



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental

“Uso de un modelo planta-bacteria para estudiar el desarrollo del sistema radical de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., durante el estrés por  $Pb^{2+}$ ”

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestro en Ciencia y Tecnología Ambiental

**Presenta:**

Biol. Natanahel Salvador Ramírez

Dirigido por:

Dr. Juan Campos Guillén

Co-Director:

Dr. Lenin Sánchez Calderón

Querétaro, Qro. 13 de Diciembre del 2019



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental

“Uso de un modelo planta-bacteria para estudiar el desarrollo del sistema radical de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., durante el estrés por  $Pb^{2+}$ ”

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestro en Ciencia y Tecnología Ambiental

**Presenta:**

Biol. Natanahel Salvador Ramírez

Dirigido por:

Dr. Juan Campos Guillén

Co-dirigido por:

Dr. Lenin Sánchez Calderón

Dr. Juan Campos Guillén

Presidente

Dr. Lenin Sánchez Calderón

Secretario

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar

Vocal

Dr. Sergio de Jesús Romero Gómez

Suplente

Dr. Miguel Angel Rico Rodríguez

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

13 de Diciembre de 2019

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

- A la Universidad Autónoma de Querétaro por permitirme pertenecer a la familia de la UAQ y disfrutar sus instalaciones con ello mi formación.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por haberme otorgado la beca de manutención para poder hacer el posgrado en la UAQ.
- A la Facultad de Química por haberme recibido a pesar de mi formación de Biólogo no me cerraron las puertas.
- Al programa de Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental por tomarme en cuenta en su programa desde el día en que dieron las fechas de aceptación de ingreso al programa.

## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

- En particular quiero agradecer a mis sinodales revisores de mi tesis Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar, Dr. Sergio Romero Gómez, Dr. Miguel Rico Rodríguez que con sus sugerencias y exigencias me ayudan a mi formación, a todos ellos gracias.
- A mis compañeros de la MCTA Erandy, Fer, Edwin, Carmen, Alex gracias por compartirme su amistad aprendimos juntos muchas cosas.
- Al laboratorio de microbiología a Erika, Vicente, Iván por compartirme su amistad y conocimiento en mi estancia en la UAQ.
- Al Laboratorio de Genómica Evolutiva Sandra, David, Fernando, Denisse, Daniel y la Dra. Melina por compartirme su apoyo, gracias.
- A Ricardo Ortiz mi amigo y compañero del Lab gracias por tus sugerencias y aquí seguimos aun estudiando plantitas.
- Al Dr. Cesar Díaz Pérez sin sus regaños no podría haber construido el árbol filogenético.
- A la Dra. Liz de la UAZ por prestarme su microscopio para hacer las capturas de mis plantitas, a ella gracias.
- Al Dr. Lenin Sánchez Calderón de la UAZ por seguirme aguantando otros años más y no correrme de mi lugar y prestarme el Lab para hacer mis experimentos con las plantitas.
- Al Dr. Juan Campos Guillen de la UAQ muchas gracias por tenerme tanta paciencia en mi formación y apoyarme tanto le debo mucho Doc.

## RESUMEN

La rizósfera es un microbioma que hospeda gran diversidad de microorganismos que interactúan con las plantas y afectan su desarrollo de manera benéfica o dañina. Las bacterias que ayudan a las plantas en su crecimiento y desarrollo son las bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Sin embargo, el suelo donde se desarrollan las plantas presenta heterogeneidad y los suelos marginales: salinos, ácidos, básicos, déficit de nutrientes y presencia de metales pesados (MPs) que afectan el desarrollo postembrionario de las plantas tienen que adaptarse para sobrevivir al ambiente y la rizósfera es clave para su adaptación. En el presente trabajo, se aislaron microorganismos de suelos contaminados por MPs y fueron caracterizados morfológicamente e identificados molecularmente. Una vez caracterizados fueron usados para evaluar su capacidad para promover el crecimiento en plantas con un sistema *in vitro* planta-bacteria reportado para aislar bacterias promotoras del crecimiento vegetal. En total se aislaron 135 microorganismos de los cuales 126 son resistentes a los MPs As, Hg o Pb. Los microorganismos más resistentes fueron aislados de endosfera, en la determinación de los MICs crecieron en altas concentraciones de MPs. En el sistema *in vitro*, los aislados microbianos de endosfera que promovieron cambios en el desarrollo del sistema radical de *A. thaliana* fueron determinados como *Naganishia globosa*, *Sphingomonas trueperi*, *Sphingopixis alaskensis*, *Shingomonas melonis*. En la caracterización fisiológica con *Sphingomonas trueperi* se observó inhibición de la división celular en el meristemo del ápice de raíz (MAR), también una desorganización y engrosamiento de la raíz primaria (RP) ocasionada por la toxicidad de  $Pb^{2+}$ . Las raíces laterales (RLs) continúan formándose indicando que el transporte de auxinas está activa únicamente en la zona de diferenciación. En conclusión, el alargamiento de la RP podría deberse a la presencia de la rizobacteria como una respuesta de escape y este efecto induce la división celular permitiéndole alejarse de la zona de estrés.

**Palabras clave:** Desarrollo postembrionario, promoción del crecimiento, estrés abiótico, plomo.

## ABSTRACT

The rhizosphere hosts a great diversity of microorganisms that interact with plants and affect their development in a manner beneficial or harmful. The bacteria that help plants in their growth and development are the bacteria plant growth promotion. However, the soil where the plants develop presents heterogeneity and the marginal soils: saline, acidic, basic, nutrient deficit and presence of heavy metals (HMs) affect the postembryonic developmental of plants that have to adapt to survive the environment and the rhizosphere is a key factor to its adaptation. In the present work, microorganisms isolated from soils contaminated by MPs were morphologically characterized and molecularly identified. Once characterized, they were used to assess their ability to promote growth in plants with a system *in vitro* plant-bacteria reported used to isolated bacteria plant growth promoting. In total, 135 microorganisms were isolated, 126 of which are resistant to As, Hg or Pb. The most resistant microorganisms were isolated from the endosphere, in the determination of MICs, they grew in high concentrations of MPs. In the *in vitro* system, microorganisms isolated from the endosphere promoted changes in the development of the root system of *A. thaliana* that were determined as *Naganishia globosa*, *Sphingomonas trueperi*, *Sphingopixis alaskensis*, *Shingomonas melonis*. In the physiologic characterization with *Sphingomonas trueperi* inhibition of cell division in the root apical meristem (RAM) was observed, disorganization and thickening of the primary root (PR) caused by the toxicity of  $Pb^{2+}$ . The lateral roots (RLs) continue growing indicating that the transport of auxins is active only in the zone of differentiation. In conclusion, the growing of RP could be due to the presence of rhizobacteria as an escape response and this effect induces cell division allowing it to move away from the stress zone.

Keywords: Postembryonic developmental, plant grown promotion, abiotic stress, lead

## ÍNDICE

RESUMEN .....	5
ABSTRACT .....	6
ABREVIATURAS.....	13
I INTRODUCCIÓN .....	15
II JUSTIFICACIÓN .....	17
III ANTECEDENTES .....	20
3.1 Los metales pesados .....	20
3.1.1 Toxicidad de MPs .....	20
3.1.2 Los MPs y su problemática en el ambiente .....	20
3.1.3 Presencia de Pb <sup>2+</sup> en suelos.....	21
3.2 El desarrollo vegetal.....	22
3.2.1 Desarrollo postembrionario.....	22
3.2.2 Desarrollo postembrionario del sistema radical .....	22
3.2.3 Hormonas implicadas en el programa de desarrollo postembrionario del sistema radical.....	23
3.2.4 Genes que participan en el desarrollo del sistema radical.....	24
3.2.5 Regulación del PDPE por el ambiente.....	25
3.3 Respuestas de las plantas al Pb <sup>2+</sup> .....	25
3.4 Resistencia de bacterias al Pb <sup>2+</sup> .....	27
3.5 Interacciones entre plantas y rizobacterias .....	28
3.5.1 Promoción del crecimiento vegetal .....	29
3.5.2 Promoción del crecimiento vegetal en ambientes afectados con Pb <sup>2+</sup> ..	29
IV HIPÓTESIS.....	31
V OBJETIVO GENERAL .....	32
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	32
VI METODOLOGÍA .....	33

6.1 Material biológico y condiciones de crecimiento. ....	33
6.1.1 Material biológico vegetal y bacteriano. ....	33
6.1.2 Cultivo <i>in vitro</i> y condiciones de crecimiento vegetal. ....	33
6.2 Condiciones de crecimiento de las bacterias. ....	34
6.3. Sitio de colecta.....	34
6.3.1 Toma de muestras en campo. ....	35
6.3.2 Aislamiento y preservación de microorganismos. ....	36
6.3.3 Recuperación de los aislados. ....	37
6.3.4 Caracterización de los microorganismos aislados. ....	37
6.4 Resistencia de los aislados a MPs (As, Hg y Pb) en medio sólido.....	38
6.4.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria.....	38
6.5 Identificación molecular de los aislados. ....	38
6.5.1 Amplificación de los genes ribosomales ..... 39	
6.5.2 Reconstrucción filogenética ..... 40	
6.6 Evaluación de los cambios de la ASR de <i>A. thaliana</i> en presencia de Pb <sup>2+</sup>	40
6.7 Evaluación de la actividad promotora del crecimiento vegetal de las rizobacterias.....	41
6.8 Evaluación fisiológica y desarrollo del sistema radical de <i>A. thaliana</i> con la línea transgénica <i>DR5::GUS</i> .....	41
6.8.1 Tinción de GUS, técnica de clareo de plántulas y microscopía. ....	41
VII RESULTADOS.....	43
7.1 Aislamiento y caracterización de microorganismos de plantas que crecen en suelos contaminados con MPs. ....	43
7.1.1 Caracterización de los microorganismos aislados. ....	44
7.1.2 Pruebas de resistencia a MPs de los microorganismos aislados. ....	45
7.2 Modificaciones al sistema de interacción <i>in vitro</i> planta-bacteria.....	47
7.2.1 Selección de las condiciones de cultivo.....	48
7.2.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC).....	53
7.2.3 Evaluación de los aislados con el sistema <i>in vitro</i> planta-bacteria.....	55
7.2.4 Identificación molecular de los aislados.....	57
7.3 Plasticidad del PDPE en condiciones de Pb <sup>2+</sup> inducidos por los microorganismos aislados de suelos con MPs. ....	58



7.4 Cambios en la arquitectura del sistema radical inducidos por <i>S. trueperi</i> en <i>A. thaliana</i> .....	62
7.5 Inducción de cambios fisiológicos y expresión génica en el PDPE con <i>S. trueperi</i> en <i>A. thaliana</i> .....	68
VIII DISCUSIÓN .....	73
8.1 Diversidad microbiana y los ambientes extremos como los jales mineros... 73	73
8.2 Mecanismos moleculares de los microorganismos aislados de plantas que crecen en suelos contaminados con MPs.....	74
8.3 Efectos del Pb <sup>2+</sup> en la arquitectura del sistema radical de <i>A. thaliana</i> .....	76
8.4 Mecanismos de la promoción del crecimiento en <i>A. thaliana</i> .....	79
8.5 Desarrollo del sistema radical mediado por <i>S trueperi</i> .....	81
IX CONCLUSIONES .....	85
X BIBLIOGRAFÍA.....	86
XI ANEXOS .....	98

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Lista de secuencias utilizadas para amplificar el gen que codifica para el RNA ribosomal 16S y la región ITS.....	39
Cuadro 2. Tasa de crecimiento por día de las plántulas transferidas y sin transferir.....	53
Cuadro 3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria.....	54
Cuadro 4. Similitud de los aislados basados en el gen ribosomal 16S RNA y la región ITS comparados con la base de datos de la NCBI.....	57
Cuadro 5. Evaluación de la arquitectura del sistema radical de <i>A. thaliana</i> a los 12 DDT inoculado con <i>Sphingomonas trueperi</i> .....	63

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sitio de estudio ubicado en el municipio de Francisco I. Madero.....	35
Figura 2. Microorganismos aislados del sitio de colecta.....	43
Figura 3.Total de formas microscópicas de los microorganismos aislados.....	44
Figura 4.Resistencia a As, Hg y Pb de los microorganismos aislados.....	46
Figura 5. Microorganismos resistentes a As, Hg y Pb en función del sitio donde fueron aislados.....	47
Figura 6.Cinetica de crecimiento de <i>A. thaliana</i> en ecotipos de Col-0 y Ws en distintas concentraciones de medio MS 0.1, 0.2, 0.5 y 1.....	49
Figura 7. Respuesta del sistema radical de <i>A. thaliana</i> en presencia de distintas concentraciones de Pb.....	51
Figura 8. Cinética de crecimiento posterior a la transferencia en medio MS 0.5X.....	52
Figura 9. Evaluación de los microorganismos aislados de endosfera y rizósfera para la promoción del crecimiento en presencia de 800 µM Pb por contacto y distancia.....	56
Figura 10. Filogenia de los aislados.....	59
Figura 11. Cinética de crecimiento de 12 DDT de las rizobacterias y levadura evaluadas.....	61
Figura 12. Evaluación del desarrollo en <i>A. thaliana</i> .....	62
Figura 13. Plántulas representativas de 12 DDT de a cinética de crecimiento con la rizobacteria <i>Sphingomonas trueperi</i> por contacto.....	65
Figura 14. Cinética de crecimiento con <i>A. thaliana</i> DR5::GUS en el sistema <i>in vitro</i> por contacto con <i>Sphingomonas trueperi</i> .....	66
Figura 15. Plántulas representativas de 12 DDT de a cinética de crecimiento con la rizobacteria <i>Sphingomonas trueperi</i> por distancia.....	67
Figura 16. Cinética de crecimiento con <i>A. thaliana</i> DR5::GUS en el sistema <i>in vitro</i> por distancia con <i>Sphingomonas trueperi</i> .....	68
Figura 17.Caracterización fisiológica y de desarrollo con la línea transgénica DR5::GUS con LasI y <i>Sphingomonas trueperi</i> .....	69

Figura 18. Caracterización fisiológica y de desarrollo con la línea transgénica DR5::GUS.....	70
Figura 19. Raíces laterales con la línea transgénica DR5::GUS.....	72
Figura 20. Mecanismos activados en plantas en presencia de Pb y mecanismos activados en bacterias en presencia de Pb.....	78
Figura 21. Respuestas y mecanismos hipotéticos activados durante la interacción entre plantas y microorganismos en presencia de Pb.....	83

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## ABREVIATURAS

ABA	ácido abscísico	Fe <sup>2+</sup>	hierro
ABC	ATP binding cassette	GAs	giberelinas
Al	aluminio	GSH	glutación
AN	agar nutritivo	Hg <sup>2+</sup>	mercurio
As V	arsenato	HMA	heavy metal associated
As III	arsenito	IAA	ácido indoleacético
ASR radical	arquitectura del sistema radical	LANGEBIO	Laboratorio nacional de genómica para la biodiversidad
BRs	brasinosteroides	LB	luria bertani
CAT	catalasa	LRP	longitud de raíz primaria
Cd <sup>2+</sup>	cadmio	MAR raíz	meristemo del apice de raíz
CKs	citocininas	Mg <sup>2+</sup>	magnesio
CN	caldo nutritivo	Mn <sup>2+</sup>	manganeso
Co <sup>2+</sup>	cobalto	Mo <sup>2+</sup>	molibdeno
Col-0	columbia 0	MPs	metales pesados
COO <sup>-</sup>	carbonato	MTs	metalotioneinas
Cr <sup>6+</sup>	cromo	N	nitrógeno
CU <sup>2+</sup>	cobre	NaCl	cloruro de sodio
DDG	días después de la germinación	NO <sub>3</sub>	nitrito
DDT	días después de la transferencia	NPA	ácido naftilalámico
DKPs	diketopiperazinas	Pb <sup>2+</sup>	plomo
DR5	línea reportera de respuesta a auxinas	PbS	sulfito de plomo
DRL	densidad de raíz lateral	PCs	fitoquelatinas
		PDPE	programa de desarrollo postembionario

PLT	plétora	SCR	scarecrow
PO <sub>4</sub>	fosfato	SHR	short root
PRL	primordio de raíz lateral	SOD	superoxido dismutasa
QC	centro quiescente	SR	Sistema radical
RAs	raíces adventicias	TSA	tripteina soya agar
RL	raíz lateral	WOX	WUSHEL related
ROS	especies reactivas de	homeobox	
oxigeno		Ws	wassilewskija
RP	raíz primaria	Zn <sup>2+</sup>	zinc
S	azufre		

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## I INTRODUCCIÓN

Uno de los órganos más importantes de las plantas es el sistema radical (SR), el cual crece en el suelo que es un ambiente donde los componentes tanto bióticos como abióticos están distribuidos de manera heterogénea. Tan pronto como el SR hace contacto con el suelo, comienza a formar un microhábitat conocido como rizósfera, uno de los hábitats más ricos en recursos, que alberga gran diversidad de microorganismos benéficos y/o patógenos (Glick, 1995; Lynch, 1995). Cuando se establece una interacción benéfica entre la planta y una bacteria de la rizósfera (rizobacteria), existe un intercambio de recursos que incluyen carbohidratos y otros nutrientes, así ambos se benefician y mantienen una cooperación constante.

Las condiciones generadas en la rizósfera de una especie vegetal por la interacción con las rizobacterias podrían estar reduciendo el estrés que generalmente impera en el suelo, permitiendo a la planta colonizar suelos con condiciones adversas, sean estos salinos, ácidos, básicos, pobres en nutrimentos o ricos en elementos tóxicos como los metales pesados (MPs) (McLaughlin *et al.*, 2000; Lynch y Brown, 2001).

El estudio de las interacciones entre las plantas y los microorganismos de su rizósfera, ha sido un tema de interés creciente en las últimas décadas y hasta la fecha se ha descrito una parte de la diversidad de microorganismos que habitan la rizósfera de algunas especies vegetales. Además, se ha reportado como estos microorganismos modifican las características fisicoquímicas de la rizósfera y cómo estas modificaciones pueden mejorar la nutrición, desarrollo y crecimiento de las plantas (van Loon y Glick, 2004).

Hasta la fecha, se han reportado las estrategias fisiológicas, bioquímicas y moleculares que presentan algunas rizobacterias aisladas de suelos ricos en MPs, para sobrevivir en esos hábitats (Gadd, 2004). Sin embargo, es escasa la información de cómo estas rizobacterias hacen que las plantas mejoren su productividad en suelos ricos en MPs. No se tiene claro si éstas son generalistas o especialistas, tampoco se cuenta con información suficiente sobre qué receptores,

cascadas de señalización y expresión de genes específicos permiten la interacción planta-bacteria (Glick, 2012).

Los mecanismos de resistencia para hacer frente a los MPs que poseen las rizobacterias y las respuestas que inducen en las plantas con las que interactúan, son de gran interés para el desarrollo de herramientas para la recuperación de suelos afectados por MPs (Remans *et al.*, 2012).

Dirección General de Bibliotecas UAQ



## II JUSTIFICACIÓN

Desde la antigüedad, el uso de productos hechos con metales pesados MPs forma parte de nuestras actividades diarias. La liberación inducida de estos contaminantes desde sus depósitos hasta el ambiente representa un riesgo severo para todos los organismos que tienen contacto con ellos (Jaishankar *et al.*, 2014).

La actividad minera necesaria para la extracción y procesamiento de los MPs genera desechos peligrosos, en el estado de Zacatecas debido a su tradición minera, estos desechos se han acumulado en depósitos que se conocen como jales mineros.

Gran parte de estos jales han sido depositados en las partes altas de las microcuencas y los MPs presentes en dichos jales han sido acarreados por lixiviación y erosión, hasta las cercanías de los poblados de las zonas bajas, donde son un riesgo para la salud pública (Salas-Luevano *et al.*, 2009; Salas-Luevano *et al.*, 2011). Dichos sitios afectados por la acumulación inducida de MPs, resultan ser de gran interés para nuestro grupo de trabajo, debido a que los organismos que los habitan, presentan una gran diversidad de estrategias bioquímicas, moleculares, fisiológicas y ecológicas que les ha permitido colonizar estos sitios (Montalbán *et al.*, 2016).

Numerosos estudios se han enfocado en la identificación y aislamiento de microorganismos procedentes de la rizósfera de diversas especies. Algunas rizobacterias han sido usadas como parte de las formulaciones de biofertilizantes debido a su capacidad de promoción del crecimiento vegetal y protección contra algunos microorganismos patógenos (Pérez-García *et al.*, 2011). También se ha reportado que algunas rizobacterias aisladas de plantas que crecen en suelos marginales, promueven el crecimiento tanto en condiciones fisiológicas como en estrés por sequía y alta salinidad (Gagné-Bourque *et al.*, 2015; Tiwari *et al.*, 2017).

El aislamiento de rizobacterias de plantas que crecen en ambientes contaminados con MPs ha permitido ampliar nuestro conocimiento, aun limitado, de los

mecanismos de resistencia, de aquellos microorganismos que cooperan y forman asociaciones para mantenerse viables en ambientes contaminados con MPs (Palacio-Rodríguez *et al.*, 2017; Pérez-Flores *et al.*, 2017). A pesar de que existen diferentes reportes de rizobacterias que mejoran la tolerancia de las plantas al estrés de los MPs (Sharma *et al.*, 2016; Palacio-Rodríguez *et al.*, 2017; Tiwari *et al.*, 2017) la falta de estudios detallados de la interacción planta-rizobacteria donde describan como ocurren los cambios fisiológicos, de desarrollo y de expresión génica que las rizobacterias inducen en las plantas para sobrevivir en medios contaminados MPs es bastante limitado.

En nuestro grupo de trabajo estamos interesados en estudiar las estrategias que subyacen en la interacción planta-rizobacteria en condiciones de estrés generadas por MPs, haciendo énfasis en el desarrollo postembrionario del sistema radical (SR). Estamos interesados en estudiar como la interacción entre la planta y la rizobacteria puede modular el desarrollo del SR y por ende la capacidad que tiene la planta para explorar el suelo, ya sea direccionando el crecimiento a zonas ricas en nutrimentos y agua o evitando las zonas desfavorables donde pueden estar los MPs. Aislar y seleccionar rizobacterias tolerantes a MPs que además promueven el crecimiento vegetal nos permitirá en el corto plazo describir los cambios fisiológicos, de desarrollo y de expresión génica que ocurren en la planta y en el mediano plazo poder utilizar algunas de las rizobacterias o modificar genéticamente a la planta para generar herramientas biotecnológicas que faciliten la fitorremediación de suelos contaminados por MPs.

Por lo anterior en el presente trabajo se han aislado bacterias de la rizósfera y endosfera de plantas que crecen en un predio contaminado con jales mineros localizado en el estado de Zacatecas. El suelo de dicho predio presenta altas concentraciones de  $Pb^{2+}$  (0.029 M), es bajo en materia orgánica y ligeramente ácido, lo cual sugiere que el  $Pb^{2+}$  se encuentra disponible para ser transportado por las plantas (Rivera-Menchaca, 2017). Para seleccionar aquellas rizobacterias capaces de promover el crecimiento vegetal en condiciones en las que el  $Pb^{2+}$  es un factor limitante para el desarrollo vegetal, se implementó un sistema *in vitro* de

interacción planta-bacteria que permite evaluar cientos de aislados en un periodo de tiempo corto. El aporte de este trabajo nos permitirá conocer como la interacción entre plantas y bacterias afecta el desarrollo de las plantas en ambientes contaminados con  $Pb^{2+}$ .

Dirección General de Bibliotecas UAQ

### III ANTECEDENTES

#### 3.1 Los metales pesados

Los metales pesados (MPs) son en su mayoría elementos metálicos y algunos metaloides que tienen una masa atómica superior a 20 y densidad superior a 5 g/cm<sup>3</sup> (Järup, 2003). Los MPs como cobalto (Co<sup>2+</sup>), cobre (Cu<sup>2+</sup>), hierro (Fe<sup>3+</sup>), manganeso (Mn<sup>2+</sup>), molibdeno (Mo<sup>2+</sup>) y zinc (Zn<sup>2+</sup>) han sido agrupados como elementos esenciales porque son necesarios para llevar a cabo procesos metabólicos basales, pero en concentraciones altas son tóxicos. Otros MPs como: el arsénico (As<sup>5+</sup>), cadmio (Cd<sup>2+</sup>), mercurio (Hg<sup>2+</sup>), cromo (Cr<sup>6+</sup>) y plomo (Pb<sup>2+</sup>) son considerados como no esenciales puesto que aún no se conoce alguna función en los organismos y en concentraciones bajas, son tóxicos (Clemens, 2001; Viehweger, 2014).

##### 3.1.1 Toxicidad de MPs

Los MPs pueden mantenerse en el ambiente o ser acumulados en tejidos biológicos. Estos MPs irrumpen los procesos metabólicos de las células reemplazando cofactores esenciales para llevar a cabo reacciones enzimáticas y pueden afectar el crecimiento de los organismos (Pourrut *et al.*, 2011). Se ha reportado que el Pb<sup>2+</sup> en humanos es carcinogénico, ocasiona deficiencias neuronales que afectan la coordinación motriz, incrementa el riesgo de tener fallos en el sistema renal y órganos reproductivos, también afecta el desarrollo de neonatos (Nigg *et al.*, 2010). En plantas también se ha reportado que los MPs afectan el desarrollo. Los síntomas típicos de la toxicidad por MPs en plantas son clorosis, inhibición del crecimiento y la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Clemens, 2001).

##### 3.1.2 Los MPs y su problemática en el ambiente

Los MPs pueden ser liberados al ambiente por procesos geológicos como la erosión de la roca madre, emisiones de gases durante la actividad volcánica, movilización desde depósitos minerales y por actividades antropogénica como la minería, la industria, la agricultura intensiva y el uso de combustibles fósiles (Gadd, 2010; Morais *et al.*, 2012). En los últimos siglos la industria minera ha generado gran cantidad de residuos, conocidos en México como jales, que fueron liberados al ambiente y se encuentran depositados en microcuencas a lo largo de nuestro país. Desde el siglo pasado, los jales se han depositados en áreas de confinamiento llamados presas de jales. Dada la naturaleza química de la vetas mineras explotadas y a los procesos de extracción, los jales son ricos en elementos tóxicos como el  $Pb^{2+}$ ,  $Cr^{6+}$ ,  $As^{5+}$  y  $Hg^{2+}$  y por ende son los principales MPs que contaminan los suelos de México (Meza-Figueroa *et al.*, 2018).

### 3.1.3 Presencia de $Pb^{2+}$ en suelos

Uno de los principales problemas de contaminación en Latinoamérica y en particular en México es el  $Pb^{2+}$ . Este MP se encuentra contaminando varias áreas en el país principalmente por la combustión de gasolinas y por los depósitos de jales mineros. Los fenómenos meteorológicos como lluvia y viento hacen que el  $Pb^{2+}$  sea esparcido ampliamente (Szalóki *et al.*, 2000). Se han encontrado altas concentraciones de  $Pb^{2+}$  en suelos cercanos a viviendas donde representa un alto riesgo para la salud humana (Delgado-Caballero *et al.*, 2018; Meza-Figueroa *et al.*, 2018). También estudios hechos por (Iskander *et al.* (1994); Salas-Luevano *et al.*, 2011) en suelos del estado de Zacatecas, reportaron altas concentraciones de  $Pb^{2+}$  en los poblados de Vetagrande y La Zacatecana.

Se ha reportado que el  $Pb^{2+}$  en el suelo forma complejos con  $O^-$  y  $OH^-$  y esto mantiene su movilidad limitada (Bruins *et al.*, 2000; Meza-Figueroa *et al.*, 2018). El uso continuo y prolongado de fertilizantes fosforados (además contienen trazas de As) propician que el  $Pb^{2+}$  se acumule en suelos agrícolas (McLaughlin *et al.*, 2000; Aydinalp y Marinova, 2003; Schipper *et al.*, 2011). También las baterías y pinturas acrílicas son fuente de  $Pb^{2+}$  (Gadd, 2010). En consecuencia la acumulación de

Pb<sup>2+</sup> en suelos y el uso intensivo de pesticidas reducen la diversidad microbiana en el suelo y la productividad vegetal (Banerjee *et al.*, 2019).

### **3.2 El desarrollo vegetal**

El desarrollo de las plantas puede ser dividido en dos etapas: a) el desarrollo embrionario y b) el desarrollo postembrionario. Ambos se encuentran estrictamente regulados por un programa establecido genéticamente (Baum *et al.*, 2002; Sánchez-Calderón *et al.*, 2013). El desarrollo embrionario inicia con la fecundación, una vez que se da la cariogamia, por medio de divisiones celulares sincronizadas y perfectamente reguladas se forma el embrión con sus meristemos: el apical aéreo y el radical en sus polos (Scheres *et al.*, 1994; Berleth y Chatfield, 2002). En el desarrollo postembrionario, a partir de los meristemos apicales, los órganos se forman crecen y maduran, ambos orquestados por un programa de desarrollo regulado genéticamente (Berleth y Chatfield, 2002; Sánchez-Calderón *et al.*, 2013).

#### **3.2.1 Desarrollo postembrionario**

Con la germinación, se inicia el programa de desarrollo post-embionario (PDPE). En el meristemo apical aéreo se comienzan a formar los primordios foliares que darán origen a las hojas y los meristemos laterales que permitirán la ramificación tallo y finalmente desarrollar los órganos florales. A partir del meristemo apical de la raíz primaria (RP), se desarrolla el sistema radical (SR) (Scheres *et al.*, 1994).

#### **3.2.2 Desarrollo postembrionario del sistema radical**

Durante la germinación el primer órgano en emerger es la RP y por los procesos de desarrollo y crecimiento, que ocurren en su ápice, la raíz comienza a explorar el sustrato (Lynch y Brown, 1998). En la región apical de la raíz, se encuentran tres zonas donde ocurren procesos fisiológicos característicos de cada una de ellas. En la región más distal se encuentra la zona meristemática, donde ocurren divisiones celulares de manera ordenada y estereotipada para formar los

diferentes prototejidos que finalmente se diferenciarán en los tejidos (estela, periciclo, endodermis, córtex, epidermis) que conforman la raíz (Dolan *et al.*, 1993). Adyacente al meristemo en la zona de elongación las células se alargan hasta llegar a su tamaño final, es en este punto donde ocurre el crecimiento de la RP, se incrementa entre 10 y 20 veces la longitud celular. Posteriormente en la zona de diferenciación las células adoptan su destino final (Scheres *et al.*, 1994; Baum *et al.*, 2002).

Posterior a la emergencia de la RP, por medio de divisiones periclinales y anticlinales, en el células muy específicas del periciclo de la zona de diferenciación de la RP, se forma un domo celular conocido como primordio de raíz lateral (PRL) y en una fase más tardía el primordio emerge para formar raíces laterales (LR) de primer orden (Malamy y Benfey, 1997), este proceso se repite para formar LR de segundo y tercer orden, las cuales harán que el SR se ramifique, a la conformación tridimensional (ramificación) del sistema radical en el sustrato se le conoce como la arquitectura del sistema radical (ASR) (Lynch y Brown, 2001). Dicha ramificación modifica la capacidad del sistema radical para explorar el suelo (Lynch y Brown, 1998).

A pesar de que el PDPE del SR está establecido genéticamente, este puede ser modulado por factores ambientales tanto bióticos (microorganismos) como abiótico (nutrimentos, sequía, MPs) presentes en el ambiente (Malamy, 2005; Sánchez-Calderón *et al.*, 2013; Zamioudis *et al.*, 2013).

### **3.2.3 Hormonas implicadas en el programa de desarrollo postembrionario del sistema radical**

Las hormonas son moléculas pequeñas sintetizadas por diferentes vías metabólicas de la planta (Santner y Estelle, 2009). Las auxinas, ácido abscísico, citocininas, giberelinas, etileno y brasinosteroides, se consideran las hormonas más importantes durante el desarrollo postembrionario.

Las auxinas (IAA, principal auxina) regulan procesos de división celular, sensibilidad a la gravedad, desarrollo vascular, establecimiento del meristemo

apical de la raíz (MAR). También participan en la iniciación y emergencia de las RLs en el SR (Benková y Hejác̃ko, 2009; Péret *et al.*, 2009). Las citocininas (CKs) también participan en la modulación de la ASR. Inhiben el crecimiento de la RP y la ramificación (Werner *et al.*, 2003). Se ha reportado que las CKs antagonizan con las auxinas, en la iniciación de las RLs, afectando la transición G2 a M en las células fundadoras que formarán las RLs regulando la ASR (Li *et al.*, 2006; Laplaze *et al.*, 2007).

Otras hormonas, las giberelinas (GAs), también modulan la ASR regulando procesos de proliferación celular y alargamiento de la raíz (Fleet y Sun, 2005; Ubeda-Tomás *et al.*, 2008). Los brasinosteroides (BRs) estimulan la división y el alargamiento celular así como la diferenciación del sistema vascular. Principalmente promueve el crecimiento de la raíz. Se ha demostrado que las BRs pueden antagonizar con el IAA para regular el crecimiento del SR (Mouchel *et al.*, 2006). El ácido abscísico (ABA) regulan el desarrollo de las RLs. También se ha observado que participa en respuestas a estrés como sequía, salinidad y frío (Finkelstein *et al.*, 2002). El ABA tiene un efecto inhibitorio en la formación de las RLs (De Smet *et al.*, 2007). En el meristemo del ápice de la raíz, el etileno inhibe la división de las células que se encuentran adyacentes a las QC (Ortega-Martínez *et al.*, 2007). La interacción entre las diferentes hormonas da como resultado la regulación del ASR regulado por el ambiente.

### **3.2.4 Genes que participan en el desarrollo del sistema radical**

El PDPE es regulado por la actividad de una población de células indiferenciadas, las células del QC (del inglés, Centro Quiescente) y las iniciales de cada uno de los tejidos, que se forman durante el desarrollo embrionario, donde participan genes como *Pletora* (*PLT*) que codifica para un factor de transcripción que se encarga de mantener el meristemo de la RP (van den Berg *et al.*, 1997; Grieneisen *et al.*, 2007). *SHR* (Shortroot) y *SCR* (Scarecrow) también participan en el mantenimiento del meristemo de raíz interaccionando de manera antagónica (Sabatini *et al.*, 2003; Galinha *et al.*, 2007). La deficiencia en la expresión de los



genes *PLT*, *SHR* y *SCR* ocasiona que el patrón de organización del SR no se lleve a cabo y no formen órganos (Scheres *et al.*, 1995). La familia de genes *WOX* (WUSHEL related homeobox) participan en el patrón de organización de la RP y en la formación de RLs (Kong *et al.*, 2016).

### **3.2.5 Regulación del PDPE por el ambiente**

Las plantas al encontrarse en el suelo heterogéneo tienen que modular su PDPE y así modificar la ASR para redireccionar su crecimiento y acercarse a las zonas ricas en nutrientes o bien evitar los lugares estresantes (Sánchez-Calderón *et al.*, 2013; Claeys *et al.*, 2014).

Se ha reportado que la deficiencia de nutrientes como el P cambian la ASR generando un fenotipo con RP corta y un SR ramificado (López-Bucio *et al.*, 2002; Gruber *et al.*, 2013). La deficiencia del N (nitrógeno) da como resultado un fenotipo con RP alargada y pocas RLs (Gifford *et al.*, 2013). En condiciones de estrés por sequía el crecimiento de la RP se reduce afectando el desarrollo del SR (Claeys *et al.*, 2014). En cactáceas se presenta crecimiento determinado de la RP, cuando crecen en condiciones de sequía (Shishkova *et al.*, 2013). En condiciones de salinidad (75 mM de NaCl) el desarrollo del SR de *A. thaliana* cambia redirigiendo el crecimiento del SR (Galvan-Ampudia *et al.*, 2013).

De manera general para los MPs, se ha reportado que la exposición a estos contaminantes ocasiona clorosis en las plantas, reducción en su biomasa, inhibe su germinación y ocasionalmente retarda su crecimiento (Clemens, 2001). Se ha demostrado que una concentración de 0.75 mM de  $Pb^{2+}$  afecta el PDPE inhibiendo la RP e incrementando las RLs (Lee *et al.*, 2005).

### **3.3 Respuestas de las plantas al $Pb^{2+}$**

Los mecanismos principales para tolerar el estrés por los MPs son la exclusión, secuestro y la bioacumulación (Clemens, 2001). Las plantas que al crecer en suelos que contienen MPs, tienden a acumularlos en sus tejidos (la concentración

del MP es mayor en sus tejidos que en el suelo), se les conocen como hiperacumuladoras (Phang *et al.*, 2011). Especies de plantas como *Brassica juncea*, *Euphorbia macroclada* y *Centaurea virgata*, han sido reportadas como hiperacumuladoras de  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  y  $Pb^{2+}$  (Szczygłowska *et al.*, 2011).

Se ha observado que la presencia de  $Pb^{2+}$  induce la síntesis de ácidos orgánicos como el cítrico y málico en plántulas de *Brassica juncea*, que interacciona con el Pb reduciendo biodisponibilidad permitiendo continuar con el desarrollo de la planta en medios afectados con  $Pb^{2+}$  (Kohli *et al.*, 2018).

Una vez que el MP es percibido, se activan defensas intracelulares para evitar su toxicidad, moléculas como las metalotioneínas (MTs), glutatión (GSH), fitoquelatinas (PCs), citrato y ascorbato se unen al MP para quelarlo e inhibir su movilidad y prevenir daño en las células (Ezaki *et al.*, 2004; Sharma y Dietz, 2006; Haydon y Cobbett, 2007; Curie *et al.*, 2008; Sharma y Dietz, 2009; Phang *et al.*, 2011). *Avicennia marina* es una de las plantas que acumula  $Pb^{2+}$  en su SR y posteriormente lo trasloca hacia la parte aérea (MacFarlane y Burchett, 2002; Yan *et al.*, 2010).

Se ha reportado que miembros de la familia de transportadores ABC (del inglés, ATP-Binding Cassette), HMA2, HMA3 y HMA4 (del inglés, Heavy Metal Associated) están involucrados en la detoxificación del  $Pb^{2+}$ , estas proteínas quelan el ion y lo almacenan en las vacuolas (Wong y Cobbett, 2009; Morel *et al.*, 2009; Mendoza-Cózatl *et al.*, 2010). Además se ha reportado que la formación de complejos facilita la translocación hacia la parte aérea (Gong *et al.*, 2003) y se ha descrito que el gen AtPDR12 está relacionado en la translocación de los complejos (Lee *et al.*, 2005).

Se ha reportado que el  $Pb^{2+}$  afecta la distribución de las auxinas (hormonas de crecimiento) que participan durante el desarrollo embrionario (Wang *et al.*, 2015) y en consecuencia cambia la configuración de la ASR (Fischer *et al.*, 2014). Los mecanismos implicados en los programas de desarrollo embrionario en medios con  $Pb^{2+}$  aún están por ser clarificados, y la interacción entre plantas y

microorganismos podría estar facilitando el crecimiento y desarrollo en suelos metalíferos (Montalbán *et al.*, 2016).

### 3.4 Resistencia de bacterias al $Pb^{2+}$

El  $Pb^{2+}$  es de los metales que más reduce la biomasa microbiana en el suelo (Khan y Scullion, 2002). Se ha reportado que las rizobacterias pueden movilizar o inmovilizar al MP una vez que ingresa al citoplasma (Gadd, 1990). En la mayoría de las estrategias usadas para tolerar los MPs participan agentes quelantes, enzimas o la secreción ácidos orgánicos, similar a las plantas (Gadd, 2004; Kaewdoung *et al.*, 2016). Estas estrategias permiten a las rizobacterias reducir la toxicidad del MP por acidificación del suelo, formación de quelatos y precipitados o por reacciones rédox modificando la biodisponibilidad del MP (Mishra *et al.*, 2017).

Los mecanismos de detoxificación del  $Pb^{2+}$  han sido descritos en *Cupriavidus metallidurans* que ha sido un excelente modelo para estudios de resistencia a MPs. Una vez que el  $Pb^{2+}$  es percibido en la membrana plasmática son activados genes como *pbrUTRABCD*, que codifican para proteínas transmembranales de la familia de las ATPasas tipo-P, que se encuentran en los plásmidos pMOL28 y pMOL30, estas proteínas se encargan de expulsar los iones de  $Pb^{2+}$  (Taghavi *et al.*, 2009)

Otro mecanismo descrito en las bacterias es el secuestro de iones de  $Pb^{2+}$  que ocurre de manera intracelular como se ha observado en *Providencia vermicola*. Los iones de  $Pb^{2+}$  son almacenados en forma PbS (Sulfuro de Plomo) en el espacio periplásmico. Además se ha observado que la morfología de la bacteria se modifica al estar en presencia de  $Pb^{2+}$  (Sharma *et al.*, 2017). De manera similar se ha descrito en *Pseudomonas aeruginosa* el secuestro de  $Pb^{2+}$  ocurre con la formación de complejos quelantes que se forman en la membrana extracelular de la bacteria y esto influencia en la resistencia de la bacteria (Harrison *et al.*, 2005).

También se ha visto que las bacterias sintetizan sideróforos, ligando que atrapan  $Fe^{3+}$  y se ha demostrado la producción de sideróforos en *P. aeruginosa* cuando

está en  $Pb^{2+}$  (Naik y Dubey, 2011). Adicionalmente, se ha relacionado al GSH que en presencia de  $Pb^{2+}$  neutraliza su actividad formando conjugados con el metal en el citosol (Van der Heggen *et al.*, 2010). Algunos de los mecanismos descritos anteriormente podrían estar influenciando el desarrollo de la planta ya sea interaccionando de manera directa o indirecta.

### 3.5 Interacciones entre plantas y rizobacterias

Las interacciones entre diferentes especies a menudo proveen de beneficios para su crecimiento. La rizósfera es un microhábitat donde interactúan la planta, los micro y macro organismos y el suelo (Bais *et al.*, 2006). La rizósfera se divide en: a) endo-rizósfera: que involucra rizobacterias endófitas que colonizan tejidos corticales o endodermales, b) rizo-plano: que comprende a las rizobacterias que se adhieren a la epidermis del SR y c) ecto-rizósfera: comprende a las rizobacterias que se encuentran cercano al sustrato que rodea al SR (Badri y Vivanco, 2009). También la filósfera forma parte de las interacciones donde habitan los microorganismos que colonizan la superficie de los órganos aéreos de la planta como las hojas (Lindow y Brandl, 2003).

De las asociaciones más conocidas, están las aquellas entre rizobacterias que fijan  $N_2$  y la raíz de las leguminosas. Los exudados liberados por el SR en la rizósfera atraen a las rizobacterias que ingresan a través de los PRs una vez dentro de los tejidos radicales proliferan e inducen a la formación de nódulos (Kumar *et al.*, 2007; Rudrappa *et al.*, 2008; Neal *et al.*, 2012). Se ha visto en rizobacterias como *P. fluorescens* y *Bacillus subtilis* son quimioatraídas por gradiente de ácidos orgánicos como maleico, málico, oxálico y cítrico, que son sintetizados por el SR (de Weert *et al.*, 2002; Erro *et al.*, 2009). Además, se ha documentado en las rizobacterias que la expresión de genes como *cheY* está relacionada con la quimiotaxis y es un determinante para colonizar el SR (Mark *et al.*, 2005). Posterior al reconocimiento ocurren cambios hormonales y metabólicos en la planta (Walker *et al.*, 2011). Establecida esta comunicación las plantas y las rizobacterias pueden beneficiarse.

### 3.5.1 Promoción del crecimiento vegetal

La promoción del crecimiento vegetal son algunos de los beneficios que proveen las rizobacterias, mejorando su crecimiento, ya sea directa o indirectamente. En el mecanismo directo: la rizobacteria incrementa la biodisponibilidad de nutrientes y modula las hormonas que participan en el crecimiento de la planta. El aumento en la tasa de crecimiento de la planta es debido al vasto suministro de nutrientes y hormonas (Rudrappa *et al.*, 2008). En el mecanismo indirecto: la rizobacteria actúa como agente de biocontrol inhibiendo el crecimiento de patógenos sintetizando antibióticos, enzimas líticas induciendo la resistencia sistémica adquirida y la competencia (Glick, 2012) de esta manera se reducen los síntomas dañinos causados por el patógeno (Bally y Elmerich, 2007; Rudrappa *et al.*, 2008). Los mecanismos involucrados en la colonización del SR de las plantas por la rizobacteria sin ser considerado patógena, aún están en discusión (Zamioudis *et al.*, 2013; Verbon y Liberman, 2016).

### 3.5.2 Promoción del crecimiento vegetal en ambientes afectados con $Pb^{2+}$

Las rizobacterias tienen una amplia adaptabilidad, tasas de crecimiento altos, además pueden solubilizar variedad de materia orgánica (Kloepper y Schroth, 1981). Estas rizobacterias inducen cambios en el desarrollo post-embriionario de la planta cuando colonizan su SR (Gamalero *et al.*, 2004). Se observado que en plantas de *B. napus* la bacteria endófito *Microbacterium* sp., incrementa la solubilidad del  $Pb^{2+}$  cuando, posterior a la solubilización, el  $Pb^{2+}$  es translocado hacia la parte aérea (Jiang *et al.*, 2008; Sheng *et al.*, 2008).

También se ha reportado que *B. subtilis* mejora la respuesta fisiológica de la planta, incrementando la actividad de las enzimas antioxidantes como SOD, CAT y además favorece la acumulación de  $Pb^{2+}$  en los tejidos de *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek (Arif *et al.*, 2019). La interacción entre la planta y la bacteria podría estar induciendo la expresión de algunos genes relacionados a estrés así como a MPs. Como se ha reportado para *O. sativa* en interacción con *Bacillus amyloliquefaciens*

donde se expresan genes involucrados en la tolerancia a sequía (Tiwari *et al.*, 2017). Sin embargo los procesos fisiológicos y moleculares involucrados durante la interacción entre planta-rizobacteria y de cómo esta interacción modifica el desarrollo post-embrionario para tolerar el estrés por  $Pb^{2+}$  aún no están claros (Remans *et al.*, 2012; Zamioudis *et al.*, 2013).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

#### IV HIPÓTESIS

Las rizobacterias aisladas de plantas que crecen en suelos metalíferos tienen la capacidad de promover cambios en la arquitectura del sistema radical de *Arabidopsis thaliana* cuando se encuentran en estrés por  $Pb^{2+}$ .

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## V OBJETIVO GENERAL

Caracterizar con un modelo *in vitro* planta-bacteria los cambios fisiológicos, de desarrollo y expresión génica del sistema radical de *A. thaliana*, inducidos por las rizobacterias aisladas de plantas que crecen en suelos metalíferos, durante el estrés por  $Pb^{2+}$

### 5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislar e identificar las rizobacterias resistentes a  $Pb^{2+}$  de plantas que crecen en suelos metalíferos.
2. Determinar las concentraciones mínimas inhibitorias de  $Pb^{2+}$  para establecer el sistema *in vitro* planta-rizobacteria.
3. Evaluar con el sistema *in vitro* planta-rizobacteria los cambios fisiológicos, de desarrollo y de expresión génica que estén induciendo las rizobacterias en la arquitectura del sistema radical de *A. thaliana* durante el estrés por  $Pb^{2+}$ .



## VI METODOLOGÍA

### 6.1 Material biológico y condiciones de crecimiento.

#### 6.1.1 Material biológico vegetal y bacteriano.

Para todos los experimentos *in vitro* se usaron plántulas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., Columbia-0 (Col-0) y Wassilewskija (Ws), adicionalmente se usó la *DR5::GUS* (*DR5*, ahora en adelante) línea marcadora de respuesta a auxinas (Ulmasov *et al.*, 1997). En el caso de las bacterias, se usaron los aislados que se obtuvieron en el presente trabajo y la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 reportada como promotora del crecimiento en *A. thaliana*.

#### 6.1.2 Cultivo *in vitro* y condiciones de crecimiento vegetal.

Las semillas se germinaron y crecieron de acuerdo con el protocolo descrito por López-Bucio *et al.* (2002) modificado. En dicho protocolo las semillas se desinfectaron superficialmente como se describe a continuación: las semillas se colocaron en un microtubo de 1.5 mL y se desinfectaron superficialmente haciendo un lavado con etanol al 70% por 5 minutos y posteriormente otro lavado con hipoclorito de sodio (comercial) al 20% por 7 minutos, después se hicieron 5 enjuagues sucesivos con agua destilada estéril. Las semillas se almacenaron a 4°C por 48 horas con la finalidad de sincronizar su germinación. Finalmente, en condiciones de esterilidad, las semillas se colocaron en cajas de Petri que contenían el medio de cultivo (superficie) modificado MS 0.5X (Murashige y Skoog, 1962) pH 5.7 adicionado con 0.5% (peso/volumen) de sacarosa y 1% (peso/volumen) de agar TC (Phytotechnology Laboratories). Las cajas se colocaron inclinadas en un ángulo aproximado de 65° en una cámara de crecimiento (Lumistell), con un fotoperiodo 16 h luz/8 h oscuridad a temperatura de 20° C ±2.

El medio MS contiene 20.6 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 18.8 mM de  $\text{KNO}_3$ ; 3 mM de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 1.5 mM de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.005 mM de KI; 0.025 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 0.1 mM de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 30 mM de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.001 mM de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0.0001

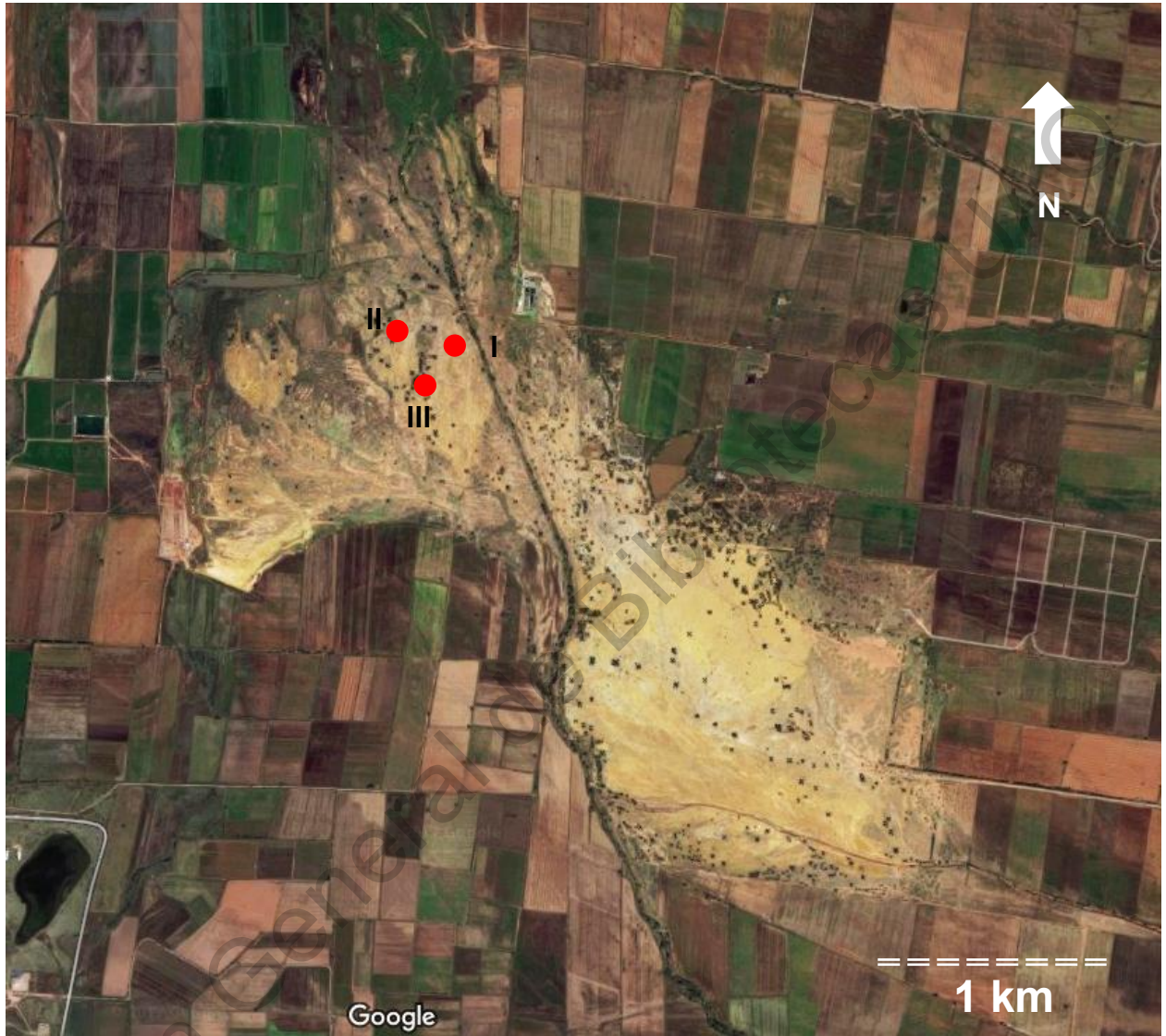
mM de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 0.00011 mM  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0.1 mM de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0.1 mM de  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , inositol (100 mg/L), y glicina (2 mg/L). Como fuente de plomo se utilizó  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ .

## **6.2 Condiciones de crecimiento de las bacterias.**

Todos los aislados crecieron en caldo nutritivo (CN), agar nutritivo (AN) que contiene g/L: 5 Peptona, 3 Extracto de levadura, Cloruro de sodio, 15 agar bacteriológico a pH de 7.3 y/o medio Luria Bertani (LB) que contiene g/L: 10 Caseína, 5 Extracto de levadura, 10 Cloruro de sodio, 15 Agar bacteriológico a pH de 7.5 en una incubadora KitLab a una temperatura de 28 °C por 24 o 48 horas hasta alcanzar una densidad óptica de 0.8. Una vez crecidas fueron recultivadas en CN y almacenados en tubos criogénicos con glicerol al 30% mantenidos en un ultracongelador Thermo Fisher TSE 320-931 a una temperatura de -70 °C hasta su reactivación.

## **6.3. Sitio de colecta**

Con base lo reportado por Rivera-Menchaca (2017), se seleccionaron el área de estudio, que se encuentran entre las coordenadas 22° 48' 22.3" y 22° 81' 70" longitud Norte y 102° 41' 11.7" y 102° 69' 59" latitud Oeste, a una altitud de 2250 msnm (Figura 1). Ubicado en el Municipio de Francisco I. Madero, Zac. El sitio presenta un clima templado árido con temperatura media anual de 17°C y precipitación media anual 200 a 300 mm (CONAGUA, 2018). Los suelos son arenosos ácidos con poca capacidad de retención de humedad y materia orgánica baja, además están cubiertos por jales mineros. Es una zona inundable donde se encuentran presas que son alimentados por los arroyos como Cieneguitas y El Bote.



**Figura 1.** Sitio de estudio ubicado en el municipio de Francisco I. Madero. En rojo: punto de colecta. Los números romanos indican la secuencia del muestreo. Escala representa 1 km.

### 6.3.1 Toma de muestras en campo.

Las muestras se obtuvieron aplicando el método de puntos en cuadrante que consiste en elegir un punto principal y el área adyacente al punto se divide en 4 cuadrantes, en cada cuadrante se tomaron las muestras. Se obtuvieron muestras

de suelo para aislar microorganismos de vida libre y de órganos vegetales (hojas, tallo y raíz). Las muestras de hojas se usaron para aislar microorganismos de filósfera (superficie de la hoja), tallos y raíces para microorganismos de endosfera y otra muestra de raíces para aislar microorganismos de rizósfera. En el punto principal de colecta a una profundidad de 5, 15 y 30 cm se tomaron tres submuestras de suelo para conformar una muestra compuesta. Las muestras hojas y los tallos fueron colectados usando una tijera de jardinería. A una profundidad de 15 cm, se colectaron secciones de raíz (5 cm cada una).

Cada una de las muestras se colocaron en bolsas ziploc sobre una cama de hielo y fueron llevadas al Laboratorio de Genómica Evolutiva de la Unidad Académica de Ciencias Biológicas de la UAZ para iniciar con el aislamiento.

### **6.3.2 Aislamiento y preservación de microorganismos.**

Las muestras se procesaron de cuatro diferentes maneras: A) Para el aislamiento de microorganismos de suelo, se pesaron 2 g de suelo en 50 mL de solución salina al 0.9% de acuerdo a Kuffner *et al.* (2010) y se dejó 1 hora en incubación a 30°C. B) para aislar microorganismos de filósfera, las muestras de hojas fueron colocadas en tubos de punta cónica con 20 mL de solución salina (NaCl) al 0.9% y se incubaron por 1 hora en agitación a una temperatura de 30 °C. C) Para aislar microorganismos de endosfera de tallos y raíces, se esterilizaron superficialmente con etanol al 70% e hipoclorito de sodio al 3% por 5 y 7 minutos, respectivamente. Se hicieron lavadas con TWEEN 80 por 5 minutos y finalmente 3 lavadas con agua destilada estéril. Cabe mencionar que la última lavada se usó como control microbiológico. Seguido a esto, se trituró el tejido en un mortero estéril adicionado con solución NaCl al 0.9%. D) Para la rizósfera, las muestras de raíz fueron colocadas en tubos de punta cónica con solución salina 0.9% incubadas por 1 hora en agitación a una temperatura de 30 °C.

Para todas las muestras (A, B, C y D) pasado el tiempo de incubación, se centrifugaron dos veces a 10 000 rpm 5 minutos, el sobrenadante recuperado se utilizó para hacer diluciones seriadas  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y se inoculó por

extensión en placa. Las placas fueron incubadas a 28 °C hasta por 72 horas. Para el aislamiento se usó Agar Soya Trypticaseina (TSA) (Bioxon) que contiene g/L: Triptona 15, Peptona 5, NaCl 5 y Agar Bacteriológico 15 a un pH de 7.3 así como el medio 869 0.1X contiene g/L: Glucosa 0.2, Triptona 1.5, Extracto de levadura 0.5, NaCl 0.5 y Agar Bacteriológico 15 a pH de 7.0 (Eevers *et al.*, 2015).

Transcurrido el tiempo de incubación cada uno de los aislados fueron transferidos a medio sólido para su aislamiento. A cada uno de los aislados se les asignó un nombre de acuerdo con la siguiente nomenclatura. La clave consta de dos letras seguidas de dos números separados por un guión (p. ej. MT 2-1) donde la primer letra significa muestra (M), la segunda letra se le asignó dependiendo de dónde se tomó y cómo se procesó la muestra, asignándole S, F, T, R o Z (suelo, filósfera, tallo endosfera, raíz endosfera o rizósfera, respectivamente). El primer número significa el punto de colecta (Figura 1) seguido del guión y el segundo número es el asignado a cada aislado. Cada uno de los aislados fueron tratados para su criopreservación en glicerol al 30% en viales con rosca de 1.5 mL (por duplicado) y almacenados a -70 °C.

### **6.3.3 Recuperación de los aislados.**

Para cada uno de los experimentos que en lo sucesivo se describen, los aislados bacterianos fueron reactivados de la siguiente forma: se tomó un fragmento de cultivo congelado por punción del criovial y se colocó en un tubo de cultivo con 3 ml que contenía CN, se dejó incubar en agitación por 48 horas, posterior a esto se hizo una resiembra en el mismo medio.

### **6.3.4 Caracterización de los microorganismos aislados.**

Con la finalidad caracterizar todos los aislados obtenidos primero se hizo la tinción diferencial de Gram, que consiste en lavar la muestra con cristal violeta por 1 min, seguido la solución del yodo por 1 min, posterior la muestra se decolora con alcohol 96% por 20 segundos, finalmente con safranina por 1 min, se hacen lavadas con H<sub>2</sub>O para hacer observaciones en el microscopio óptico. Además se

determinó la morfología celular (coco, diplococo, estafilococo, estreptococo, sarcina, tétrada, cocobacilo, bacilo, diplobacilo, estreptobacilo, vibrio o espirilo) y la morfología de la colonia (forma, margen, elevación, color) de acuerdo a (Holt *et al.*, 1994).

#### **6.4 Resistencia de los aislados a MPs (As, Hg y Pb) en medio sólido.**

Tomando en cuenta las concentraciones previamente reportadas (Anexo I) (Trevors *et al.*, 1985; Nieto *et al.*, 1987; Gadd, 1990; Abou-Shanab *et al.*, 2007; Kuffner *et al.*, 2010; Romaniuk *et al.*, 2018), a todos los aislados obtenidos se evaluó su capacidad para crecer en medios suplementados con MPs. Cada uno de los aislados se inocularon por estriado en medios con AN adicionados con As (18 mM;  $\text{KH}_2\text{AsO}_4$ ), Hg (2.5 mM;  $\text{HgCl}_2$ ) o Pb (3 mM;  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ). Se hicieron tres réplicas experimentales y tres réplicas biológicas. Se tomaron como positivos aquellos aislados que crecieron en el medio suplementado con el metal. Se generaron las tablas correspondientes y se tomó una fotografía representativa.

##### **6.4.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria.**

Para conocer la resistencia de los aislados en cada MP: arsenito ( $\text{NaAsO}_2$ ), arsenato ( $\text{Na}_3\text{AsO}_4$ ), mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ), plomo ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ), cobre ( $\text{CuSO}_4$ ), zinc ( $\text{ZnCl}_2$ ), cromo ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ), cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ), cadmio ( $\text{CdCl}_2$ ) se determinó la concentración mínima inhibitoria (MICs). Se hizo un escrutinio de concentración para cada MP desde menor a mayor hasta determinar el MIC, el aislado fue marcado positivo cuando se observó un crecimiento en un periodo de 48 y 72 horas.

#### **6.5 Identificación molecular de los aislados.**

### 6.5.1 Amplificación de los genes ribosomales

Para la identificación molecular de los aislados, se extrajo el DNA total de las microorganismos seleccionados por el método de fenol-cloroformo, reportado por Sessitsch *et al.* (2001), posteriormente se amplificó la región del gen que codifica para el RNA ribosomal 16S usando los oligonucleótidos 27F y 1492R, ITS1 y ITS4 (Cuadro 1). La región se amplificó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con la mezcla de reacción compuesta por buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, dNTPs 0.4 mM, DNA polimerasa Go Taq Flexi 1 U/25 µL (casa comercial) y 2 pmoles de cada uno de los oligonucleótidos antes mencionados. Las condiciones usadas fueron: un paso de desnaturalización a 95°C por 5 min, seguido por 30 ciclos de 95°C por 30 s, alineamiento a 55 °C por 60 s, extensión 72 °C por 1 min 30 s, para finalmente dar un paso de extensión final de 72°C por 7 min.

**Cuadro 1.** Lista de secuencias utilizadas para amplificar el gen que codifica para el RNA ribosomal 16S y la región ITS (Internal Transcribed Space).

Oligo	Secuencia
27F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
1492R	5'-TACCTTGTTACGACTT-3'
ITSF1	5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'
ITS4	5-'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

(Lane, 1991; Deng *et al.*, 2012).

### 6.5.2 Reconstrucción filogenética

Los productos de PCR fueron enviados al Laboratorio de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO), Irapuato para su secuenciación por el método de Sanger *et al.* (1977).

Con las secuencias (Anexo X, XI, XII y XIII) se hizo un BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para comparar las secuencias reportadas en la base de datos de la NCBI para conocer los grupos con mayor similitud. Se obtuvieron las secuencias que presentaran un porcentaje superior a 95. Todas las secuencias fueron alineadas usando el programa TCOFFEE (<http://tcoffee.crg.cat/>) (Notredame *et al.*, 2000). Concluido el alineamiento, se determinaron los grupos con mayor similitud se construyó un árbol filogenético con el programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013) usando el método del más probable, con el modelo Kimura +G para medir las distancias evolutivas, con un bootstrap de 1000 réplicas (Kimura, 1980).

### 6.6 Evaluación de los cambios de la ASR de *A. thaliana* en presencia de $Pb^{2+}$

Se hicieron cinéticas de crecimiento para determinar la concentración de  $Pb^{2+}$  que se usará para el sistema de interacción *in vitro* planta-bacteria en MS al 0.5X. Las concentraciones de  $Pb^{2+}$  usadas fueron (0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000  $\mu M Pb^{2+}$ ). Se evaluaron los cambios en los componentes del sistema radical como la longitud de la raíz primaria (LRP), número de raíces laterales. Se tomaron datos a los 0, 3, 6, 9 y 12 días después germinación (DDG). Adicionalmente se determinaron las condiciones de cultivo para las plántulas que serán usadas en el sistema *in vitro* haciendo cambios de medio.

Posteriormente se capturaron los datos se obtuvieron las medias (X) y error estándar ( $\pm$ ) para hacer el estadístico de Tukey con ( $P < 0.05$ ). Para cada experimento se hicieron dos réplicas independientes.



## **6.7 Evaluación de la actividad promotora del crecimiento vegetal de las rizobacterias.**

Para el análisis de la interacción *in vitro* planta-bacteria se usó el sistema propuesto por Castro *et al.* (2013) con modificaciones. Dicho sistema consta de cocultivar el aislado bacteriano con *A. thaliana* en un medio de cultivo MS adicionado con  $Pb^{2+}$ . Dependiendo de la naturaleza de la interacción, se inoculó en la parte superior de la caja (por contacto) o en la parte inferior de la caja (a distancia). La inoculación se hizo en una campana con flujo laminar horizontal en condiciones asépticas, a partir de un precultivo en caldo nutritivo (DO 0.8) se incubaron por 24 horas a temperatura 28 °C a 250 rpm. Transcurrido el tiempo de incubación, se transfirieron a cajas de Petri las plántulas de 6 días, fueron selladas y se dejaron crecer por otros 12 días más para observar cambios en el desarrollo vegetal.

Al término del ensayo se obtuvieron los datos y fotografías representativas además se cuantificó la biomasa en fresco y seco de las plántulas en una balanza analítica (Sartorius) con una precisión de 0.1 mg. Se obtuvo el peso seco de las plántulas, almacenadas y deshidratadas en un horno a 50 °C hasta llegar a peso constante.

## **6.8 Evaluación fisiológica y desarrollo del sistema radical de *A. thaliana* con la línea transgénica DR5::*GUS*.**

Para caracterizar las respuestas fisiológicas en el desarrollo del sistema radical usando el modelo *in vitro* planta-bacteria que ocurren durante la interacción, se usó la línea transgénica DR5 que es de respuesta a auxinas. Se hizo una cinética de crecimiento con el aislado seleccionado únicamente por contacto. El diseño experimental consistió en tomar datos de LRP, NRLs y teñir la línea marcadora a los 0, 2, 4, 6, 8, 10 DDT (días después de la transferencia). Al finalizar se capturaron las fotografías representativas de cada tratamiento.

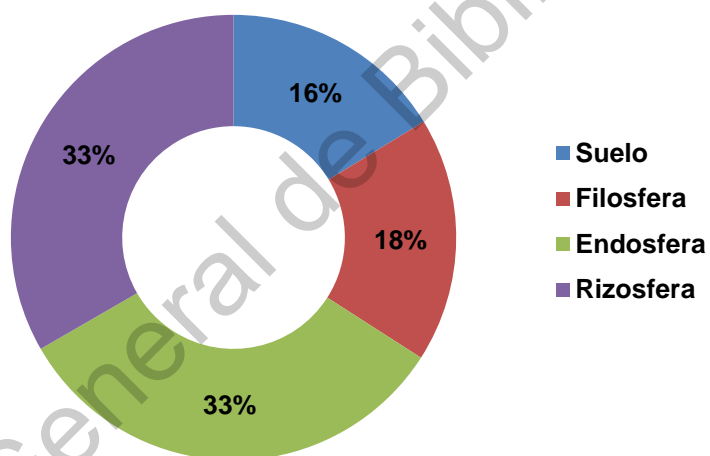
### **6.8.1 Tinción de GUS, técnica de clareo de plántulas y microscopia.**

Las plántulas fueron teñidas con la solución GUS que contiene: 20 mg/mL X-gluc, fosfato monobásico de sodio 1M, fosfato dibásico de sodio 1M, buffer de fosfatos pH 7 1M, EDTA pH 8 0.25M, triton 10%, ferrocianuro de potasio 100 mM, ferricianuro de potasio 100 mM a una temperatura de 37 °C (Kosugi *et al.*, 1990). Con la finalidad de llevar a cabo las observaciones en el microscopio los tejidos vegetales fueron clareados por el método de Malamy y Benfey (1997). Se incubaron a 60 °C por una hora con la solución 1 (0.24 N HCl, metanol 20%). Posteriormente, se agregó la solución 2 (etanol 60%, NaOH 7%). Fueron rehidratadas secuencialmente con 40%, 20% y 10% de etanol. Los tejidos fueron montados en portaobjetos con 50% de glicerol para hacer las observaciones en el microscopio (Malamy y Benfey, 1997).

## VII RESULTADOS

### 7.1 Aislamiento y caracterización de microorganismos de plantas que crecen en suelos contaminados con MPs.

De las muestras de suelo, filósfera, endosfera de raíz, endosfera de tallo y rizósfera colectadas en las salidas de campo, se aislaron un total de 135 microorganismos. El 16% de los microorganismos aislados proviene del suelo, el 18% de la filósfera, 33% de endosfera (tallos y raíz) y 33% rizósfera (Figura 2).

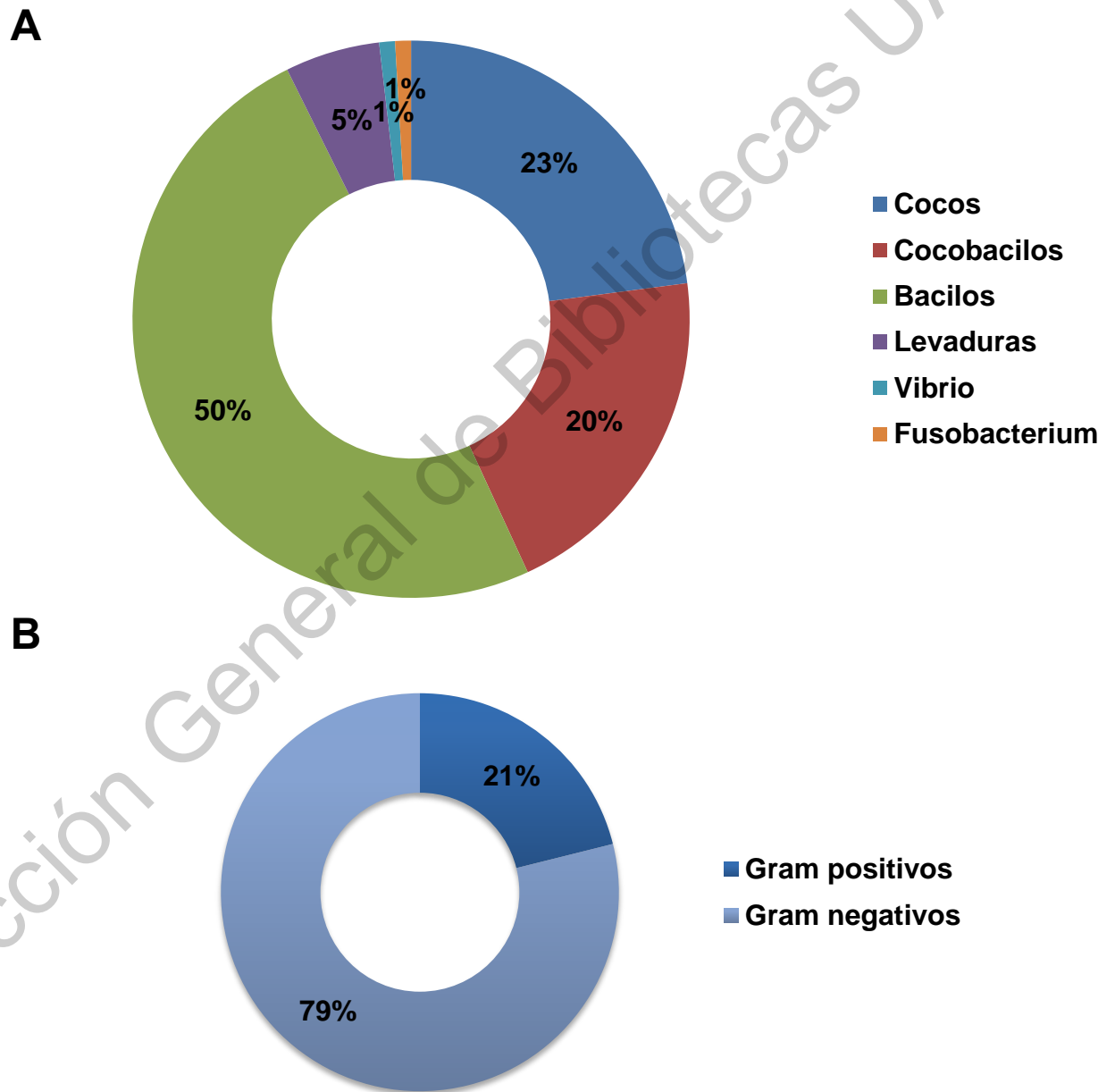


**Figura 2.** Microorganismos aislados del sitio de colecta. Total 135.

A todos los microorganismos aislados se les asignó su clave (métodos sección 6.3.2). Para los microorganismos aislados de suelo la nomenclatura MS (Anexo II). Para los microorganismos aislados de filósfera MF (Anexo III). Para los aislados de endosfera de tallos MT o de endosfera de raíces MR (Anexo IV). Finalmente, para los de rizósfera MZ (Anexo V).

### 7.1.1 Caracterización de los microorganismos aislados.

De todos los microorganismos aislados se describió morfología celular y colonial de acuerdo a Holt *et al.* (1994) (Figura 3, Anexo II a V).



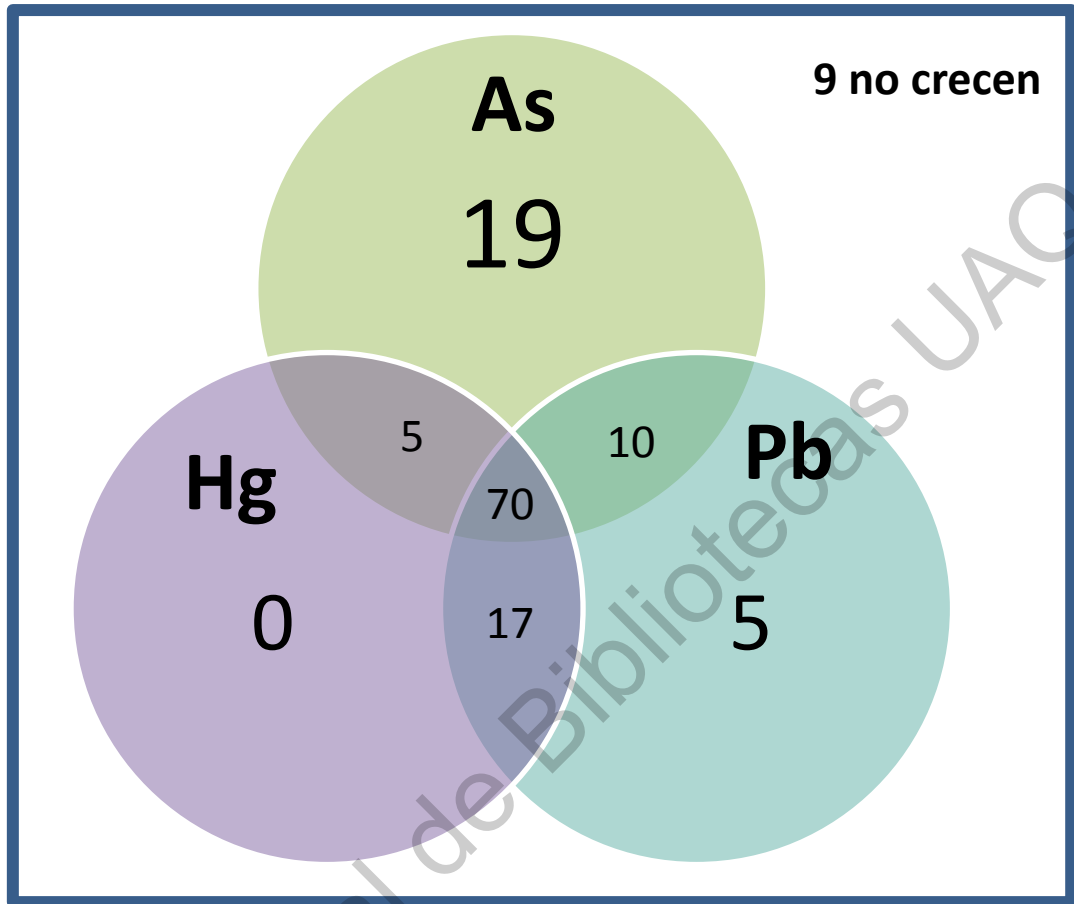
**Figura 3.** A) Total de formas microscópicas de los microorganismos aislados. B) Total de Gram positivos y negativos.

De los aislados, el 50% fueron bacilos, 23% cocos, 29% cocobacilos, el 5% fueron levaduras (Figura 3A, Anexo II a V). Dos terceras partes de la colección fueron bacterias Gram negativos y un tercio Gram positivos (Figura 3A, Anexo II a V). Además, se hizo la caracterización de la colonia (Anexo II y V).

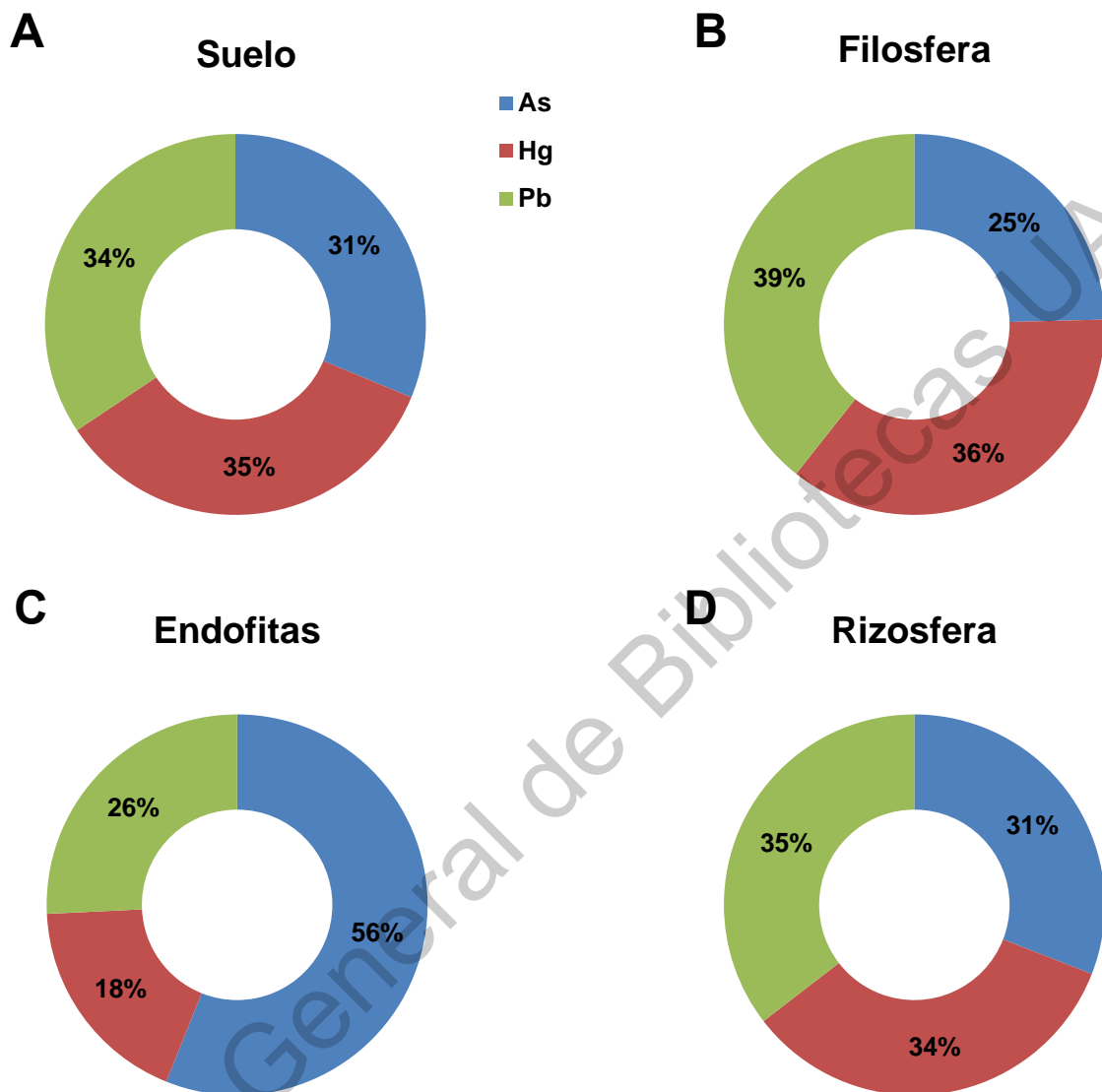
### **7.1.2 Pruebas de resistencia a MPs de los microorganismos aislados.**

Con la finalidad de determinar si los microorganismos aislados eran resistentes a uno o más MPs, se evaluó su capacidad de crecer en medios adicionados con As 18 mM, Hg 2.5 mM y Pb 3 mM. Dichas concentraciones fueron determinadas con base en la literatura (Anexo I) (Trevors *et al.*, 1985; Nieto *et al.*, 1987; Abou-Shanab *et al.*, 2007; Romaniuk *et al.*, 2018). De los 135 microorganismos aislados, 9 no crecen en presencia de cualquiera de los MPs usados, 70 crecen en As, Hg o Pb y 32 crecen en al menos dos metales distintos (Figura 4, Anexo VI, VII, VIII y IX).

De los aislados provenientes de suelo el 31% fueron resistentes a As, el 35% a Hg y 34% a Pb (Figura 5A, Anexo VI). Los aislados provenientes de filósfera el 25% fue resistentes As, 36% a Hg y 39% a Pb (Figura 5B, Anexo VII). En aislados de endosfera el 56% crecieron en As, 18% en Hg y 26% en Pb (Figura 5C, Anexo VIII). Finalmente los aislados provenientes de rizósfera el 31% fue resistente a As, 34% a Hg y 35% a Pb (Figura 5D Anexo IX). Los aislados endófitos crecen más en As seguido de Hg y Pb. Una vez aislados y caracterizados se criopreservaron para formar parte de la colección de microorganismos del Laboratorio de Genómica Evolutiva.



**Figura 4.** Resistencia a As (18 mM), Hg (2.5 mM) y Pb (3 mM) de los 135 microorganismos aislados.



**Figura 5.** Microorganismos resistentes a As, Hg y Pb en función del sitio de donde fueron aislados A) Suelo, B) Filósfera, C) Endófitas y D) Rizósfera.

## 7.2 Modificaciones al sistema de interacción *in vitro* planta-bacteria.

El sistema *in vitro* planta-bacteria fue modificado, consistió en cocultivar a *A. thaliana* y al microorganismo aislado y temporalmente se evalúan los cambios en el sistema radical. El sistema permite hacer una búsqueda rápida de

microorganismos que sean capaces de promover el crecimiento en condiciones controladas.

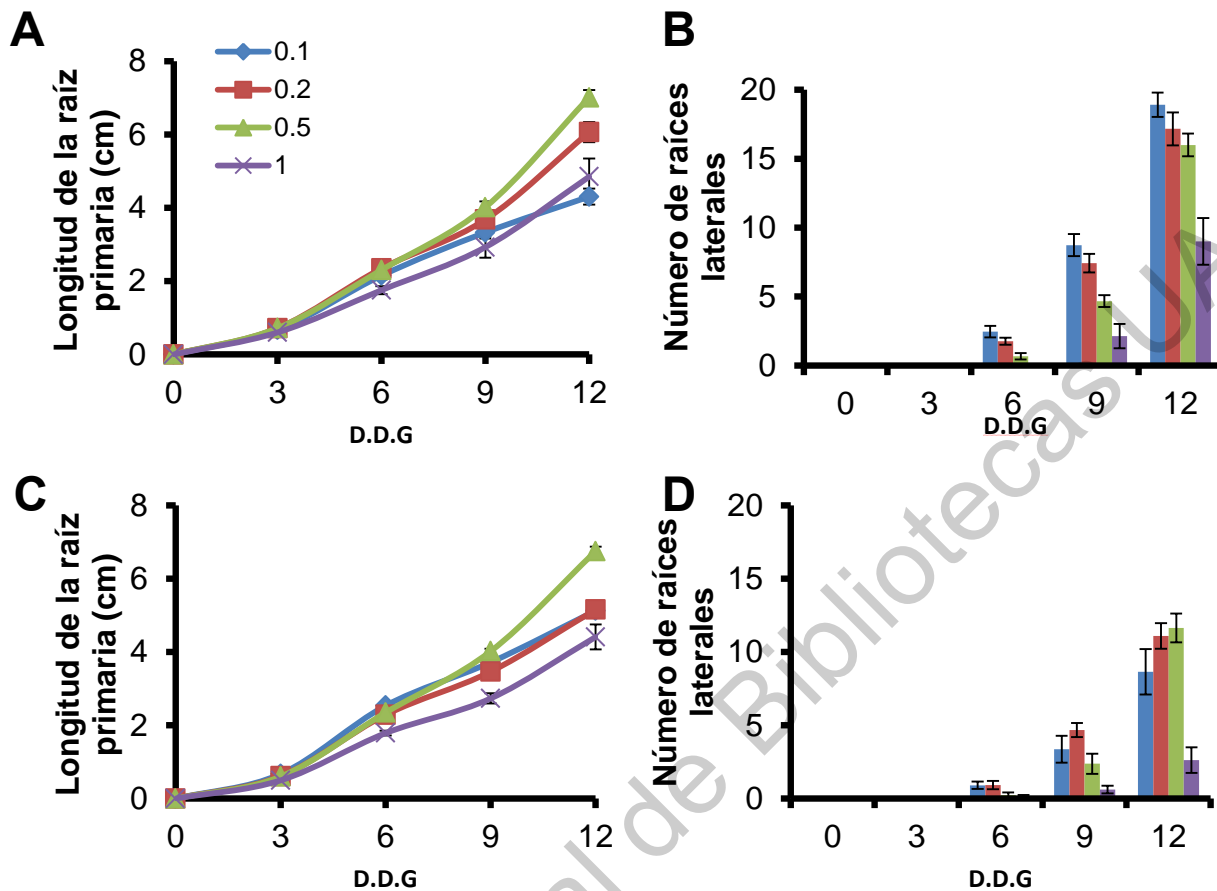
### **7.2.1 Selección de las condiciones de cultivo.**

Primero se determinó la concentración del medio de cultivo para el óptimo crecimiento de la planta, seguido a esto la concentración del  $Pb^{2+}$  que se usará para el cocultivo y finalmente se evaluará si la manipulación de las plántulas jóvenes podría afectar el crecimiento de la planta.

Dado que el medio de cultivo MS fue formulado para el cultivo de tejidos, es un medio rico en nutrimentos y se ha reportado que este exceso inhibe el crecimiento del sistema radical (Murashige y Skoog, 1962; Gruber *et al.*, 2013) se hicieron diluciones del medio MS (0.1, 0.2, 0.5). Se usaron semillas de *Arabidopsis* Col-0 y Ws, se midió la longitud de la RP y se contaron las RLs cada 3 días durante los 12 días que duró el experimento (Figura 6).

Se encontró que las plantas (Col-0 y Ws) que crecieron en MS 0.5X presentaron la RP de mayor longitud (Figura 6A, C), con respecto al NRL no se observaron diferencias entre los tratamientos usados (Figura 6B, D). Con base en los resultados observados se eligió el medio MS 0.5X porque tuvo mayor crecimiento la RP en ambos ecotipos Col-0 y Ws y se usó en el sistema *in vitro*.





**Figura 6.** Cinética de crecimiento de *A. thaliana* en ecotipos Col-0 y WS en distintas concentraciones de medio MS 0.1, 0.2, 0.5 y 1. A) longitud de la raíz primaria de Col-0. B) Número de raíces laterales de Col-0. C) Longitud de la raíz primaria de WS. D) Número de raíces laterales de WS. D.D.G: días después de la germinación. Barras indican error estándar.

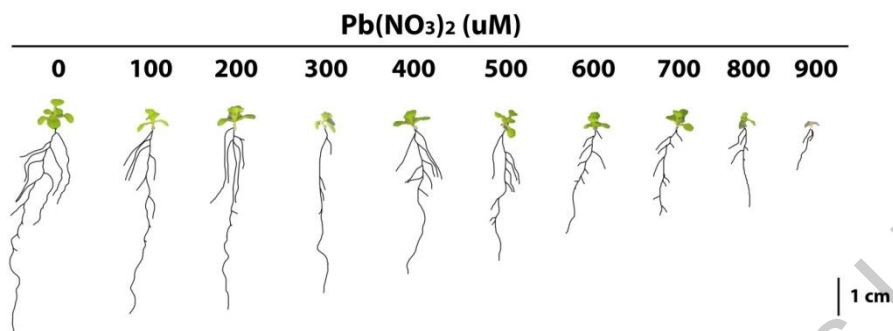
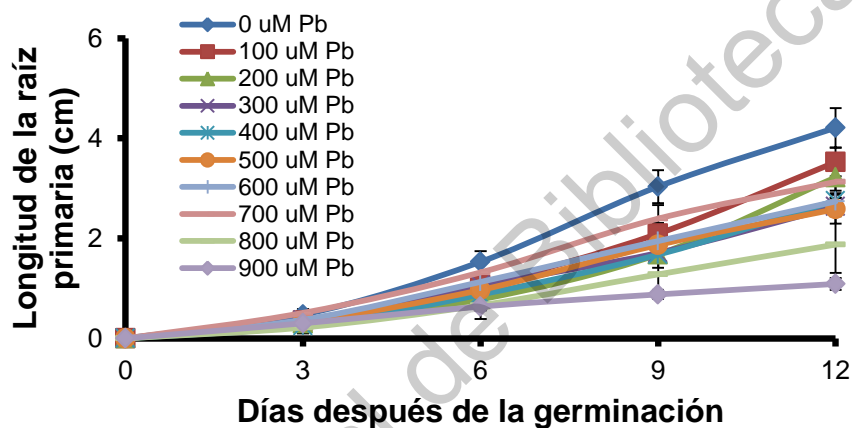
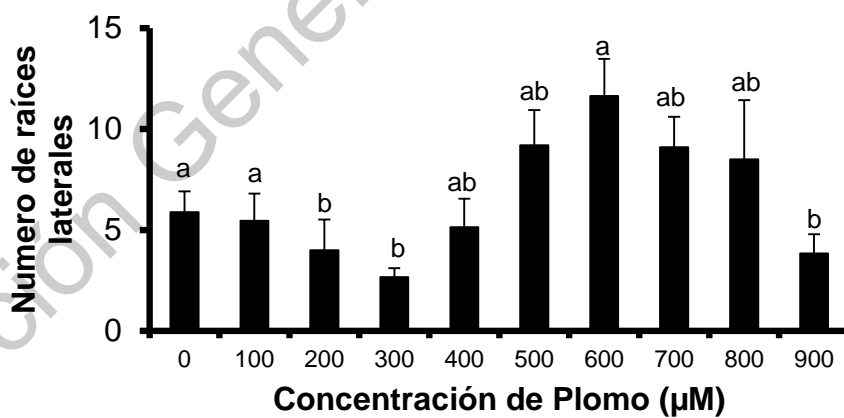
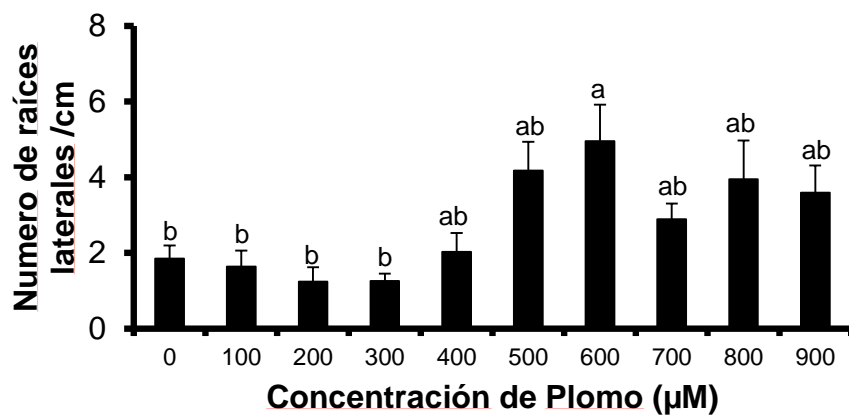
Para seleccionar la concentración de  $Pb^{2+}$  en la cual el sistema radical de *Arabidopsis* presente el fenotipo que se usará en el modelo *in vitro* planta-bacteria, se hizo una cinética de crecimiento usando a *A. thaliana* en medio MS al 0.5X en concentraciones crecientes de  $Pb^{2+}$  (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, y 900  $\mu M$ ), se tomaron datos de LRP, NRLs y DRLs (Figura 7).

Encontramos que a concentraciones de 100 a 300  $\mu M$  de  $Pb^{2+}$ , la LRP es menor (hasta 20 %) y el NRL disminuye en un 50% (Figura 7A, B, C). Al incrementar las concentración hasta llegar a los 600  $\mu M$  de  $Pb^{2+}$ , la LRP es menor en un 45 %

(Figura 7B) el NRLs incrementa de 6 a 8 por planta también la DRLs incrementó (Figura 7C, D).

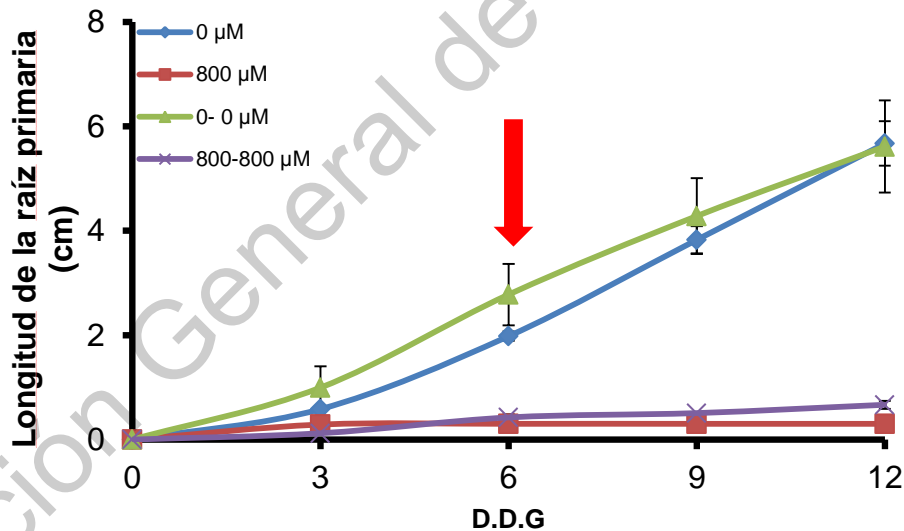
Al incrementar las concentraciones desde 700 hasta 900  $\mu\text{M}$  de  $\text{Pb}^{2+}$  observamos inhibición del 75 al 90% en la longitud de la RP, el NRLs disminuye de forma gradual (Figura 7 C, D). A concentraciones de 800 y 900  $\mu\text{M}$  de  $\text{Pb}^{2+}$  los fenotipos del sistema radical mostraron RP corta indicando que a estas concentraciones de  $\text{Pb}^{2+}$  son las más tóxicas. La concentración de 800  $\mu\text{M}$  de  $\text{Pb}^{2+}$  se seleccionó porque presentó un fenotipo con RP corta y mayor número de RLs que servirá para evaluar si los aislados tienen la capacidad de recuperar el crecimiento aunque el  $\text{Pb}^{2+}$  haya afectado el sistema radical.

Para saber si la transferencia de las plántulas modifica el desarrollo del sistema radical se hicieron cambios de medio. A los 6 DDG las plántulas crecidas en medios los medios de cultivo fueron transferidos a medios de cultivo nuevos con la misma concentración de  $\text{Pb}^{2+}$  (Figura 8A). Cada tres días se midió la raíz primaria durante los 12 días que duró el experimento. Se usaron como controles plántulas sin transferir crecidas en 0 y 800  $\mu\text{M}$  de  $\text{Pb}^{2+}$  (Figura 8A). Al comparar las plántulas transferidas con aquellas que no, encontramos que la transferencia de las plántulas a los 6 DDG (Figura 8A, flecha roja) no afecta la tasa de crecimiento del sistema radical (Figura 8B, Cuadro 2).

**A****B****C****D**

**Figura 7.** Respuesta del sistema radical de *A. thaliana* en presencia de distintas concentraciones de Pb. A) Fenotipos del sistema radical con 12 D.D.G. B) Longitud de la raíz primaria. C) Numero de raíces laterales. D) Densidad de raíces laterales. ES±. N=8. P<0.05. DDG: días después de la germinación.

Con base en los resultados anteriores, se estandarizaron las condiciones para el sistema de interacción *in vitro* planta-microorganismo-Pb<sup>2+</sup>, para evaluar la capacidad de los microorganismos aislados para la promoción del crecimiento vegetal en plantas estresadas por Pb<sup>2+</sup>. Las condiciones fueron medio MS 0.5X con 800 µM de Pb<sup>2+</sup>. Además, se determinó que primero se inoculará la bacteria en el medio se dejará crecer por 24 horas y posterior a esto se transferirán las plántulas de *A. thaliana* ya sea en contacto directo con el aislado (contacto) o a distancia.



**Figura 8.** Cinética de crecimiento posterior a la transferencia en medio MS 0.5X que contiene 0 µM Pb<sup>2+</sup> a 0 µM Pb<sup>2+</sup> y 800 µM Pb<sup>2+</sup> a 800 µM Pb<sup>2+</sup> en plántulas de *A. thaliana*. A) Respuesta posterior a la transferencia. ES±. N=7. Flecha roja: indica el día que se hizo el cambio de medio.

**Cuadro 2.** Tasa de crecimiento por día de las plántulas transferidas y sin transferir.

D.D.G.	Tratamientos $\mu\text{M Pb}$			
	cm /día			
	0	800	0-0	800-800
0	0	0	0	0
3	0.19	0.04	0.33	0.10
6	0.66	0.14	0.93	0.10
9	1.27	0.17	1.43	0.10
12	1.89	0.22	1.87	0.10

Además de estandarizar las condiciones para la interacción *in vitro* planta-microorganismo- $\text{Pb}^{2+}$ , también se hizo para los MPs arsenato ( $\text{AsH}_2\text{O}_4$ ) y mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) (Anexo VIII y IX).

De la colección de microorganismos generada, seleccionamos al azar, cinco aislados de endosfera de raíz, cuatro aislados de endosfera de tallo y uno de rizósfera, para continuar con el trabajo experimental.

### 7.2.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC).

Puesto que es muy común que los microorganismos sean resistentes a más de un MP, con los 10 microorganismos aislados se determinaron la concentración mínima inhibitoria para los metales As V, As III, Co, Cr, Cu, Zn, Cd, Pb y Hg. Se encontró que 5 de los 10 aislados se requirieron concentraciones más altas de As V, As III y Pb (en ese orden), para inhibir su crecimiento. Para los aislados MT 2-2, MT 2-3, MR 2-7, MR 3-9 y MR 3-14 los MPs As V, As III y Cu (en ese orden) fueron los que inhibieron el crecimiento en mayor concentración. Los aislados MT 2-1 (endosfera de tallo) y MR 3-5 (endosfera de raíz) fueron los que requirieron mayor concentración de Pb para que su crecimiento fuera inhibido (Cuadro 3). Adicionalmente, se determinó el tiempo de crecimiento de los microorganismos

aislados para ser evaluados en el sistema *in vitro* una vez determinadas sus MICs (Anexo X).

**Cuadro 3.** Determinación de la concentración mínima inhibitoria (mM)

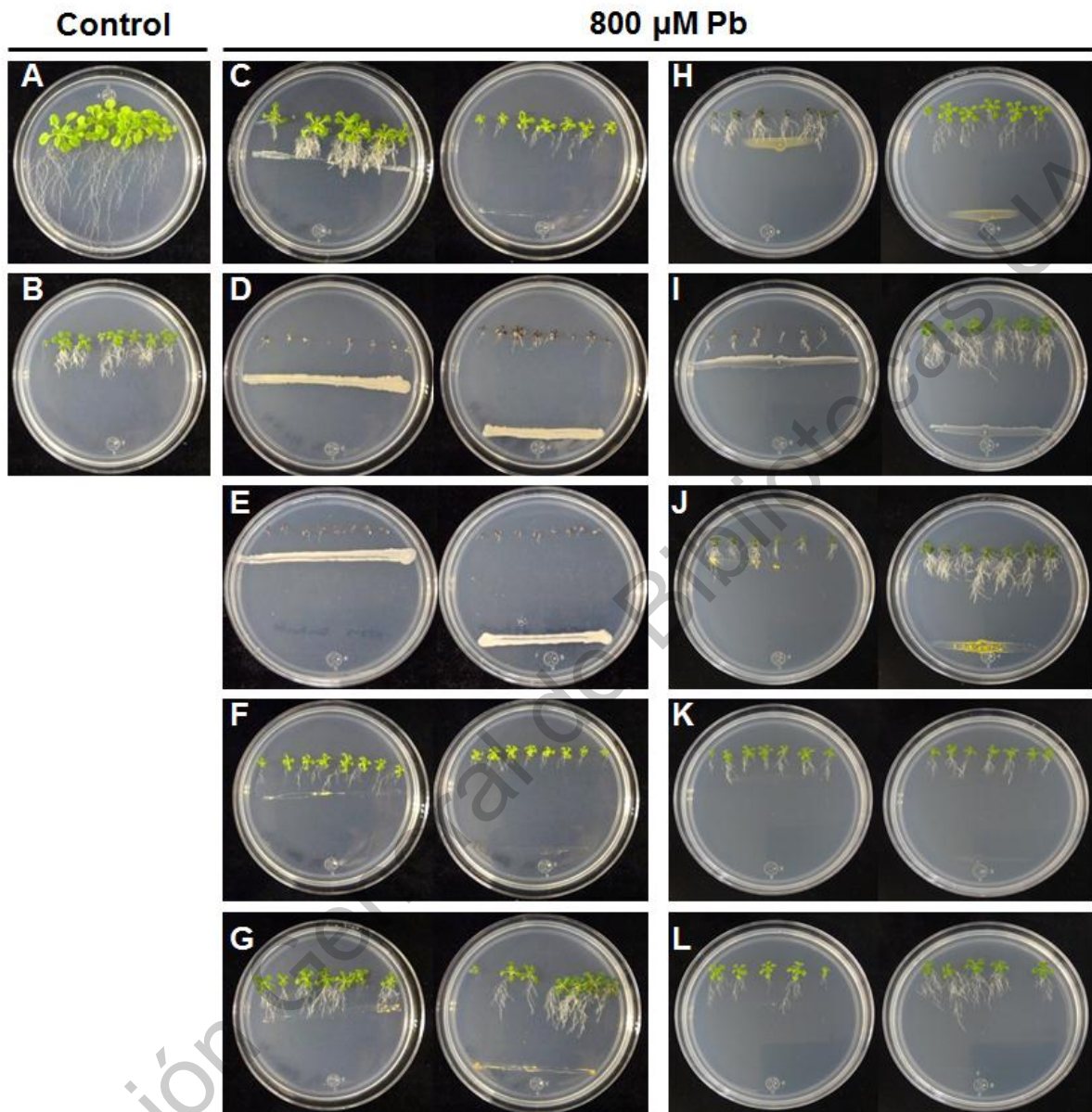
Aislado	As <sup>5+</sup>	As <sup>3+</sup>	Co <sup>2+</sup>	Cr <sup>6+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	Pb <sup>2+</sup>	Hg <sup>2+</sup>
<b>MT 2-1</b>	140	30	1	0.3	5	2	0.5	40	0.1
<b>MT 2-2</b>	40	5	0.1	0.1	1	0.1	0.05	0.5	0.1
<b>MT 2-3</b>	100	10	0.2	0.2	4	1	0.5	2.5	0.1
<b>MT 3-2</b>	100	10	1	0.3	3	2	0.5	3	0.1
<b>MR 2-7</b>	120	5	1	0.5	4	2	0.5	3	0.2
<b>MR 3-5</b>	140	20	0.2	3	1	2	0.1	40	2
<b>MR 3-9</b>	100	20	0.2	1	5	2	1	0.5	0.1
<b>MR 3-10</b>	80	5	0.5	0.5	3	2	0.3	3	0.1
<b>MR 3-14</b>	140	5	0.2	0.3	6	4	2	3	0.1
<b>MZ 3-2</b>	80	5	0.7	0.2	4	2	0.5	3	0.1

### 7.2.3 Evaluación de los aislados con el sistema *in vitro* planta-bacteria.

Una vez estandarizadas las condiciones para el uso del sistema *in vitro* planta-microorganismo-Pb. Se evaluó la capacidad de los 10 microorganismos aislados para promover el crecimiento de *A. thaliana* cuando crece en presencia de  $Pb^{2+}$  (800  $\mu$ M). Se evaluó tanto por contacto como a distancia (descrito en la sección métodos 6.4) (Figura 9).

Los microorganismos aislados MT 2-1, MR 3-14 (Figura 9C y G) promovieron un sistema radical corto con mayor densidad de raíces laterales tanto en contacto como a distancia. Los aislados MZ 3-2, MR 2-7, MR 3-5 (Figura 9H, I y J) únicamente a distancia fueron capaces de inducir sistemas radicales con una alta densidad de raíces laterales. De manera opuesta los aislados MT 2-3, MT 3-2, MR 3-9, MR 3-10 (Figura 9D, E, F y K) afectaron el sistema radical.

Adicionalmente, el sistema también se estandarizó para As o Hg por contacto y distancia (Anexo XI y XII). Con base en los resultados de la evaluación de la promoción del crecimiento se eligió a MT 2-1, MR 3-5, MR 3-9 y MR 3-14 para continuar con el trabajo experimental.



**Figura 9.** Evaluación de los microorganismos aislados de endosfera y rizósfera para la promoción del crecimiento vegetal en presencia de 800  $\mu\text{M}$  Pb por contacto y distancia. A) Mock. B) 800  $\mu\text{M}$  Pb, mock. C) MT 2-1. D) MT 2-3. E) MT 3-2. F) MR 3-9. G) MR 3-14. H) MZ 3-2. I) MR 2-7. J) MR 3-5. K) MR 3-10. L) MT 2-2. Replica biológica n=8.



#### 7.2.4 Identificación molecular de los aislados.

Los aislados evaluados en la promoción del crecimiento fueron identificados molecularmente amplificando la región del gen que codifica para el RNA ribosomal 16S y la región ITS (Internal Transcribed Space). Obtenidos los resultados de la secuenciación, por el método Sanger las secuencias fueron comparadas con las reportadas en la base de datos de la NCBI. Se hizo un BLAST por cada aislado para poder comparar la similitud de las secuencias obtenidas.

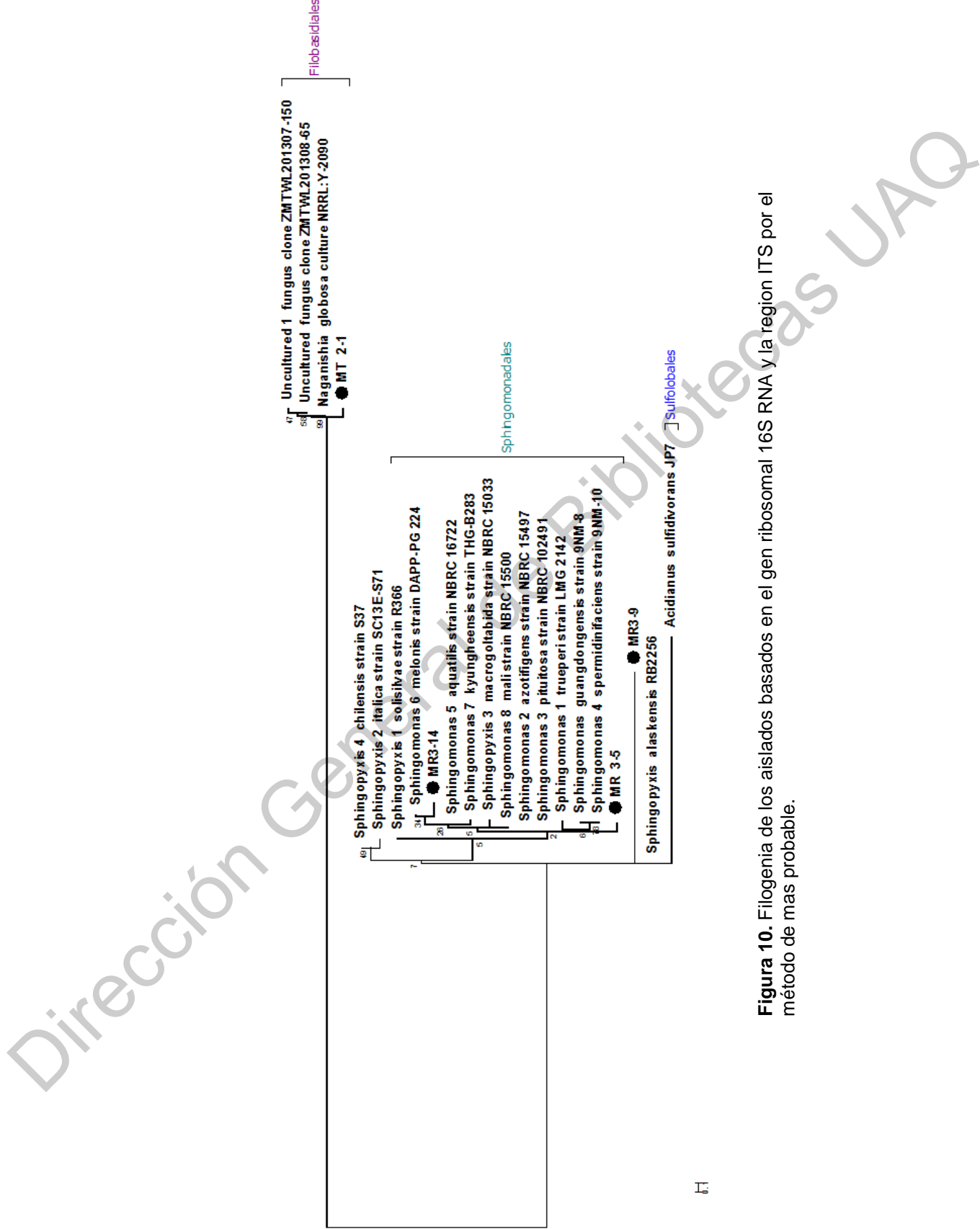
**Cuadro 4.** Similitud de los aislados basados en el gen ribosomal 16S RNA y la región ITS comparados con la base de datos de la NCBI.

Aislados	Cepas reportadas en Genbank (accession number)	Similitud %
MT 2-1	<i>Naganishia globosa</i> (MH809978.1)	98.41
MR 3-5	<i>Sphingomonas trueperi</i> (NR_026338.1)	100
MR 3-9	<i>Sphingopyxis alaskensis</i> RB2256 (NR_074280.1)	92
MR 3-14	<i>Sphingomonas melonis</i> strain DAPP-PG 224 (NR_028626.1)	99.23

El análisis reveló que las secuencias de MT 2-1 es una levadura con similitud del 100% que desde ahora se mencionara como *Naganishia globosa* (MH809978.1) (Cuadro 4). El aislado MR 3-5 y MR 3-14 tienen similitud al género de *Shingomonas trueperi* (NR\_026338.1) y *Sphingomonas melonis* (NR\_028626.1) 100 y 92%, respetivamente. Para el aislado MR 3-9 mostró similitud del 99% a *Sphingopyxis alaskensis* (NR\_074280.1) (Cuadro 4). El análisis permitió conocer el grupo con mayor similitud y la reconstrucción filogenética nos permitió ubicarlos en los grupos previamente reportados (Figura 10).

### **7.3 Plasticidad del PDPE en condiciones de Pb<sup>2+</sup> inducidos por los microorganismos aislados de suelos con MPs.**

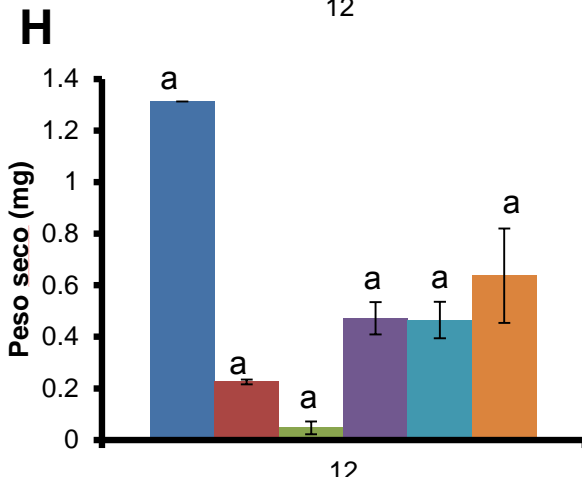
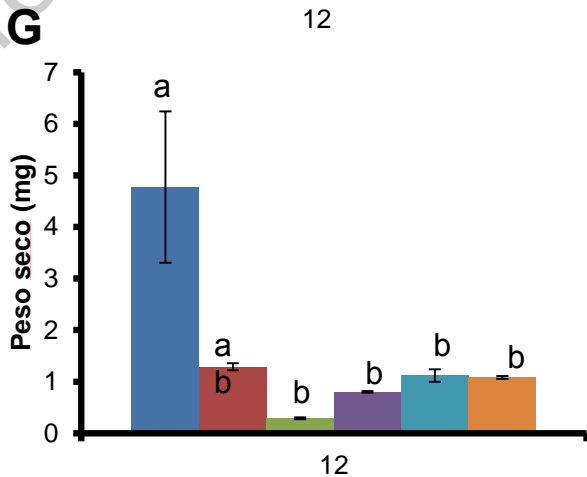
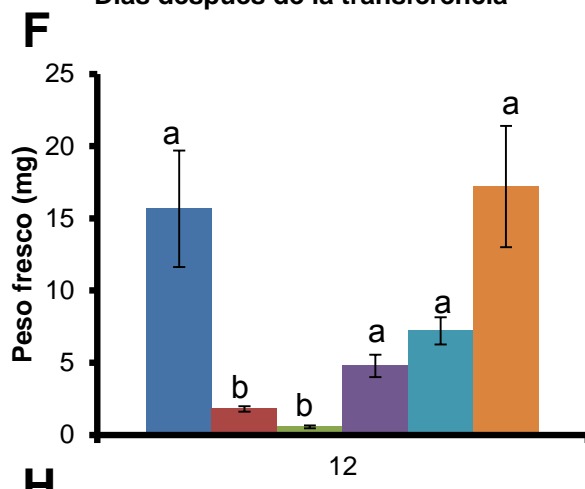
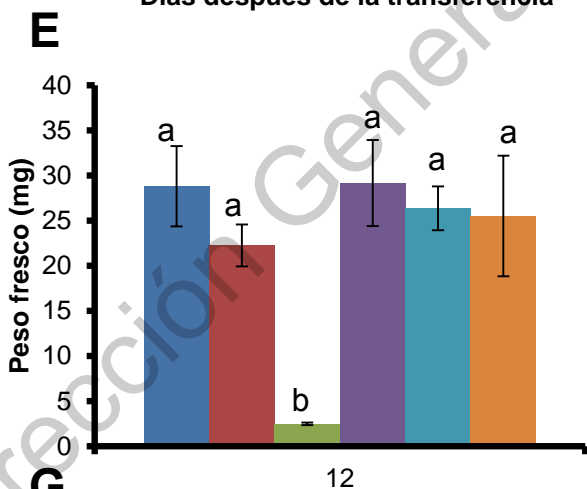
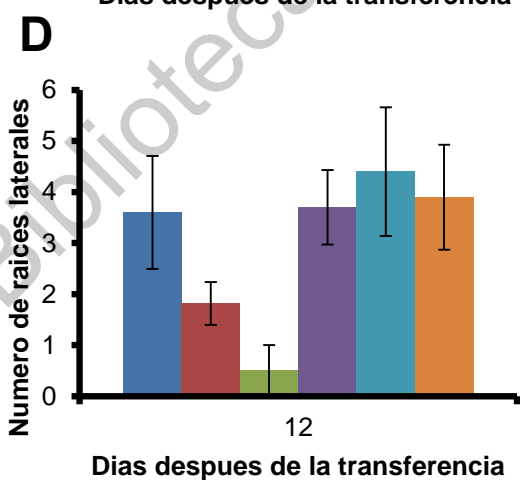
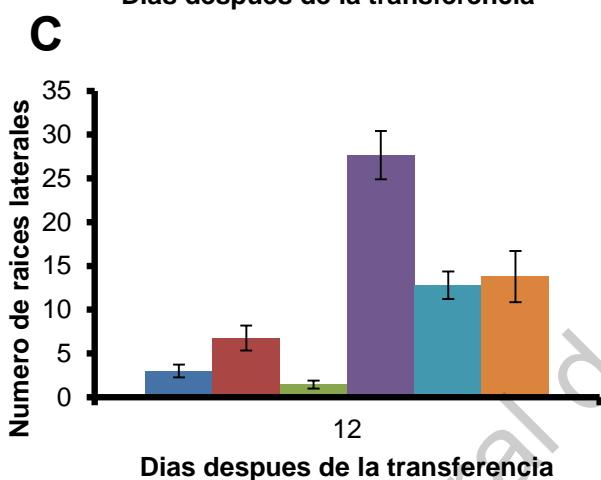
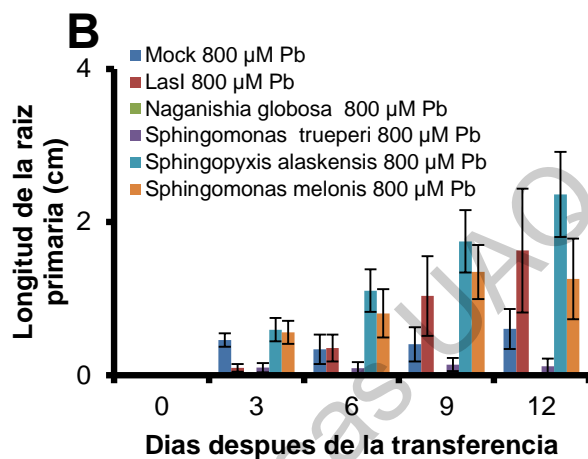
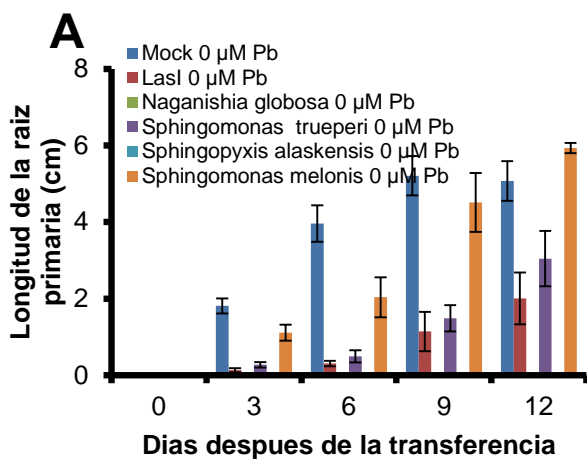
Para describir de manera detallada el desarrollo postembrionario del sistema radical con las bacterias seleccionadas *S. trueperi*, *S. alaskensis*, *S. melonis*, y la levadura *N. globosa*, se hicieron cinéticas de crecimiento para evaluar el desarrollo del sistema radical de *A. thaliana* en presencia y ausencia de Pb<sup>2+</sup>. Se usó a *Pseudomonas aeruginosa* (LasI, a partir de ahora) como control positivo (Castro *et al.*, 2013).



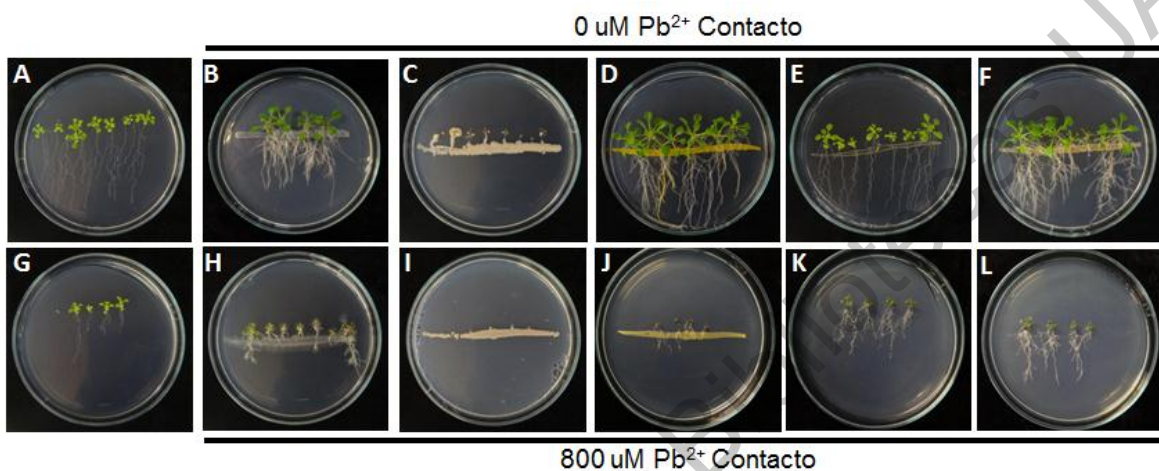
**Figura 10.** Filogenia de los aislados basados en el gen ribosomal 16S RNA y la region ITS por el método de mas probable.

En las condiciones sin adición de  $Pb^{2+}$  los aislados fueron evaluados durante 12 DDT donde *S. melonis* mostró efecto de mayor crecimiento desde etapas tempranas que los demás aislados con RLs de 10-12 RLs (Figura 11A, C;12F) con peso fresco y seco similar que el control (Figura 11 E, G; 12A). *S. trueperi* incrementó la RP en 50% y 25-30 RLs que fue la que presentó más RLs comparados con el resto de los aislados con peso fresco y seco similar que el control (Figura 11A, C;12D). Por otro lado, *N. globosa* y *S. alaskensis* inhibieron el crecimiento de la RP (Figura 11A,12C) con pocas RLs y presentaron peso fresco más bajo. *S. alaskensis* presentó peso fresco y seco similar que el control (Figura 11E, G;12E).

Continuando con el análisis, los aislados fueron evaluados en medios MS con 800  $\mu M Pb^{2+}$ . *S. alaskensis* y *S. trueperi* mostraron mayor crecimiento y el NRLs fue de 3 a 4 (Figura 11B, D; 12 K,L). *S. trueperi* y *N. globosa* mostraron crecimiento reducido de la RP en *A. thaliana* (Figura 12B;12I, J). *S. trueperi* desarrolló más RLs que *N. globosa* (Figura 12D). En pesos fresco *S. melonis* fue mayor que el resto de los aislados seguido de *S. alaskensis* y *S. trueperi* (Figura 11F, H;12J, K). Cuando medimos el peso seco constante mostraron pesos similares (Figura 11H). Estos resultados indican que las rizobacterias y levadura evaluadas modifican el crecimiento en medios sin  $Pb^{2+}$ , sin embargo en medios adicionados con  $Pb^{2+}$  (Figura 11) muestran crecimiento reducido en el desarrollo del sistema radical en consecuencia diferentes fenotipos (Figura 11). Con base en los resultados de las diferentes condiciones de  $Pb^{2+}$  se seleccionó a *S. trueperi* para la evaluación del desarrollo del sistema radical en el sistema por contacto y distancia.



**Figura 11.** Cinética de crecimiento de 12 DDT de las rizobacterias y levadura evaluadas. Crecimiento de la raíz primaria A) sin  $Pb^{2+}$ . B) con  $Pb^{2+}$  C) Numero de raíces laterales sin  $Pb^{2+}$ . D) Numero de raíces laterales con  $Pb^{2+}$  E) Peso fresco sin  $Pb^{2+}$ . F) Peso fresco con  $Pb^{2+}$  G) Peso seco sin  $Pb^{2+}$ . H) Peso seco con  $Pb^{2+}$  ES±. N=7. Las letras indican diferencias significativas  $P < 0.05$ . DDT: días después de la transferencia.



**Figura 12.** Evaluación del desarrollo en *A. thaliana*. Parte superior; tratamientos sin adición de  $Pb^{2+}$ . A) Mock B) *LasI* C) *Naganishia globosa* D) *Shingomonas trueperi*. E) *Shingopixis alaskensis* F) *Sphingomonas melonis*. Parte inferior; tratamientos adicionados con  $Pb^{2+}$ . G) 800  $\mu M$   $Pb$  H) *LasI* I) *Naganishia globosa* J) *Shingomonas trueperi* K) *Shingopixis alaskensis* L) *Sphingomonas melonis*. Plántulas con 12 días después de la transferencia.

#### 7.4 Cambios en la arquitectura del sistema radical inducidos por *S. trueperi* en *A. thaliana*.

Para la caracterización del sistema radical inducidas por la rizobacteria *Sphingomonas* sp., en función de la resistencia (40 mM de  $Pb^{2+}$ ) que fue mayor que los demás aislados y que también presentó diferentes fenotipos (Figura 11) se hicieron cinéticas de crecimiento con inóculo por contacto y a distancia.

El crecimiento se evaluó hasta los 12 DDT donde *S. trueperi* inoculado por contacto muestra una inhibición gradual desde la concentración 100  $\mu M$   $Pb^{2+}$  y al incrementar la concentración el crecimiento de la RP se inhibe (Cuadro 5, 14C). El

NRLs incrementa y sin embargo al incrementar la concentración hasta 500  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}^{2+}$  el NRLs se reduce hasta llegar a formar un sistema radical ramificado (Cuadro 5, Figura 14G).

**Cuadro 5.** Evaluación de la arquitectura del sistema radical de *A. thaliana* a los 12 días después de la transferencia inoculado con *S. trueperi*.

Contacto						
Tratamientos ( $\mu\text{M}$ Pb)	RP (cm)*	ES $\pm$ <sup>^</sup>	RLs <sup>#</sup>	ES $\pm$	DRLs/cm <sup>\$</sup>	ES $\pm$ <sup>z</sup>
<i>Mock</i>	4.08	0.3 a	6	1.41 g	1.26	0.36 c
<i>0</i>	2.68	0.48 bc	20.5	0.64 cdef	6.4	0.56 b
<i>100</i>	3.01	0.35 ab	27.5	1.84 ab	7.64	0.96 ab
<i>200</i>	2.64	0.46 bc	29	2.67 a	8.54	1.31 ab
<i>300</i>	1.96	0.089 bcde	25.5	0.64 abc	9.84	1.02 ab
<i>400</i>	2.26	0.23 bcd	24.75	1.31 abcd	8.33	0.81 ab
<i>500</i>	1.56	0.04 cdef	20	1.47 cdef	8.33	1.27 ab
<i>600</i>	1.21	0.15 def	18.5	1.19 def	9.36	1.57 ab
<i>700</i>	0.81	0.12 ef	22.25	0.62 bcde	11.56	0.13 a
<i>800</i>	0.64	0.04 ef	16.33	0.88 ef	9.26	0.88 ab
<i>900</i>	0.73	0.09 ef	14.25	0.75 f	10.6	0.47 ab
<i>1000</i>	0.11	0.02 f	3	0 g	7.25	0.74 ab

Distancia						
Tratamientos ( $\mu\text{M}$ Pb)	RP (cm)	ES $\pm$	RLs	ES $\pm$	DRLs/cm	ES $\pm$
<i>Mock</i>	4.08	0.3 a	6	1.41 e	1.26	0.36 c
<i>0</i>	2.59	0.07 b	19	1.47 bc	5.42	0.5 b
<i>100</i>	2.64	0.05 b	24.25	0.75 ab	6.72	0.26 ab
<i>200</i>	2.3	0.06 bc	26.75	1.31 a	9.33	0.79 ab
<i>300</i>	2.38	0.12 bc	21	1.35 abc	7.4	0.48 ab
<i>400</i>	2.065	0.09 bc	21	1.58 abc	7.89	0.75 ab
<i>500</i>	2.14	0.04 bc	16.5	2.21 cd	6.18	0.88 ab
<i>600</i>	1.84	0.08 cd	18.75	0.85 bcd	7.8	0.37 ab
<i>700</i>	1.37	0.13 de	19.75	1.31 abc	9.74	1.21 a
<i>800</i>	0.95	0.034 ef	19	5 abcd	9.16	1.19 ab
<i>900</i>	0.671	0.06 f	10.25	0.85 de	8.64	0.46 ab
<i>1000</i>	0.147	0.002 f	3.5	0.5 e	7.15	0.81 ab

\*RP: raíz primaria.

---

#RLs: raíces laterales.

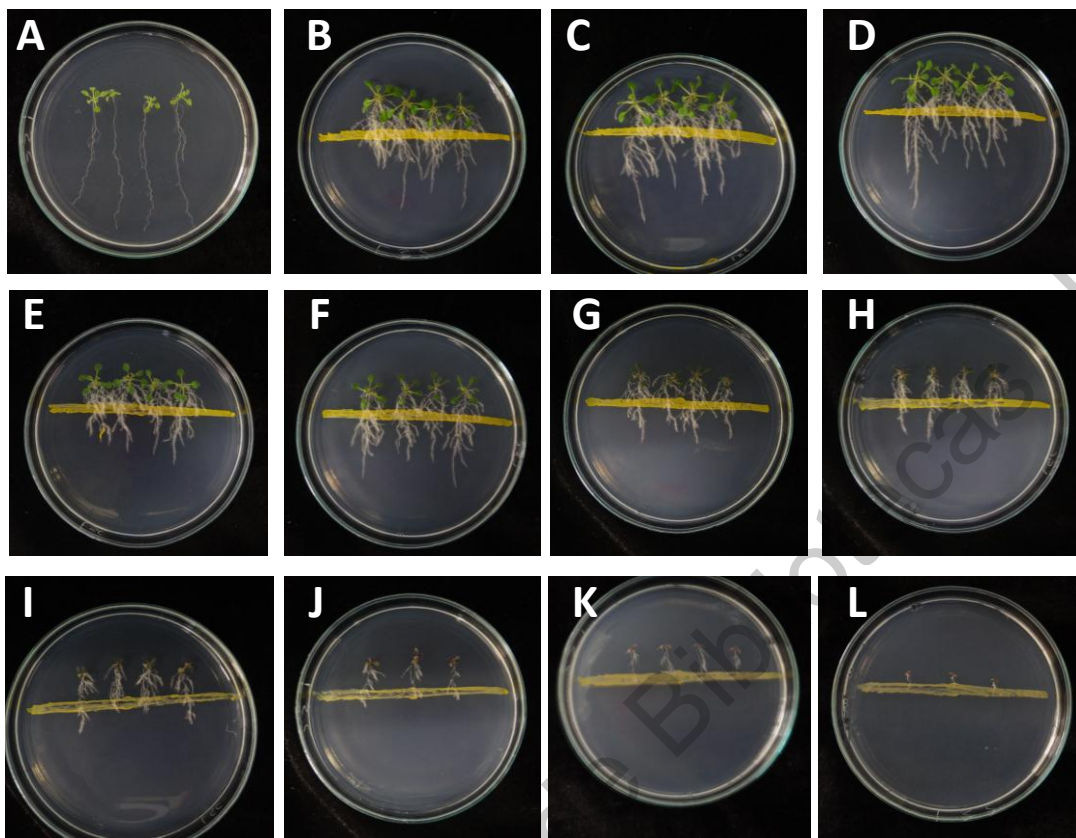
\$DRLs: densidad de raíces laterales.

^ES: error estándar.

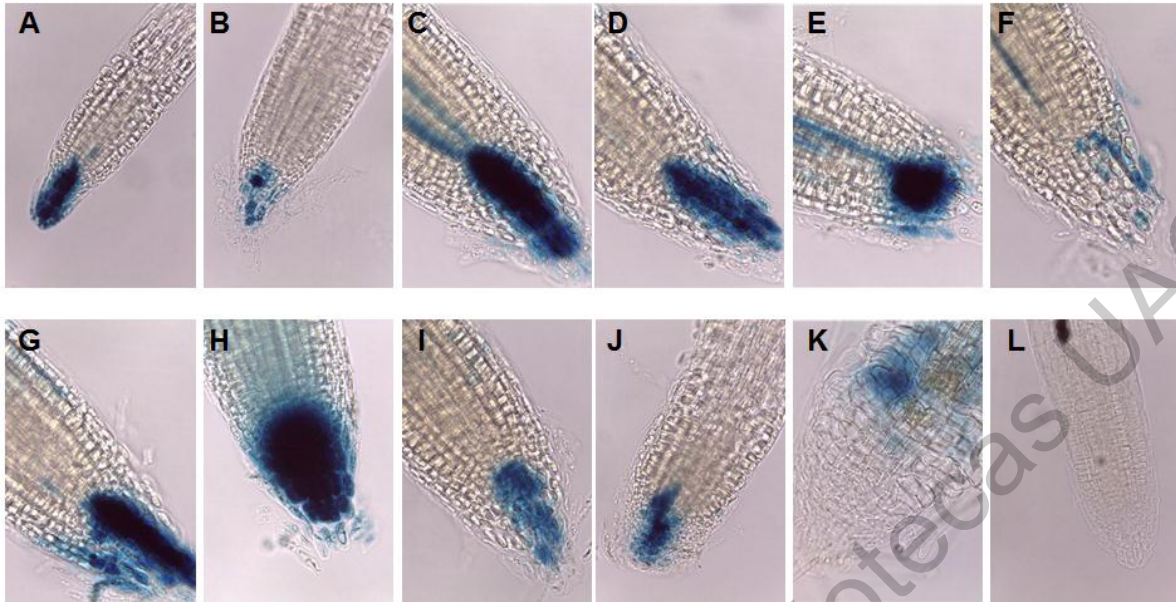
<sup>z</sup>P<0.05.

Cuando *S. trueperi* fue inoculada por distancia se observó inhibición del sistema radical similar al observado inoculado por contacto (Cuadro 5, Figura 15). Cuando las plántulas están presentes (sin Pb<sup>2+</sup>) no hay cambios en el crecimiento, al incrementar la concentración a 100 hasta 600 μM Pb<sup>2+</sup> ocurre una inhibición del 50% con respecto al tratamiento mock y 0 μM Pb<sup>2+</sup> (Cuadro 5; Figura 14D, H). Al incrementar aún más la concentración de (800-900 μM Pb<sup>2+</sup>) (Cuadro 5, Figura 15I-K) donde muestra una inhibición del 80 y 90% similar a lo observado en la cinética inoculada por contacto en concentración similar (Cuadro 5, 15J). La formación de RLs a bajas concentraciones (100-200 μM Pb<sup>2+</sup>) se induce más la formación de las RLs. En concentraciones (300-700 μM Pb<sup>2+</sup>) aún se forman las RLs (Cuadro 5) y a altas concentraciones (800 y 900 μM Pb<sup>2+</sup>) la formación disminuye (Cuadro 5; Figura 16J-L).





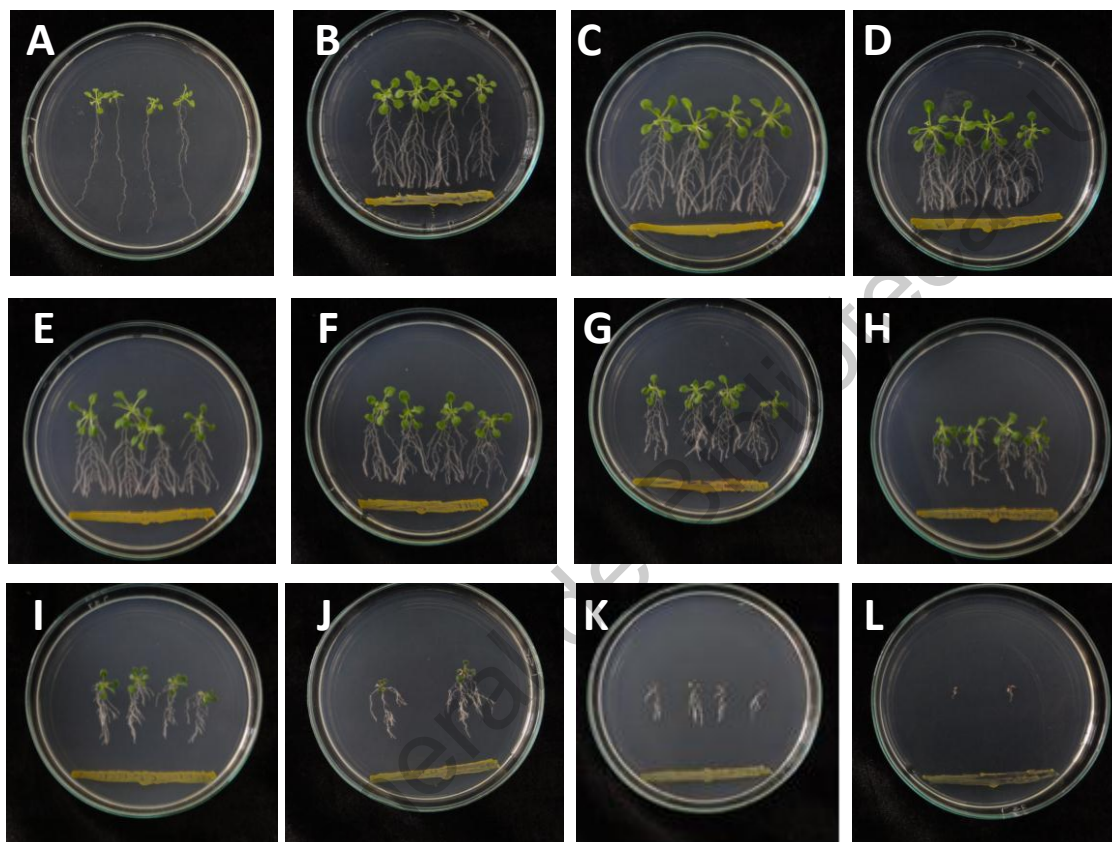
**Figura 13.** Plántulas representativas de 12 DDT de a cinética de crecimiento con la rizobacteria *S. trueperi* por contacto. A) Mock. B) 0  $\mu\text{M Pb}^{2+}$ . C) 100  $\mu\text{M Pb}^{2+}$ . D) 200  $\mu\text{M Pb}^{2+}$ . E) 300  $\mu\text{M Pb}^{2+}$ . F) 400  $\mu\text{M Pb}^{2+}$ . G) 500  $\mu\text{M Pb}^{2+}$ . H) 600  $\mu\text{M Pb}^{2+}$ . I) 700  $\mu\text{M Pb}^{2+}$ . J) 800  $\mu\text{M Pb}^{2+}$ . K) 900  $\mu\text{M Pb}^{2+}$ . L) 1000  $\mu\text{M Pb}^{2+}$ . DDT: días después de la transferencia.



**Figura 14.** Cinética de crecimiento con *A. thaliana* DR5::GUS en el sistema *in vitro* por contacto con *S. trueperi* A) Mock. B) 0  $\mu\text{M}$  Pb. C) 100  $\mu\text{M}$  Pb. D) 200  $\mu\text{M}$  Pb. E) 300  $\mu\text{M}$  Pb. F) 400  $\mu\text{M}$  Pb. G) 500  $\mu\text{M}$  Pb. H) 600  $\mu\text{M}$  Pb. I) 700  $\mu\text{M}$  Pb. J) 800  $\mu\text{M}$  Pb. K) 900  $\mu\text{M}$  Pb. L) 1000  $\mu\text{M}$  Pb. Dos replicas biológicas. Plántulas con 12 DDT. N=3.

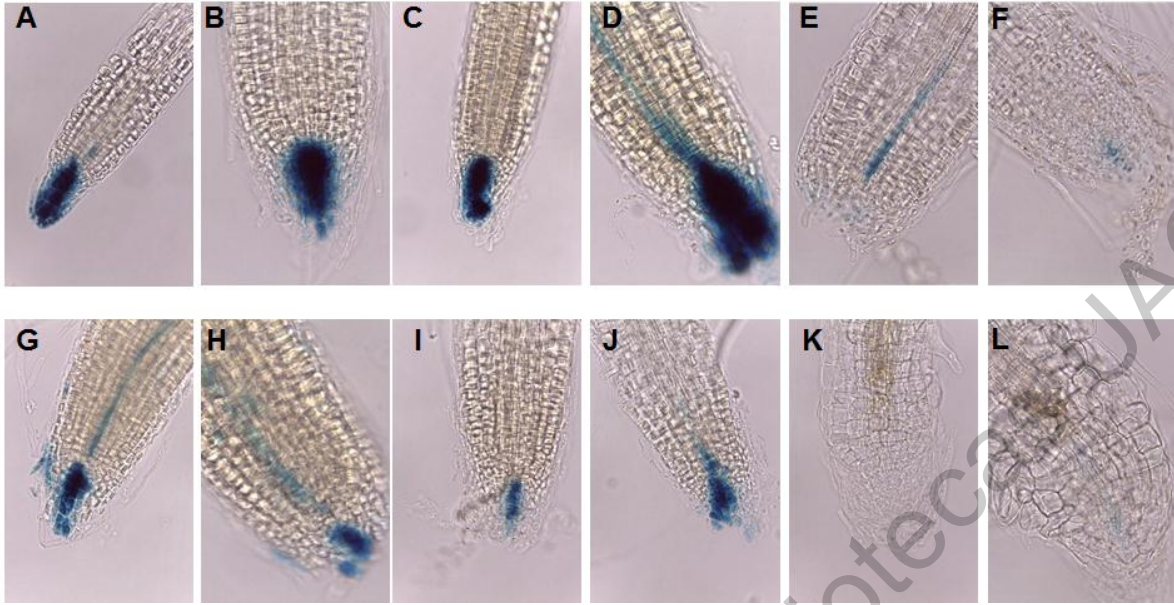
En general la DRLs incrementa al cambiar la concentración de  $\text{Pb}^{2+}$  en orden ascendente (Cuadro 5). Adicionalmente, al término de la cinética las plántulas fueron tenidas con la solución GUS para observar la actividad del gen reportero GUS de la línea transgénica DR5 que es de respuesta a IAAs que al teñir con la solución GUS nos indica en donde se encuentra la distribución de las IAA que inducen a división celular y la formación de RLs.(Figura 15, 17). Los resultados nos sugieren que *S. trueperi* por contacto y distancia genera un fenotipo similar en bajas, intermedias y altas concentraciones de  $\text{Pb}^{2+}$  ya que la tendencia fue similar en ambas condiciones por contacto y distancia (Cuadro 5). Notablemente la actividad de gen reportero GUS disminuye en el sistema por contacto y distancia (Figura 15, 17). Las plántulas del sistema por distancia fueron más afectadas con una RP inhibida (Figura 17) que las del sistema por contacto (Figura 15). Los resultados nos indican respuestas de crecimiento similar en la ASR, sin embargo los fenotipos fueron diferentes y son más drásticos en el sistema por contacto que a distancia, además la desorganización del meristemo en el ápice por contacto

parece más tolerante al  $Pb^{2+}$ . Con base en los resultados se usó el sistema por contacto para continuar con la parte experimental.



**Figura 15.** Plántulas representativas de 12 DDT de a cinética de crecimiento con la rizobacteria *S. trueperi* por distancia. A) Mock. B)  $0 \mu M Pb^{2+}$ . C)  $100 \mu M Pb^{2+}$ . D)  $200 \mu M Pb^{2+}$ . E)  $300 \mu M Pb^{2+}$ . F)  $400 \mu M Pb^{2+}$ . G)  $500 \mu M Pb^{2+}$ . H)  $600 \mu M Pb^{2+}$ . I)  $700 \mu M Pb^{2+}$ . J)  $800 \mu M Pb^{2+}$ . K)  $900 \mu M Pb^{2+}$ . L)  $1000 \mu M Pb^{2+}$ . DDT: días después de la transferencia.

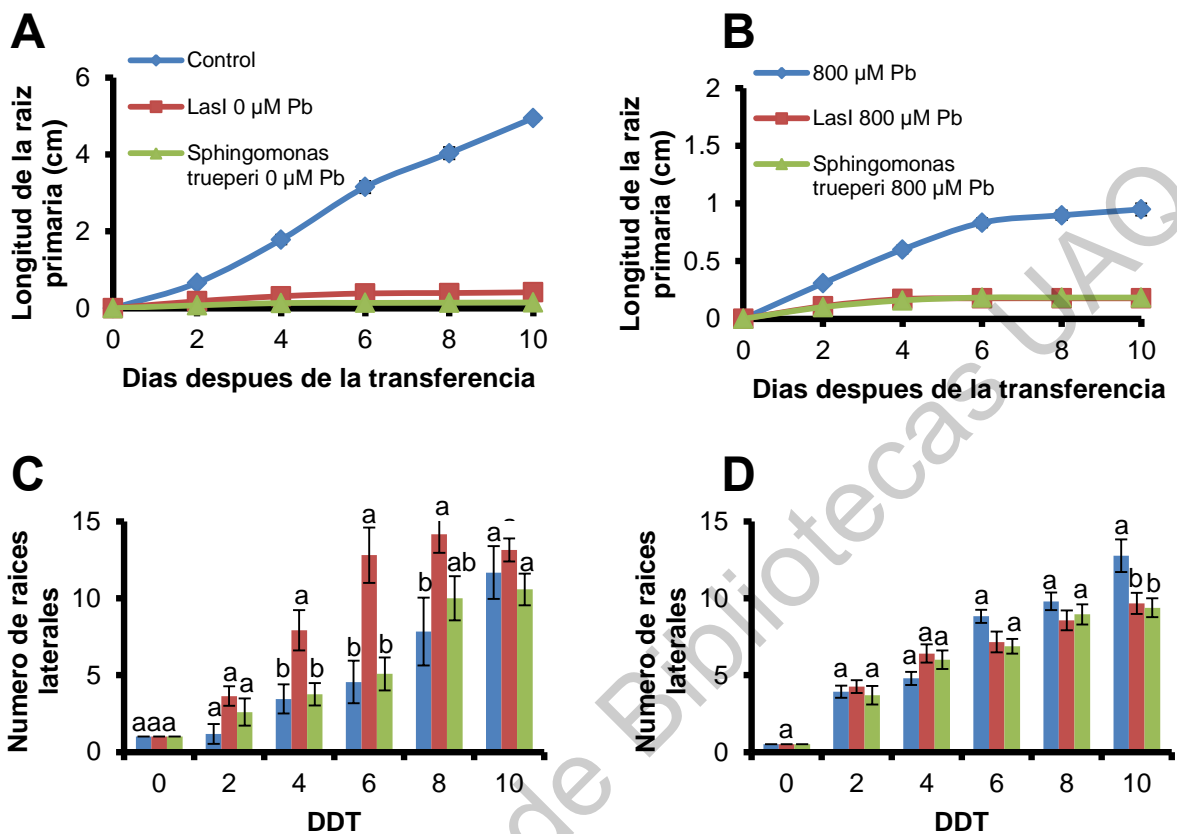




**Figura 16.** Cinética de crecimiento con *A. thaliana* DR5::GUS en el sistema *in vitro* por distancia con *S. trueperi*. A) Mock. B) 0  $\mu\text{M}$  Pb. C) 100  $\mu\text{M}$  Pb. D) 200  $\mu\text{M}$  Pb. E) 300  $\mu\text{M}$  Pb. F) 400  $\mu\text{M}$  Pb. G) 500  $\mu\text{M}$  Pb. H) 600  $\mu\text{M}$  Pb. I) 700  $\mu\text{M}$  Pb. J) 800  $\mu\text{M}$  Pb. K) 900  $\mu\text{M}$  Pb. L) 1000  $\mu\text{M}$  Pb. Dos replicas biológicas. Plántulas con 12 DDT. N=3.

### 7.5 Inducción de cambios fisiológicos y expresión génica en el PDPE con *S. trueperi* en *A. thaliana*

Con base en los resultados de la caracterización del PDPE (14, 15, 16, 17) se usó el sistema por contacto para caracterizar la respuesta fisiológica y de desarrollo que induce *S. trueperi* en etapas tempranas. El crecimiento de la RP presentó una inhibición del 95% en tratamientos sin  $\text{Pb}^{2+}$  (Figura 18A), la expresión del gen reportero GUS mostró actividad hasta 4 DDT (Figura 19Z) posterior a los 6 DDT en el tratamiento *S. trueperi* 0  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}^{2+}$  no se observó la expresión del gen reportero en comparación con *LasI* y en el tratamiento con mock se mantuvo activo hasta los 10 DDT (Figura 19M-Q, A-F).



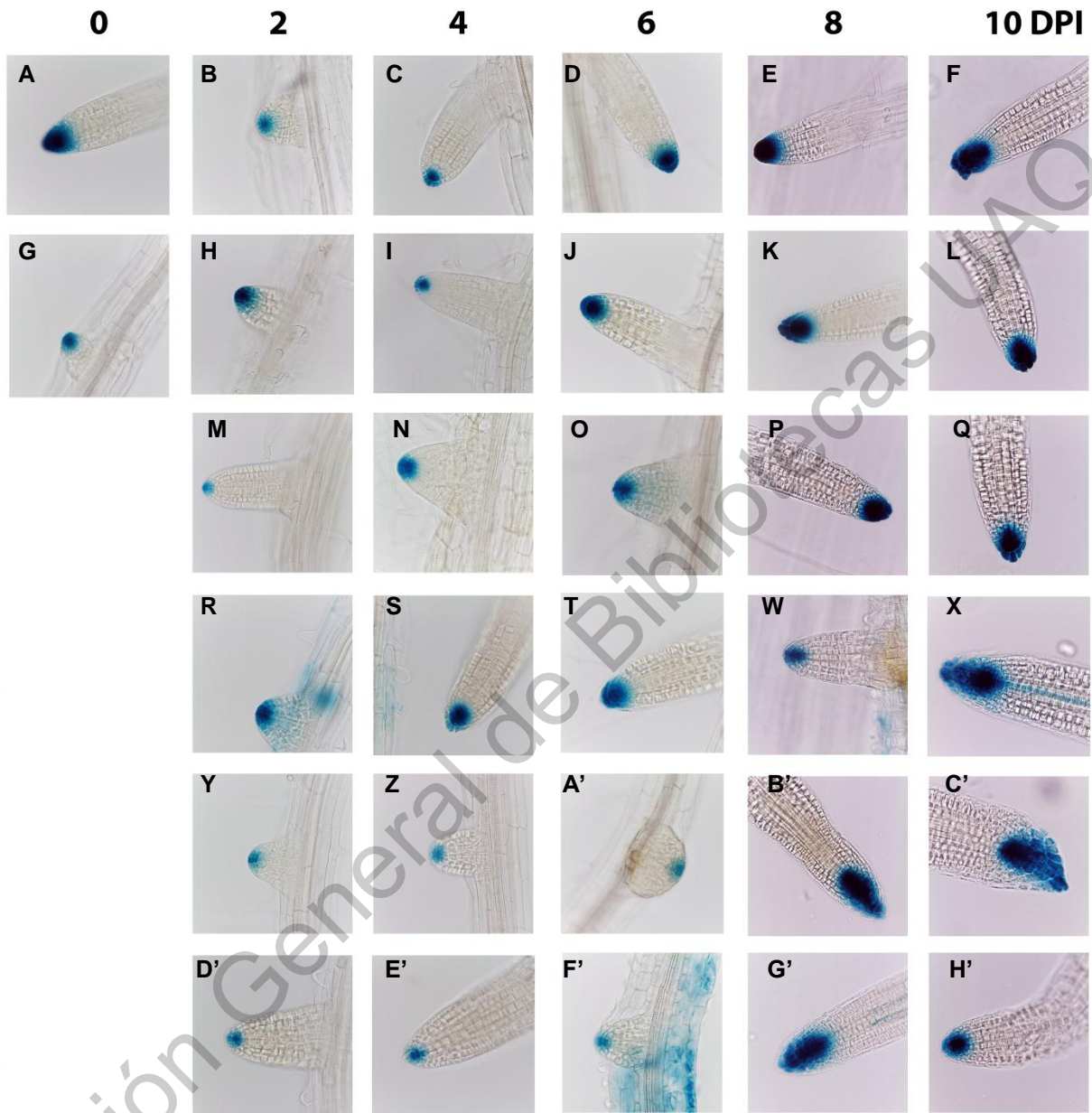
**Figura 17.** Caracterización fisiológica y de desarrollo con la línea transgénica *DR5::GUS* con *LasI* y *S. trueperi*. A) Longitud de raíz primaria sin adicionar  $Pb^{2+}$ . B) Longitud de raíz primaria con adición  $Pb^{2+}$ . C) Numero de raíces laterales sin adicionar  $Pb^{2+}$ . D) Numero de raíces laterales con adición  $Pb^{2+}$ . N=9. DDT: días después de la transferencia. Las letras indican diferencias significativas  $p < 0.05$ .



**Figura 18.** Caracterización fisiológica y de desarrollo con la línea transgénica *DR5::GUS*. Mock (A-F). 800  $\mu\text{M Pb}^{2+}$  (G-L). *LasI* 0  $\mu\text{M Pb}^{2+}$  (M-Q). *LasI* 800  $\mu\text{M Pb}^{2+}$  (R-X). *S. trueperi* 0  $\mu\text{M Pb}^{2+}$  (Y-C'). *S. trueperi* 800  $\mu\text{M Pb}^{2+}$  (D'-H'). N=3. DDT: días después de la transferencia. Color en azul indica la expresión del gen reportero *GUS*.

Sin embargo la formación de las RLs fue incrementando conforme transcurrían los días, no fue hubo diferencias significativas con *LasI* y *S. trueperi*. formaron un NRLs similar (Figura 18C) y la expresión del gen reportero no fue afectada cuando se analizaron las RLs en todos los tratamientos (Figura 20) lo que sugiere que el transporte de las IAA está activo para continuar con la formación de RLs.

En la condición adicionado con  $Pb^{2+}$  observamos una inhibición del 85% del crecimiento de la RP en *LasI* y *S. trueperi* en ambos tratamientos en comparación con el mock (Figura 18B). La actividad del gen reportero GUS mostró un incremento a los 2 DDT en ambos tratamientos con *LasI* y *S. trueperi* (Figura 19R-S, D'-H') en comparación con el 800  $\mu M$   $Pb^{2+}$  sin la presencia de la bacteria que no hubo incremento durante los 10 DDT (Figura 19G-L). Interesantemente, a partir de los días 4 DDT en los tratamientos *LasI* 800  $\mu M$   $Pb^{2+}$  y *S. trueperi* 800  $\mu M$   $Pb^{2+}$  (Figura 19T, E') la expresión del gen reportero fue disminuyendo y se acumuló en las periferias también se observó una desorganización en el ápice de la RP sugiriendo la inhibición del transporte de IAAs y la pérdida de división celular. La formación de RLs fue incrementando gradualmente y las RLs mostraron actividad del gen reportero GUS en todos los tratamientos (Figura 20). En la caracterización fisiológica y de desarrollo se observaron cambios en el PDPE desde etapas tempranas y la actividad del gen GUS evidencio la modificación de la RP temporalmente y contrastó los cambios fisiológicos que ocurren en los diferentes tratamientos con *LasI* y *S. trueperi* que sugiere que a presencia de  $Pb^{2+}$  podría estar reprimiendo la función patógena de los aislados.



**Figura 19.** Raíces laterales con la línea transgénica *DR5::GUS*. Mock (A-F).  $800 \mu\text{M Pb}^{2+}$  (G-L). *LasI*  $0 \mu\text{M Pb}^{2+}$  (M-Q). *LasI*  $800 \mu\text{M Pb}^{2+}$  (R-X). *S. trueperi*  $0 \mu\text{M Pb}^{2+}$  (Y-C'). *S. trueperi*  $800 \mu\text{M Pb}^{2+}$  (D'-H'). N=3. DDT: días después de la transferencia. Color en azul indica la expresión del gen reportero *GUS*.



## VIII DISCUSIÓN

### 8.1 Diversidad microbiana y los ambientes extremos como los jales mineros.

En nuestro estudio se obtuvieron un total de 135 aislados microbianos, se describieron morfológicamente (Anexo VI, VII y VIII). Los microorganismos aislados más numerosos fueron de endosfera y rizósfera. La diversidad de formas que dominó en nuestro estudio fueron los bacilos, cocos y cocobacilos y también dominaron los Gram negativos (Figura 2, 3A, B). De los aislados microbianos evaluados que atrajo nuestro interés en la determinación de MICs y promoción del crecimiento vegetal fueron los que tuvieron alta similitud al género *Sphingomonas*.

Los resultados son similares a los reportados por Kuffner *et al.* (2010) donde aislaron microorganismos en suelos contaminados con  $Zn^{2+}$  y  $Cd^{2+}$  los grupos dominantes fueron *Sphingomonas* y *Methylobacterium* (Idris *et al.*, 2004). Adicionalmente, Kuffner *et al.* (2010) también reportaron que el grupo de las proteobacterias, actinobacterias y bacteroidetes representan mayor proporción de la rizósfera de *Salix caprea*. En otro estudio se demostró que el grupo  $\gamma$ -proteobacterias, bacteroidetes y actinobacterias representan el mayor número de comunidades bacterianas (Romaniuk *et al.*, 2018). En sentido amplio, los géneros de bacterias reportados que han sido aislados de suelos afectados por  $Pb^{2+}$  son *Bradyrhizobium* sp., *Variovorax* sp., *Sphingomonas* sp., *Janthinobacterium* sp., *Collimonas*, *Arthrobacter* sp., *Microbacterium* sp., *Flavobacterium* sp., *Methylobacterium* sp., *Ochrobactrum* sp., *Bacillus* sp

La mayoría de las endófitas suelen colonizar tejidos de raíz en células endodermales como se ha reportado para *Serratia marcescens* (Gyaneshwar *et al.*, 2001) y que además promueve el crecimiento en *Oriza sativa*. Las endófitas podrían tener ventajas sobre las rizobacterias siendo más competitivas las endófitas. Los aislados identificados como *Shingomonas* sp. en nuestro sitio de estudio además de ser endófitas podrían mantenerse sin dificultad en los tejidos internos de las plantas (tallos y raíces) y para las rizobacterias con los suelos

enriquecidos con metal, carente en materia orgánica, altas concentraciones de  $Pb^{2+}$  y pH ácido.

Interesantemente, un reporte hecho por (Jebara *et al.*, 2015) observaron que en suelos contaminados con  $Pb^{2+}$  aislaron a *Pseudomonas* y *Rhizobium* reportan que la actividad enzimática de POX (Peroxidasa), CAT (Catalasa) y SOD (Superoxido dismutasa) le confiere la capacidad para crecer fácilmente en medios con  $Pb^{2+}$ . Por lo que los microorganismos que fueron aislados algunos podrían tener activos estos mecanismos.

## **8.2 Mecanismos moleculares de los microorganismos aislados de plantas que crecen en suelos contaminados con MPs**

La filogenia de los microorganismos nos permite conocer su ubicación dentro de los taxones y su relación con sus parientes más cercanos. El análisis de las secuencias mostró que MT 2-1 es una levadura con 98.41% de similitud a *Naganishia globosa*, MR 3-5 presentaron similitud de 100% a *Sphingomonas trueperi* y MR 3-14 con 99.23% a *Sphingomonas melonis*. MR 3-9 que mostró 92% de similitud a *Sphingopyxis alaskensis* (Cuadro 4). Los aislados evaluados en el presente trabajo fueron descritos como endófitas ya que colonizan tejidos de plantas además crecen en medios afectados con MPs.

El género de *Sphingomonas* sp. coloniza la endosfera de plantas reportadas en *Salix caprea* (Kuffner *et al.*, 2010). Cercano al grupo de *Sphingomonas* sp. está el género de *Sphingopyxis* sp. (Figura 10) que forman la clase de  $\alpha$ -proteobacterias, se ha demostrado que tienen la capacidad para degradar variedad de contaminantes orgánicos e inorgánicos (Li *et al.*, 2013). En nuestros resultados (Cuadro 3) las endófitas resistieron altas concentraciones de As V, As III,  $Pb^{2+}$  y  $Hg^{2+}$  que fueron más altas en comparación (2-3 veces más alto) con los reportados por (Kuffner *et al.*, 2010; Jebara *et al.*, 2015; Romaniuk *et al.*, 2018) afirmando que las endófitas son resistentes a la mayoría de los MPs evaluados.

La habilidad del microorganismo para resistir altas concentraciones de MPs reside en su capacidad para inmovilizar el MP (Majumder *et al.*, 2013). La probabilidad de encontrar microorganismos resistentes a  $Pb^{2+}$  incrementa cuando estos son aislados en sitios contaminados por MPs (Jebara *et al.*, 2015) aunque esto no es un primer requisito para resistir la presencia de algunos MPs como ya se ha observado para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Essa *et al.*, 2018).

De esta manera las ATPsas tipo P-1B podrían estar participando en la exclusión del  $Pb^{2+}$  ya que algunos de los microorganismos conservan en su plásmido el operón *UTRABCD* que codifican a proteínas que participan desde la percepción, quelación y hasta la exclusión de  $Pb^{2+}$  (Roane, 1999; Taghavi *et al.*, 2009). El  $Pb^{2+}$  se une a un dominio que funciona como un sitio de unión. Posteriormente, ocurre una fosforilación con un cambio conformacional en la estructura de la ATPasa y esta reacción expulsa al  $Pb^{2+}$  funcionando como una bomba que expulsa los iones similar como se ha observado en la exclusión de iones de  $Cu^{2+}$  (Argüello *et al.*, 2011). Aunque no se descarta que *S. trueperi* podría estar secretando componentes que modifican y reducen la movilidad del  $Pb^{2+}$  en el medio (Nieto *et al.*, 1987).

También el  $Pb^{2+}$  puede ser almacenado en el periplasma (espacio intermembranal) de *Providencia vermicola*. Observaciones de Sharma *et al.* (2017) sugieren que la acumulación de  $Pb^{2+}$  se debe a su baja movilidad. En este sentido *S. trueperi* podría estar excluyendo el  $Pb^{2+}$  por medio de esta bomba de ATPasa una vez que ingresa en su citoplasma y esto le permite mantenerse en el ambiente. Este género también ha sido reportado que presenta resistencia a  $Hg^{2+}$  resisten concentraciones más altas (34.95 mg/L  $Hg^{2+}$ ) comparadas con las reportadas para *Pseudomonas putida* que fue de 2.3 mg/L de  $Hg^{2+}$  (Xiao *et al.*, 2011; Mahbub *et al.*, 2017) por lo que los resultados observados en la resistencia a  $Hg^{2+}$  en el cuadro 3 podrían deberse a mecanismos de exclusión y volatilización propias de los aislados que además presentan gran similitud con los genes *Mer* (Taghavi *et al.*, 2009). Este mecanismo se señala en la Figura 21 donde los mecanismos descritos podrían estar activos.

Por otro lado, el aislado MT 2-1 presentó una similitud a *N. globosa*, la presencia de este microorganismo no se descarta en nuestro sitio de estudio, ha sido aislada de suelos con alta salinidad y su mecanismos genéticos ha sido descritos (Mokhtarnejad *et al.*, 2016). Se ha reportado que conforme transcurre el tiempo la comunidad cambia y las especies claves se mantienen (Banerjee *et al.*, 2019). En nuestros resultados esta levadura podría formar parte de las especies residentes (Yurkov *et al.*, 2012). Los aislados reportados han sido encontrados en diferentes ambientes afectados por MPs y/o alta salinidad lo que nos sugiere que los mecanismos moleculares y la relación evolutiva de cada aislado los mantiene en la endosfera de las plantas (Deng *et al.*, 2012) que podrían estar excluyendo o translocado el  $Pb^{2+}$  de acuerdo a su afinidad por el MP en plantas que crecen en ambientes contaminados con MPs.

### **8.3 Efectos del $Pb^{2+}$ en la arquitectura del sistema radical de *A. thaliana***

Las plantas toman el  $Pb^{2+}$  en su sistema radical y lo almacenan en sus organelos. La toxicidad del  $Pb^{2+}$  afecta el desarrollo de la plantas inhibiendo el crecimiento de la RP (Morel *et al.*, 2009). En nuestros resultados (Figura 7) la cinética de crecimiento en presencia de  $Pb^{2+}$  (0-1000  $\mu M$   $Pb^{2+}$ ) nos permitió evaluar los efectos que ocasiona el incremento en la concentración de  $Pb^{2+}$  observando que la RP fue inhibiendo gradualmente al incrementar las concentraciones de  $Pb^{2+}$  (Figura 7B). Estos efectos tóxicos se han relacionado con la inhibición de una división celular completa en el MAR donde se ha observado que la línea marcadora *DR5* deja de tener actividad que en consecuencia ocasiona una desorganización del MAR (Sabatini *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2015).

Otro aporte hecho por Eun *et al.* (2000) sugiere que la inhibición de la longitud de la RP se debe a una baja tasa de división celular en el MAR donde los microtúbulos son afectados por el incremento de la concentración de  $Pb^{2+}$ . La concentración toxica reportada de  $Pb^{2+}$  es de 500  $\mu M$  en *A. thaliana*, estos

resultados nos sugiere que a 500  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}^{2+}$  inician los síntomas severos de toxicidad y no a 800  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}^{2+}$ .

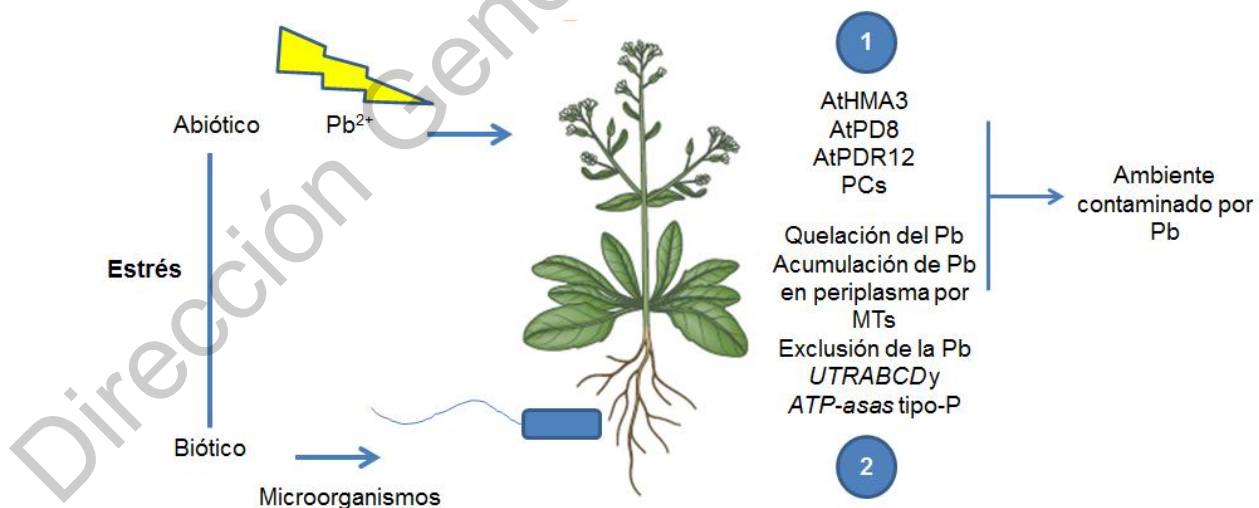
Sin embargo, el incremento en la formación de RLs y DRLs en la concentración de 500  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}^{2+}$  mostro un SR ramificado que también sugieren síntomas de toxicidad ocasionadas por el  $\text{Pb}^{2+}$  (Figura 7C,D). Este incremento en la formación de las RLs en *A. thaliana* también se observó en plántulas de *Oriza sativa* L. En esta ocasión la formación de las raíces adventicias (RAs) que son generadas durante el estrés por  $\text{Pb}^{2+}$  y son más resistentes que las formadas antes de la transferencia de medios con  $\text{Pb}^{2+}$  (Yang *et al.*, 2000). Esta respuesta podría tener una explicación, en *Arabidopsis* las RLs que se generan podrían estar secretando componentes que inmovilizan el  $\text{Pb}^{2+}$  desde etapas tempranas de su desarrollo dejándolo al  $\text{Pb}^{2+}$  bioindisponible, posteriormente las nuevas RLs que emergen ya no pueden tomar el  $\text{Pb}^{2+}$  debido a que no está disponible para su toma (Yang *et al.*, 2000).

El  $\text{Pb}^{2+}$  puede adherirse en la membrana formando precipitados con los grupos  $\text{PO}_4$ ,  $\text{COO}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{N}^-$ ,  $\text{S}^-$  (Peralta-Videa *et al.*, 2009). Se ha observado que el oxalato tiene la capacidad de reducir la movilidad el  $\text{Pb}^{2+}$ . Este mecanismo comparte relación descrito para el Aluminio (Al) donde la síntesis de ácidos orgánicos como (citrato, malato, oxalato) que se unen al metal reducen su movilidad y no permiten la entrada de iones de  $\text{Pb}^{2+}$  en los tejidos internos de *Arabidopsis*.

Por otro lado, una familia de proteínas de membrana (HMA3) dependientes de ATP que participan en el transporte de iones como el  $\text{Zn}^{2+}$  también podrían estar secuestrando los iones  $\text{Pb}^{2+}$  (Hussain *et al.*, 2004) (Figura 7). HMA3 se expresa en el ápice de la RP y en el haz vascular de *A. thaliana* secuestrando los iones de  $\text{Pb}^{2+}$  (Morel *et al.*, 2009). En otro tipo silvestre Wassileskija (Ws) se reportó que la concentración de 750  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}^{2+}$  mostro que la RP está ligeramente inhibida además con una sobreexpresión de HMA3 que confiere tolerancia a *Arabidopsis* en presencia de  $\text{Pb}^{2+}$  (Morel *et al.*, 2009).

Las mutantes en HMA3 lo hacen más sensible que el tipo silvestre Ws y los niveles de expresión son bajos en Ws y completamente ausentes en Col-0. En las plantas metalofitas como *A. halleri* este gen muestra niveles altos de expresión (100 veces) (Talke *et al.*, 2006). La descripción de HMA3 como un pseudogen se ha especulado que podría estar actuando con su similar HMA2 y algunos otros componentes de detoxificación de MPs como CAT (Catalasa) (Morel *et al.*, 2009). El transporte de  $Pb^{2+}$  desde el SR puede ser mediado por HMA3 que secuestra y almacena directamente los iones en las vacuolas, de esta manera no permite la translocación de  $Pb^{2+}$  hacia la parte aérea.

Sin embargo se ha descrito otro mecanismo que involucra la participación de las fitoquelatinas AtPCS1 que codifica a una proteína que forma complejo con el  $Pb^{2+}$ . Además se ha descrito que el gen AtPDR12 tiene una función similar que AtPCS1. La formación de este complejo facilita el transporte hacia la parte aérea y su acumulación en las vacuolas (Lee *et al.*, 2005; Fischer *et al.*, 2014). Las plántulas que presentan toxicidad del Pb desde  $500 \mu M Pb^{2+}$  se debe a la ausencia de HMA3 en Col-0 por lo que no se es posible secuestrarlos (Figura 7A). Los posibles mecanismos moleculares involucrados se muestran en la Figura 20 en el punto 1 que le estaría permitiendo a la planta mantener en estos ambientes contaminados.



**Figura 20.** 1) Mecanismos activados en plantas en presencia de Pb. 2) Mecanismos activados en bacterias en presencia de Pb.

#### 8.4 Mecanismos de la promoción del crecimiento en *A. thaliana*

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal favorecen el crecimiento y desarrollo directa e indirectamente y confiere tolerancia al estrés abiótico (Glick, 1995; Haney *et al.*, 2015). En nuestros resultados los aislados evaluados con el sistema por contacto en ausencia y presencia de  $Pb^{2+}$  mostraron cambios en la ASR en ambos tratamientos, sin embargo la RP tuvo más desarrollo en el tratamiento sin  $Pb^{2+}$  y la formación de RL fue mayor que en el tratamiento adicionado con  $Pb^{2+}$  con menor número de RLs (Figura 11, 12).

La inhibición de la RP en *A. thaliana* ya ha sido reportada por (Zamioudis *et al.*, 2013; Asari *et al.*, 2017) donde observo que *Bacillus amyloliquefaciens* y *Pseudomonas* sp. inhiben el crecimiento de la RP y en consecuencia incrementan las RLs, sin embargo aún no se han descrito los mecanismos involucrados. En la evaluación los tratamientos adicionados con  $Pb^{2+}$  el crecimiento de la RP fue inhibido (Figura 11A), sin embargo la formación de RLs continua (Figura 11B) similar a lo reportado por (López-Bucio *et al.*, 2007; Zamioudis *et al.*, 2013; Asari *et al.*, 2017) interesantemente nuestras condiciones están con  $Pb^{2+}$  cuando se da este efecto, entonces las vías de repuesta que activan esta señal podrían estar relacionadas al momento de enviar la señal de inhibición y genera más RLs.

En algunas condiciones se observó incremento en la formación de PRs similar a lo observado por (Asari *et al.*, 2017) donde observaron un incremento en la densidad de PRs y RLs en diferentes líneas mutagenizadas. Las transferencias de las plántulas en los experimentos usando el sistema *in vitro* planta-bacteria no tuvieron cambios significativos en el desarrollo de la RP (Figura 9) nos sugiere que la manipulación no afecta el crecimiento de la RP como también se ha reportado en estudios hechos por (López-Bucio *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2013; Asari *et al.*, 2017).

Se ha demostrado que gran cantidad de rizobacterias promueven el crecimiento en *A. thaliana* además modifican la ASR (Palacio-Rodríguez *et al.*, 2017). Los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal en presencia de estrés salino y

Pb<sup>2+</sup> podrían estar relacionados con mecanismos similares e interactuando con otros factores y esto mejora el crecimiento de las plantas (Viehweger, 2014; Sharma *et al.*, 2016). Uno de los mecanismos usados por las bacterias *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. es la capacidad de sintetizar IAA que esto modula el desarrollo de la ASR en *A. thaliana* (Palacio-Rodríguez *et al.*, 2017).

En *Arachis hypogaea* L. se observó promoción del crecimiento en condiciones salinas (100 mM) inoculadas con *Agrobacterium tumefaciens*, *Klebsiella* sp., *Ochrobactrum anthropi*, *Pseudomonas* sp. (Sharma *et al.*, 2016). Los aislados además de conferir protección a *A. hypogaea* tienen mecanismos adicionales como la capacidad de solubilizar fósforo, sintetizar IAA y degradar ACC además también incrementan la actividad de la CAT en interacción con estos mecanismos tienen mejor desempeño para promover el crecimiento (Nabti *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2016).

En la caracterización del desarrollo se hizo una cinética de crecimiento con un barrido de concentraciones de Pb<sup>2+</sup> usando a *S. trueperi*. por contacto y distancia. El incremento de la concentración de Pb<sup>2+</sup> inhibió el crecimiento de la RP en ambos tratamientos (contacto y distancia). Al termino del experimento las longitudes no fueron estadísticamente diferentes  $p < 0.05$  (Cuadro 4). Aunque en algunos estudios hay relación con el volumen del inóculo depositado que podría estar inhibiendo la RP en nuestro sistema el uso de *S. trueperi* falla en incrementar el alargamiento de la RP con Pb<sup>2+</sup> aunque si mantiene la formación de RLs (Cordovez *et al.*, 2017).

Los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal en presencia de estrés salino y Pb<sup>2+</sup> podrían estar relacionados con mecanismos similares e interactuando con otros factores y esto mejora el crecimiento de las plantas.



### 8.5 Desarrollo del sistema radical mediado por *S trueperi*.

El PDPE es esta determinado genéticamente, la participación de los genes (WOX, SCR, PLT, CLA) median procesos de división celular, elongación celular y diferenciación celular en el MAR (Sarkar *et al.*, 2007; Bennett y Scheres, 2010). Una correcta distribución de las IAA son requeridas para mantener el MAR organizado y para la generación de nuevos órganos como las RLs implicadas en el desarrollo del SR (Sabatini *et al.*, 1999). El uso de la línea transgénica *DR5* como herramienta para estudiar los cambios fisiológicos que ocurren durante la interacción planta-bacteria permitió seguir espacio temporal (Figura 18).

En nuestros resultados en presencia de  $Pb^{2+}$  se observó un incremento en la actividad de *DR5* a los 2 y 4 DDT (Figura 19 R-S, D'-E') sin embargo al transcurso de los días fue reduciendo la actividad hasta la pérdida de la actividad (Punto 1, Figura 21). También ocurrió una desorganización en los tratamientos adicionados con  $Pb^{2+}$  con el aislado (Figura 19). Estos resultados son diferentes a los descritos por (Pérez-Flores *et al.*, 2017) en *A. thaliana* donde la respuesta de *DR5* incrementa y se mantiene cuando la bacteria está presente. Otro aporte indica que no es una respuesta aislada ya que en *Pseudomonas* WCS417 induce la actividad del gen reportero *DR5* (Zamioudis *et al.*, 2013).

El incremento en la actividad de *DR5* puede ser por la participación de las IAA, sin embargo en algunas rizobacterias como *Pseudomonas* spp. WCS417 aunque tienen la capacidad de sintetizar IAA no promueven el crecimiento en *A. thaliana*, esto sugiere que está involucrado otra vía de señalización para mediar el desarrollo del SR. Adicionalmente a la participación de las IAA se ha sugerido la participación del etileno y el ácido jasmónico para mediar esta respuesta (Pieterse *et al.*, 2012).

Las diketopiperazinas (DKPs) pudieran ser las responsables de ocasionar los cambios en la ASR (Ortiz-Castro *et al.*, 2011). Se ha observado que *Pseudomonas* WCS417 podría estar sintetizando este compuesto que se difunde en el medio y reactiva la formación de RLs y PRs imitando al función de las IAA que además

podrían estar sufriendo un transporte polar (Zamioudis *et al.*, 2013). El mecanismo de respuesta se indica en el punto 3 de la figura 21.

Adicionalmente, el alargamiento de la RP inoculado por contacto podría ser un mecanismo de escape del SR de la zona donde se depositó el inoculo bacteriano en consecuencia la RP se alarga como se observó en *A. thaliana* inoculado con un patógeno *Rhizoctonia solani* (Cordovez *et al.*, 2017). Este mecanismo se indica en el punto 2 de la figura 21.

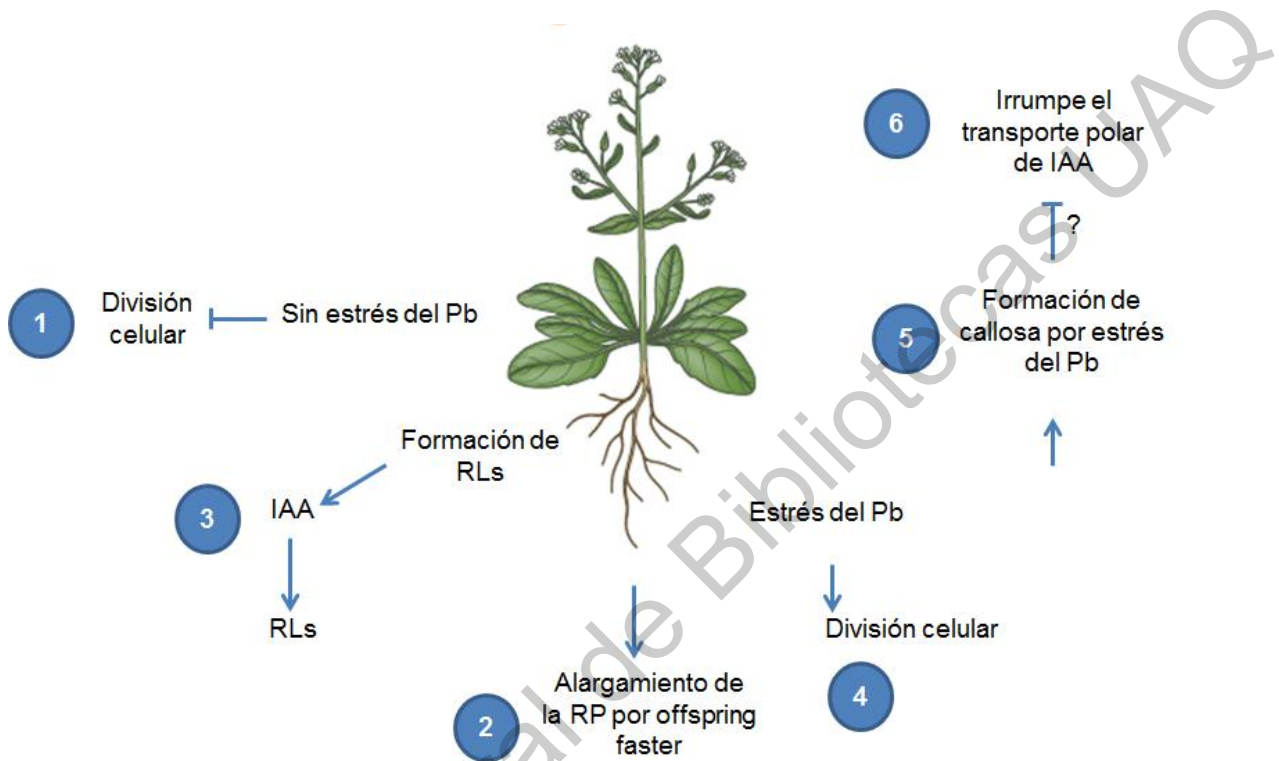
La desorganización observada en el MAR (Figura 19) en los tratamientos con 800  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}^{2+}$  únicamente fue en los inoculados con *LasI* y *S. trueperi*. La desorganización del MAR podría deberse a la inhibición del transporte de las IAA o las DKPs como se observó con NPA (ácido naftiltalamico) lo que ocasiona que la distribución de las IAA sean desplazados a la periferias.

Los resultados observados muestran similitud reportados por Müller *et al.* (2015) donde la respuesta de diferenciación del MAR se debe a la deposición de callosa que afecta la comunicación celular. Esta deposición de callosa podría estar afectando la organización del MAR con las membranas celulares afectadas así como el transporte polar de IAA. La formación de RLs y la actividad de *DR5* sugieren que el transporte polar está activo únicamente en la zona de elongación y diferenciación (Punto 6, Figura 19, 21).

Además, se observó que los PRs tienen una deformación con forma globosa (Sabatini *et al.*, 1999). Sin embargo los estudios reportados no se encuentran en condiciones de estrés de  $\text{Pb}^{2+}$ , con nuestros resultados sugiere que la toxicidad de  $\text{Pb}^{2+}$  tienen un efecto similar en la desorganización del meristemo.

Los tratamientos inoculados con *S. trueperi* a partir del día 6 DDT en las raíces se observó lignificación en los tejidos de la endodermis y haz vascular sugiriendo que la RP deja de crecer en esta etapa (Punto 5, Figura 21). *S. trueperi* a pesar de ser endófito con mayores mecanismos para poder colonizar el tejido vegetal de *A. thaliana* en medio adicionado con  $\text{Pb}^{2+}$  es incapaz de promover el crecimiento en

*A. thaliana* lo que sugiere que *S. trueperi* únicamente excluye el  $Pb^{2+}$  de la zona de contacto donde colonizo *S. trueperi* y el metal restante afecta el crecimiento RP.



**Figura 21.** Respuestas y mecanismos hipotéticos activados durante la interacción entre plantas y microorganismos en presencia de Pb.

A manera de resumen en el sistema *in vitro* planta-bacteria con las condiciones establecidas, la falta de promoción del crecimiento de *A. thaliana* con *S. trueperi* en presencia de  $Pb^{2+}$  podría ser que los mecanismos de *A. thaliana* Col-0 al tener inactivo HMA3 sea incapaz de expulsar los iones de  $Pb^{2+}$  en la concentración de  $800 \mu M Pb^{2+}$  por esta razón la inhibición de la RP es mayor, aunque al presencia de *Sphingomonas* sp. (por contacto y distancia) mejora la tolerancia a  $Pb^{2+}$  a bajas concentraciones, en concentraciones de  $700 \mu M Pb^{2+}$  es mayor la toxicidad, de esta manera *S. trueperi* en altas concentraciones de  $Pb^{2+}$  es incapaz de rescatar el crecimiento de la RP.

Otros efectos observados cuando hay ausencia de  $Pb^{2+}$  tienen mejor crecimiento. Sugiere que la concentración de  $800 \mu M Pb^{2+}$  es inadecuada para estudiar la promoción del crecimiento. Sin embargo, en altas concentraciones de  $Pb^{2+}$  se observaron cambios en el MAR diferentes a los observados a concentraciones bajas indicando que las respuestas podrían variar en cada barrido de concentraciones y el desempeño del aislado para la promoción del crecimiento no depende de manera directa con los MICs determinados sino de los mecanismos moleculares de la bacteria por lo que la cuantificación de MPs podría elucidar estos mecanismos además de los entender los mecanismos moleculares y vías de señalización que usan las rizobacterias.

## IX CONCLUSIONES

En total se aislaron 126 microorganismos resistentes a As, Hg y Pb de los jales mineros. De los cuales el 80% presento resistencia siendo la mayoría endófitas. El sistema *in vitro* planta-bacteria por contacto y distancia permitió seleccionar aquellos aislados capaces de modificar la ASR de *A. thaliana* en presencia de  $Pb^{2+}$ . Los aislados microbianos seleccionados para evaluación del desarrollo del SR en ausencia de  $Pb^{2+}$  mejoran el crecimiento y en presencia de  $Pb^{2+}$  muestran síntomas de toxicidad severos. Un barrido de concentraciones de  $Pb^{2+}$  permitió caracterizar el desarrollo del SR de una mejor manera con la bacteria *Sphingomonas trueperi* ampliando nuestro conocimiento en la respuesta general de  $Pb^{2+}$ . En ambos, en el sistema por contacto y distancia se observaron longitudes y numero de RLs similares. En la caracterización fisiológica del SR con el sistema *in vitro* por contacto en ausencia y presencia de  $Pb^{2+}$  mostraron respuestas diferentes y donde la acumulación de callosa se debe a una consecuencia de la toxicidad del  $Pb^{2+}$  que bloquea el transporte polar de IAA en consecuencia ocurre una desorganización en el MAR.

## X BIBLIOGRAFÍA

- ABOU-SHANAB, R., VAN BERKUM, P. y ANGLE, J. 2007. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere*, 68, 360-367.
- ARGÜELLO, J. M., GONZÁLEZ-GUERRERO, M. y RAIMUNDA, D. 2011. Bacterial transition metal P1B-ATPases: transport mechanism and roles in virulence. *Biochemistry*, 50, 9940-9949.
- ARIF, M. S., YASMEEN, T., SHAHZAD, S. M., RIAZ, M., RIZWAN, M., IQBAL, S., ASIF, M., SOLIMAN, M. H. y ALI, S. 2019. Lead toxicity induced phytotoxic effects on mung bean can be relegated by lead tolerant *Bacillus subtilis* (PbRB3). *Chemosphere*.
- ASARI, S., TARKOWSKÁ, D., ROLČÍK, J., NOVÁK, O., PALMERO, D. V., BEJAL, S. y MEIJER, J. 2017. Analysis of plant growth-promoting properties of *Bacillus amyloliquefaciens* UCMB5113 using *Arabidopsis thaliana* as host plant. *Planta*, 245, 15-30.
- AYDINALP, C. y MARINOVA, S. 2003. Distribution and Forms of Heavy Metals in Some Agricultural Soils. *Polish Journal of Environmental Studies*, 12.
- BADRI, D. V. y VIVANCO, J. M. 2009. Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell & Environment*, 32, 666-681.
- BAIS, H. P., WEIR, T. L., PERRY, L. G., GILROY, S. y VIVANCO, J. M. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 233-266.
- BALLY, R. y ELMERICH, C. 2007. Biocontrol of plant diseases by associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria. *Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations*. Springer.
- BANERJEE, S., WALDER, F., BÜCHI, L., MEYER, M., HELD, A. Y., GATTINGER, A., KELLER, T., CHARLES, R. y VAN DER HEIJDEN, M. G. 2019. Agricultural intensification reduces microbial network complexity and the abundance of keystone taxa in roots. *The ISME journal*, 1.
- BAUM, S. F., DUBROVSKY, J. G. y ROST, T. L. 2002. Apical organization and maturation of the cortex and vascular cylinder in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) roots. *American journal of botany*, 89, 908-920.
- BENKOVÁ, E. y HEJÁTKO, J. 2009. Hormone interactions at the root apical meristem. *Plant molecular biology*, 69, 383.
- BENNETT, T. y SCHERES, B. 2010. Root development—two meristems for the price of one? *Current topics in developmental biology*. Elsevier.
- BERLETH, T. y CHATFIELD, S. 2002. Embryogenesis: pattern formation from a single cell. *The Arabidopsis Book*, 7, 1-88.
- BRUINS, M. R., KAPIL, S. y OEHME, F. W. 2000. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 45, 198-207.
- CASTRO, R. O., GARCÍA, J. C. y BUCIO, J. L. 2013. Rapid Identification of Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria Using an Agar Plate Cocultivation System with *Arabidopsis*. *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere: Volume 1 & 2*, 345-353.

- CLAEYS, H., VAN LANDEGHEM, S., DUBOIS, M., MALEUX, K. y INZÉ, D. 2014. What is stress? Dose-response effects in commonly used in vitro stress assays. *Plant physiology*, pp. 113.234641.
- CLEMENS, S. 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, 212, 475-486.
- CONAGUA. 2018. Available: <https://www.gob.mx/conagua>. Fecha de consulta 22 de Agosto de 2018.
- CORDOVEZ, V., MOMMER, L., MOISAN, K., LUCAS-BARBOSA, D., PIERIK, R., MUMM, R., CARRION, V. J. y RAAIJMAKERS, J. M. 2017. Plant phenotypic and transcriptional changes induced by volatiles from the fungal root pathogen *Rhizoctonia solani*. *Frontiers in plant science*, 8, 1262.
- CURIE, C., CASSIN, G., COUCH, D., DIVOL, F., HIGUCHI, K., LE JEAN, M., MISSON, J., SCHIKORA, A., CZERNIC, P. y MARI, S. 2008. Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Annals of botany*, 103, 1-11.
- DE SMET, I., TETSUMURA, T., DE RYBEL, B., DIT FREY, N. F., LAPLAZE, L., CASIMIRO, I., SWARUP, R., NAUDTS, M., VANNESTE, S. y AUDENAERT, D. 2007. Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*. *Development*, 134, 681-690.
- DE WEERT, S., VERMEIREN, H., MULDER, I. H., KUIPER, I., HENDRICKX, N., BLOEMBERG, G. V., VANDERLEYDEN, J., DE MOT, R. y LUGTENBERG, B. J. 2002. Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15, 1173-1180.
- DELGADO-CABALLERO, M., VALLES-ARAGÓN, M., MILLAN, R. y ALARCÓN-HERRERA, M. 2018. Risk assessment through ieubk model in an inhabited area contaminated with lead. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 37, 391-398.
- DENG, Z., WANG, W., TAN, H. y CAO, L. 2012. Characterization of heavy metal-resistant endophytic yeast *Cryptococcus* sp. CBSB78 from rapeseed (*Brassica chinensis*) and its potential in promoting the growth of *Brassica* spp. in metal-contaminated soils. *Water, Air, & Soil Pollution*, 223, 5321-5329.
- DOLAN, L., JANMAAT, K., WILLEMSSEN, V., LINSTED, P., POETHIG, S., ROBERTS, K. y SCHERES, B. 1993. Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development*, 119, 71-84.
- EEVERS, N., GIELEN, M., SÁNCHEZ-LÓPEZ, A., JASPERS, S., WHITE, J., VANGRONSVELD, J. y WEYENS, N. 2015. Optimization of isolation and cultivation of bacterial endophytes through addition of plant extract to nutrient media. *Microbial biotechnology*, 8, 707-715.
- ERRO, J., ZAMARRENO, A. M., YVIN, J.-C. y GARCIA-MINA, J. M. 2009. Determination of organic acids in tissues and exudates of maize, lupin, and chickpea by high-performance liquid chromatography– tandem mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57, 4004-4010.
- ESSA, A. M., AL ABOUD, M. A. y KHATIB, S. I. 2018. Metal transformation as a strategy for bacterial detoxification of heavy metals. *Journal of basic microbiology*, 58, 17-29.

- EUN, S. O., SHIK YOUN, H. y LEE, Y. 2000. Lead disturbs microtubule organization in the root meristem of *Zea mays*. *Physiologia plantarum*, 110, 357-365.
- EZAKI, B., SUZUKI, M., MOTODA, H., KAWAMURA, M., NAKASHIMA, S. y MATSUMOTO, H. 2004. Mechanism of gene expression of *Arabidopsis* glutathione S-transferase, AtGST1, and AtGST11 in response to aluminum stress. *Plant physiology*, 134, 1672-1682.
- FINKELSTEIN, R. R., GAMPALA, S. S. y ROCK, C. D. 2002. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *The Plant Cell*, 14, S15-S45.
- FISCHER, S., KÜHNLENZ, T., THIEME, M., SCHMIDT, H. y CLEMENS, S. 2014. Analysis of plant Pb tolerance at realistic submicromolar concentrations demonstrates the role of phytochelatin synthesis for Pb detoxification. *Environmental science & technology*, 48, 7552-7559.
- FLEET, C. M. y SUN, T.-P. 2005. A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Current opinion in plant biology*, 8, 77-85.
- GADD, G. M. 1990. Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. *Experientia*, 46, 834-840.
- GADD, G. M. 2004. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma*, 122, 109-119.
- GADD, G. M. 2010. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*, 156, 609-643.
- GAGNÉ-BOURQUE, F., MAYER, B. F., CHARRON, J.-B., VALI, H., BERTRAND, A. y JABAJI, S. 2015. Accelerated growth rate and increased drought stress resilience of the model grass *Brachypodium distachyon* colonized by *Bacillus subtilis* B26. *PLoS One*, 10, e0130456.
- GALINHA, C., HOFHUIS, H., LUIJTEN, M., WILLEMSSEN, V., BLILOU, I., HEIDSTRA, R. y SCHERES, B. 2007. PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of *Arabidopsis* root development. *Nature*, 449, 1053.
- GALVAN-AMPUDIA, C. S., JULKOWSKA, M. M., DARWISH, E., GANDULLO, J., KORVER, R. A., BRUNOUD, G., HARING, M. A., MUNNIK, T., VERNOUX, T. y TESTERINK, C. 2013. Halotropism is a response of plant roots to avoid a saline environment. *Current Biology*, 23, 2044-2050.
- GAMALERO, E., LINGUA, G., GIUSY CAPRÌ, F., FUSCONI, A., BERTA, G. y LEMANCEAU, P. 2004. Colonization pattern of primary tomato roots by *Pseudomonas fluorescens* A6RI characterized by dilution plating, flow cytometry, fluorescence, confocal and scanning electron microscopy. *FEMS Microbiology Ecology*, 48, 79-87.
- GIFFORD, M. L., BANTA, J. A., KATARI, M. S., HULSMANS, J., CHEN, L., RISTOVA, D., TRANCHINA, D., PURUGGANAN, M. D., CORUZZI, G. M. y BIRNBAUM, K. D. 2013. Plasticity regulators modulate specific root traits in discrete nitrogen environments. *PLoS genetics*, 9, e1003760.
- GLICK, B. R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian journal of microbiology*, 41, 109-117.
- GLICK, B. R. 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012.



- GONG, J.-M., LEE, D. A. y SCHROEDER, J. I. 2003. Long-distance root-to-shoot transport of phytochelatins and cadmium in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 10118-10123.
- GRIENEISEN, V. A., XU, J., MARÉE, A. F., HOGEWEG, P. y SCHERES, B. 2007. Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature*, 449, 1008.
- GRUBER, B. D., GIEHL, R. F., FRIEDEL, S. y VON WIRÉN, N. 2013. Plasticity of the *Arabidopsis* root system under nutrient deficiencies. *Plant physiology*, 163, 161-179.
- GYANESHWAR, P., JAMES, E. K., MATHAN, N., REDDY, P. M., REINHOLD-HUREK, B. y LADHA, J. K. 2001. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *Journal of bacteriology*, 183, 2634-2645.
- HANEY, C. H., SAMUEL, B. S., BUSH, J. y AUSUBEL, F. M. 2015. Associations with rhizosphere bacteria can confer an adaptive advantage to plants. *Nature plants*, 1, 15051.
- HARRISON, J. J., TURNER, R. J. y CERI, H. 2005. Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 7, 981-994.
- HAYDON, M. J. y COBBETT, C. S. 2007. Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *New Phytologist*, 174, 499-506.
- HOLT, J. G., KRIEG, N., SNEATH, P. H., STALEY, J. y WILLIAMS, S. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th. *Baltimor: William & Wilkins*.
- HUSSAIN, D., HAYDON, M. J., WANG, Y., WONG, E., SHERSON, S. M., YOUNG, J., CAMAKARIS, J., HARPER, J. F. y COBBETT, C. S. 2004. P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*. *The plant cell*, 16, 1327-1339.
- IDRIS, R., TRIFONOVA, R., PUSCHENREITER, M., WENZEL, W. W. y SESSITSCH, A. 2004. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 2667-2677.
- ISKANDER, F. Y., VEGA-CARRILLO, H. R. y ACUNA, E. M. 1994. Determination of mercury and other elements in La Zacatecana Dam sediment in Mexico. *Science of the total environment*, 148, 45-48.
- JAISHANKAR, M., TSETEN, T., ANBALAGAN, N., MATHEW, B. B. y BEEREGOWDA, K. N. 2014. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary toxicology*, 7, 60-72.
- JÄRUP, L. 2003. Hazards of heavy metal contamination. *British medical bulletin*, 68, 167-182.
- JEBARA, S. H., ABDELKERIM, S., FATNASSI, I. C., CHIBOUB, M., SAADANI, O. y JEBARA, M. 2015. Identification of effective Pb resistant bacteria isolated from *Lens culinaris* growing in lead contaminated soils. *Journal of basic microbiology*, 55, 346-353.
- JIANG, C.-Y., SHENG, X.-F., QIAN, M. y WANG, Q.-Y. 2008. Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant

- growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. *Chemosphere*, 72, 157-164.
- KAEWDOUNG, B., SUTJARITVORAKUL, T., GADD, G. M., WHALLEY, A. J. y SIHANONTH, P. 2016. Heavy metal tolerance and biotransformation of toxic metal compounds by new isolates of wood-rotting fungi from Thailand. *Geomicrobiology Journal*, 33, 283-288.
- KHAN, M. y SCULLION, J. 2002. Effects of metal (Cd, Cu, Ni, Pb or Zn) enrichment of sewage-sludge on soil micro-organisms and their activities. *Applied Soil Ecology*, 20, 145-155.
- KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 16, 111-120.
- KLOEPPER, J. y SCHROTH, M. 1981. Relationship of in vitro antibiosis of plant growth-promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. *Phytopathology*, 71, 1020-1024.
- KOHLI, S. K., HANDA, N., SHARMA, A., GAUTAM, V., ARORA, S., BHARDWAJ, R., ALYEMENI, M. N., WIJAYA, L. y AHMAD, P. 2018. Combined effect of 24-epibrassinolide and salicylic acid mitigates lead (Pb) toxicity by modulating various metabolites in *Brassica juncea* L. seedlings. *Protoplasma*, 255, 11-24.
- KONG, D., HAO, Y. y CUI, H. 2016. The WUSCHEL related homeobox protein WOX7 regulates the sugar response of lateral root development in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant*, 9, 261-270.
- KOSUGI, S., OHASHI, Y., NAKAJIMA, K. y ARAI, Y. 1990. An improved assay for  $\beta$ -glucuronidase in transformed cells: methanol almost completely suppresses a putative endogenous  $\beta$ -glucuronidase activity. *Plant Science*, 70, 133-140.
- KUFFNER, M., DE MARIA, S., PUSCHENREITER, M., FALLMANN, K., WIESHAMMER, G., GORFER, M., STRAUSS, J., RIVELLI, A. y SESSITSCH, A. 2010. Culturable bacteria from Zn-and Cd-accumulating *Salix caprea* with differential effects on plant growth and heavy metal availability. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 1471-1484.
- KUMAR, R., BHATIA, R., KUKREJA, K., BEHL, R. K., DUDEJA, S. S. y NARULA, N. 2007. Establishment of *Azotobacter* on plant roots: chemotactic response, development and analysis of root exudates of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Basic Microbiology*, 47, 436-439.
- LANE, D. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, 115-175.
- LAPLAZE, L., BENKOVA, E., CASIMIRO, I., MAES, L., VANNESTE, S., SWARUP, R., WEIJERS, D., CALVO, V., PARIZOT, B. y HERRERA-RODRIGUEZ, M. B. 2007. Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *The Plant Cell*, 19, 3889-3900.
- LEE, M., LEE, K., LEE, J., NOH, E. W. y LEE, Y. 2005. AtPDR12 contributes to lead resistance in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 138, 827-836.

- LI, X., MO, X., SHOU, H. y WU, P. 2006. Cytokinin-mediated cell cycling arrest of pericycle founder cells in lateral root initiation of *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 47, 1112-1123.
- LINDOW, S. E. y BRANDL, M. T. 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 1875-1883.
- LÓPEZ-BUCIO, J., CAMPOS-CUEVAS, J. C., HERNÁNDEZ-CALDERÓN, E., VELÁSQUEZ-BECERRA, C., FARÍAS-RODRÍGUEZ, R., MACÍAS-RODRÍGUEZ, L. I. y VALENCIA-CANTERO, E. 2007. *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin-and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20, 207-217.
- LÓPEZ-BUCIO, J., HERNÁNDEZ-ABREU, E., SÁNCHEZ-CALDERÓN, L., NIETO-JACOBO, M. F., SIMPSON, J. y HERRERA-ESTRELLA, L. 2002. Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant physiology*, 129, 244-256.
- LYNCH, J. 1995. Root architecture and plant productivity. *Plant physiology*, 109, 7.
- LYNCH, J. y BROWN, K. 1998. Regulation of root architecture by phosphorus availability. *Current Topics in Plant Physiology*, 19, 148-156.
- LYNCH, J. P. y BROWN, K. M. 2001. Topsoil foraging—an architectural adaptation of plants to low phosphorus availability. *Plant and Soil*, 237, 225-237.
- MACFARLANE, G. y BURCHETT, M. 2002. Toxicity, growth and accumulation relationships of copper, lead and zinc in the grey mangrove *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Marine Environmental Research*, 54, 65-84.
- MAHBUB, K. R., KRISHNAN, K., NAIDU, R. y MEGHARAJ, M. 2017. Mercury remediation potential of a mercury resistant strain *Sphingopyxis* sp. SE2 isolated from contaminated soil. *Journal of Environmental Sciences*, 51, 128-137.
- MAJUMDER, A., BHATTACHARYYA, K., BHATTACHARYYA, S. y KOLE, S. 2013. Arsenic-tolerant, arsenite-oxidising bacterial strains in the contaminated soils of West Bengal, India. *Science of the total environment*, 463, 1006-1014.
- MALAMY, J. 2005. Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant, cell & environment*, 28, 67-77.
- MALAMY, J. E. y BENFEY, P. N. 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 124, 33-44.
- MARK, G. L., DOW, J. M., KIELY, P. D., HIGGINS, H., HAYNES, J., BAYSSE, C., ABBAS, A., FOLEY, T., FRANKS, A. y MORRISSEY, J. 2005. Transcriptome profiling of bacterial responses to root exudates identifies genes involved in microbe-plant interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 17454-17459.
- MCLAUGHLIN, M. J., ZARCINAS, B., STEVENS, D. y COOK, N. 2000. Soil testing for heavy metals. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 31, 1661-1700.
- MENDOZA-CÓZATL, D. G., ZHAI, Z., JOBE, T. O., AKMAKJIAN, G. Z., SONG, W.-Y., LIMBO, O., RUSSELL, M. R., KOZLOVSKYY, V. I., MARTINOIA, E. y VATAMANIUK, O. K. 2010. *Schizosaccharomyces pombe* Abc2

- transporter mediates phytochelatin accumulation in vacuoles and confers cadmium tolerance. *Journal of Biological Chemistry*, jbc. M110. 155408.
- MEZA-FIGUEROA, D., GONZÁLEZ-GRIJALVA, B., ROMERO, F., RUIZ, J., PEDROZA-MONTERO, M., RIVERO, C., ACOSTA-ELÍAS, M., OCHOA-LANDIN, L. y NAVARRO-ESPINOZA, S. 2018. Source apportionment and environmental fate of lead chromates in atmospheric dust in arid environments. *The Science of the total environment*, 630, 1596-1607.
- MISHRA, J., SINGH, R. y ARORA, N. K. 2017. Alleviation of heavy metal stress in plants and remediation of soil by rhizosphere microorganisms. *Frontiers in microbiology*, 8, 1706.
- MOKHTARNEJAD, L., ARZANLOU, M., BABAI-AHARI, A., DI MAURO, S., ONOFRI, A., BUZZINI, P. y TURCHETTI, B. 2016. Characterization of basidiomycetous yeasts in hypersaline soils of the Urmia Lake National Park, Iran. *Extremophiles*, 20, 915-928.
- MONTALBÁN, B., CROES, S., WEYENS, N., LOBO, M. C., PÉREZ-SANZ, A. y VANGRONSVELD, J. 2016. Characterization of bacterial communities associated with *Brassica napus* L. growing on a Zn-contaminated soil and their effects on root growth. *International journal of phytoremediation*, 18, 985-993.
- MORAIS, S., E COSTA, F. G. y DE LOURDES PEREIRA, M. 2012. Heavy metals and human health. *Environmental Health-Emerging Issues and Practice*. InTech.
- MOREL, M., CROUZET, J., GRAVOT, A., AUROY, P., LEONHARDT, N., VAVASSEUR, A. y RICHAUD, P. 2009. AtHMA3, a P1B-ATPase allowing Cd/Zn/co/Pb vacuolar storage in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 149, 894-904.
- MOUCHEL, C. F., OSMONT, K. S. y HARDTKE, C. S. 2006. BRX mediates feedback between brassinosteroid levels and auxin signalling in root growth. *Nature*, 443, 458.
- MÜLLER, J., TOEV, T., HEISTERS, M., TELLER, J., MOORE, K. L., HAUSE, G., DINESH, D. C., BÜRSTENBINDER, K. y ABEL, S. 2015. Iron-dependent callose deposition adjusts root meristem maintenance to phosphate availability. *Developmental cell*, 33, 216-230.
- MURASHIGE, T. y SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15, 473-497.
- NABTI, E., SCHMID, M. y HARTMANN, A. 2015. Application of halotolerant bacteria to restore plant growth under salt stress. *Halophiles*. Springer.
- NAIK, M. M. y DUBEY, S. K. 2011. Lead-enhanced siderophore production and alteration in cell morphology in a Pb-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain 4EA. *Current microbiology*, 62, 409-414.
- NEAL, A. L., AHMAD, S., GORDON-WEEKS, R. y TON, J. 2012. Benzoxazinoids in root exudates of maize attract *Pseudomonas putida* to the rhizosphere. *PloS one*, 7, e35498.
- NIETO, J., VENTOSA, A. y RUIZ-BERRAQUERO, F. 1987. Susceptibility of halobacteria to heavy metals. *Applied and environmental microbiology*, 53, 1199-1202.

- NIGG, J. T., NIKOLAS, M., MARK KNOTTNERUS, G., CAVANAGH, K. y FRIDERICI, K. 2010. Confirmation and extension of association of blood lead with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) and ADHD symptom domains at population-typical exposure levels. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 51, 58-65.
- NOTREDAME, C., HIGGINS, D. G. y HERINGA, J. 2000. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of molecular biology*, 302, 205-217.
- ORTEGA-MARTÍNEZ, O., PERNAS, M., CAROL, R. J. y DOLAN, L. 2007. Ethylene modulates stem cell division in the *Arabidopsis thaliana* root. *Science*, 317, 507-510.
- ORTIZ-CASTRO, R., DÍAZ-PÉREZ, C., MARTÍNEZ-TRUJILLO, M., ROSA, E., CAMPOS-GARCÍA, J. y LÓPEZ-BUCIO, J. 2011. Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 7253-7258.
- PALACIO-RODRÍGUEZ, R., CORIA-ARELLANO, J. L., LÓPEZ-BUCIO, J., SÁNCHEZ-SALAS, J., MURO-PÉREZ, G., CASTAÑEDA-GAYTÁN, G. y SÁENZ-MATA, J. 2017. Halophilic rhizobacteria from *Distichlis spicata* promote growth and improve salt tolerance in heterologous plant hosts. *Symbiosis*, 73, 179-189.
- PÉRET, B., DE RYBEL, B., CASIMIRO, I., BENKOVÁ, E., SWARUP, R., LAPLAZE, L., BEECKMAN, T. y BENNETT, M. J. 2009. *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends in plant science*, 14, 399-408.
- PÉREZ-FLORES, P., VALENCIA-CANTERO, E., ALTAMIRANO-HERNÁNDEZ, J., PELAGIO-FLORES, R., LÓPEZ-BUCIO, J., GARCÍA-JUÁREZ, P. y MACÍAS-RODRÍGUEZ, L. 2017. *Bacillus methylotrophicus* M4-96 isolated from maize (*Zea mays*) rhizoplane increases growth and auxin content in *Arabidopsis thaliana* via emission of volatiles. *Protoplasma*, 254, 2201-2213.
- PÉREZ-GARCÍA, A., ROMERO, D. y DE VICENTE, A. 2011. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology*, 22, 187-193.
- PHANG, C., LEUNG, D. W., TAYLOR, H. H. y BURRITT, D. J. 2011. Correlation of growth inhibition with accumulation of Pb in cell wall and changes in response to oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant growth regulation*, 64, 17-25.
- PIETERSE, C. M., VAN DER DOES, D., ZAMIOUDIS, C., LEON-REYES, A. y VAN WEES, S. C. 2012. Hormonal modulation of plant immunity. *Annual review of cell and developmental biology*, 28, 489-521.
- POURRUT, B., SHAHID, M., DUMAT, C., WINTERTON, P. y PINELLI, E. 2011. Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 213*. Springer.
- REMANS, T., THIJS, S., TRUYENS, S., WEYENS, N., SCHELLINGEN, K., KEUNEN, E., GIELEN, H., CUYPERS, A. y VANGRONSVELD, J. 2012. Understanding the development of roots exposed to contaminants and the potential of plant-associated bacteria for optimization of growth. *Annals of botany*, 110, 239-252.

- RIVERA-MENCHACA, R. 2017. Estructura y composición de la vegetación de un predio contaminado con metales pesados de Zacatecas. Tesis de Biólogo, Universidad Autónoma de Zacatecas.
- ROANE, T. 1999. Lead resistance in two bacterial isolates from heavy metal-contaminated soils. *Microbial ecology*, 37, 218-224.
- ROMANIUK, K., CIOK, A., DECEWICZ, P., UHRYNOWSKI, W., BUDZIK, K., NIECKARZ, M., PAWLOWSKA, J., ZDANOWSKI, M. K., BARTOSIK, D. y DZIEWIT, L. 2018. Insight into heavy metal resistome of soil psychrotolerant bacteria originating from King George Island (Antarctica). *Polar Biology*, 1-15.
- RUDRAPPA, T., CZYMMEK, K. J., PARÉ, P. W. y BAIS, H. P. 2008. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant physiology*, 148, 1547-1556.
- SABATINI, S., BEIS, D., WOLKENFELT, H., MURFETT, J., GUILFOYLE, T., MALAMY, J., BENFEY, P., LEYSER, O., BECHTOLD, N. y WEISBEEK, P. 1999. An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell*, 99, 463-472.
- SABATINI, S., HEIDSTRA, R., WILDWATER, M. y SCHERES, B. 2003. SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem. *Genes & development*, 17, 354-358.
- SALAS-LUEVANO, M., MANZANARES-ACUÑA, E., LETECHIPÍA-DE LEÓN, C. y VEGA-CARRILLO, H. 2009. Tolerant and hyperaccumulators autochthonous plant species from mine tailing disposal sites. *Asian Journal of Experimental Sciences*, 23, 27-32.
- SALAS-LUEVANO, M. A., MANZANARES-ACUNA, E., LETECHIPIA-DE LEON, C., HERNANDEZ-DAVILA, V. M. y VEGA-CARRILLO, H. R. 2011. Lead concentration in soil from an old mining town. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 289, 35-39.
- SÁNCHEZ-CALDERÓN, L., IBARRA-CORTÉS, M. y ZEPEDA-JAZO, I. 2013. Root development and abiotic stress adaptation. *Abiotic Stress-Plant Responses and Applications in Agriculture*. InTech.
- SANGER, F., NICKLEN, S. y COULSON, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74, 5463-5467.
- SANTNER, A. y ESTELLE, M. 2009. Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature*, 459, 1071.
- SARKAR, A. K., LUIJTEN, M., MIYASHIMA, S., LENHARD, M., HASHIMOTO, T., NAKAJIMA, K., SCHERES, B., HEIDSTRA, R. y LAUX, T. 2007. Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature*, 446, 811.
- SCHERES, B., DI LAURENZIO, L., WILLEMSSEN, V., HAUSER, M.-T., JANMAAT, K., WEISBEEK, P. y BENFEY, P. N. 1995. Mutations affecting the radial organisation of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development*, 121, 53-62.
- SCHERES, B., WOLKENFELT, H., WILLEMSSEN, V., TERLOUW, M., LAWSON, E., DEAN, C. y WEISBEEK, P. 1994. Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials. *Development*, 120, 2475-2487.

- SCHIPPER, L. A., SPARLING, G. P., FISK, L., DODD, M., POWER, I. y LITTLER, R. A. 2011. Rates of accumulation of cadmium and uranium in a New Zealand hill farm soil as a result of long-term use of phosphate fertilizer. *Agriculture, ecosystems & environment*, 144, 95-101.
- SESSITSCH, A., WEILHARTER, A., GERZABEK, M. H., KIRCHMANN, H. y KANDELER, E. 2001. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 4215-4224.
- SHARMA, J., SHAMIM, K., DUBEY, S. K. y MEENA, R. M. 2017. Metallothionein assisted periplasmic lead sequestration as lead sulfite by *Providencia vermicola* strain SJ2A. *Science of the Total Environment*, 579, 359-365.
- SHARMA, S., KULKARNI, J. y JHA, B. 2016. Halotolerant rhizobacteria promote growth and enhance salinity tolerance in peanut. *Frontiers in microbiology*, 7, 1600.
- SHARMA, S. S. y DIETZ, K.-J. 2006. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of experimental botany*, 57, 711-726.
- SHARMA, S. S. y DIETZ, K.-J. 2009. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in plant science*, 14, 43-50.
- SHENG, X.-F., XIA, J.-J., JIANG, C.-Y., HE, L.-Y. y QIAN, M. 2008. Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. *Environmental pollution*, 156, 1164-1170.
- SHISHKOVA, S., LAS PEÑAS, M. L., NAPSUCIALY-MENDIVIL, S., MATVIENKO, M., KOZIK, A., MONTIEL, J., PATIÑO, A. y DUBROVSKY, J. G. 2013. Determinate primary root growth as an adaptation to aridity in Cactaceae: towards an understanding of the evolution and genetic control of the trait. *Annals of botany*, 112, 239-252.
- SZALÓKI, I., BRAUN, M. y VAN GRIEKEN, R. 2000. Quantitative characterisation of the leaching of lead and other elements from glazed surfaces of historical ceramics. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 15, 843-850.
- SZCZYGLÓWSKA, M., PIEKARSKA, A., KONIECZKA, P. y NAMIEŚNIK, J. 2011. Use of brassica plants in the phytoremediation and biofumigation processes. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 7760-7771.
- TAGHAVI, S., LESAULNIER, C., MONCHY, S., WATTIEZ, R., MERGEAY, M. y VAN DER LELIE, D. 2009. Lead (II) resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34: interplay between plasmid and chromosomally-located functions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 96, 171.
- TALKE, I. N., HANIKENNE, M. y KRÄMER, U. 2006. Zinc-dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation, and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant physiology*, 142, 148-167.
- TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A. y KUMAR, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30, 2725-2729.
- TIWARI, S., PRASAD, V., CHAUHAN, P. S. y LATA, C. 2017. *Bacillus amyloliquefaciens* confers tolerance to various abiotic stresses and

- modulates plant response to phytohormones through osmoprotection and gene expression regulation in rice. *Frontiers in plant science*, 8, 1510.
- TREVORS, J., ODDIE, K. y BELLIVEAU, B. 1985. Metal resistance in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 1, 39-54.
- UBEDA-TOMÁS, S., SWARUP, R., COATES, J., SWARUP, K., LAPLAZE, L., BEEMSTER, G. T., HEDDEN, P., BHALERAO, R. y BENNETT, M. J. 2008. Root growth in *Arabidopsis* requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis. *Nature cell biology*, 10, 625.
- ULMASOV, T., MURFETT, J., HAGEN, G. y GUILFOYLE, T. J. 1997. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *The Plant Cell*, 9, 1963-1971.
- VAN DEN BERG, C., WILLEMSSEN, V., HENDRIKS, G., WEISBEEK, P. y SCHERES, B. 1997. Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature*, 390, 287.
- VAN DER HEGGEN, M., MARTINS, S., FLORES, G. y SOARES, E. V. 2010. Lead toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 88, 1355-1361.
- VAN LOON, L. C. y GLICK, B. R. 2004. Increased plant fitness by rhizobacteria. *Molecular ecotoxicology of plants*. Springer.
- VERBON, E. H. y LIBERMAN, L. M. 2016. Beneficial microbes affect endogenous mechanisms controlling root development. *Trends in plant science*, 21, 218-229.
- VIEHWEGER, K. 2014. How plants cope with heavy metals. *Botanical Studies*, 55, 35.
- WALKER, V., BERTRAND, C., BELLVERT, F., MOËNNE-LOCCOZ, Y., BALLY, R. y COMTE, G. 2011. Host plant secondary metabolite profiling shows a complex, strain-dependent response of maize to plant growth-promoting rhizobacteria of the genus *Azospirillum*. *New Phytologist*, 189, 494-506.
- WANG, R., WANG, J., ZHAO, L., YANG, S. y SONG, Y. 2015. Impact of heavy metal stresses on the growth and auxin homeostasis of *Arabidopsis* seedlings. *Biometals*, 28, 123-132.
- WERNER, T., MOTYKA, V., LAUCOU, V., SMETS, R., VAN ONCKELEN, H. y SCHMÜLLING, T. 2003. Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *The Plant Cell*, 15, 2532-2550.
- WONG, C. K. E. y COBBETT, C. S. 2009. HMA P-type ATPases are the major mechanism for root-to-shoot Cd translocation in *Arabidopsis thaliana*. *New phytologist*, 181, 71-78.
- XIAO, C., YAN, H., WANG, J., WEI, W., NING, J. y PAN, G. 2011. Microcystin-LR biodegradation by *Sphingopyxis* sp. USTB-05. *Frontiers of Environmental Science & Engineering in China*, 5, 526-532.
- YAN, Z. Z., KE, L. y TAM, N. F. Y. 2010. Lead stress in seedlings of *Avicennia marina*, a common mangrove species in South China, with and without cotyledons. *Aquatic Botany*, 92, 112-118.



- YANG, Y.-Y., JUNG, J.-Y., SONG, W.-Y., SUH, H.-S. y LEE, Y. 2000. Identification of rice varieties with high tolerance or sensitivity to lead and characterization of the mechanism of tolerance. *Plant Physiology*, 124, 1019-1026.
- YURKOV, A., KEMLER, M. y BEGEROW, D. 2012. Assessment of yeast diversity in soils under different management regimes. *fungus ecology*, 5, 24-35.
- ZAMIOUDIS, C., MASTRANESTI, P., DHONUKSHE, P., BLILOU, I. y PIETERSE, C. M. 2013. Unraveling root developmental programs initiated by beneficial *Pseudomonas* bacteria. *Plant physiology*, pp. 112.212597.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## XI ANEXOS

### Índice

Anexo I.....	97
Anexo II.....	98
Anexo III.....	99
Anexo IV.....	100
Anexo V.....	101
Anexo VI.....	102
Anexo VII.....	104
Anexo VIII.....	106
Anexo IX.....	107
Anexo X.....	110
Anexo XI.....	111
Anexo XII.....	112
Anexo XIII.....	113
Anexo XIV.....	113
Anexo XV.....	113
Anexo XVI.....	114
Anexo XVII.....	115

**Anexo I. Concentraciones de metales pesados usadas frecuentemente para evaluar la resistencia de los microorganismos.**

Concentraciones de metales pesados usadas frecuentemente para evaluar la resistencia de los microorganismos.		
<b>As</b>	20mM	Abou-Shanab et al. 2007.
	20 mM	Nieto et al. 1987.
	12 mM	Trevors et al. 1985.
	10 mM	Romaniuk et al. 2018.
<b>Hg</b>	2 mM	Ashraf et al. 2017.
	0.1 mM	Abou-Shanab et al. 2007.
	0.1 mM	Romaniuk et al. 2018.
	0.05 mM	Nieto et al. 1987.
	0.01 mM	Trevors et al. 1985.
<b>Pb</b>	20 mM	Ashraf et al. 2017.
	20 mM	Nieto et al. 1987.
	15 mM	Abou-Shanab et al. 2007.

## Anexo II.- Caracterización de los microorganismos aislados de suelo.

Caracterización de los microorganismos aislados de suelo.

Aislado	Color	Elevación	Margen	Forma	Tinción gram	Microscopía
MS 1-1	Crema	Convexa	Redondeado	Irregular	Negativa	Cocobacilos
MS 1-2	Blanco	Acuminada	Filamentoso	Filamentosa	Positiva	Streptobacilos
MS 2-1	Cristalino	Plana	Redondeado	Irregular	Negativa	Cocos
MS 2-3	Blanco	Convexa	Redondeado	Circular	Negativa	Streptobacilos
MS 2-4	Crema	Convexa	Redondeado	Circular	Positiva	Bacilos
MS 2-6	Crema	Convexa	Redondeado	Circular	Negativa	Streptobacilos
MS 3-1	Blanco	Planoconvexa	Ondulado	Irregular	Positiva	Streptobacilos
MS 3-3	Crema	Convexa	Redondeado	Circular	Positiva	Bacilos
MS 3-4	Crema	Convexa	Ondulado	Irregular	Positiva	Diplobacilos
MS 3-5	Cristalino	Acuminada	Ondulado	Irregular	Negativa	Bacilos
MS 3-6	Blanco	Papilada	Ondulado	Irregular	Negativa	Bacilos
MS 3-7	Blanco	Convexa	Redondeado	Circular	Negativa	Cocobacilos
MS 3-8	Blanco	Plana	Filamentosa	Irregular	Positiva	Streptobacilos
MS 3-9	Crema	Convexa	Filamentosa	Circular	Negativa	Diplococos
MS 3-10	Crema	Plana	Ondulado	Irregular	Negativa	Bacilos
MS 3-11	Blanco	Convexa	Filamentosa	Circular	Negativa	Cocobacilos
MS 3-12	Blanco	Convexa	Redondeado	Circular	Negativa	Streptobacilos
MS 3-13	Blanco	Planoconvexa	Lobulada	Circular	Positiva	Cocobacilos
MS 3-14	Blanco	Convexa	Redondeado	Circular	Positiva	Cocobacilos

### Anexo III.- Caracterización de los microorganismos aislados de filósfera.

Caracterización de los microorganismos aislados de filósfera.

Aislado	Color	Elevación	Margen	Forma	Tinción gram	Microscopía
MF 1-1	Beige	Convexa	Redondeado	Circular	Negativa	Diplococos encapsulados
MF 1-3	Amarillo	Convexa	Redondeado	Circular	Negativa	Bacilos
MF 1-4	Amarillo	Convexa	Redondeado	Circular	Negativa	Cocobacilos
MF 2-2	Cristalino	Convexa	Redondeado	Circular	Negativa	Diplobacilos
MF 2-3	Amarillo	Convexa	Redondeado	Circular	Negativa	Cocobacilos
MF 2-4	Blanco	Convexa	Redondeado	Circular	Positiva	Diplobacilos
MF 2-5	Amarillo	Acuminada	Redondeado	Circular	Negativa	Bacilos
MF 2-6	Rosa	Convexa	Redondeado	Circular	Negativa	Cocobacilos
MF 2-7	Blanco	Acuminada	Redondeado	Circular	Positiva	Cocobacilos
MF 2-8	Rosa	Acuminada	Redondeado	Circular	Negativa	Cocobacilos
MF 3-1	Amarillo intenso	Convexa	Redondeado	Circular	Negativa	Cocobacilos
MF 3-2	Amarillo intenso	Acuminada	Redondeado	Circular	Negativa	Bacilos
MF 3-3	Blanco	Planoconvexa	Ondulado	Irregular	Positiva	Bacilos
MF 3-4	Cristalino	Convexa	Redondeado	Circular	Negativa	Cocobacilos
MF 3-5	Crema	Papilada	Ondulado	Irregular	Negativa	Vibrio
MF 3-6	Crema	Convexa	Redondeado	Circular	Negativa	Cocobacilos
MF 3-7	Blanco	Convexa	Ondulado	Circular	Negativa	Diplococos
MF 3-8	Amarillo	Acuminada	Redondeado	Puntiforme	Negativa	Cocobacilos
MF 3-9	Rosa palido	Convexa	Redondeado	Circular	Negativa	Streptococos
MF 3-10	Crema	Acuminada	Ondulado	Irregular	Negativa	Cocobacilos
MF 3-11	Crema	Convexa	Redondeado	Circular	Negativa	Cocobacilos
MF 3-12	Amarillo	Convexa	Redondeado	Circular	Negativa	Bacilos

#### Anexo IV.- Caracterización de los microorganismos aislados de endosfera.

Caracterización de los microorganismos aislados de endosfera.						
Aislado	Color	Elevación	Margen	Forma	Tinción gram	Microscopía
MT 1-1	Crema	Convexa	Ondulado	Circular	Negativa	Estreptococo
MT 1-2	Blanco	Papilada	Filamentoso	Rizoide	Positiva	Bacilo
MT 1-3	Crema	Convexa	Ondulado	Circular	Positiva	Estreptococo
MT 1-4	Crema	Convexa	Redondeado	Circular	Positiva	Bacilo
MT 1-5	Crema	Convexa	Rizoide	Circular	Positiva	Bacilo
MT 2-1	Cristalino	Convexa	Ondulado	Irregular	Positiva	Levadura
MT 2-2	Cristalino	Planoconvexa	Ondulado	Irregular	Negativa	Bacilos
MT 2-3	Crema	Convexa	Ondulado	Circular	Positiva	Levadura
MT 2-4	Crema	Papilada	Filamentoso	Filamentosa	Positiva	Levadura
MT 3-1	Crema	Convexa	Ondulado	Circular	Negativa	Estreptococo
MT 3-2	Cristalino	Convexa	Ondulado	Circular	Negativa	Cocobacilos
MR 1-1	Crema/a marillo	Convexa	Redondeado	Circular	Negativa	Bacilo
MR 2-2	Crema	Convexa	Ondulado	Circular	Positiva	Levadura
MR 2-3	Blanco	Papilada	Ondulado	Irregular	Negativa	Cocobacilos
MR 2-4	Blanco	Convexa	Redondeado	Circular	Positiva	Levadura
MR 2-9	Crema	Convexa	Redondeado	Circular	Positiva	Levadura
MR 3-1	Crema/a marillo	Convexa	Ondulado	Circular	Negativa	Bacilo
MR 3-2	Crema	Convexa	Ondulado	Circular	Negativa	Estreptococo
MR 3-3	Cristalino	Convexa	Redondeado	Circular	Negativa	Bacilos
MR 3-4	Crema	Convexa	Ondulado	Circular	Negativa	Estreptococo
MR 3-5	Amarillo	Convexa	Ondulado	Circular	Negativa	Estreptococo
MR 3-6	Crema amarillo	Planoconvexa	Rizoide	Circular	Negativa	Bacilo
MR 3-7	Crema amarillo	Convexa	Redondeado	Circular	Negativa	Fusobacteriu m
MR 3-8	Blanco	Convexa	Redondeado	Circular	Negativa	Bacilos
MR 3-9	Crema amarillent o	Planoconvexa	Redondeado	Circular	Negativa	Estreptococo
MR 3-10	Crema amarillent o	Convexa	Ondulado	Circular	Negativa	Bacilo
MR 3-14	Amarillo	Convexa	Ondulado	Circular	Negativa	Bacilo
MR 3-15	Cristalino	Convexa	Redondeado	Circular		
MR 3-16	Blanco	Acuminado	Redondeado	Circular	Positiva	Cocos

## Anexo V.- Caracterización de los microorganismos aislados de rizosfera.

Caracterización de los microorganismos aislados de rizósfera.

Aislado	Color	Elevación	Margen	Forma	Tinción gram	Microscopía
MZ 1-1	Crema	Papilada	Redondeado	Circular	Negativa	Cocobacilos
MZ 1-2	Blanco	Convexa	Redondeado	Circular	Negativa	Bacilos
MZ 1-3 (1)	Amarillo	Convexa	Ondulado	Irregular	Positiva	Streptococos
MZ 1-3 (2)	Blanco	Convexa	Filamentosa	Irregular	Negativa	Streptobacilos
MZ 2-1	Crema	Convexa	Redondeado	Irregular	Negativa	Bacilos
MZ 2-2	Blanco	Planoconvexa	Ondulado	Irregular	Negativa	Bacilos
MZ 2-3	Blanco	Convexa	Redondeado	Irregular	Negativa	Streptococos
MZ 2-4	Blanco	Planoconvexa	Ondulado	Circular	Negativa	Bacilos
MZ 2-5	Crema	Convexa	Redondeado	Irregular	Negativa	Bacilos
MZ 3-2	Blanco	Plano	Ondulado	Irregular	Negativa	Bacilos
MZ 3-3	Cristalino/a marillo	Convexa	Redondeado	Irregular	Negativa	Bacilos
MZ 3-4	Blanco/ cristalino	Plano	Ondulado	Irregular	Negativa	Streptococos
MZ 3-5	Cristalino	Acuminada	Redondeado	Circular	Negativa	Bacilos
MZ 3-8	Amarillo	Acuminada	Redondeado	Circular	Negativa	Bacilos
MZ 3-9	Blanco/ cristalino	Acuminada	Ondulado	Irregular	Negativa	Cocos
MZ 3-10	Blanco/ cristalino	Plano	Ondulado	Irregular	Negativa	Streptococos
MZ 3-11	Cristalino	Acuminada	Ondulado	Irregular	Negativa	Diplococos
MZ 3-12	Amarillo	Convexa	Ondulado	Irregular	Negativa	Streptococos
MZ 3-13	Amarillo	Acuminada	Redondeado	Circular	Negativa	Streptococos
MZ 3-14	Blanco	Convexa	Redondeado	Circular	Negativa	Cocobacilos
MZ 3-15	Cristalino	Plano	Lobulada	Irregular	Negativa	Bacilos
MZ 3-16	Blanco/ cristalino	Acuminada	Ondulado	Irregular	Negativa	Bacilos
MZ 3-17	Crema	Convexa	Filamentoso	Filamentosa	Negativa	Cocobacilos
MZ 3-19	Blanco	Convexa	Redondeado	Circular	Negativa	Streptococos
MZ 3-20	Crema	Convexa	Redondeado	Circular	Negativa	Streptococos
MZ 3-21	Blanco	Convexa	Ondulado	Irregular	Negativa	Diplococos
MZ 3-22	Amarillo	Acuminada	Redondeado	Circular	Negativa	Streptococos
MZ 3-23	Cristalino	Plana	Filamentoso	Filamentosa	Negativa	Streptococos
MZ 3-24	Amarillo	Convexa	Lobulada	Circular	Negativa	Bacilos
MZ 3-25	Crema	Planoconvexa	Lobulada	Circular	Negativa	Bacilos
MZ 3-26	Blanco	Convexa	Redondeado	Circular	Negativa	Bacilos
MZ 3-27	Amarillo	Convexa	Redondeado	Irregular	Negativa	Streptobacilo
MZ 3-28	Blanco	Convexa	Redondeado	Circular	Negativa	Bacilos
MZ 3-29	Blanco	Convexa	Redondeado	Circular	Negativa	Bacilos
MZ 3-30	Blanco	Convexa	Redondeado	Irregular	Negativa	Bacilos
MZ 3-31	Cristalino	Convexa	Redondeado	Circular	Negativa	Cocobacilos
MZ 3-32	Blanco	Convexa	Redondeado	Circular	Negativa	Cocobacilos
MZ 3-33	Blanco	Convexa	Redondeado	Circular	Negativa	Bacilos

## Anexo VI.- Microorganismos aislados de suelo probados en As, Hg y Pb.

Microorganismos aislados de suelo probados en As, Hg y Pb.

Aislado	As 18 mM	Hg 2.5 mM	Pb 3 mM
MS 1-1	1	1	1
MS 1-2	1	1	1
MS 2-1	1	1	1
MS 2-2	1	1	1
MS 2-3	0	1	1
MS 2-4	1	1	1
MS 2-5	1	1	1
MS 2-6	1	1	1
MS 3-1	1	1	1
MS 3-2	1	1	1
MS 3-3	1	1	1
MS 3-4	1	1	1
MS 3-5	1	1	1
MS 3-6	1	1	1
MS 3-7	1	1	1
MS 3-8	1	1	1
MS 3-9	1	1	1
MS 3-10	1	1	1
MS 3-11	0	1	1
MS 3-12	1	1	1
MS 3-13	1	1	1
MS 3-14	1	1	1

Microorganismos aislados de filósfera probados en As, Hg y Pb.

Aislado	As 18 mM	Hg 2.5 mM	Pb 3 mM
MF 1-1	1	1	1
MF 1-2	0	0	1
MF 1-3	1	1	1
MF 1-4	1	1	1
MF 2-1	0	1	1
MF 2-2	1	1	1
MF 2-3	1	1	1
MF 2-4	1	1	1
MF 2-5	1	1	1
MF 2-6	0	1	1
MF 2-7	1	1	1
MF 2-8	1	1	1
MF 3-1	1	1	1
MF 3-2	1	1	1
MF 3-3	0	1	1
MF 3-4	1	1	1
MF 3-5	1	1	1
MF 3-6	1	1	1
MF 3-7	0	1	1
MF 3-8	1	1	1
MF 3-9	0	1	1
MF 3-10	0	1	1
MF 3-11	0	0	1
MF 3-12	0	1	1



**Anexo VII.- Microorganismos aislados de endosfera y rizosfera probados en As, Hg y Pb.**

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Microorganismos aislados de endosfera probados en As, Hg y Pb.

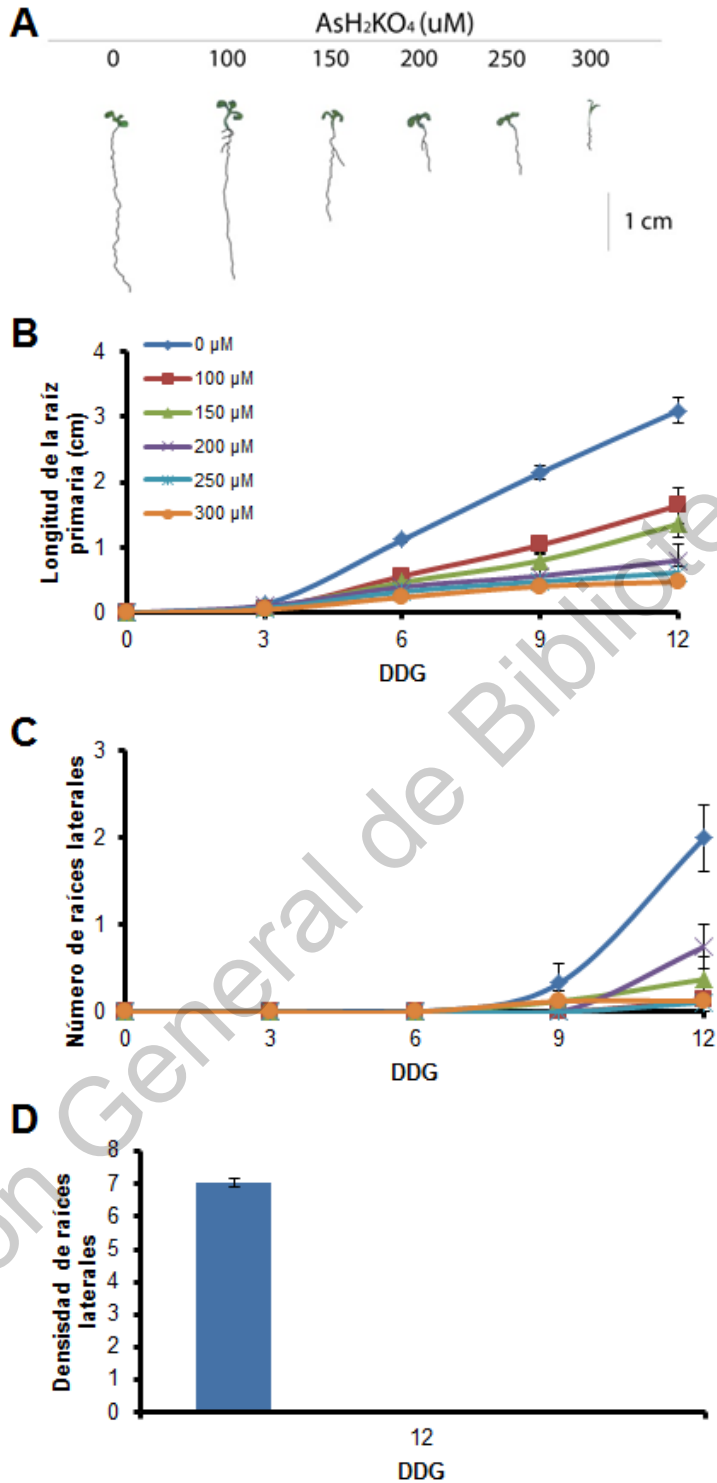
Aislado	As 18 mM	Hg 2.5 mM	Pb 3 mM
MT 1-1	1	0	0
MT 1-2	1	0	1
MT 1-3	1	0	1
MT 1-4	1	0	0
MT 1-5	1	1	1
MT 2-1	0	1	1
MT 2-2	1	1	1
MT 2-3	1	1	1
MT 2-4	1	0	1
MT 3-1	0	0	0
MT 3-2	1	1	1
MR 1-1	0	0	1
MR 1-2	1	0	1
MR 1-3	1	0	1
MR 2-1	1	0	0
MR 2-2	1	0	1
MR 2-3	0	0	0
MR 2-4	0	0	0
MR 2-5	1	0	0
MR 2-6	1	1	0
MR 2-7	1	0	0
MR 2-8	1	0	0
MR 2-9	1	0	1
MR2-10	1	0	0
MR2-11	0	0	0
MR2-12	0	0	1
MR2-13	1	0	0
MR 3-1	1	1	0
MR 3-2	1	0	0
MR 3-3	1	1	0
MR 3-4	1	0	0
MR 3-5	1	0	1
MR 3-6	1	0	0
MR 3-7	1	0	0
MR 3-8	1	1	0
MR 3-9	1	0	0
MR 3-10	1	0	1
MR 3-11	1	0	0
MR 3-12	1	0	0
MR 3-13	1	1	1
MR 3-14	1	1	0
MR 3-15	1	0	1
MR 3-16	1	0	0
MR3-17	1	0	0
MR3-18	1	0	0
MR3-19	1	1	1

Microorganismos aislados de rizósfera. probados en As, Hg y Pb.

Aislado	As 18 mM	Hg 2.5 mM	Pb 3 mM
MZ 1-1	1	0	0
MZ 1-2	1	1	1
MZ 1-3 (1)	1	1	1
MZ 1-3 (2)	1	1	1
MZ 1-4	1	1	1
MZ 2-1	1	1	1
MZ 2-2	1	1	1
MZ 2-3	0	1	1
MZ 2-4	0	1	1
MZ 2-5	0	1	1
MZ 3-1	0	0	0
MZ 3-2	1	0	1
MZ 3-3	0	0	0
MZ 3-4	0	0	0
MZ 3-5	0	0	0
MZ 3-6	0	0	0
MZ 3-7	1	1	1
MZ 3-8	1	1	1
MZ 3-9	1	1	1
MZ 3-10	1	1	1
MZ 3-11	1	1	1
MZ 3-12	1	1	1
MZ 3-13	1	1	1
MZ 3-14	1	1	1
MZ 3-15	1	1	1
MZ 3-16	0	1	1
MZ 3-17	1	1	1
MZ 3-18	1	1	1
MZ 3-19	1	1	1
MZ 3-20	1	1	1
MZ 3-21	1	1	1
MZ 3-22	1	1	1
MZ 3-23	0	1	1
MZ 3-24	0	1	1
MZ 3-25	1	1	1
MZ 3-26	0	1	1
MZ 3-27	1	1	1
MZ 3-28	1	1	1
MZ 3-29	1	1	1
MZ 3-30	1	1	1
MZ 3-31	1	1	1
MZ 3-32	1	1	1
MZ 3-33	1	1	1

**Anexo VIII. Estandarización de las condiciones de As con cinética de crecimiento en *A. thaliana*.**

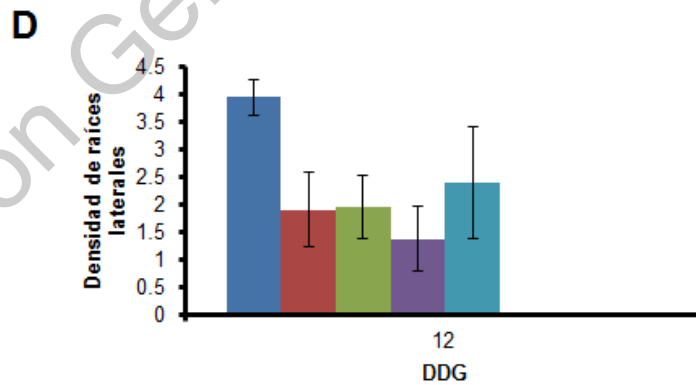
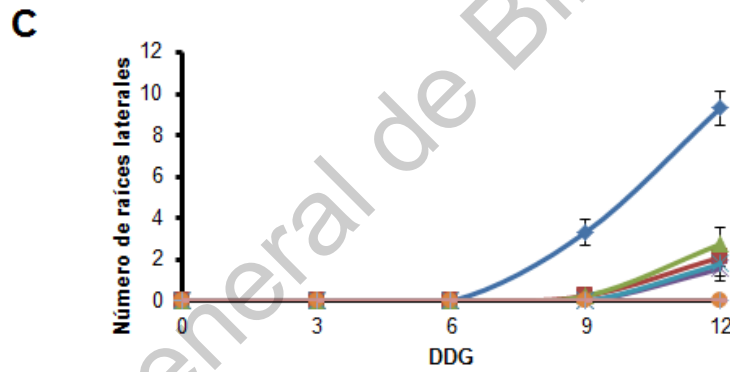
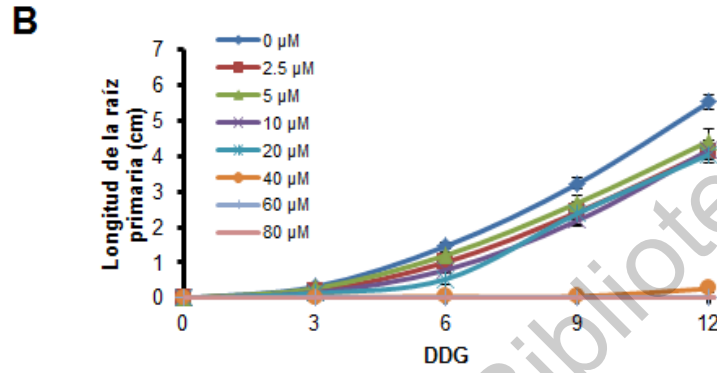
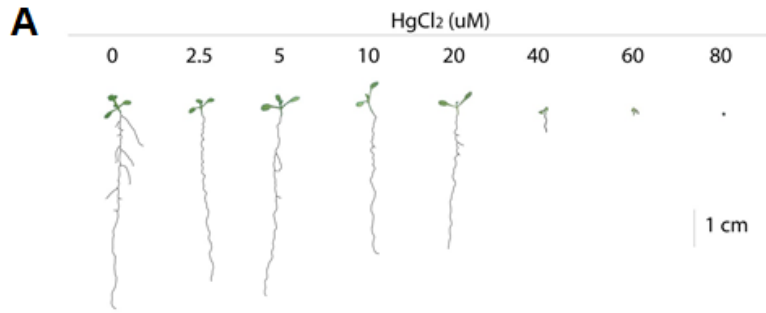
Dirección General de Bibliotecas UAQ



Respuesta del sistema radical de *A. thaliana* en presencia de distintas concentraciones de As. A) Fenotipos del sistema radical con 12 D.D.G. B) Longitud de la raíz primaria. C) Número de raíces laterales. D) Densidad de raíces laterales. ES±. N=8. DDG: días después de la germinación.

**Anexo IX. Estandarización de las condiciones de Hg con cinética de crecimiento en *A. thaliana*.**

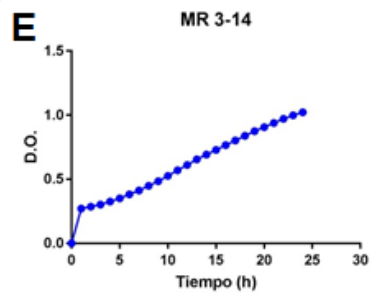
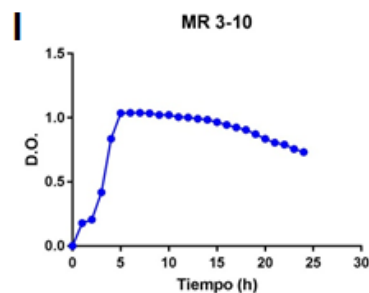
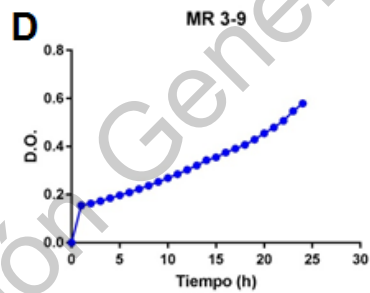
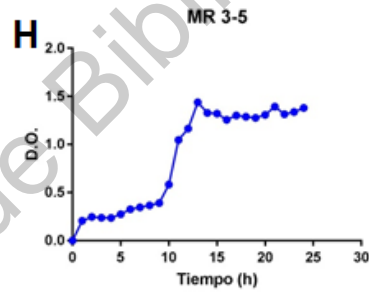
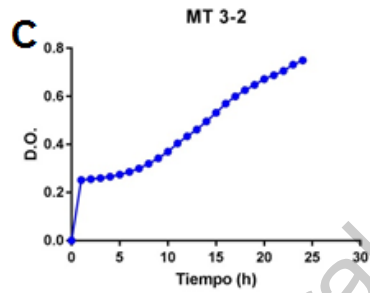
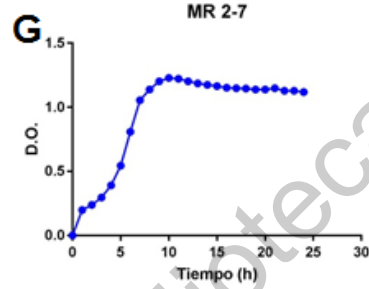
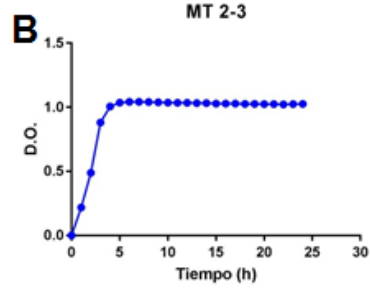
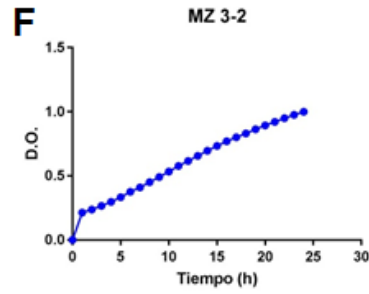
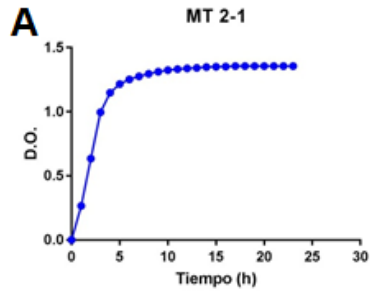
Dirección General de Bibliotecas UAQ



Respuesta del sistema radical de *A. thaliana* en presencia de distintas concentraciones de Hg. A) Fenotipos del sistema radical con 12 D.D.G. B) Longitud de la raíz primaria. C) Número de raíces laterales. D) Densidad de raíces laterales. ES±. N=8. DDG: días después de la germinación.

**Anexo X. Determinación del tiempo de crecimiento de los microorganismos aislados de suelos contaminados por MPs**

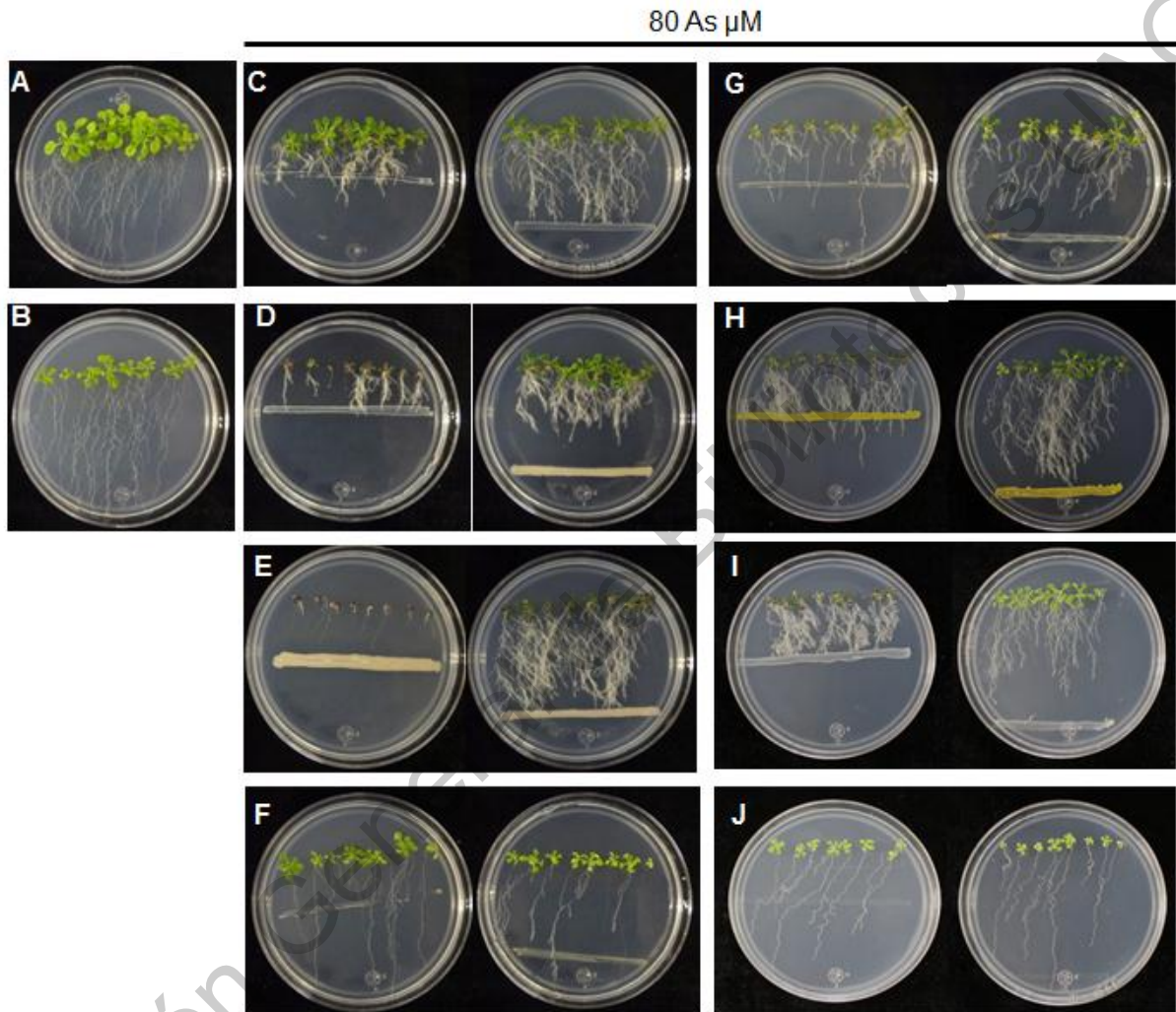
Dirección General de Bibliotecas UAQ



Determinación del tiempo de crecimiento de los aislados en medios de cultivo líquido en ausencia de MPs.

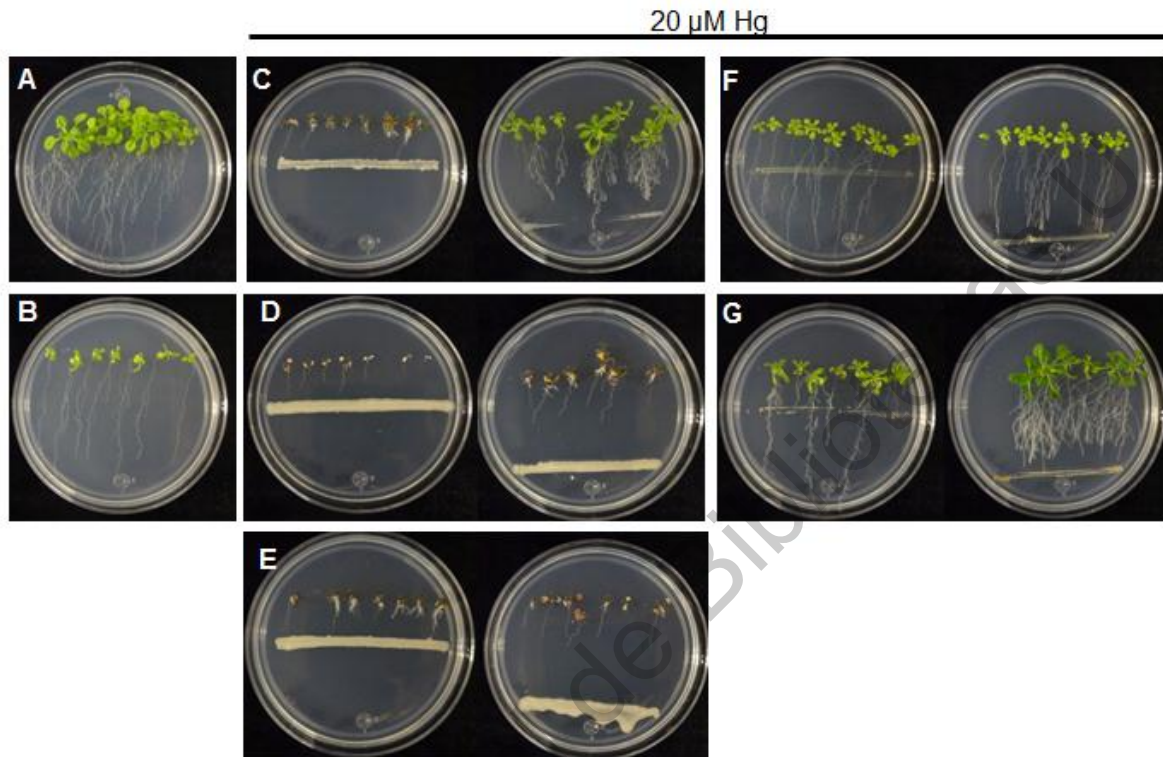


**Anexo XI. Evaluación de los microorganismos aislados de endosfera para la promoción del crecimiento vegetal en presencia de 80  $\mu\text{M}$  As por contacto y distancia.**



Evaluación de los microorganismos aislados de endosfera para la promoción del crecimiento vegetal en presencia de 80  $\mu\text{M}$  As por contacto y distancia. A) Mock. B) 80  $\mu\text{M}$  As. C) MT 2-1. D) MT 2-3. E) MT 3-2. F) MR 3-9. G) MR 3-14. H) MR 3-5. I) MR 3-10. J) MT 2-2. Replica biológica.

**Anexo XII. Evaluación de los microorganismos aislados de endosfera para la promoción del crecimiento vegetal en presencia de 20  $\mu\text{M}$  As por contacto y distancia.**



Evaluación de los microorganismos aislados de endosfera para la promoción del crecimiento vegetal en presencia de 20  $\mu\text{M}$  Hg por contacto y distancia. A) Mock. B) 20  $\mu\text{M}$  Hg. C) MT 2-31 D) MT 2-3. E) MT 3-2. F) MR 3-9. G) MR 3-14. Replica biológica.

### Anexo XIII. Secuencias del aislado MR 3-5.

AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATAACTAGCTGTCCGGG  
CACTTGGTGCTTGGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTATCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA  
AGGTTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCTGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTC  
GAAGCAACGCGCAGAACCCTACCAGCGTTTGACATGGTAGGACGACTGGCAGAGATGCCTTT  
CTTCCCTTCGGGGACCTACACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATG  
TTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGACTTTAGTTACCATCATTAAAGTTGGGTACT  
TTAAAGTAACCGCCGGTGATAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCC  
TTACGCGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAAGTACAGTGGGCAGCAATCCCGCGAGGG  
TGAGCTAATCTCCAAAACCTTGTCTCAGTTCGATTGTTCTCTGCAACTCGAGAGCATGAAGGC  
GGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCAGGCCTTGACACA  
CCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGGTTACCCGAAGGCGTTGCGCTAACTCAGCAATGAGA  
GGCAGGCGACCAC

### Anexo XIV. Secuencias del aislado.

TAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATGAAT  
ACAGATGCCTGTGAGCTTGCTCACGGGCTTTCTATCATATCCATAACACCTGTGCACCTGTTG  
GATGTTCTAGAGACTAAATGCTTACAGCTGTGGTCAATAGTCATCCACTTACACTAAACAATAAT  
GTAACAAATGTAGTCTTATTATAACATAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGCTCTCGCATC  
GATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGAGAATTCAGTGAATCATCGAATC  
TTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTATGAAAACC  
CTCAACCTTAGATTGTTATTTGACCTTTCTTTGGCTTGGATTTGGACGTTTGCCGATGTCAAGT  
CGGCTCGTCTTAAAAGTAATAGCTGGATCTGTCTCGCGACATGGTTTGACTTGGCGTAATAAGT  
ATTTGCTAAGGACATCTTCGGATGGCCCTGTTGCAGGACTAAAGAACCGCTTTCTAATCCATT  
GATCTTCGGATTAATATTCATAACATCTGGCCTCAAATCAG  
GTAGGACA

### Anexo XV. Secuencias del aislado.

CGGTGAACTGACTTGATCCTGACTAGAGTGAGACCTTCGGTCTAGTGGCGCACGGGTGCGT  
AACGCGTGGGAATCTGCCCTTGGGTACGGAATAACTCAGAGAAATTTGTGCTAATACCGTATA  
ATGACTTCGGTCCAAAATTTATCGCCCAAGGATGAGCCCGCGTAAGATTAGCTAGTTGGTGG  
GGTAAAATTCTACCAAGGCGACTATCTTTAGCTGGTGGCGAGGAAGACCCTGACACTGGGAC  
TGACAGCGATCACAGATGGCAACCCTCATCGCTACGTGGAACCTGCCACAATTCCTCAATAG  
AGAATCGGCTGCTTCGAGTTCGGCAACCGGCTTAGTGTCTGTTACGCTAATACCCGAAGCGC  
TTCGGCGCGCCTTGGCGGTAGTAACAGGGTAACTCTCGAATGCGCCCGGCTCTAAAAATAT  
GAT



## Anexo XVI. Secuencias del aislado.

GGCGTGGATGCTCGGATACTGGGCGTAAGCGCACGTAGGCGGCTTTGTAAGTTAGAGGTGAAG  
CCTGGAGCTCAACTCCAGAATTGCCTTTAAGACTGCATCGCTTGAATCCAGGAGAGGTGAGTGG  
AATCCGAGTGTAAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCA  
CTGGACTGGTATTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA  
GTCCACGCCGTAAACGATGATAACTAGCTGTCCGGGGACTTGGTCTTTGGGTGGCGCAGCTAAC  
GCATTAAGTTATCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGC  
CTGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCGTTTGA  
CATGTCCGGACGGTTTCAGAGATGGACTCCTTCCCTTCGGGGACTGGAACACAGGTGCTGCAT  
GGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCC  
TTTAGTTACCATCATTTAGTTGGGGACTCTAAAGGAACCGCCGGTGATAAGCCGGAGGAAGGTG  
GGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTACGCGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTG  
ACAGTGGGCAGCAAACCTCGCGAGAGTGCCTAATCTCCAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGTT  
TCTGCAACTCGAGAGCATGAAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAA  
TACGTTCCAGGCCTTGACACACCGCCCGTACACCATGGAGTTGGGTTACCCGAAGGCGTT  
GCGCTAACTCAGCAATGAGAGGCACGCGACCACGGTAGGGCTTAGCGACTGGTGTGGAGTCGT  
ACAGGGGTAAGCCGTAAGATAGCCGAGCTATCTCCCGGTAAGTGTGCATATCATCCCGGTAAGAG  
CTTACATCCTTATGCTCAGTCACTCAGGCGGCCATTGCTGGAATCAGGCTTTCGCATGTCGATAT  
GCCACTGCTGCCTTCCGTAAGGAAGTCTTGGGG

C

**ANEXO XVII. Microorganismos perdidos durante la caracterización.**

Microorganismos perdidos durante la caracterización.						
Aislado	Color	Elevación	Margen	Forma	Tinción gram	Microscopía
MS 2-2	-	-	-	-	-	-
MS 2-5	-	-	-	-	-	-
MS 3-2	-	-	-	-	-	-
MF 1-2	-	-	-	-	-	-
MF 2-1	-	-	-	-	-	-
MR 1-2	-	-	-	-	-	-
MR 1-3	-	-	-	-	-	-
MR 2-1	-	-	-	-	-	-
MR 2-5	-	-	-	-	-	-
MR 2-6	-	-	-	-	-	-
MR 2-7	-	-	-	-	-	-
MR 2-8	-	-	-	-	-	-
MR 3-11	-	-	-	-	-	-
MR 3-12	-	-	-	-	-	-
MR 3-13	-	-	-	-	-	-
MZ 1-4	-	-	-	-	-	-
MZ 3-1	-	-	-	-	-	-
MZ 3-6	-	-	-	-	-	-
MZ 3-7	-	-	-	-	-	-
MZ 3-18	-	-	-	-	-	-

Dirección General de Bibliotecas UAQ