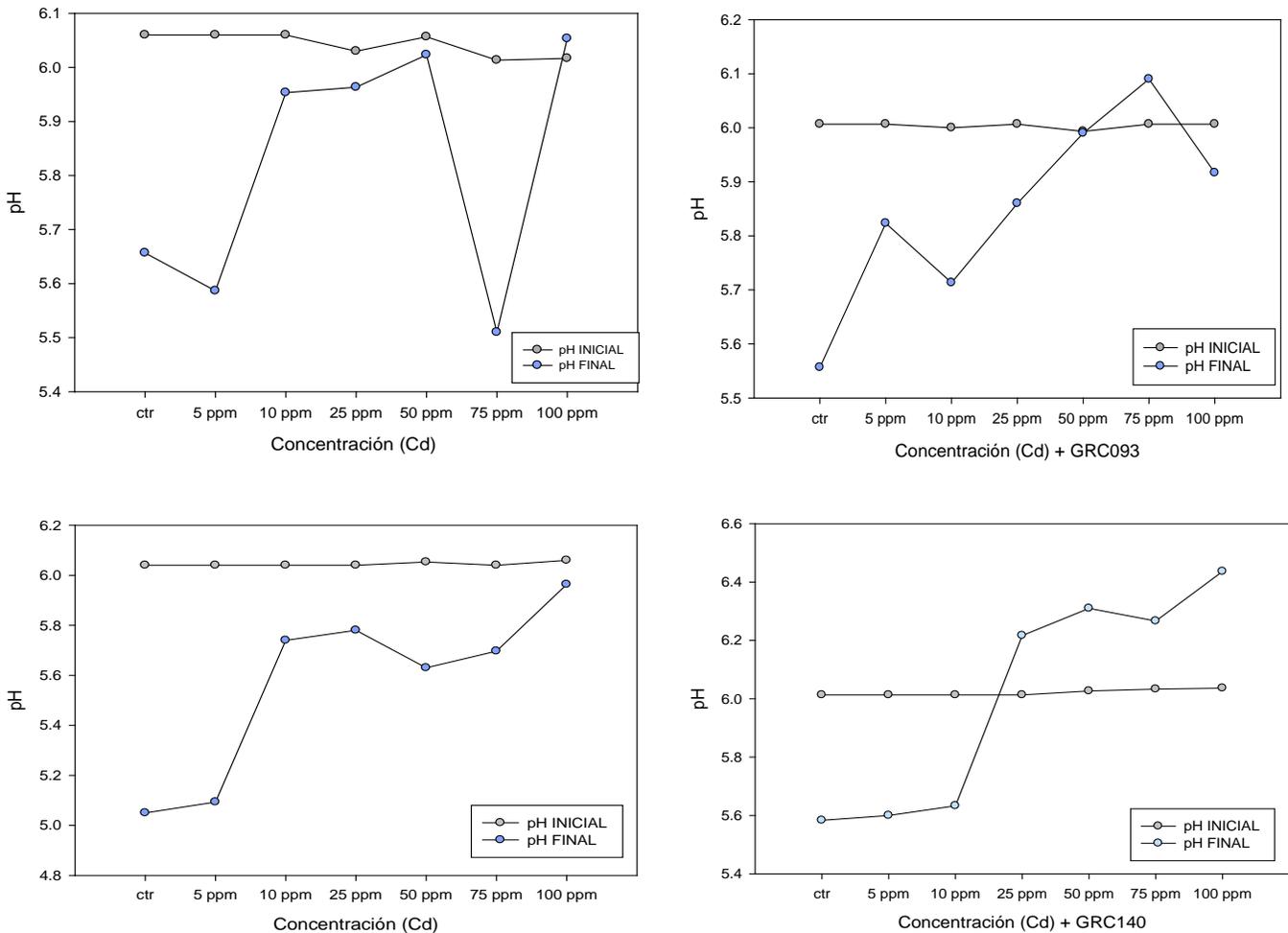


Figura 12. Monitoreo de pH (inicial y final) durante la exposición de *T. latifolia* en diferentes concentraciones de Cd (II).

En una investigación llevada a cabo por Goswami *et al.*, (2010) con la especie vegetal *Eichornia crassipes*, se demostró que la planta tiene la capacidad de cambiar el pH, hasta alcanzar la alcalinidad, cuando se encuentra inducida a un estrés por metales pesados, esto por la capacidad de la planta de liberar exudados desde la raíz para alcalinizar la solución y optimizarla para su supervivencia. Por lo cual, se sugiere que *T. latifolia*, llevó a cabo estos mecanismos de defensa, lo cual le permitió adaptarse al entorno para lograr su supervivencia.

El pH del medio es un factor importante en la intensidad de la acción enzimática, ya que diferentes enzimas tienen diversidad de intervalos óptimos de pH. Las enzimas hidrolíticas generalmente requieren un medio ácido, mientras que las enzimas oxidativas a menudo funcionan más eficientemente en un pH cercano a la neutralidad. Existen pruebas de que las acciones enzimáticas en las plantas también dependen del pH del medio; referente a qué tan hidrolizado o no esté (Miller, 1981).

Ciertos microorganismos del suelo producen sideróforos y quelatos de hierro que aseguran la disponibilidad del hierro en la rizósfera, reducen el pH del medio y/o solubilizan metal-fosfatos, lo que afecta la movilidad y disponibilidad de metales para las plantas (Ma et al., 2009; Juárez y Tijerina, 2011), lo que puede estar relacionado con los resultados del contenido del Cd (II) removido y acumulado por las plántulas de *T. latifolia* en esta investigación.

En ese sentido, es importante destacar que los aislados endófitos GR140 y GR093 cuentan con la capacidad de producir sideróforos, además de otros compuestos que le confieren características de promoción de crecimiento vegetal.

4.8 Evaluación del proceso de fitoextracción de Cd (II) por *T. latifolia*

4.8.1 Remoción de Cd (II) por *T. latifolia* con y sin adición de *Pseudomonas* endófitas

Para evidenciar el efecto de *Pseudomonas* endófitas en el proceso de fitoextracción de *T. latifolia*, se cuantificó el contenido de Cd (II) en cada una de las concentraciones utilizadas con y sin la adición de dichos aislados bacterianos.

Es por ello que se expusieron estas plantas a determinadas concentraciones de Cd (II) durante 10 días. En los cuales, al día 0, 5 y 10 se tomaron muestras de 3 mL para evaluar la remoción del metal, las cuales se sometieron a un proceso de digestión ácida en autoclave, acidificadas con HNO₃ al 50%. Posteriormente se analizaron mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica.

Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 13 y 14, (con y sin la adición del aislado endófito GR140, respectivamente). Respecto a la adición de éste aislado

bacteriano, se evidenció que conforme al paso de los días de exposición al Cd (II), el porcentaje de remoción va en aumento, observándose que para el día 10, incluso sobrepasa el 50% de remoción en la concentración de 75 ppm, resultado similar al experimento sin la adición del aislado bacteriano, en relación a la concentración donde se removió mayormente el metal, pero con un valor cercano al 25%, lo cual permite evidenciar que con la adición de este aislado bacteriano se aumenta al doble la eficiencia en el proceso de fitoextracción de Cd (II) por plántulas de *T. latifolia*.

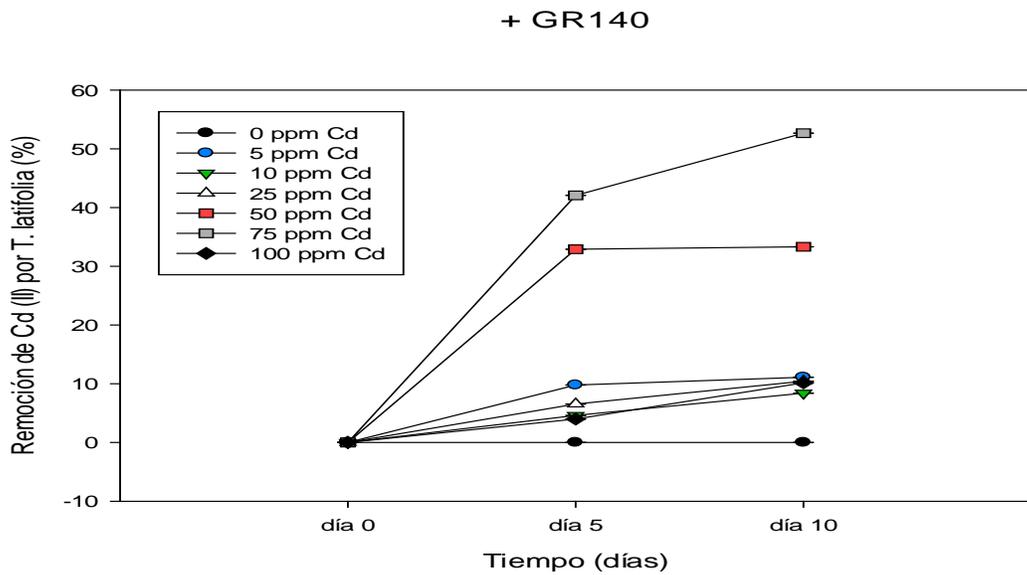


Figura 13. Remoción de Cd (II) por plántulas de *T. latifolia* con la adición de *Pseudomonas* endófitas (GR140).

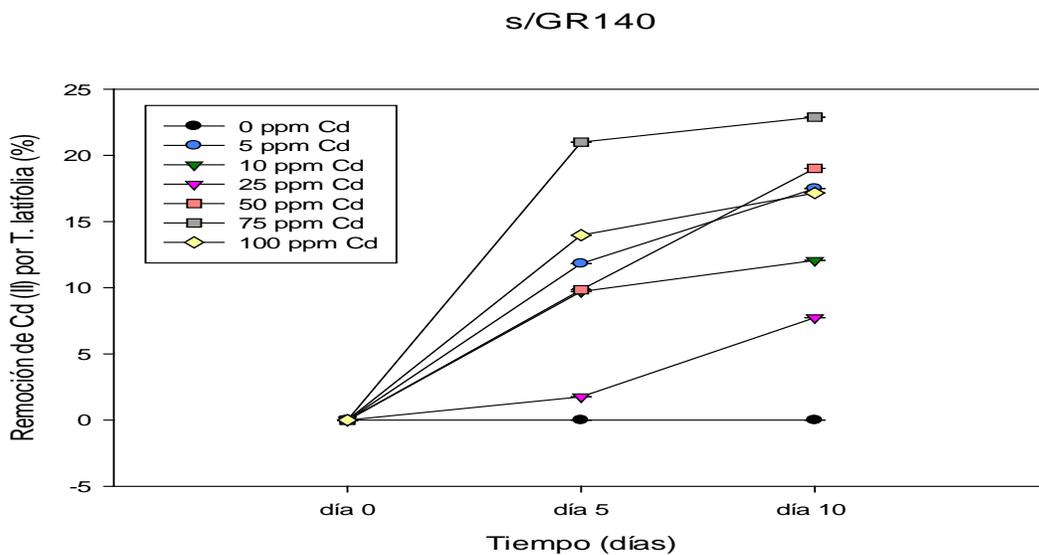


Figura 14. Remoción de Cd (II) por plántulas de *T. latifolia* sin la presencia de aislados bacterianos.

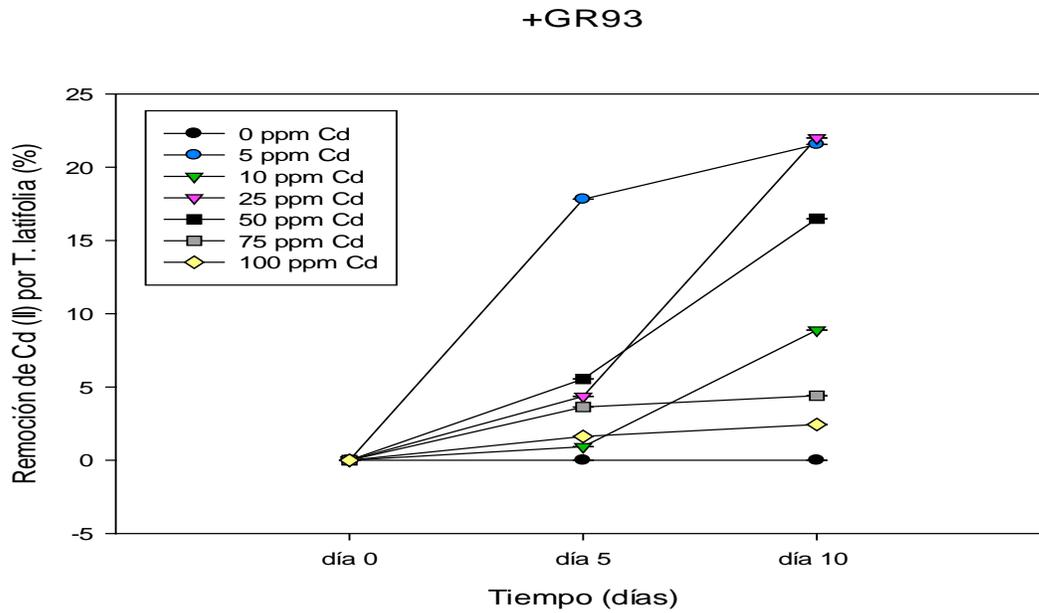


Figura 15. Remoción de Cd (II) por plántulas de *T. latifolia* con la adición de *Pseudomonas* endófitas (GR93).

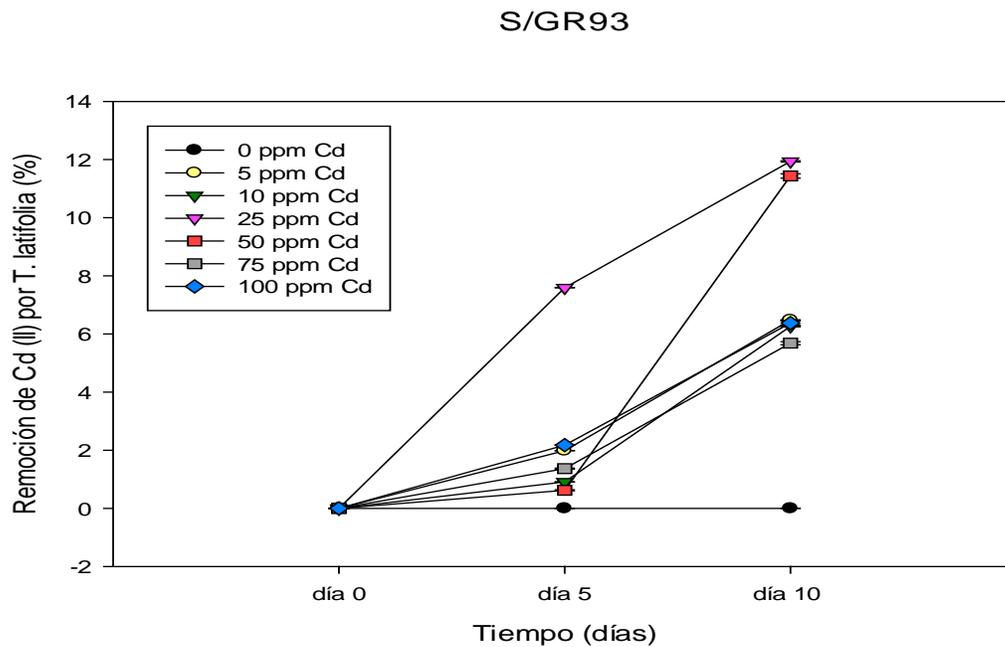


Figura 16. Remoción de Cd (II) por plántulas de *T. latifolia* sin la presencia de aislados bacterianos.

Un comportamiento similar se observó cuando se evaluó el efecto del aislado endófito GR93 (Figura 15) donde los porcentajes de remoción son mayores cuando ésta bacteria es inoculada, alcanzando un 20 % de eficiencia de remoción en las concentraciones de 5 y 25 ppm de Cd (II). En cambio, cuando el aislado no se inocula en la solución (Figura 16), el porcentaje de remoción alcanza un 12% de eficiencia para la concentración de 25 ppm.

A pesar de que *T. latifolia* ha sido ampliamente utilizada en los procesos de fitoextracción, no está documentado el estudio de la interacción de esta especie vegetal con aislados endófitos, sin embargo; en experimentos similares con la misma especie demostraron una eficiencia de remoción del 55% en concentraciones de 20 ppm de Cd (II), utilizando plantas completas colectadas en campo (Leura *et al.*, 2013), lo cual coincide con los resultados obtenidos en esta investigación.

Por otra parte, el éxito en los procesos de fitoextracción depende del potencial de las plantas para producir alta biomasa y soportar el estrés metálico. Además, la biodisponibilidad del metal en el suelo de rizósfera se considera otro factor crítico que determina la eficiencia del proceso de translocación y fitostabilización de metales (Ma *et al.*, 2011a).

En años recientes, varios estudios se han enfocado en la utilización de agentes químicos, tales como EDTA, para mejorar el proceso de fitoextracción o fitostabilización (Barrutia *et al.*, 2010, Wu *et al.*, 2011b). Aunque estos compuestos pueden aumentar la eficacia de fitoextracción/fitostabilización, algunos no sólo son fitotóxicas (Evangelou *et al.*, 2007), sino también tóxicos para los microorganismos que juegan un papel importante en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Mühlbachová, 2009; Ultra *et al.*, 2005). Lo cual propone como una alternativa prometedora la aplicación de procesos mediados por microorganismos, en los que tanto metabolitos, como los procesos microbianos afectan a la planta y la captación del metal mediante la alteración de la movilidad y la biodisponibilidad de éste en el tejido vegetal.

En consideración a lo anterior, la alteración de la movilización de metales pesados, puede ser aprovechada mediante la utilización de microorganismos ya que los metabolitos microbianos son biodegradables, menos tóxicos, y puede ser posible

producirlas *in situ* en suelos de rizósfera. Además, las sustancias promotoras del crecimiento tales como sideróforos, y hormonas como: ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) desaminasa producidos por microbios asociados a plantas, mejoran el crecimiento en sitios contaminados con metales.

Dadas las características de promoción de crecimiento vegetal presentes en los aislados endófitos del género *Pseudomonas* utilizados en esta investigación (GRC140 y GRC093), se sugiere que la alta tolerancia a metales pesados presentada por los aislados puede deberse a una exposición a las concentraciones elevadas de Cd presentes en el suelo, incluso la planta de donde fueron obtenidos dichos microorganismos endófitos.

En este sentido, las concentraciones a las que se sometieron las plántulas de *T. latifolia* favorecieron la selección y adaptación de las bacterias con características bioquímicas para la tolerancia y supervivencia en presencia del Cd (II) (Díaz-Ravina y Baath, 1996). Dichas adaptaciones pueden ser consecuencia de diversos mecanismos como cambios en su morfología celular y el desarrollo de componentes celulares que capturan los iones, así como transportadores de membrana que expulsan los metales desde el citoplasma celular (Poitrowska-Seget *et al.*, 2005; Marrero-Coto *et al.*, 2010).

Por lo tanto, los resultados sugieren que las plántulas de *T. latifolia* obtenidas del cultivo *in vitro* pudieron remover eficientemente el Cd (II) cuando se adicionó el aislado bacteriano (GR140), de la misma manera que cuando se utilizan plantas adultas en condiciones naturales.

En estudios recientes, que investigan el papel de los microorganismos asociados a las plantas y su protección contra el estrés metálico han demostrado que la colonización bacteriana favorece una mayor absorción de nutrientes y el aumento de la biomasa vegetal (Dimkpa *et al.*, 2008, Luo *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2010; Maria *et al.*, 2011; Mastretta *et al.*, 2009). Además, se ha comprobado que los metales pesados a menudo interfieren con la absorción de la raíz de nutrientes tales como Fe, P, Mg, Ca, Zn y con funciones metabólicas de los nutrientes esenciales, lo que lleva al retraso del crecimiento de las plantas (Ouzounidou *et al.*, 2006, Parida *et al.*, 2003).

En este sentido, las plantas asociadas a microorganismos pueden mejorar la captación de nutrientes, mediante la movilización de los mismos y la disposición de estos a través del tejido radicular.

El aumento del crecimiento de la planta y la absorción de P se han observado que inóculo de *Pseudomonas* sp. En trigo (Babana y Antoun, 2006) *Pantoea* J49 en cacahuete (Taurian *et al.*, 2010), y *Psychrobacter* sp. SRS8 en *Ricinus communis* y *Helianthus annuus* (Ma *et al.*, 2010). También se demostró que los sideróforos producidas por bacterias pueden solubilizar fuentes de Fe insolubles e inducir el crecimiento de plantas y la captación de hierro en las mismas (Dimkpa *et al.*, 2009b, Ma *et al.*, 2010).

4.8.2 Evaluación del contenido de Cd (II) acumulado en el tejido vegetal de *T. latifolia* en el proceso de fitoextracción

Una vez expuestas las plantas a los experimentos de remoción de cadmio, se cuantificó el contenido del metal en el interior de la planta. Los resultados de la acumulación de Cd en *T. latifolia* se presentan en las Figuras 17 y 18.

Respecto a la fitoacumulación de Cd (II) en el tejido vegetal de *T. latifolia* (Figura 16), se realizó la cuantificación tanto en el tallo y raíz de la especie vegetal; donde se observó que el tejido donde predomina la mayor cantidad del metal acumulado es en la raíz, tanto cuando se adiciona el microorganismo endófito (GR140), como cuando la planta estuvo libre del inóculo bacteriano, en el caso de todas las concentraciones. Además, se evidenció que para las concentraciones de 5 y 10 ppm de Cd (II) existe un efecto benéfico de la adición del aislado endófito, ya que el contenido del metal acumulado es mayor que cuando el tejido vegetal carece del microorganismo. Sin embargo, este comportamiento ya no se observó a partir de la concentración de 25 ppm a 100 ppm de Cd (II).

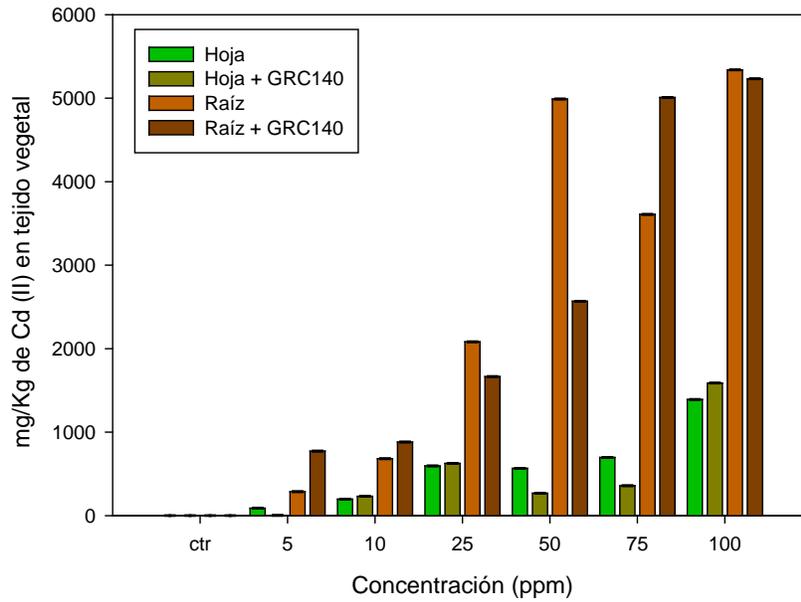


Figura 17. Fitoacumulación de Cd (II) contenido en el tejido vegetal de las plántulas de *T. latifolia* con y sin la presencia de aislados bacterianos (GR140).

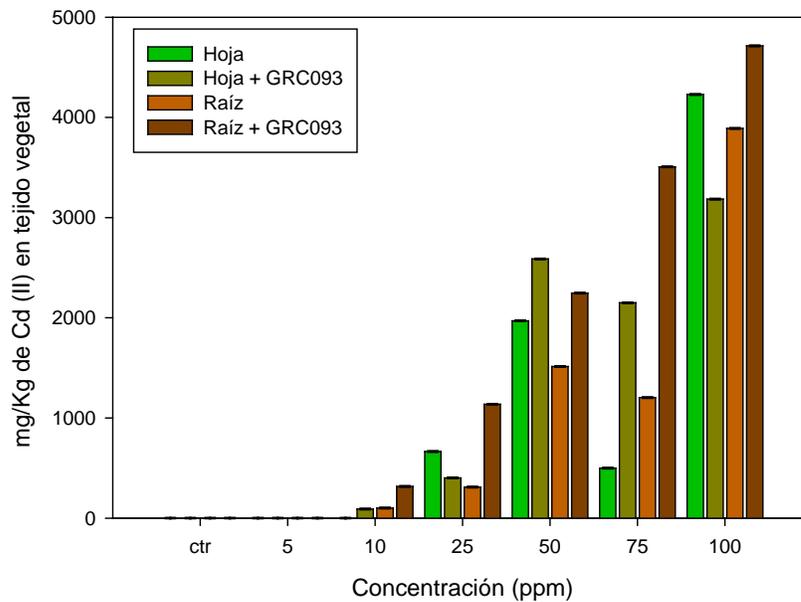


Figura 18. Fitoacumulación de Cd (II) contenido en el tejido vegetal de las plántulas de *T. latifolia* con y sin la presencia de aislados bacterianos (GR140).

Por otra parte, cuando se evaluó el efecto de la adición y ausencia del aislado GR 93 (Figura 17), se observó que al igual que el experimento anterior, el mayor contenido de Cd (II) acumulado se cuantificó en la raíz de *T. latifolia*, en las concentraciones de 10 y 25 ppm.

En relación a lo obtenido, además de mejorar la absorción de nutrientes y el crecimiento de las plantas, las bacterias asociadas a la especie vegetal pueden estar disminuyendo o aligerando la toxicidad producida por la exposición al metal. En ese sentido, debido al estrés generado a la planta, se puede estar induciendo la producción endógena de etileno, lo que puede afectar el crecimiento de las raíces y por consiguiente, el crecimiento de toda la planta.

No obstante, las bacterias endófitas evaluadas en este estudio tienen la capacidad para producir la enzima ACC desaminasa, que actúa reduciendo la producción de etileno en las plantas, a través de la ACC en α -cetobutirato (precursor del etileno) y amoníaco (Glick *et al.*, 2007). Bajo tal condición, para mantener el equilibrio entre el medio y el interior de la raíz, los niveles de ACC en las plantas empiezan a liberar mayor cantidad de enzimas a través de la exudación y así disminuir los niveles de etileno, causado debido al estrés metálico (Adams y Yang, 1979).

Por otra parte, Madhaiyan *et al.*, (2007) determinaron que *M. oryzae* (CBMB20) que tiene actividad ACC desaminasa, lo que favoreció el crecimiento de plántulas de tomate cultivadas en suelos contaminados con Ni y Cd. La bacteria logró reducir la producción de etileno, causada por la exposición a dichos metales. De manera reciente, Zhang *et al.* (2011) confirmaron la resistencia a Pb, a través de bacterias endófitas con la capacidad de producir ACC, además de otorgar tolerancia al metal y disminución de la síntesis de etileno, favoreciendo así el crecimiento de la planta.

Además, se ha observado el crecimiento de *Allysusm serpyllifolium* y *B. juncea* cuando son expuestas a Ni, gracias a la inoculación de bacterias endófitas que favorecen la producción de ACC desaminasa (Ma *et al.*, 2011b).

Sin duda alguna, la utilización y aprovechamiento de la inoculación de bacterias endófitas arroja un sinnúmero de efectos benéficos tanto para la planta, como para el microorganismo, aprovechando al máximo las características de promoción de crecimiento vegetal, al grado de efficientar procesos como la fitoextracción, gracias a

la producción de sustancias quelantes como los sideróforos, que juegan un papel fundamental en la reducción de los efectos perjudiciales, causadas por el estrés metálico, mejorando así la mayor producción de biomasa en las plantas.

Luo *et al.*, (2011) reveló que la inoculación de bacterias endófitas a *S. nigrum* aumentaron significativamente el crecimiento de las plantas cuando fueron expuestas a concentraciones de Cd, sin presentar signos de toxicidad en comparación con los controles. Este efecto, similar al obtenido en el presente estudio puede ser atribuido al efecto de los aislados endófitos GRC140 y GRC093, en relación a la producción de ACC desaminasa, sideróforos, solubilización de fosfatos y síntesis de algunas auxinas como ácido indol acético (AIA).

El efecto del AIA en el sistema radicular es un mecanismo sumamente importante para las plantas, debido a que le permite un mayor acceso a la cantidad de nutrientes del suelo y así poder incrementar su área superficial (Vessey, 2003), esta característica podría aumentar potencialmente el efecto de los aislados bacterianos en la promoción de crecimiento vegetal y con ello favorecer el potencial de *T. latifolia* en la fitoextracción de Cd (II).

Se ha reportado que dentro de las alteraciones en las propiedades fisicoquímicas y biológicas causadas por el estrés biótico o abiótico, pueden ejercer un efecto sobre la interacción planta-microorganismo, de manera que dichos aislados poseen el potencial para estimular la adquisición de nutrientes, reducir la toxicidad del metal, movilizar e inmovilizar dichos elementos, así como reciclar los nutrientes, incluyendo aminoácidos, azúcares, ácidos orgánicos y control de patógenos en las plantas; aunque también depende en gran medida de la capacidad de la planta para resistir la tolerancia al metal y la capacidad de producir biomasa (Rajkumar *et al.*, 2012).

Por lo tanto, se sugiere que la inoculación de dichos microorganismos (GR140 y GR93) con la capacidad de soportar el estrés metálico y su potencial en la promoción de crecimiento vegetal favoreció la tolerancia de las plantas expuestas a diversas concentraciones de Cd (5, 10 y 25 ppm), considerándose una herramienta biotecnológica potencial en los procesos de fitoextracción. Puesto que las bacterias

endófitas asociadas a plantas hiperacumuladoras, además de propiciar el crecimiento de su planta hospedera, tienen la capacidad de facilitar la captación de los metales pesados al afectar la movilidad y disponibilidad de elementos traza en la especie vegetal y mejorar así la translocación de los metales pesados (Rajkumar *et al.*, 2012; Jing *et al.*, 2007; Rajkumar y Freitas, 2008).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

- Se estableció un protocolo de asepsia adecuado para inducir la formación de plántulas a través del cultivo de tejidos vegetales, resultando más efectivo el Tratamiento B (fungicida, AgNO₃, bacterin, cloro al 10%, Tween 20, etanol al 70% y 5 lavados con agua destilada estéril).
- Se encontró que al aumentar la concentración de cadmio (50-100 ppm) se inhibe la germinación de las semillas de *T. latifolia*.
- Se logró la regeneración *in vitro* de plántulas de *T. latifolia* como modelo para evaluar el efecto de *Pseudomonas* tolerantes a Cd (II) en condiciones controladas.
- El Índice de Crecimiento (IC) de las plántulas de *T. latifolia* no se ve afectado, considerando que en todas las concentraciones el IC es igual o mayor de 1.
- Los aislados bacterianos GRC140 y GRC093 (*Pseudomonas*) aumentan la fitoextracción, acumulando el cadmio en concentraciones de 5 y 10 ppm; 5, 10,75 y 100 ppm, respectivamente, siendo mayor el porcentaje de metal removido cuando se adicionó el aislado GRC140 (50%).
- El contenido de cadmio cuantificado en el tejido vegetal de *T. latifolia* se presentó en mayor concentración en la raíz de la espadaña.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adams D. O., Yang S. F. Ethylene biosynthesis: identification of l-aminocyclopropanecarboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76:170–4.
2. Ahemad, M. 2012. Implications of bacterial resistance against heavy metals in bioremediation: a review. *IIOABJ* 3:39–46.
3. Alexander, D. B. & Zuberer, D. A. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 12, 39-45.
4. Alfaro de la Torre, M.C., Rivera, B. A., Acosta, R. I., Crispín, E. I., Pelallo, M. N. A., Carranza, A. C., González, Z. J. (2006). Biomonitores del agua contaminada por metales pesados. *UNIVERSITARIOS Potosinos*, Número 10:4-9.
5. Andrade, L.; M. Farina y G.A. Filho (2002). Role of *Padina gymnospora* (Dictyotales, Phaeophyceae) cell walls in cadmium accumulation, *Phycologia*: 41 (1): 39-48.
6. Azofeifa, A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía Mesoamericana*, 20 (1), 153-175.
7. Babana A. H., Antoun H. Effect of Tilemsi phosphate rock-solubilizing microorganisms on phosphorus uptake and yield of field grown wheat (*Triticum aestivum* L.) in Mali. *Plant Soil* 2006; 28:51–8.
8. Barceló, J.; C. Poschenrieder, 1990. "Plant water relations as affected by heavy metals: a review". *J. Plant Nutr.*, **13**: 1-37.
9. Barlow, R., Bryant, N., Andersland, J. y Sahi, S. (2000). Lead hyperaccumulation by *Sesbania drummondii*. *Conference on Hazardous Waste Research*. 112-114.
10. Barrutia O, Garbisu C, Hernandez-Allica J, Garcia-Plazaola JI, Becerril J. M. Differences in EDTA-assisted metal phytoextraction between metallicolous and non-metallicolous accessions of *Rumex acetosa* L. *Environ Pollut* 2010; 158:1710–5.

11. Barzanti, R.; Ozino, F.; Bazzicalupo, M.; Gabbrielli, R.; Galardi, F.; Gonnelli, C.; Mengoni, A. 2007. Isolation and characterization of endophytic bacteria from the nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii*. *Microbiology of Ecology* 53: 306-316.
12. Benavides, A. (2002). "Estrés oxidativo. "Ecofisiología y Bioquímica del estrés en Plantas". Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Departamento de Horticultura, Buenavista, Saltillo, Coahuila. México, 2002, p. 287.
13. Benhamou, N.; Gagné, S.; Quéré, D. L.; Dehbi, L. 2000. Bacterial-mediated induced resistance in cucumber: beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia plymuthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum*. *Biochem. Cell Biol* 90: 45-56.
14. Borges, W. D. S.; Borges, K. B.; Bonato, P. S.; Said, S.; Pupo, M. T. (2009). Endophytic fungi: Natural products, enzymes and biotransformation reactions. *Current Organic Chemistry* 13(12):1137–1163.
15. Bowler, C., Van Camp, W., Van Montagu, M., y Inze, D. (1994). Superoxide dismutase in plant's. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13: 199-218
16. Broos, K., Beyens, H. y Smolders, E. (2005). Survival of rhizoia in soil is sensitive to elevated zinc in the absence of the host plant. *Soil Biol. Biochem.* 37, 573-579.
17. Buchanan B. B., Gruissem W., Russell L. J. (2000). Nitrate and other compounds serve as signals to regulate NR gene expression. En: *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of plant physiologists Rockville, Maryland. pp 820-822.
18. Burd, G.I.; Dixon, D.G.; Glick, B.R. A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: pp. 3663-3668, 1998.
19. Carranza, A. C. (2005). Fitoextracción de Pb, Cr, Mn y Fe por plantas de *Scirpus americanus* (Tule) y *Typha latifolia* (Espadaña) en el Tanque Tenorio. Tesis de

Maestría. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, S.L.P., México, p. 107.

20. Castillo, A., 2008. Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo Las Brujas, Uruguay: AR-VITRO, INIA, 8 p.
21. Castillo P. L. J. (2016). Micropropagación de *Laelia anceps*. Lindl. subsp. *anceps* (Orchidaceae). Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca, UASLP. Tesis de Licenciatura en Bioquímica.
22. Comité Europeo de Normalización Publicaciones (CEN). (2003). Chemical Analyses - Digestion of sediment, sludge, soil, biowaste and waste for the extraction of nitric acid soluble fraction of trace elements.
23. Chanway, C. P. 1998. Bacterial endophytes: ecological and practical implications. *Sydowia* 50, 149–170.
24. Chaudri, A. M., Allain, C. M., Barbosa-Jefferson, V. L., Nicholson, F. A., Chambers, B. J. y McGrath, S. P. (2000). A study of the impacts of Zn and Cu on two rhizobial species in soils of a long term field experiment. *Plant Soil*. 22, 167-179.
25. Cho, U.; J. Park, 2000. "Mercury-induced oxidative stress in tomato seedlings". *Plant Sci.*, **156**: 1-9.
26. Clijsters, H.; F. Van Assche, 1985. "Inhibition of photosynthesis by metals". *Photosynth. Res.*, **7**: 31-40.
27. Compant, S.; Reiter, B.; Sessitsch, A.; Nowak, J.; Clément, C.; Ait Barka, E. 2005. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by a plant growth-promoting bacterium, *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Applied Environmental Microbiology* 71:1685–1693.
28. Dan, T., Hale, B., Johnson, D., Conard, B., Stiebel, B. y Veska, E. (2008). Effect of heavy metals on development stages of ovules and embryonic sac in: *Euphorbia cheirandenia*. *Pakistan J. Biol. Sci.* 8, 622.625.

29. Dary, M.; Chamber-Pérez Ma.; Palomares, A. J.; Pajuelo, E. 2010. "In situ" phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. *J Hazard Mater* 177:323–30.
- Baker, A.J.M., y Walker, P.L. (1998). Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. *In Heavy metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects*, Ed AJ Shaw, 155-177, CRC Press, Boca Raton, FL.
30. Díaz-Ravina, M. & Baath, E. 1996. Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2970-2977.
31. Digonzelli P., Díaz L. & Carrizo DE B.S. (2005). Uso de PPM (Plant Preservative Mixture) para controlar contaminantes bacterianos en la multiplicación in vitro de caña de azúcar. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 22(1), 22-32.
32. Dimkpa C. O, Svatos A., Merten D., Büchel G., Kothe E. Hydroxamate siderophores produced by *Streptomyces acidiscabies* E13 bind nickel and promote growth in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) under nickel stress. *Can J Microbiol* 2008; 54:163–72.
33. Dimkpa C. O, Merten D., Svatoš A., Büchel G., Kothe E. Metal-induced oxidative stress impacting plant growth in contaminated soil is alleviated by microbial siderophores. *Soil Biol Biochem* 2009b; 41:154–62.
34. Doran, P. (2009) Application of plant tissue cultures in phytoremediation research: incentives and limitations. *Biotechnol. Bioeng.* 103:60-76.
35. Drazkiewicz, A. 1994. Chlorophyllase: Occurrence, functions, mechanism of action, effects of external and internal factors. *Photosynthetica*, 30: 321-331
36. Environmental Protection Agency (EPA). (2001) Treatment Technologies for site cleanup: Annual Status Report. 10th Edition. Office of Solid Waste and Emergency.
37. Evangelou M. W. H., Ebel M., Schaeffer A. Evaluation of the effect of small organic acids on phytoextraction of Cu and Pb from soil with tobacco *Nicotiana tabacum*. *Chemosphere* 2006; 63:996-1004.

38. Funamoto, Y.; Yamauchi, N.; Shigenaga, T. & Sigyo, M. 2002. Effects of heat treatments on chlorophyll degrading enzymes in stored broccoli (*Brassica oleracea* L.). *Postharvest Biology and Technology*, 24: 163-170.
39. Gambale, F., Bregante, M., Paganetto, A., Magistrelli, P., Martella, L. (2001) A pilot phytoremediation system for the decontamination of lead-polluted soils published in autumn. *Columbus, Ohio*. (6):5.
40. Garbaye, J. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*. 128: pp. 197-210, 1994.
41. Geebelen, W.; J. Vangronsveld, D.C. Adriano, L.C. Van Poucke, H. Clijsters, 2002. "Effects of Pb-EDTA and EDTA on oxidative stress reactions and mineral uptake in *Phaseolus vulgaris*". *Physiology Plant.*, **115**: 377-384.
42. Glick BR, Todorovic B, Czarny J, Cheng Z, Duan J, McConkey B. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Crit Rev Plant Sci* 2007; 26:227–42.
43. Glick, B.R.; D.M. Karaturovic, P.C. Newell, 1995. "A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting pseudomonads". *Can. J. Microbiol.*, **41**: 533-536.
44. Grandlic, C. J; Mendez, M. O.; Chorover, J.; Machado, B.; Maier, R. M. 2008. Plant growth-promoting bacteria for phytostabilization of mine tailings. *Int J Environ Sci Technol* 42: 2079–84.
45. Haider, S., Kanwal, S.; Uddin, F. & Azmat, R. 2006. Phytotoxicity of Pb: II. Changes in Chlorophyll Absorption Spectrum due to Toxic Metal Pb Stress on *Phaseolus mungo* and *Lens culinaris*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9: 2062-2068.
46. Hart, J. J.; R. M. Welch, W. A. Norvell, L. A., Sullivan, L. V. Kochian, 1998. "Characterization of Cd binding, uptake and translocation in intact seedlings of bread and durum wheat cultivars". *Plant Physiol.*, **116**: 1314-1420.
47. Harmurt, K. L.; Hak, R. & Rinderle, U. (1990). The chlorophyll fluorescence ratio F690/F730 in leaves of different chlorophyll content. *Photosynthesis Research*, 25: 295-598

48. Ibañez, R. F. & Calderón, A. 2005. Efecto del estrés por salinidad en cuatro cepas de *Dunaliella salina* teod. en el Perú. *Ecología Aplicada*, 4: 128-133
49. Idris, R.; Trifonova, R.; Puschenreiter, M.; Wenzel, W. W.; Sessitsch, A. 2004. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2667–2677.
50. INEGI (1996). Relación de sitios afectados por disposiciones inadecuadas de residuos peligrosos. México.
51. INEGI, SEMARNAP. (1997) Estadísticas del Medio Ambiente, México.
52. Jing, Y. D., He, Z. L. & Yang, X. E. 2007. Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *J Zhejiang Univ Sci B*, 8, 192-207.
53. Jarup L. (2003). Hazards of heavy metal contamination, *Br. Med. Bull.* 68:167–182.
54. Jones, P., Kortenkamp, A., O'Brien, P., Wang, G., y Yang, G. (2002) Evidence for the generation of hydroxyl radicals from a chromium (V) intermediate isolated from the reaction of chromate with glutathione. *Biochim. Biophys. Acta* 286: 652-655
55. Karnwal, A. Production of Indole Acetic Acid by Fluorescent *Pseudomonas* in the presence of L-Tryptophan and rice root exudates. *Plant Pathology*. 91(1): pp. 61- 63, 2009.
56. Kaur, G. 2014. Alterations in growth and physiology of wheat to lead (Pb) stress under soil culture. *International Journal of Scientific Research*, 3: 173-176.
57. Kidd, P.; Barcelo, J.; Bernal, M. P; Navari-izzo, F.; Poschenrieder, C.; Shilev S. 2009. Trace element behaviour at the root–soil interface: implications in phytoremediation. *Environ Exp Bot* 67:243–59.
58. Kiran, Y.; A. Şahin, 2006. "The effects of cadmium on seed germination, root development and mitotic of root tip cells of Lentil (*Lens culinaris* Medik)". *World J. Agric. Sci.*, 2: 196-200.

59. Kloepper, J., 2006. Effect of seed piece inoculation with plant growth promoting rhizobacteria on population of *Erwinia carotovora* on potato roots and in daughter tubers. *Phitopathology*. 73: 217-219.
60. Kranner, I.; L. Colville, 2011. "Metals and seeds: Biochemical and molecular implications and their significance for seed germination". *Environ. Exp. Bot.*, **72**: 93-105.
61. Krishnaveni, M. S. Studies on Phosphate Solubilizing Bacteria (PSB) in Rhizosphere and Non-Rhizosphere Soils in Different Varieties of Foxtail Millet (*Setaria italica*). *International Journal of Agriculture and Food Science Technology*. 1: pp. 23-39, 2010.
62. Kuffner, M.; Puschenreiter, M.; Wieshammer, G.; Gorfer, M.; Sessitsch A. 2008. Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows. *Plant Soil* 304:35–44
63. Lara, C., Oviedo, L. & Alemán, A. 2011. Aislados nativos con potencial en la producción de ácido indol acético para mejorar la agricultura. *Bioteconología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 9, 17-23.
64. Lara, C.; Villalba, M.; Oviedo, L.E. Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba. Colombia. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 9 (2): pp. 6-14, 2007.
65. Larcher, W. (1995) *Physiological Plant Ecology*, Berlin, Heidelberg, Springer-Verlang, p. 506
66. Lasat, M. M. (2000) Phytoextraction of metals from contaminated soil: A review of plant/soil/metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues. *Journal of Hazardous Substance Research*. 2 (5):1- 25.
67. Lavid, N.; A. Schwartz, O. Yarden, E. Tel-Or, 2001. "The involvement of polyphenols and peroxidase activities in heavy-metal accumulation by epidermal glands of the waterlily (*Nymphaeaceae*)". *Planta*, **212**: 323-331.
68. Leura, V. A., Alonso, C. A., Carranza, A. C., Alfaro De la Torre, M. C., Loredó, P. R. y García De la Cruz, R. F. (2013). Removal and Accumulation of As, Cd and Cr by *Typha latifolia*. *Bull Environ Contam Toxicol.* 90 (2).

69. Li, W.Q.; M.A. Khan, S. Yamaguchi, Y. Kamiya, 2005. "Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*". *Plant Growth Regul.*, **46**: 45-50.
70. Limsuwan, S.; Kouwenc, T.; Piersmac, S.; Hiranrat, A.; Mahabusarakam, W.; Etal, R. 2009. A new candidate as natural antibacterial drug from *Rhodomyrtus tomentosa*. *Phytomedicine* 16:645–51.
71. Lodewyckx, C.; Vangronsveld, J.; Porteous, F.; Moore, E.R.B.; Taghavi, S.; Mezgeay, M.; Van der Lelie, D. 2002. Endophytic bacteria and their potential applications. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21: 583–606.
72. Luo, S. L.; Wan, Y.; Xiao, X.; Guo, H. J.; Chen, L.; Xi, Q.; Zeng, G. M.; Liu, C. B.; Chen, J. L. 2010. Isolation and characterization of endophytic bacterium LRE07 from cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and its potential for remediation. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 89:1637–1644.
73. Luo S. L, Chen L., Chen J. I, Xiao X., Xu T. Y, Wan Y. Analysis and characterization of cultivable heavy metal-resistant bacterial endophytes isolated from Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and their potential use for phytoremediation. *Chemosphere* 2011; 85:1130–8.
74. Luo S., Xu T., Chen L., Chen J., Rao C., Xiao X. Endophyte-assisted promotion of biomass production and metal-uptake of energy crop sweet sorghum by plant-growth-promoting endophyte *Bacillus* sp. SLS18. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012; 93:1745–53.
75. Ma, Y.; Mani, R.; Freitas, H. Isolation and characterization of Ni mobilizing PGPB from serpentine soils and their potencial in promoting plant growth and Ni accumulation by *Brassica* spp. *Chemosphera*. 75: pp. 719-725, 2009. 6. Carrillo,
76. Ma, Y.; Rajkumar M.; Freitas, H. 2009. Inoculation of plant growth promoting bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain Ax10 for the improvement of copper phytoextraction by *Brassica juncea*. *J Environ Manage* 90:831–7.

77. Ma, Y.; Rajkumar, M.; Freitas, H. 2009. Improvement of plant growth and nickel uptake by nickel resistant-plant growth promoting bacteria. *J Hazard Mater* 2009; 166:1154–61.
78. Ma, Y.; Rajkumar M.; Freitas H. 2009. Isolation and characterization of Ni mobilizing PGPB from serpentine soils and their potential in promoting plant growth and Ni accumulation by *Brassica* spp. *Chemosphere* 2009;75:719–25.
79. Ma Y., Rajkumar M., Vicente J., Freitas H. Inoculation of Ni-resistant plant growth promoting bacterium *Psychrobacter* sp. strain SRS8 for the improvement of nickel phytoextraction by energy crops. *Int J Phytoremediation* 2010; 13:126–39.
80. Ma, Y.; Prasad, M.; Rajkumar, M.; Freitas, H. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnology Advances* 29: 248–258.
81. McDonnell G., Russell A. D. Antiseptics and Disinfectants: activity, action and resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1999; 12:147-79.
82. Madhaiyan, M.; Poonguzhali, S.; Sa, T. 2007. Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Chemosphere* 69:220–8.
83. Maria S. D, Rivelli A. R, Kuffner M., Sessitsch A., Wenzel W. W, Gorfer M. Interactions between accumulation of trace elements and macronutrients in *Salix caprea* after inoculation with rhizosphere microorganisms. *Chemosphere* 2011; 84:1256–61.
84. M.G.; Juárez, J.; Tijerina, G.D. Isolation of innocuous microorganisms able to produce siderophores useful in phytoremediation systems. *Tropical and subtropical agrosystems.* 13 (3), 2011.
85. Marrero-Coto, J., Amores-Sánchez, I. & Coto-Pérez, O. 2012. Fitorremediación, una tecnología que involucra a plantas y microorganismos en el saneamiento ambiental. *ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar*, 46, 52-61.

86. Mastretta C., Taghavi S., Van der Lelie D., Mengoni A., Galardi F., Gonnelli C. Endophytic bacteria from seeds of *Nicotiana tabacum* can reduce cadmium phytotoxicity. *Int J Phytoremediation* 2009;11:251–67
87. Matagi, S.V., Swai, D., y Mugabe, R. (1998) A review of heavy metal removal mechanisms in wetlands. *Afr. J. Trop. Hydrobiol, Fish.* 8: 23-35.
88. Mejía, S.J.J. (2005) *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(8): 2037-2044.
89. Mengoni, A.; Pini, F.; Huang, L. N.; Shu, W. S.; Bazzicalupo, M. 2009. Plant-by-plant variations of bacterial communities associated with leaves of the nickel hyperaccumulator *Alyssum bertolonii* Desv. *Microbiol. Ecol.* 58:660–667.
90. Mhatre, G. N.; S. B. Chaphekar, 1982. "Effect of heavy metals on seed germination and early growth". *J. Environ. Biol.*, 3: 53-63.
91. MIAO V, DAVIES J: Actinobacteria. 2010. The good, the bad, and the ugly. *Anton Leeuwenhoek* 98:143-150.
92. Miller, V. E., 1981. *Fisiología vegetal*. Unión tipográfica Ed. Hispano-Americana, S.A. de C.V. 1° ed. Pp. 7-13.
93. Moore F. P.; Barac T.; Borremans B.; Oeyen L.; Vangronsveld J.; Van Der Lelie D.; Campbel C. D., Moore E. R. B. 2006. Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: The characterization of isolates with potential to enhance phytoremediation. *Systematic and Applied Microbiology* 29:539–556.
94. Mühlbachová G. Microbial biomass dynamics after addition of EDTA into heavy metal contaminated soils. *Plant Soil Environ* 2009; 55:544–50.
95. Munguía S. L. G., Castro A. N. I. (2012). *Micropropagación de especies forestales de la huasteca potosina.*, Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca, UASLP. Tesis de Licenciatura en Bioquímica.
96. Navarro, A. J. P., Aguilar, A. I. y López, M. J. R. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en las plantas., *Ecosistemas*, vol. 16, núm. 2, p. 1-17, Alicante, España.

97. Osti, C. L.; Reyes, L. L.; Victoria, E. D. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: Una revisión. *Terra Latinoamericana*. 22: pp. 225-239, 2004.
98. Ouzounidou G., Moustakas M., Symeonidis L., Karataglis, S. Response of wheat seedlings to Ni stress: effects of supplemental calcium. *Arch Environ Contam Toxicol* 2006; 50:346–52.
99. Parida BK, Chhibba IM, Nayyar VK. Influence of nickel contaminated soils on fenugreek (*Trigonella corniculata* L.) growth and mineral composition. *Sci Hortic-Amsterdam* 2003; 98:113–9.
100. Passardi, F.; C. Cosio, C. Penel, C. Dunand, 2005. "Peroxidases have more functions than a Swiss army knife". *Plant Cell Rep.*, **24**: 255-265.
101. Pecina-Martínez S. (2008). Remoción de Cromo y Cadmio en Solución por plantas de *Typha latifolia*. Tesis para obtener el título de Químico Farmacobiólogo, Facultad de Ciencias Químicas, UASLP, México.
102. Pérez M. B. E., Ramírez M. R., Núñez P. H. G. & Ochoa A. N. (1999). Introducción al cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México.
103. Pilon-Smits, E. A. H., y Pilon M. (2002). Phytoremediation of Metals Using Transgenic Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 21(5): 439-456. Piotrowska-Seget, Z., Cycón, M. & Kozdrój, J. 2005. Metal-tolerant bacteria occurring in heavily polluted soil and mine spoil *Applied Soil Ecology*, 28, 237-246.
104. Poschenrieder, C., Gunse, B. y Barcelo, J. (1989). Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance, and abscisic acid content in expanding bean leaves. *Plant Physiology*. 90: 1365-1371.
105. Raghuram N., Sopory S.K. (1995). Light regulation of nitrate reductase gene expression mechanism and signal-response coupling. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 1, 103-114.
106. Rajkumar, M.; Narasimha, M.; Vara, P.F.; Noriharu, A. Biotechnological applications of serpentine soil bacteria for phytoremediation of trace metals. *Biotechnology*. 29 (2): pp. 120-130, 2009.

107. Rajkumar, M. & Freitas, H. 2008. Influence of metal resistant-plant growth-promoting bacteria on the growth of *Ricinus communis* in soil contaminated with heavy metals. *Chemosphere*, 71, 834-842.
108. Rajkumar, M., Sandhya, S., Prasad, M. N. V. & Freitas, H. 2012. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnology Advances*, 30, 1562-1574.
109. Rolón C. G. A. (2015). Aislamiento y caracterización de bacterias endófitas de la raíz de *Typha latifolia* tolerantes a cadmio., Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca, UASLP. Tesis de Licenciatura en Bioquímica.
110. Ruiz, J.M.; B. Blasco, J.J. Ríos, L.M. Cervilla, M.A. Rosales, M.M. Rubio-Wilhelmi, E. Sánchez-Rodríguez, R. Castellano, L. Romero, 2009. "Distribución y eficiencia de la fitoextracción de cadmio por diferentes quelatos orgánicos". *Terra Latinoamericana*, **27**: 295-301.
111. Salt, D.E., Smith, R.D., Raskin, I. (1998). Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1998, p. 643–668.
112. Sánchez M. D. O. (2016). Micropropagación y aclimatación de *Encyclia parviflora*, orquídea del humedal natural Ciénaga de Cabezas, Tamasopo, S.L.P. Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca, UASLP. Tesis de Licenciatura en Bioquímica.
113. Sandalio, L. M., Dalurzo, H. C., Gomez, M., Romero-Puertas, M.C., Del Río, L.A. (2001). Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany*. 52:2115-2126.
114. Sasmaz, A.; Obek. E.; Hasar, H. (2008). The accumulation of heavy metals in *Typha latifolia* L. grown in a stream carrying secondary effluent, Elazig, Turkey.
115. Schützendübel, A.; A. Polle, 2002. "Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by micorrhization". *J. Exp. Bot.*, **53**: 1351-1365.

116. Sharma, P. & Dubey, R. S. 2005. Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17: 35-52.
117. Sheng, X.-F. & Xia, J.-J. 2006. Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium-resistant bacteria. *Chemosphere*, 64, 1036–1042.
118. Sessitsch, A.; Kuffner, M.; Kidd, P.; Vangronsveld, J.; Wenzel, W.; Fallmann, K.; Puschenreiter, M. 2013. The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. *Soil Biology & Biochemistry* 60: 182 - 194.
119. Simpson-Michael G. (2005) "Typhaceae", *Plant Systematics. Elsevier In.*, p. 205-206.
120. Singh, P.K. y Tewari, R.K. (2003). Cadmium toxicity induced changes in plant water relations and oxidative metabolism of *Brassica juncea* L. plants. *Journal of Environmental Biology*. 24:107-112.
121. Smiri, M., Chaoui, A., Rouhier, N., Gelhaye, E., Jacquot, J.P., Ferjani, E., 2010. "Oxidative damage and redox change in pea seeds treated with cadmium". *Comp. Rendus Biolog.*, **333**: 801-807.
122. Song Z. y Huang G. (2007). Toxic effects of pentachlorophenol on *Lemna polyrhiza*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 66 (3):343-347.
123. Strobel, G.; Daisy, B. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(4):491–502.
124. Taurian T., Anzuay M. S., Angelini J. G., Tonelli M. L, Ludueña L., Pena D. Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. *Plant Soil* 2010; 329:421–31.
125. Ultra V.U., Yano A., Iwasaki K., Tanaka S., Kang Y. M., Sakurai K. Influence of chelating agent addition on copper distribution and microbial activity in soil and copper uptake by brown mustard (*Brassica juncea*). *Soil Sci Plant Nutr* 2005; 51:193–202.

126. Vajpayee P., Tripathi R.D., Rai U.N., Ali M.B., Singh S.N. (2000). Chromium (VI) accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content in *Nymphaea alba* L. *Chemosphere* 41, 1075-1082.
127. Valdez, P. F. y Cabrera, M. V. M. (1998) La contaminación por metales pesados en Torreón, Coahuila. En defensa del medio ambiente, Torreón, Coah.
128. VAN A. 2004. Biodegradation of Nitro-Substituted Explosives 2,4,6-Trinitrotoluene, Hexahydro-1,3,5-Trinitro-1,3,5-Triazine, and Octahydro-1,3,5,7-Tetranitro-1,3,5-Tetrazocine by a Phytosymbiotic Methylobacterium sp. Associated with Poplar Tissues (*Populus deltoides/nigra* DN34). *Applied Environmental Microbiology*. 70: 508–517.
129. Van Der Lelie D., Barac T., Taghavi S., Vangronsveld J. 2005. Response to Newman. New uses of endophytic bacteria to improve phytoremediation. *TRENDS in Biotechnology* 23(1): 8-12.
130. Vara Prasad, M. N. y De Oliveira Freitas, H.M. (2003). Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology*. 6(3): 285-321.
131. Velázquez, J. L. H.; Torres R. L. M.; García de La Cruz, R.F. (2008) Estudio electroquímico de la interacción de Pb^{2+} y Cd^{2+} acumulados en raíces de *Typha latifolia* con protones, Facultad de Ciencias Químicas-CIEP, UASLP.
132. Vessey, J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255, 571-586.
133. Volke, T., y Velasco, J.T. (2002) Tecnologías de remediación para suelos contaminados. INEGI-SEMARNAT, México.
134. Volkmar, K.M.; E. Bremer, 1998. "Effects of seed inoculation with a strain of *Pseudomonas fluorescens* on root growth and activity of wheat in well-watered and drought-stressed glass-fronted rhizotrons". *Can. J. Plant Sci.*, 78: 545-551.
135. Vasquez M.O., Horan N.J., Mara, D.D. (1995). Effects of nitrogen application rates

- using treated wastewaters, on nitrogen uptake and crop yield based on pot trials with maize and soyabean. *Water Res.* 29, 1945-1949.
136. Vasquez Ma. D., Poschenrieder Ch., Barceló J. (1987). Chromium VI induced Structural and Ultrastructural changes in Besh bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) *Ann. Bot.* 59, 427-438.
137. Williams, P., Ketley, J. & Salmond, G. 1998. *Bacterial Pathogenesis*, London, Academic Press.
138. Wu Q, Wang S, Thangavel P, Li Q, Zheng H, Bai J, et al. Phytostabilization potential of *Jatropha curcas* L. in polymetallic acid mine tailings. *Int J Phytoremediation* 2011b; 13:788–804.
139. Ye, Z. H., Whiting, S. N., Lin, Z.Q., Lytle, C. M., Qian, J. H., y Terry, N. (2002) Removal and Distribution of Iron, Manganese, Cobalt, and Nickel within a Pennsylvania Constructed Wetland Treating Coal Combustion By-Product Leachate. *J. Environ. Qual*, p. 1464-1473.
140. Zerón, G. G. (2014). Establecimiento del cultivo *in vitro* de *Encyclia parviflora* orquídea del humedal natural Ciénaga de Tamasopo, S.L.P., Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca, UASLP. Tesis de Licenciatura en Bioquímica.
141. Zhang, Y. F.; He, L. Y.; Chen, Z. J.; Zhang, W. H.; Wang, Q. Y.; Qian, M. 2011. Characterization of lead- 1271 resistant and ACC deaminase-producing endophytic bacteria and their potential in 1272 promoting lead accumulation of rape. *J Hazard Mater* 186:720–5.

Anexo 1

Tratamiento A

- Colocar las semillas de *Typha latifolia* en un tubo cónico de 50 ml, enseguida adicionar solución fungicida al 1% y agitar de manera vigorosa durante 5 minutos. Al término de este tiempo retirar la solución con ayuda de una pipeta Pasteur estéril.
- En el mismo tubo, adicionar 5 ml de AgNO₃ al 0.5%, agitar vigorosamente durante 5 min y decantar la solución.
- Enseguida, colocar 5 ml de bacterin al 5%, agitar vigorosamente durante 5 min y decantar la solución.
- Después, se colocan 5 ml de cloro al 10%, agitar vigorosamente durante 5 min y decantar la solución.
- Adicionar 5 ml de Tween al 1%, agitar vigorosamente durante 5 min y decantar la solución.
- Por último, realizar tres lavados con agua destilada estéril, agitando vigorosamente durante 5 min por cada lavado y decantar la solución residual.

Tratamiento B

- Colocar las semillas de *Typha latifolia* en un tubo cónico de 50 ml, enseguida adicionar solución fungicida al 1% y agitar de manera vigorosa durante 5 minutos. Al término de este tiempo retirar la solución con ayuda de una pipeta Pasteur estéril.
- En el mismo tubo, adicionar 5 ml de AgNO₃ al 0.5%, agitar vigorosamente durante 5 min y decantar la solución.
- Enseguida, colocar 5 ml de bacterin al 5%, agitar vigorosamente durante 5 min y decantar la solución.
- Después, se colocan 5 ml de cloro al 10%, agitar vigorosamente durante 5 min y decantar la solución.
- Adicionar 5 ml de Tween al 1%, agitar vigorosamente durante 5 min y decantar la solución.
- Agregar 5 ml de etanol al 70%, agitar vigorosamente durante 5 min y decantar la solución.
- Por último, realizar cinco lavados con agua destilada estéril, agitando vigorosamente durante 5 min por cada lavado y decantar la solución residual.

Anexo 2

Preparación de medio de cultivo LB

- Colocar las semillas de *Typha latifolia* en un tubo cónico de 50 ml, enseguida adicionar solución fungicida al 1% y agitar de manera vigorosa durante 5 minutos. Al término de este tiempo retirar la solución con ayuda de una pipeta Pasteur estéril.
- En el mismo tubo, adicionar 5 ml de AgNO₃ al 0.5%, agitar vigorosamente durante 5 min y decantar la solución.
- Enseguida, colocar 5 ml de bacterin al 5%, agitar vigorosamente durante 5 min y decantar la solución.
- Después, se colocan 5 ml de cloro al 10%, agitar vigorosamente durante 5 min y decantar la solución.
- Adicionar 5 ml de Tween al 1%, agitar vigorosamente durante 5 min y decantar la solución.
- Por último, realizar tres lavados con agua destilada estéril, agitando vigorosamente durante 5 min por cada lavado y decantar la solución residual.