

Valeria Hernández Carrillo

Efecto de la inoculación de rizobacterias en *Nicotiana glauca* para la fitoextracción de cadmio en suelo

2022



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química

Efecto de la inoculación de rizobacterias en *Nicotiana glauca* para la fitoextracción de cadmio en suelo

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en

Ciencia y Tecnología Ambiental

Presenta

Valeria Hernández Carrillo

Dirigido por:

Miguel Ángel Rico Rodríguez

Querétaro, Qro. a 2022



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

Efecto de la inoculación de rizobacterias en *Nicotiana glauca* para la
fitoextracción de cadmio en suelo

Tesis

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

Presenta

Valeria Hernández Carrillo

Dirigido por:

Miguel Ángel Rico Rodríguez

Miguel Ángel Rico Rodríguez

Presidente

Jorge Noel Gracida Rodríguez

Secretario

Juan Antonio Valencia Hernández

Vocal

Víctor Pérez Moreno

Vocal

Juan Campos Guillén

Suplente

Centro Universitario Querétaro, Qro.

2022, México

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento a Dios, a la participación de mi Comité de investigación por sus valiosas aportaciones, en particular, al M. en C. Juan Antonio Valencia Hernández, por el apoyo y la guía en cada parte del trabajo y a mi Director de tesis Miguel Ángel Rico Rodríguez por la libertad y la confianza ante el proyecto. A mi compañera Damara Benazir Damas Solano, un inmenso gracias por la compañía y la tolerancia. A mi familia y amigos con los que no alcanzan las palabras para agradecer.

Un especial agradecimiento al cuerpo docente y administrativo de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, al Centro de Estudios Académicos sobre Contaminación Ambiental (CEACA) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por los recursos brindados para la realización de este trabajo.

INDICE

	Página
RESUMEN.....	10
I. INTRODUCCION.....	13
II. ANTECEDENTES.....	16
Metales pesados en suelo.....	16
Cadmio en suelo.....	16
Propiedades del Cadmio en suelo.....	17
Técnicas de remoción de Cadmio en suelo.....	17
Fitorremediación.....	18
Fitoextracción.....	19
<i>Nicotiana glauca</i>	20
Microorganismos rizosféricos.....	21
Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR).....	22
Mecanismos de acción de PGPRs.....	24
III. HIPÓTESIS.....	26
IV. OBJETIVOS.....	26
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
Selección de rizobacterias tolerantes a Cd.....	27
Muestreo de suelo, raíces y semillas.....	27
Aislamiento de bacterias en raíces muestreadas.....	27
Prueba de tolerancia a Cd de bacterias en raíces muestreadas.....	27
Identificación de bacterias en rizosfera.....	28
Establecimiento de la concentración máxima de cadmio en suelo que tolere <i>Nicotiana glauca</i>.....	28
Curva hormética.....	28
Determinación de la concentración de cadmio en suelo y tejidos vegetales.....	29

Evaluación de la relación planta-bacteria expuestas al cadmio	30
Cultivo en <i>in vitro</i> de semillas y bacterias	30
Prueba en <i>in vivo</i> de la relación planta bacteria expuestas al cadmio	30
Conteo de especies bacterianas inoculadas.....	31
Análisis estadístico	32
VI. RESULTADOS Y DISCUSION	33
Selección de rizobacterias tolerantes a Cd	33
Prueba de tolerancia a Cd de bacterias en raíces muestreadas	33
Identificación de bacterias en rizosfera	35
Establecimiento de la concentración máxima de cadmio en suelo que tolere <i>Nicotiana glauca</i>	38
Curva hormética.....	38
Cuantificación de cadmio en tejidos vegetales	39
Evaluación de la relación planta-bacteria expuestas al Cd	41
Cultivo en <i>in vitro</i> de semillas y bacterias	41
Prueba en <i>in vivo</i> de la relación planta-bacteria expuestas al Cd	43
Cuantificación de Cd en planta y suelo.....	47
Conteo de especies bacterianas inoculadas.....	51
VII. CONCLUSIONES	54
VIII. BIBLIOGRAFÍA	56
IX. ANEXOS	64

Agradecimientos	ii
Indice	iii
Indice de cuadros	iv
Indice de figuras	v
Resumen	vi

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
<i>Cuadro 1.</i> Taxonomía de <i>N. glauca</i> (Nattero <i>et al.</i> , 2010).....	21
<i>Cuadro 2.</i> Distribución de grupos microbianos en el perfil del suelo (Glick, 2010) 22	22
<i>Cuadro 3.</i> Combinaciones de plantas y bacterias en diversos estudios de fitorremediación de metales.	23
<i>Cuadro 4.</i> Análisis estadístico entre aislados bacterianos de rizosfera con y sin Cd en medio LB	34
<i>Cuadro 5.</i> Análisis macroscópico de caracterización morfológica de colonias bacterianas aisladas.....	36
<i>Cuadro 6.</i> Análisis a nivel molecular de los tres aislados seleccionados. .	37
<i>Cuadro 7.</i> Análisis de altura y diámetro de tallo para plantas sometidas a las pruebas de tolerancia a Cd.	39
<i>Cuadro 8.</i> Análisis de las mediciones de raíz de <i>N. glauca</i> germinada en <i>in vitro</i> durante cuatro semanas para cada inóculo.....	41
<i>Cuadro 9.</i> Caracterización fisicoquímica de la arena de río	43
<i>Cuadro 10.</i> Análisis estadístico de las mediciones de altura de <i>N. glauca</i>	44
<i>Cuadro 11.</i> Análisis estadístico de las mediciones del diámetro tallo de <i>N. glauca</i> 46	46
<i>Cuadro 12.</i> Resultados de la cuantificación de Cd en planta para los diferentes tratamientos	48
<i>Cuadro 13.</i> Resultados de la cuantificación de Cd en suelo para los diferentes tratamientos	50
<i>Cuadro 14.</i> Resultados del conteo de colonias bacterianas.....	52

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
<i>Figura 1.</i> Aislados de colonias bacterianas en medio LB 3, 15, 17, 18 y 21.	36
<i>Figura 2.</i> Plantas de <i>N. glauca</i> en el suelo contaminado con Cd.	39
<i>Figura 3.</i> Resultados de la cuantificación de Cd en planta para los diferentes tratamientos (0, 60, 100 y 200 mg de Cd/Kg de suelo)	40
<i>Figura 4.</i> Resultados del monitoreo de longitud de raíz de semillas de <i>N. glauca</i> en <i>in vitro</i> inoculadas con las cepas bacterianas.	42
<i>Figura 5.</i> Resultados del monitoreo de la altura de <i>N. glauca</i> en <i>in vivo</i> inoculadas con las cepas bacterianas.	45
<i>Figura 6.</i> Resultados del monitoreo de los diámetros de tallo de <i>N. glauca</i> en <i>in vivo</i> inoculadas con las cepas bacterianas.	46
<i>Figura 7.</i> Resultados de la cuantificación de Cd en planta para los diferentes tratamientos.....	48
<i>Figura 8.</i> Resultados de la cuantificación de Cd en suelo para los diferentes tratamientos.....	51
<i>Figura 9.</i> Resultados del conteo de colonias bacterianas en planta para los diferentes tratamientos	53

RESUMEN

Los procesos de degradación del suelo son un fenómeno presente en todo el mundo. La degradación química es la mayor afección en el país, y en este tipo de degradación está la contaminación por metales pesados. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la fitoextracción de Cd de *Nicotiana glauca* en simbiosis con diferentes rizobacterias aisladas de jales mineros. En la zona minera de Maconí, Querétaro, se muestrearon suelo y semillas de *N. glauca*. Se obtuvieron aislados, se determinó la tolerancia a Cd por espectroscopia UV/VIS e identificó las bacterias a molecularmente. Se estableció la concentración máxima de Cd en suelo para *N. glauca*. Se evaluó la relación simbiótica planta-bacteria en *in vitro*, y luego, planta-bacteria en *in vivo* expuestas al Cd. Se cuantificó el metal por absorción atómica en hojas, tallos, raíces y suelo. Por último, se hizo un conteo bacteriano. Se aislaron 25 colonias bacterianas, se seleccionaron colonias con tolerancia a Cd, se descartaron las bacterias Gram – y se tomaron las que resultaron Gram +, siendo estas, *Arthrobacter aurescens*, *Arthrobacter ilicis* y *Bacillus simplex*. La tolerancia de *N. glauca* al Cd fue de 200 mg de Cd/Kg de suelo, por lo que se estableció esa concentración para la siguiente fase experimental. En cuanto a la prueba en *in vitro*, el consorcio presentó una diferencia significativa con respecto al blanco con una longitud de raíz 60% mayor, mostrando favorecer el crecimiento de la planta. Durante la prueba en *in vivo*, el consorcio, presentó una diferencia significativa respecto al control con Cd, alcanzando una altura promedio de 26.83 cm. Por último, la extracción más alta por la planta fue del 27.43 % de Cd en asociación con *B. Simplex* con una diferencia significativa con respecto a los demás tratamientos, y el conteo final bacteriano, señaló un promedio de 4.88×10^8 UFC/g para el consorcio con una diferencia significativa con respecto a los otros tratamientos. Con esto se concluye que hubo un incremento en la capacidad extractiva de *N. glauca* mediante la relación simbiótica planta-bacteria en concentraciones altas de cadmio, ofreciendo una alternativa más eficaz de fitorremediación en suelos contaminados que las estrategias habituales.

Palabras Clave: Fitorremediación, hiperacumulación, simbiosis.

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

34

35

SUMMARY

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

Soil degradation processes are a phenomenon present throughout the world. Chemical degradation is the greatest condition in the country, and in this type of degradation is contamination by heavy metals. The objective of this study was to evaluate the phytoextraction of Cd from *Nicotiana glauca* in symbiosis with different rhizobacteria isolated from mining tailings. In the mining area of Maconí, Querétaro, soil and seeds of *N. glauca* were sampled. Isolates were obtained, tolerance to Cd was determined by UV/VIS spectroscopy and the bacteria were molecularly identified. The maximum concentration of Cd in soil for *N. glauca* was established. The plant-bacteria symbiotic relationship was evaluated in vitro, and then plant-bacteria in vivo exposed to Cd. The metal was quantified by atomic absorption in leaves, stems, roots and soil. Finally, a bacterial count was made. Twenty-five bacterial colonies were isolated, colonies with tolerance to Cd were selected, Gram - bacteria were discarded and those that were Gram + were taken, these being *Arthrobacter aurescens*, *Arthrobacter ilicis* and *Bacillus simplex*. The tolerance of *N. glauca* to Cd was 200 mg of Cd/Kg of soil, so that concentration was established for the next experimental phase. Regarding the in vitro test, the consortium presented a significant difference with respect to the white with a 60% greater root length, showing to favor the growth of the plant. During the in vivo test, the consortium presented a significant difference with respect to the control with Cd, reaching an average height of 26.83 cm. Finally, the highest extraction by the plant was 27.43% of Cd in association with *B. Simplex* with a significant difference with respect to the other treatments, and the final bacterial count indicated an average of 4.88×10^8 CFU/g for the consortium with a significant difference with respect to the other treatments. With this, it is concluded that there was an increase in the extractive capacity of *N. glauca* through the plant-bacteria symbiotic relationship in high concentrations of cadmium, offering a more effective alternative for phytoremediation in contaminated soils than the usual strategies.

63

Keywords: Phytoremediation, hyperaccumulation, symbiosis.

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

I. INTRODUCCION

79

80 El suelo es un componente esencial de los ecosistemas terrestres,
81 su condición de interfaz lo convierte en un medio receptor de una variedad
82 de contaminantes que tienden a acumularse en éste (INECC, 2007). Como
83 consecuencia de varios siglos de actividad minera y agrícola en México, se
84 han producido cantidades excesivas y muy difíciles de cuantificar de
85 residuos peligrosos en el suelo (NOM-147, 2007). De acuerdo con datos
86 publicados por el INEGI (2010), la superficie de suelo degradado por
87 causas de contaminación en 2005 fue de 25,967 km² en la República
88 mexicana, y El Programa Nacional de Remediación de Sitios
89 Contaminados publicado en 2016 señaló que en el periodo de 2003 a 2009
90 se registraron 297 sitios considerados como pasivos ambientales
91 abandonados, señalando que una de las principales causas de la
92 contaminación ha sido la disposición histórica de residuos mineros
93 (SEMARNAT, 2016).

94

95 Entre los principales contaminantes en los suelos de diversas partes
96 del mundo, incluido México, están los metales pesados, que se definen
97 como un grupo de elementos químicos (metales o metaloides) de alto peso
98 molecular y densidad mayor a 6 g/mL, como el arsénico, cadmio, cobre,
99 cromo, mercurio, plata, plomo, y zinc (Dhanker *et al.*, 2012; Kushwaha *et*
100 *al.*, 2019). Los niveles excesivos de estos en el suelo generan graves
101 problemas ambientales debido a su baja solubilidad y bioacumulación. A
102 su vez, éstos constituyen una preocupación crítica para la salud humana
103 por ser carcinógenos y mutagénicos (Sheoran *et al.*, 2008; Mahbub *et al.*,
2017).

104

105 El cadmio (Cd) destaca en este grupo por su elevada toxicidad y su
106 larga vida media, características que hace al metal más disponible y
107 propenso a acumularse en los seres vivos (Capó, 2007; Detmann *et al.*,
2012), además de ser una de las 20 sustancias más peligrosas para la

108 salud humana (ATSDR, 2012). Las concentraciones totales de Cd en suelo
109 oscilan entre 0.1 y 1 mg/Kg de suelo, y aunque no se conoce una
110 concentración media aproximada de Cd en suelos mexicanos, un ejemplo
111 de esto es que, actualmente en el Estado de Querétaro en el Municipio de
112 Cadereyta de Montes, en la zona minera de Maconí, las concentraciones
113 de metales pesados en los jales representan un riesgo para el ambiente y
114 la población (Santos, 2013).

115

116 Ahora bien, las concentraciones de referencia totales (CRT) para el
117 Cd establecidas por La Secretaría de Medio Ambiente y Recursos
118 Naturales y la Secretaría de Salud para uso agrícola, residencial o
119 comercial es de 37 mg/Kg de suelo, mientras que para uso industrial es de
120 450 mg/Kg (NOM-147, 2007). La remediación de suelos es compleja y las
121 estrategias pueden variar ampliamente, sin embargo, un método alternativo
122 es la fitorremediación, técnica que utiliza plantas para remover, transferir,
123 estabilizar, concentrar y/o destruir contaminantes, los mecanismos de
124 fitorremediación enfocados a metales pesados son la fitoextracción,
125 fitoestabilización y fitovolatilización (Jutsz *et al.*, 2015).

126

127 La fitoextracción implica la absorción y el movimiento de
128 contaminantes metálicos en el suelo a través del sistema vascular de las
129 plantas partiendo de las raíces hacia la biomasa aérea, las especies de
130 plantas más utilizadas son las hiperacumuladoras, estas se encuentran en
131 suelos metalíferos, están muy extendidas en todo el mundo y constituyen
132 una parte integral de la biodiversidad (Reeves y Baker, 2000; Jutsz *et al.*,
133 2015). *Nicotiana glauca* es una planta perenne perteneciente a la familia
134 *Solanaceae*, presente en sitios de eliminación de residuos sólidos
135 industriales, agrícolas y mineros, Oz Barazani (2004) encontró que esta
136 especie fue capaz de almacenar más de 50 mg por Kg de Cd en suelo
137 proveniente de jales mineros de la Unión de Murcia.

138

139 Por otro lado, entre la diversidad de microorganismos del suelo se
140 encuentran las rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas PGPR
141 (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), la mayoría de estas toleran
142 naturalmente los contaminantes metálicos (Sarwar *et al.*, 2017), además
143 de ejercer efectos benéficos en las plantas a través mecanismos directos e
144 indirectos para la promoción del crecimiento vegetal. En la promoción
145 directa, las bacterias sintetizan metabolitos que facilita a las plantas, la
146 toma de ciertos nutrientes del suelo, mientras que el mecanismo indirecto
147 se lleva a cabo cuando las PGPR disminuyen o previenen la entrada
148 fitopatógenos por control biológico (Ullah *et al.*, 2015).

149

150 El uso de PGPR es para mejorar el crecimiento de especies de
151 plantas hiperacumuladoras ya que, han demostrado ser capaces de
152 mejorar la capacidad de acumulación de metales al aumentar la solubilidad
153 y aliviar las plantas contra las tensiones, entre los géneros y las cepas
154 bacterianas PGPR conocidas que se sabe que mejoran la eficiencia de
155 plantas hiperacumuladoras para la absorción de Cd se encuentran:
156 *Variovorax paradoxus*, *Flavobacterium sp.*, *Burkholderia cepacia*, *Bacillus*
157 *licheniformis*, *B. biosubtyl*, *B. thurnigiensis*, *B. megaterium*, *Pseudomonas*
158 *putida*, *Rhodococcus erythropolis*, *Serratia marcescens*, *Cedecea davisae*,
159 *S. nematodiphila*, *B. sp. SLS18*, *Micrococcus sp. MU1*, *Klebsiella sp. BAM1*,
160 *Rhizobium sp.* (Saeed *et al.*, 2018).

161

162 Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo es evaluar la
163 capacidad de extracción de cadmio en suelo empleando plantas de
164 *Nicotiana glauca* inoculadas con rizobacterias de suelos contaminados.

165

166

II. ANTECEDENTES

167

168

169 Metales pesados en suelo

170 Los metales pesados es un conjunto de elementos químicos que comprenden
171 principalmente metales de transición, algunos semimetales, lantánidos y actínidos
172 de alto peso molecular y densidad mayor a 6 g/mL. La concentración más alta de
173 metales pesados en suelo se encuentra en la superficie, a una profundidad de 5
174 cm, la cantidad de estos se encuentra limitada al intercambio iónico, procesos de
175 adsorción, intercambio de cationes y quelaciones, sin embargo, todo esto depende
176 del pH, la cantidad de materia orgánica, el potencial redox y la presencia de arcillas
177 en el suelo. Debido a su toxicidad, su movilidad y su capacidad para permanecer
178 en el ambiente un largo periodo de tiempo, cinco metales pesados son
179 considerados como prioritarios: As, Cd, Cr, Hg y Pb (Jan *et al.*, 2014).

180

181 Cadmio en suelo

182 La transición del cadmio (Cd) en diferentes fases se explica por el ciclo genérico
183 del metal traza, una vez que el Cd se extrae de los embalses profundos en la tierra
184 a través de la erupción volcánica o la minería, se transporta entre la atmósfera, el
185 agua superficial, el agua subterránea y la capa superficial del suelo (Mason, 2013),
186 aunque el Cd existe en el aire, el agua y el suelo solo en cantidades mínimas, el
187 metal es bioacumulativo (Dziubanek *et al.*, 2015). No es un elemento esencial para
188 las plantas y la concentración en suelo aumenta progresivamente debido a
189 actividades antropogénicas, tales como la minería, fundición y aleación de metales,
190 uso de fertilizantes fosfatados, quema de combustibles fósiles, fabricación de
191 electrónicos, baterías, aerosoles, pigmentos y plásticos, así como la gestión de
192 residuos (Kabata–Pendias y Murkherjee, 2007; Liu *et al.*, 2015).

193

194 Los síntomas de la intoxicación típicos por Cd son: daño renal, osteoporosis y
195 efectos carcinógenos, la dosis letal en la dieta humana va de 15 a 9.8 g/día y los
196 niveles de contaminación máximos (NCM) son de 0.01 g/L todos estos establecidos
197 por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) referentes

198 a Cd (Caviedes Rubio *et al.*, 2015). El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en
199 Aditivos Alimentarios (JECFA) estableció en 2010 que, el valor de ingesta máxima
200 tolerable mensual para el cadmio de 25 µg/Kg de peso.

201

202 Propiedades del Cadmio en suelo

203 El cadmio es un elemento perteneciente al grupo 12 de la tabla periódica, a la par
204 del mercurio y el zinc. El metal puro es blando, dúctil y maleable, de color plateado
205 claro. Al ser calentado se combina con oxígeno, azufre, fósforo y halógenos, y es
206 fácilmente disuelto por ácidos (Greenwood y Earnshaw, 2012). En el medio natural
207 el cadmio se encuentra con valencia 2+, por lo que en solución forma especies
208 químicas tales como CdCl^+ , CdOH^+ , CdHCO_3^+ , CdCl_3^- , CdCl_4^{2-} , $\text{Cd}(\text{OH})_3^-$ y
209 $\text{Cd}(\text{OH})_4^{2-}$ y quelatos orgánicos (Kabata-Pendias, 2000; Bücken-Neto *et al.*, 2017).

210

211 Investigaciones realizadas acerca de la movilidad del cadmio en este medio han
212 reportado que en todos los suelos la dinámica del metal está afectada
213 principalmente por el pH y en cuanto a los suelos ácidos, el cadmio se intercambia
214 fácilmente, lo que lo hace disponible para las plantas, mientras que, la naturaleza
215 de las superficies de adsorción y de los ligandos orgánicos es también importante
216 (Kabata-Pendias, 2000; Sangthong *et al.*, 2016).

217

218 Técnicas de remoción de Cadmio en suelo

219 Las propiedades del suelo, principalmente las químicas, juegan un papel crucial en
220 la reducción o aumento de la toxicidad de los metales (Krumova *et al.*, 2016).
221 Debido a la repercusión ambiental de la acumulación de cadmio en el suelo, los
222 principales tratamientos utilizados incluyen métodos como la recuperación,
223 floculación, intercambio iónico, nanofiltración, por mencionar algunos, así como
224 métodos fisicoquímicos como lavado de suelos, estabilización, extracción,
225 inmovilización, entre otros. Estos métodos, incluso si son efectivos, son
226 generalmente costosos ya que requieren de una alta energía y sustancias
227 químicas, además de generar productos finales nocivos (Kang *et al.*, 2016).

228

229 Fitorremediación

230 Es una técnica que usa plantas para remover, transferir, estabilizar, concentrar y/o
231 destruir contaminantes (orgánicos e inorgánicos) en suelos, lodos y sedimentos,
232 este proceso puede aplicarse en *in situ* o en *ex situ*. Los mecanismos de
233 fitorremediación enfocados a metales pesados, incluido el Cd, son: fitoextracción,
234 fitoestabilización y fitovolatilización (Wan *et al.*, 2016).

- 235 • Fitoextracción, los contaminantes se absorben por las raíces y luego, son
236 traslocados y/o acumulados en tallos y hojas.
- 237 • Fitoestabilización, las plantas condicionan la movilidad y biodisponibilidad de
238 los contaminantes en el suelo, debido a la producción de químicos en las
239 raíces, ya que pueden adsorber y/o formar complejos con los contaminantes,
240 inmovilizándolos en la interfase raíces-suelo.
- 241 • Fitovolatilización: Se basa en la transferencia de contaminantes del suelo o
242 agua hacia la atmósfera. la planta capta, modifica el contaminante y lo libera
243 a la atmósfera como transpiración (Hammer *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2016).

244 Las principales limitaciones con respecto a los procesos de fitoextracción es la
245 biodisponibilidad del metal objetivo y la capacidad de las plantas para acumular el
246 Cd dentro de la biomasa aérea (Raskin y Ensley, 2000; Jutsz *et al.*, 2015).

247

248 Fitoextracción

249 La fitoextracción implica la absorción y el movimiento de contaminantes metálicos
250 en el suelo a través de las plantas partiendo de las raíces hacia la biomasa aérea,
251 según el mecanismo de hiperacumulación (Jutsz *et al.*, 2015). Las plantas
252 hiperacumuladoras absorben metales en grandes cantidades de suelos
253 contaminados, luego los transportan y los acumulan en órganos sobre el suelo a
254 concentraciones de 100 a 1000 veces más altas que las que se encuentran en
255 especies no hiperacumuladoras sin sufrir aparente efecto fitotóxico (Jabeen *et al.*,
256 2009; Rascio y Navarilzzo, 2011). Por lo tanto, son muy adecuadas para la
257 fitorremediación.

258

259 Van der Ent (2013) dio los siguientes criterios para plantas hiperacumuladoras
260 basadas en concentraciones de metales en follaje seco: Cd 100, Co, Cu, Cr 300,
261 Pb, Ni 1000, Zn 3000 y Mn (μg por g respectivamente). Con base en estos criterios,
262 alrededor de 500 taxones han sido identificados como hiperacumuladores de
263 algunos metales y los populares son representantes de las siguientes familias:
264 *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Caryophyllaceae*, *Cunouniaceae*, *Cyperaceae*,
265 *Euphorbiaceae*, *Fabaceae*, *Flacourtiaceae*, *Lamiaceae*, *Solanaceae*, *Poaceae* y
266 *Violaceae* (Reeves, 2006; Rascio y Navarilzzo, 2011; Van der Ent *et al.*, 2013).

267

268 Los números de taxones hiperacumulativos de metales han ido aumentando, sin
269 embargo, son pocos los estudios realizados con plantas adaptadas a las zonas
270 áridas en la fitoextracción de metales pesados; a pesar de que la región árida y
271 semiárida comprende aproximadamente 103 millones de hectáreas, es decir el 52%
272 de la superficie continental de México, en estas regiones existe un reservorio
273 natural de plantas con un potencial poco estudiado (Bolan *et al.*, 2014).

274 Estas plantas son únicas debido a las siguientes características: (1) poseen la
275 capacidad de absorber cantidades elevadas de metales pesados del suelo (2) son
276 capaces de una mayor translocación de iones metálicos de raíz a brote; (3) tienen
277 mecanismos para desintoxicar y secuestrar cantidades extremadamente grandes
278 de metales pesados en los brotes (Rascio y Navarilzzo, 2011) (4) pueden crecer
279 rápidamente; y (5) poseen un sistema de raíz profuso (Jabeen *et al.*, 2009).

280

281 Cabe destacar que el sitio de acumulación de estos metales pesados difiere de una
282 planta a otra, así como según el tipo de suelo presente en un sitio contaminado y
283 el grado de la contaminación por metales, determina la velocidad a la que las
284 plantas hiperacumuladoras pueden remediar ese sitio (Sarwar *et al.*, 2017). Chan y
285 Hale (2004) reportaron que el Cd se bioacumula en la raíz y sólo una pequeña
286 cantidad es traslocada a la parte aérea de la planta, concentrándose en orden
287 decreciente en raíz, tallo, hoja, fruto y semilla.

288

289 *Nicotiana glauca*

290 También conocida como palán palán, alamillo o tabaquillo. Es una especie nativa que
291 se distribuye en todo el país, principalmente en zonas áridas, como especie ruderal. Los
292 parches de propagación de *N. glauca* se han identificado en países sudamericanos con
293 una amplia distribución en el continente, la información taxonómica se presenta en el
294 cuadro 1. Esta planta perenne se encuentra en sitios de eliminación de residuos sólidos
295 industriales, agrícolas y mineros, es nitrofila y crece hasta altitudes de 3700 msnm
296 (Nattero *et al.*, 2010).

297

298 En estudios como planta fitorremediadora, *N. glauca*, ha presentado buenos resultados,
299 por ejemplo, se ha experimentado en suelo extraído de la región minera de La Unión de
300 Murcia con una concentración de 50 ± 6.4 mg de Cd/Kg de suelo, acumuló en seis
301 meses, 8 ± 0.6 , el 16 % del cadmio que había en el terreno.

302

303 *Cuadro 1. Taxonomía de N. glauca (Nattero et al., 2010)*

Taxonomía	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Genero	<i>Nicotiana</i>
Especie	<i>Nicotiana glauca</i>

304

305 Microorganismos rizosféricos

306 La rizósfera es un microsistema complejo localizado en las raíces de las plantas,
307 constituido por una gran biodiversidad que incluye: bacterias, hongos y algas, además
308 de, protozoos, nematodos e insectos, y a través de los exudados se pueden dar diversas
309 relaciones microorganismo-raíz que afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas.
310 Estos procesos de detoxificación dependen de la micro y mesofauna de la rizósfera, así
311 como de las características de la planta huésped, propiedades del suelo y condiciones
312 ambientales (Ullah et al., 2015).

313

314 Los microorganismos se dispersan según las condiciones ambientales y la disponibilidad
315 de alimento, en los primeros centímetros del suelo existe mayor cantidad de restos
316 orgánicos y oxígeno, por lo que allí se dispone la mayor cantidad de organismos con
317 metabolismos aeróbicos (Ullah et al., 2015). En el cuadro 2 se presenta la distribución
318 de grupos microbianos en el perfil del suelo.

319

320 **Cuadro 2.** Distribución de grupos microbianos en el perfil del suelo (Glick,
 321 2010)

Horizonte	Cm	Bacterias aerobias	Bacterias anaerobias	Actinomycetes	Hongos	Algas	Protozoos
A ₀	0-10	1 116 915	1 000	11 335	303 000	500	640
A ₁	10-12	1 111 000	70 000	16 000	165 000	5 000	320
A ₂	12-20	317 640	181 000	11 950	77 500	100	40
B	20-40	19 750	700 000	7 250	14 740	100	10
C	50-100	463	10 000	197	1 850	0	0

322

323 El aislamiento y la aplicación de poblaciones microbianas para la remediación de
 324 metales pesados del suelo ha atraído a varios investigadores, y las rizobacterias,
 325 bacterias capaces de interactuar con las raíces de las plantas, han sido objeto de
 326 atención particular (Akciil *et al.*, 2015). Las rizobacterias de las plantas son capaces de
 327 generar varios mecanismos por los cuales afectan positivamente su crecimiento y
 328 desarrollo (Tirry *et al.*, 2018).

329

330 Los estudios informados, que abarcan un rango de diferentes plantas, metales, suelos y
 331 bacterias, señalan que el efecto de agregar la bacteria es típicamente para facilitar el
 332 crecimiento de las plantas, en el cuadro 3 se presentan algunos ejemplos, aún con la
 333 serie de trabajos realizados existe una creciente necesidad de encontrar nuevos
 334 recursos microbianos que puedan ayudar a mejorar el crecimiento y el rendimiento de
 335 las plantas en suelos contaminados (Aafi *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2012; Sarwar *et al.*,
 336 2017).

337

338 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)

339 La mayoría de las bacterias rizosféricas toleran naturalmente los contaminantes
 340 ambientales, por lo tanto, se usan en fitorremediación para eliminar contaminantes
 341 inorgánicos como metales pesados, además, algunas rizobacterias PGP tienen la

342 capacidad de disminuir el nivel de etileno en las plantas, lo que aumenta el crecimiento
343 de la planta, esto se atribuye a la ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilato) desaminasa,
344 que hidroliza ACC, el precursor biosintético del etileno en las plantas (Ullah *et al.*, 2015).

345

346 Dado que muchas bacterias promotoras del crecimiento de las plantas poseen varias de
347 estas características, una bacteria puede utilizar diferentes mecanismos en varios
348 momentos durante el ciclo de vida de la planta (Wang *et al.*, 2019). Estas PGPR
349 estimulan el crecimiento y desarrollo de la planta por mecanismos directos o indirectos
350 (Bhattacharyya y Jha, 2012). Los mecanismos directos incluyen producción de
351 sideróforos, solubilización de fosfato y síntesis de 1-aminociclopropano-1-carboxilato
352 desaminasa que permiten que la planta resista condiciones de estrés abiótico al reducir
353 los niveles de etileno y mejorar producción de hormonas de crecimiento vegetal
354 (Bhattacharyya y Jha, 2012; Ahemad y Kibret, 2014); mientras que el mecanismo
355 indirecto de promoción del crecimiento implica que las PGPR actúen como agentes de
356 biocontrol y desintoxican sustancias nocivas como los metales pesados y pesticidas
357 (Glick, 2012; Thiem *et al.*, 2018).

358

359 Las PGPR podrían ser rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas
360 extracelulares (ePGPR) o rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas
361 intracelulares (iPGPR) dependiendo del nivel de interacción con las células de la raíz de
362 la planta huésped (Martínez-Viveros *et al.*, 2010; Ramadan *et al.*, 2016). La mayoría de
363 estos géneros bacterianos son ePGPR e incluyen: *Agrobacterium*, *Arthrobacter*
364 *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*,
365 *Micrococcus*, *Pseudomonas* y *Serratia* (Bhattacharyya y Jha, 2012; Jing *et al.*, 2014).

366 **Cuadro 3.** Combinaciones de plantas y bacterias en diversos estudios de
367 fitorremediación de metales.

Bacteria	Planta	Metal	Efecto/Mecanismo	Referencia
<i>Variovorax paradoxus</i> , <i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Flavobacterium sp.</i>	Mostaza india	Cadmio	Aumento de la longitud de la raíz; IAA, sideróforos, ACC desaminasa	Belimov <i>et al.</i> , 2005

<i>Rhizosphere bacteria</i>	Graminaceae gramíneas	Cadmio, zinc, níquel	AA, sideróforos, ACC desaminasa	Dell'Amico <i>et al.</i> , 2005
<i>P. putida</i>	Girasol	Cadmio	Aumento de la absorción de cadmio y disminución de la toxicidad	Wu <i>et al.</i> , 2006
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Sedum alfredii</i>	Cadmio, zinc	Aumento de la biomasa, absorción de metales y translocación de metal a brotes	Li <i>et al.</i> , 2007
<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>B. biosubtyl</i> , <i>B. thurnigiensis</i>	Mostaza india	Selenio, cadmio, cromo	Aumento de la absorción de metales	Hussein <i>et al.</i> , 2008
10 diferentes rizobacterias	<i>Salix caprea</i>	Cadmio, zinc	Aumento de la absorción de metales; IAA, sideróforos, ACC desaminasa	Kuffner <i>et al.</i> , 2008

368

369 Mecanismos de acción de PGPRs

370

371 Las PGPR aumentan significativamente la disponibilidad de metales pesados en el suelo
 372 mediante una diversidad de métodos que van desde químicos hasta biológicos y
 373 bioquímicos. Esta disponibilidad aumenta mediante la secreción de diferentes
 374 compuestos y el establecimiento de una relación simbiótica planta-microbio o microbio-
 375 microbio (Jalili *et al.*, 2009; Gamalero *et al.*, 2009). Además de aumentar la
 376 biodisponibilidad, estos PGPR también aceleran la absorción de metales pesados por
 377 las plantas (Gupta *et al.*, 2014).

378

379 Entre las bacterias de la rizosfera, las PGPR están directamente involucradas en la
 380 absorción de metales al catalizar la movilidad del metal por la producción de
 381 biosurfactantes, ácidos orgánicos, reacciones redox, producción de fitohormonas, liberar
 382 agentes quelantes y alterar el pH del suelo (Lasat 2002; Khan *et al.*, 2009; Wenzel, 2009;
 383 Rajkumar *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2011).

384

385 En ambientes hostiles a los metales, las PGPR facilitan la planta de dos maneras, es
 386 decir, mediante la actividad desaminasa de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC)
 387 para reducir el estrés por etileno, lo que permite que la planta establezca raíces más

388 largas, especialmente durante las primeras etapas de crecimiento, lo que resulta en una
389 mayor biomasa de las plantas que se están cultivando. un requisito previo para que las
390 plantas se utilicen como hiperacumuladores (Pandey *et al.*, 2013). En segundo lugar, los
391 PGPR liberan sideróforos, que son compuestos complejantes del hierro que ayudan a
392 las plantas a obtener más hierro de los hábitats contaminados por metales (Burd *et al.*,
393 2000; Rajkumar *et al.*, 2010).

394

395 Un consorcio adecuado de PGPR y la cubierta vegetal, influyen de manera importante
396 en la movilidad y absorción de metales pesados. *Noccaea caerulescens*, un
397 hiperacumulador de Zn, Cd y Ni, acumuló una concentración de Zn cuatro veces mayor
398 en sus brotes cuando se inoculó el consorcio de *Microbacterium saperdae*,
399 *Pseudomonas monteilii* y *Enterobacter cancerogenes* en comparación con las plantas de
400 control inoculadas con cualquiera de las cepas individuales (Whiting *et al.*, 2001). Los
401 sistemas integrados de fitorremediación han demostrado ser es una tecnología más
402 rápida y segura para remediar sitios contaminados con metales (Guarino y Sciarrillo,
403 2017).

404

405

406

III. HIPÓTESIS

407

408 Las bacterias rizosféricas aisladas de suelos contaminados con metales pesados
409 promueven el crecimiento de la planta y aumentan la bioacumulación de Cd en tejidos
410 vegetales de *Nicotiana glauca*.

411

412

IV. OBJETIVOS

413

414

General

415 Evaluar la capacidad de extracción de Cd de *Nicotiana glauca* inoculada con diferentes
416 especies de rizobacterias tomadas de zonas contaminadas con metales pesados.

417

418

Específicos

419

1. Seleccionar rizobacterias tolerantes a Cd.

420

421

2. Establecer la concentración máxima de cadmio en suelo que tolere *Nicotiana*
422 *glauca*.

423

424

3. Evaluar la relación existente planta-bacteria expuestas al cadmio.

425

426

V. MATERIALES Y MÉTODOS

427

428

429 **Selección de rizobacterias tolerantes a Cd**

430

431 Muestreo de suelo, raíces y semillas

432 Se realizó el muestreo de la rizosfera de una planta de *Nicotiana glauca*, una vez
433 seleccionada, se tomó una muestra compuesta de suelo rizósferico de acuerdo a la
434 metodología señalada en la NMX-AA-132-SCFI-2006. Se colectaron cinco muestras
435 simples, a una profundidad de 20 cm para la obtención de las bacterias. El suelo y la
436 raíz fueron colectados y se almacenaron en bolsas de papel manteniéndolas a 4° C
437 (Santana-Flores *et al.*, 2020). Así mismo se colectaron semillas de la planta adulta de
438 *N. glauca*, en la zona Minera San Joaquín de la localidad de Maconí en Cadereyta de
439 Montes, Querétaro, ubicada a una latitud 20° 50 ' 5.07" y a una longitud 99° 32' 29.517".

440

441 Aislamiento de bacterias en raíces muestreadas

442 A partir de la mezcla del suelo rizosférico de *N. glauca* se realizaron siete diluciones
443 seriadas (1, 0.1, 0.001, 0.0001, 0.00001, 0.000001 y 0.0000001 mg/mL) y se realizaron
444 siembras en cajas Petri por la técnica superficial, en medio de cultivo LB (Bioxon); se
445 incubaron (Barnstead, modelo No.846) a 27° C por tres días para el crecimiento de
446 rizobacterias, con la finalidad de obtener colonias separadas. El aislamiento y
447 purificación consistió en realizar siembras continuas por la técnica de estría cruzada en
448 cajas Petri (Han *et al.*, 2020).

449

450 Prueba de tolerancia a Cd de bacterias en raíces muestreadas

451 En una campana de flujo laminar (Thermo, Forma Class II, B2) se tomaron las colonias
452 de bacterias que presentaron mayor crecimiento, se sembraron las diferentes bacterias
453 en medio LB líquido y se comparó el crecimiento de las mismas expuestas a una
454 concentración de Cd 200 mg/L, utilizando cloruro de cadmio (CdCl₂). Esto se realizó con
455 15 de las bacterias aisladas por triplicado. La comparación se realizó mediante la

456 medición de la densidad óptica por espectrofotometría UV/VIS a una longitud de onda
457 de 700 nm (Rodríguez *et al.*, 2008).

458

459 Identificación de bacterias en rizosfera

460 Se realizó la observación al estereoscopio de la morfología colonial bacteriana
461 descriptiva con respecto al crecimiento bacteriano en medio de cultivo LB sólido acorde
462 al Atlas Global de las bacterias dominantes que se encuentran en el suelo. Más adelante
463 para conocer más sobre los componentes estructurales, se realizaron reacciones de
464 hidróxido de potasio (KOH) con las cepas aisladas seleccionadas para determinar a que
465 grupo Gram pertenecían, en un portaobjetos se colocó una gota de KOH al 3% y se
466 tomó una muestra de cada aislado, se colocó el asa sobre la solución y se removió
467 durante 30 segundos para luego levantar el asa suavemente 3 cm. Este paso se realizó
468 por triplicado (Rojas-Triviño, 2011). Por último, de las diferentes cepas bacterianas
469 aisladas se realizó la identificación a nivel molecular basada en el análisis del gen que
470 codifica para el ARN ribosomal de la subunidad 16S de las tres especies que
471 presentaron mejores resultados (Sontakke *et al.*, 2009).

472

473 **Establecimiento de la concentración máxima de cadmio en suelo que tolere** 474 ***Nicotiana glauca***

475

476 Curva hormética

477 Se desinfectaron las semillas con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 10 %
478 por 5 min. Se lavaron cuatro veces con agua destilada estéril. Más adelante, en cajas
479 Petri estériles se colocaron, por triplicado, 20 semillas de *N. glauca* sobre papel
480 absorbente estéril de forma equidistante y se adicionó agua. Se contaron las semillas
481 germinadas y se calculó el porcentaje de germinación. Así mismo se determinó el tiempo
482 de germinación.

483

484 Se sembraron las semillas en almacigo con cavidades de 140 mL, en una proporción
485 4:1 de peat moss y perlita. Se aplicaron los tratamientos con cadmio en plántulas a partir
486 de tres pares de hojas verdaderas a las siguientes concentraciones: 0, 60, 100 y 200
487 mg de Cd/Kg de suelo, usando como referencia 60 mg de Cd/Kg de suelo (Oz Barazani,
488 2004). Se creció las plantas por cuatro semanas con riego cada dos días en invernadero
489 bajo condiciones controladas. La evaluación se hizo con respecto al vigor de la planta
490 (medición de altura, tallo y cantidad de clorofila).

491

492 Determinación de la concentración de cadmio en suelo y tejidos vegetales

493

494 Transcurridas las cuatro semanas, a las muestras de suelo y de tejidos vegetales se les
495 hizo una digestión ácida para determinar el contenido total de Cadmio presente en el
496 suelo. La digestión se realizó mediante el método de la EPA 3051 en un horno de
497 microondas Mars X por triplicado para cada unidad experimental de los diferentes
498 tratamientos. Se pesaron 0.5 g de muestra y se colocaron en vasos de teflón y se
499 adicionaron 5 mL de Ácido Nítrico concentrado. Se utilizaron tres etapas para obtener
500 una buena digestión, en la primera etapa se elevó la presión 300 psi por 10 min, en la
501 segunda se mantuvo constante la presión durante 10 min y finalmente en la tercera se
502 enfrió por 5 min. Posteriormente se filtraron las muestras de planta y suelo y se aforaron
503 a 10 y 50 mL respectivamente con agua destilada. La determinación de Cd se hizo
504 mediante espectrometría de absorción atómica por la técnica de flama (One source,
505 modelo Anayst 200), a una longitud de onda de 228.8 y se realizó la curva de calibración
506 a partir de estándares certificados de Cd $1000 \pm 3 \mu\text{g/mL}$ marca High-purity standards
507 acreditados para ISO/EC 17025. La curva de calibración se llevó a cabo por medio de
508 una ecuación lineal con un coeficiente de correlación mayor o igual a 0.999.
509 Posteriormente se procedió a realizar el análisis con el instrumento. Cada muestra se
510 midió por triplicado (Skoog, 2008).

511

512 **Evaluación de la relación planta-bacteria expuestas al cadmio**

513

514 Cultivo en *in vitro* de semillas y bacterias

515 Se preparó medio sólido compuesto por la solución mineral de Murashigue y Skoog y
516 como agente gelificante phytigel. Tras la preparación del medio, se midió y ajustó el pH
517 a 5.8 para no limitar el crecimiento de las plantas.

518 Para la limpieza y desinfección del material vegetal, se colocaron las semillas sobre
519 papel absorbente en caja Petri con un primer tratamiento de etanol al 70 %, luego se
520 utilizó hipoclorito de sodio al 10 % y se introdujeron las semillas agitando cada 2 minutos
521 por 10 minutos, y luego, sucesivos lavados con agua estéril en tres frascos estériles
522 haciendo uso de pinzas previamente esterilizadas por cinco minutos con agitaciones
523 constantes.

524 Luego, se colocaron las semillas en una caja Petri. Se inocularon las semillas,
525 sumergiéndolas en el medio con bacterias, y más adelante se sembraron de manera
526 equidistante, a una distancia de 2 mm, este ensayo se hizo por triplicado con una unidad
527 experimental de tres semillas, finalmente se sellaron las cajas y se colocaron en cámara
528 de crecimiento. Luego de la germinación de las semillas, se midió la longitud de la raíz
529 una vez por semana durante un mes.

530

531 Prueba en *in vivo* de la relación planta bacteria expuestas al cadmio

532

533 Se sembraron las semillas en almácigos con cavidades de 140 mL. Más adelante, se
534 trasplantó en macetas de 1.5 L en suelo caracterizado siguiendo la NOM-021-
535 SEMARNAT-2000, el suelo fue esterilizado posteriormente, y se agregó con una capa
536 de 2cm de tezontle, para evitar o minimizar las pérdidas de suelo durante los riegos. Se
537 creció las plantas por tres meses con riego cada cinco días adicionando solución
538 Hoagland, el proyecto se realizó en invernadero bajo condiciones controladas. El
539 sustrato se contaminó con Cd a la concentración que mejor respondió en lo evaluado en
540 la curva de adaptabilidad, 200 mg de Cd/Kg de suelo. Se agregaron las colonias
541 bacterianas previamente seleccionadas e identificadas en medio líquido LB, y se hizo a

542 tres cuartas partes del tallo con respecto a la hoja, se inoculó 5 mL una vez por semana
543 durante cuatro semanas, para el consorcio se agregó 1.6 ml de cada una de los aislados,
544 partiendo de un conteo colonial bacteriano al microscopio (UFC/g) para el consorcio de
545 $9.18E+07$, *Bacillus simplex* $6.25E+07$, *Arthrobacter aureescens* $6.37E+07$ y *Arthrobacter*
546 *ilicis* $5.17E+07$. A la mitad y al final del ensayo experimental, se determinó el cadmio en
547 planta y suelo y se monitoreó altura y grosor de tallo durante el ensayo.

548

549 El montaje del experimento se llevó a cabo con tres repeticiones y una unidad
550 experimental de cinco plantas bajo un diseño aleatorio simple.

551 CS: Control Planta y sustrato sin Cd

552 C: Control Planta y sustrato con Cd

553 CI1: Planta, sustrato y semilla con inóculo 1

554 CI2: Planta, sustrato y semilla con inóculo 2

555 CI3: Planta, sustrato y semilla con inóculo 3

556 CI4: Planta, sustrato y semilla con inóculo 1,2 y 3

557

558 Conteo de especies bacterianas inoculadas

559

560 A lo largo del experimento se tomaron tres muestras de suelo rizosférico y raíces de
561 cada tratamiento, de estas se pesaron 0.5 g, para realizar diluciones seriadas por
562 tratamiento (1, 0.1, 0.001, 0.0001, 0.00001, 0.000001 y 0.0000001 mg por mL) y se
563 sembró 100 µl de la 5ª dilución en cajas Petri por la técnica superficial (Hui Han *et al.*,
564 2020) en medio de cultivo LB; se incubaron a 27 °C por 24 h para el crecimiento de los
565 aislados bacterianos, con la finalidad de obtener colonias separadas. Se observaron las
566 colonias al estereoscopio, se analizaron con respecto a aislados puros almacenados y
567 a la caracterización morfológica previamente realizada para identificar las bacterias
568 inoculadas, y se hizo el conteo de cada aislado utilizado en los tratamientos (UFC/g).

569

570 **Análisis estadístico**

571 El proyecto se fragmentó en dos fases. La primera fase se realizó con un diseño
572 completamente al azar, se colocó la plántula con 4 tratamientos, 3 repeticiones y la
573 unidad experimental fue de 5 plántulas; La segunda fase se hizo en un diseño
574 completamente al azar con 5 tratamientos, 3 repeticiones y la unidad experimental fue
575 de 5 plantas. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía por Tukey para
576 parámetros individuales con un nivel de significancia de $p < 0.05$ utilizando el paquete
577 estadístico Graph Pad PRISM software, versión 7.

578

579

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

580

581 **Selección de rizobacterias tolerantes a Cd**

582

583 Prueba de tolerancia a Cd de bacterias en raíces muestreadas

584

585 Se aislaron 25 diferentes colonias bacterianas de suelo y rizosfera muestreados en los
586 jales mineros, sin embargo, existe una mayor diversidad en hábitats con alto contenido
587 de metales, controlada por diversos factores bióticos y abióticos que favorecen su
588 establecimiento y crecimiento, la rizosfera destaca por la disposición de nutrientes (Yu
589 *et al.*, 2014). De los aislados obtenidos se seleccionaron 9 que presentaron un mayor
590 crecimiento y fueron sembrados en un medio LB líquido con 200 mg Cd/L, y se
591 identificaron las colonias bacterianas con mayor tolerancia a Cd. Destacando el aislado
592 17 con una DO promedio de 0.353 en presencia de Cd y 0.387 en el medio sin el metal,
593 presentando la concentración bacteriana máxima, seguido de este, el aislado 3 con una
594 DO de 0.191 en el medio con Cd y de 0.229 sin Cd, el aislado 21, con una DO en
595 presencia de Cd de 0.162 y de 0.179 en el medio sin el metal y el aislado 18 con una
596 DO de 0.157 con Cd y 0.201 en el medio sin Cd (Cuadro 4).

597 Esto coincide con el trabajo de Santana-Flores *et al.* (2020) en el que aisló e identificó
598 114 especies de bacterias tolerantes a metales pesados, a partir de jales mineros, en
599 concentraciones ascendentes que van de 0.5 a 20 mM de distintas sales metálicas, entre
600 ellas $Cd(NO_3)_2$, determinando así la mayor tolerancia a Cd por parte de especies
601 pertenecientes al género de *Pseudomonas* sp. Con esto se demuestra la presencia de
602 microbiota y su tolerancia a altas concentraciones de metales, lo que podría deberse a
603 que estas bacterias se encuentran en un hábitat con elevadas cantidades de Cd y otros
604 metales, y han generado diferentes tipos de asociaciones que les permiten proliferar.
605 Por otro lado, los aislados 5, 6, 15, 20 y 22 presentaron una diferencia significativa en el
606 análisis, lo cual demuestra una inhibición del crecimiento ante el Cd, y podría deberse a
607 que la diversidad de las comunidades bacterianas es afectada por las concentraciones

608 y el tipo de metal asociado, ya que, si bien pueden tolerar la presencia de estos
609 contaminantes, se ve afectada su propagación y proliferación ante el Cd en específico
610 (O'Brien y Buckling, 2015).

611 Las bacterias asociadas con la rizosfera de las plantas son capaces de generar varios
612 mecanismos de interacción entre los cuales encontramos la producción de nutrientes
613 para el desarrollo de las plantas y fitohormonas como auxinas, citoquininas, giberelinas,
614 que pueden promover el desarrollo de las plantas; también pueden presentar actividad
615 enzimática específica y protegen a las plantas de contaminantes metálicos mediante
616 agentes quelantes (Ullah *et al.*, 2015; Sarwar *et al.*, 2017), por lo cual además de los
617 aislados 17, 13, 21 y 18, se eligió una más al azar de entre los que mostraron baja
618 tolerancia para las siguientes fases experimentales, el cual resultó ser el aislado 15.

619 *Cuadro 4.* Análisis estadístico entre aislados bacterianos de rizosfera con y sin
620 Cd en medio LB

621

Aislado	DO
17	0.387 ± 0.02 a
17Cd	0.353 ± 0.01 a
3	0.229 ± 0.01 b
18	0.201 ± 0.01 bc
3Cd	0.191 ± 0.09 bcd
21	0.179 ± 0.00 bcd
21Cd	0.162 ± 0.01 bcde
18Cd	0.157 ± 0.06 bcde
6	0.15 ± 0.01 cde
15	0.143 ± 0.01 cdef
20	0.14 ± 0.03 cdef
5	0.123 ± 0.49 defg
22	0.089 ± 0.47 efgh
5Cd	0.074 ± 0.04 fgh
6Cd	0.069 ± 0.03 fgh
20Cd	0.063 ± 0.00 gh

15Cd 0.046 ± 0.00 h

22Cd 0.046 ± 0.00 h

622

623 (bacteria 3, bacteria 5, bacteria 6, bacteria 15, bacteria 17, bacteria 18, bacteria 20,
624 bacteria 21, bacteria 22). Los datos representan la media ± DE (n=3) y letras diferentes
625 indican una diferencia significativa (P =0.05) usando la prueba de Tukey.

626

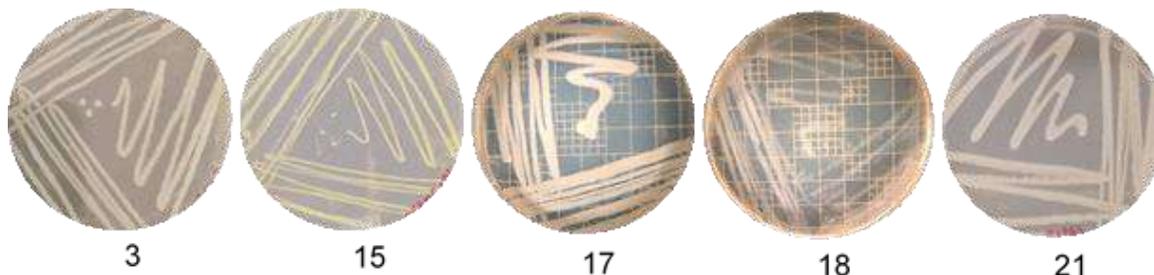
627 Identificación de bacterias en rizosfera

628

629 Se realizó una caracterización morfológica colonial para comenzar con la
630 identificación de los aislados seleccionados (Figura 1), en el cuadro 5 se
631 describe el aspecto del crecimiento bacteriano en medio de cultivo con base a
632 las características de las colonias bacterianas de acuerdo a la forma, borde,
633 elevación y superficie (Rojas-Triviño, 2011). De acuerdo a la observación
634 realizada al estereoscopio, las características presentadas por los aislados 17 y
635 21 podrían ser típicas de la morfología de especies pertenecientes al género
636 *Bacillus*, mientras que, los aislados 3 y 15 podrían pertenecer a géneros
637 *Arthrobacter*, *Erwinia* o *Micrococcus*. Acorde con la clasificación del Atlas Global
638 de las bacterias dominantes que se encuentran en el suelo, las especies del
639 género *Bacillus* pueden presentar una forma circular, un borde ondulado y una
640 superficie brillante, rugosa y cremosa, ahora bien, especies de géneros como
641 *Arthrobacter*, *Erwinia* o *Micrococcus* ya que, presentan formas puntiformes o
642 circulares, bordes filamentos, sin embargo, también podemos encontrar
643 lobulados, mayores elevaciones y superficies secas y mates (Delgado-
644 Baquerizo *et al.*, 2018). Las rizobacterias promotoras del crecimiento de las
645 plantas (PGPR, por sus siglas en inglés) podrían ser extracelulares (ePGPR) o
646 intracelulares (iPGPR) dependiendo del nivel de interacción con las células de
647 la raíz de la planta huésped (Ramadan *et al.*, 2016), y la mayoría de los géneros
648 bacterianos son ePGPR e incluyen: *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*,
649 *Azotobacter*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*,

650 *Micrococcus, Pseudomonas y Serratia* (Bhattacharyya y Jha, 2012; Jing *et al.*,
651 2014). Esto señala que estas bacterias podrían ser ePGPR.

652



653 *Figura 1.* Aislados de colonias bacterianas en medio LB 3, 15, 17, 18 y 21.

654

655 *Cuadro 5.* Análisis macroscópico de caracterización morfológica de colonias
656 bacterianas aisladas.

657

Aislado	Forma	Borde	Elevación	Superficie
3	Puntiforme	Filamentoso	elevada	Seca
15	Circular	Lobulado	elevada	Mate
17	Circular	Ondulado	convexa	Brillante
18	Irregular	Ondulado	plana	Rugosa
21	Circular	Ondulado	convexa	Cremosa

658

659 Análisis basado en el Atlas Global de las bacterias del suelo.

660

661 Más adelante se realizaron pruebas de Gram a los aislados previamente seleccionados
662 (3, 15, 17, 18 y 21), tomando como criterio que fueran Gram (+). Esto para descartar a
663 aquellas colonias que pudieran presentar características fitopatógenas de acuerdo a
664 Rojas-Triviño (2011), el cual indica que las colonias bacterianas pertenecientes al grupo
665 Gram (-) son, en su mayoría, inductores de enfermedades en plantas. Basados en la
666 viscosidad, los aislados 17 y 18 al agregar el hidróxido de potasio (KOH) al 3% se

667 observó un aspecto viscoso por lo que se determinó que la pared celular era Gram (-)
668 debido a que el alto pH del KOH ocasiona que el ADN de este tipo de bacterias se vuelva
669 grueso y viscoso, mientras que los aislados 3, 15 y 21 no presentaron viscosidad. Esto
670 debido a que no hubo ninguna alteración de la pared celular por lo que se determinó que
671 eran Gram (+). Con esta prueba se seleccionaron los aislados para la segunda fase
672 experimental y secuenciados para identificación, y fueron los aislados 3, 15 y 21.

673

674 El análisis comparativo de cada secuenciación se realizó utilizando BLAST (Basic Local
675 Alignment Search Tool). Este programa usa el algoritmo Smith-Waterman para realizar
676 sus alineamientos. Obteniendo los siguientes resultados (Cuadro 6). Las secuencias de
677 cada aislado puede encontrarlas en anexos.

678

679 *Cuadro 6.* Análisis a nivel molecular de los tres aislados seleccionados.

680

Aislado	Especie	Puntuación max	Valor de E	% de alineación
3	<i>Arthrobacter aurescens</i>	1382	0	94.94
15	<i>Arthrobacter ilicis</i>	1395	0	94.89
21	<i>Bacillus simplex</i>	1164	0	93.34

681

682 Análisis basado en el gen que codifica para el ARN ribosomal de la subunidad 16S entre
683 los aislados seleccionados mediante el programa BLAST. Los datos representan la
684 puntuación máxima obtenida, el valor de E y el % de alineación.

685

686 Este análisis permite conocer secuencias semejantes a las poblaciones de bacterias
687 que mostraron una tolerancia a Cd. Es interesante indicar que un género dominante
688 detectado en estos 3 aislados se relaciona con cepas resistentes a metales pesados,
689 tales como *Bacillus*, ya que, Khare S *et al.* (2010) informaron que *Bacillus* es un género
690 bacteriano que ha presentado una amplia resistencia al mercurio (Hg), además Kumar
691 A *et al.* (2010) indicaron que bacterias resistentes a metales pesados como *Bacillus*
692 pueden utilizarse en sitios contaminados que permitan la biorremediación de ambientes

693 contaminados. Las cepas del genero *Lysinibacillus* son ampliamente aplicadas en la
694 biorremediación de metales pesados, tales como Co, Cu, Cr y Pb (Tuzen *et al.*, 2007;
695 Peña-Montenegro *et al.*, 2013).

696 Ahora bien, el uso de especies bacterianas autóctonas de sitios contaminados
697 representa una alterativa preferible medioambientalmente y disminuye el costo de esta
698 tecnología, González-Chávez reportó (2005) que especies Gram positivas como
699 *Arthrobacter ramosus* y *A. aurescens*, se encuentran dentro de las bacterias que son
700 aisladas de manera más frecuente en ambientes contaminados por el hombre con
701 Elementos Potencialmente Tóxicos (EPTs), lo que indica que es posible que cepas
702 *Arthrobacter spp.* desempeñen también, un papel importante en la atenuación natural y
703 la remediación de sitios contaminados. Suzuki y Banfield (2004) reportaron un aislado
704 Gram + relacionado con *A. ilicis*, que acumuló uranio intracelularmente como
705 precipitados estrechamente asociados con gránulos de polifosfato en aguas
706 subterráneas. Lo cual indica que podrían ser especies utilizadas para la regeneración
707 de suelos.

708

709 **Establecimiento de la concentración máxima de cadmio en suelo que tolere** 710 ***Nicotiana glauca***

711

712 Curva hormética

713

714 El porcentaje de germinación de las semillas muestreadas fue del 80 % y la germinación
715 se dio entre el tercer y sexto día. Las mediciones de altura de las plantas, diámetro de
716 tallo y cantidad de clorofila se realizaron una vez por semana durante cuatro semanas
717 (Cuadro 7). No se encontró diferencia significativa a lo largo del tiempo, las plantas en
718 el suelo contaminado no mostraron síntomas de estrés como clorosis, necrosis o
719 marchitamiento (Figura 2), lo que indica que existe tolerancia de *N. glauca* al Cd. Con
720 estos resultados se estableció la concentración de 200 mg de Cd/Kg de suelo para la
721 siguiente fase experimental.



722 *Figura 2.* Plantas de *N. glauca* en el suelo contaminado con Cd.

723 *Cuadro 7.* Análisis de altura y diámetro de tallo para plantas sometidas a las
724 pruebas de tolerancia a Cd.

725

Tratamientos (mg Cd/Kg)	Altura (cm)	Tallo (mm)	Contenido de clorofila (Unidades spad)
T1 0	2.2 ± 0.1	2.6 ± 0.2	45 ± 0.2
T2 60	2 ± 0.2	2.2 ± 0.1	43 ± 0.3
T3 100	1.8 ± 0.3	2.4 ± 0.1	44.5 ± 0.2
T4 200	1.7 ± 0.2	2.4 ± 0.1	44 ± 0.4

726

727 Los datos representan la media ± DE (n=3) y letras diferentes indican una diferencia
728 significativa (P =0.05) usando la prueba de Tukey.

729

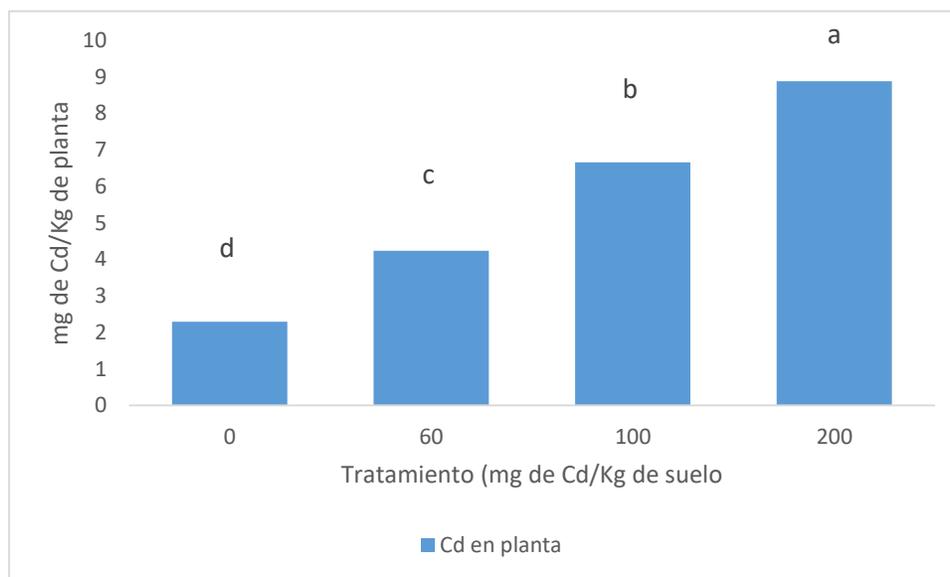
730 Cuantificación de cadmio en tejidos vegetales

731

732 Se cuantificó la cantidad de Cd acumulado por la planta, determinando en el material
733 vegetal, una diferencia significativa entre cada uno de los tratamientos así como, un
734 aumento en la concentración de Cd proporcional al contenido en los diferentes
735 tratamientos, observando que para el tratamiento de 60 mg de Cd/Kg de suelo hubo una
736 cantidad de 4.24 mg de cadmio acumulado por Kg de planta, mientras que, para el
737 tratamiento de 100 mg de Cd/Kg de suelo hubo 6.66 mg por Kg de planta y para la mayor
738 concentración (200 mg de Cd/Kg de suelo) fue de 8.887 (Figura 3), lo cual señala que

739 además de que existe una tolerancia al metal por parte de *N. glauca*, un potencial
740 fitorremediador parte de esta ya que, este metal pesado podría almacenarse en la raíz
741 o transportarse. En un estudio realizado por Oz Barazani *et al.* (2004) *N. glauca* fue
742 colocada en suelo extraído de la región minera de La Unión de Murcia con una
743 concentración de 50 ± 9.4 mg de Cd/Kg de suelo, la planta acumuló en seis meses, $8 \pm$
744 0.6 , el 16 % del cadmio que había en el terreno. Con lo obtenido en estas evaluaciones
745 se comprobó que *N. glauca* es una planta ideal para procesos de fitorremediación ya
746 que, no solamente es capaz de tolerar altas concentraciones de Cd, sino que también
747 puede absorber y almacenar concentraciones importantes de este metal en tiempos
748 relativamente cortos. Sin embargo, también representa grandes oportunidades para
749 mejorar la eficiencia de extracción y acumulación del contaminante.

750



751

752 *Figura 3.* Resultados de la cuantificación de Cd en planta para los diferentes
753 tratamientos (0, 60, 100 y 200 mg de Cd/Kg de suelo)

754 Los datos representan la media \pm DE (n=3) y letras diferentes indican una diferencia
755 significativa (P =0.05) usando la prueba de Tukey.

756

757

758 Evaluación de la relación planta-bacteria expuestas al Cd

759

760 Cultivo en *in vitro* de semillas y bacterias

761

762 El cultivo en *in vitro* de material vegetal se realizó con el objetivo de eliminar cualquier
763 interferencia y lograr condiciones asépticas para así analizar la relación de la planta con
764 las bacterias que presentaron mayor tolerancia al Cd en medio líquido, luego de la
765 germinación de las semillas de *Nicotiana glauca* inoculadas con las tres especies de
766 bacterias seleccionadas e identificadas, la medición de la longitud de raíz se realizó con
767 respecto al tejido radicular con mayor crecimiento para cada uno de los tratamientos, los
768 resultados se muestran en el Cuadro 8 (Figura 4), en donde se puede observar un
769 crecimiento constante en cada uno de los tratamientos. Durante la primera semana y la
770 última no hubo una diferencia significativa entre la longitud de las raíces de las semillas
771 inoculadas con *Arthrobacter aurescens* y el blanco, respecto al consorcio, es decir no
772 favoreció al desarrollo la inoculación de la cepa bacteriana. Sin embargo, si hubo una
773 diferencia significativa en la semana 2 y 3 entre *A. aurescens* y el blanco. Por otro lado,
774 si hubo una diferencia significativa a lo largo del ensayo experimental en las semillas
775 inoculadas con el consorcio y *A. ilicis* con respecto al blanco. Las semillas inoculadas
776 con el consorcio y *A. ilicis* alcanzaron longitudes de raíz de 1.6 y 1.37 cm, siendo los
777 tejidos radiculares que presentaron un mayor crecimiento.

778

779 **Cuadro 8.** Análisis de las mediciones de raíz de *N. glauca* germinada en *in vitro*
780 durante cuatro semanas para cada inoculo.

781

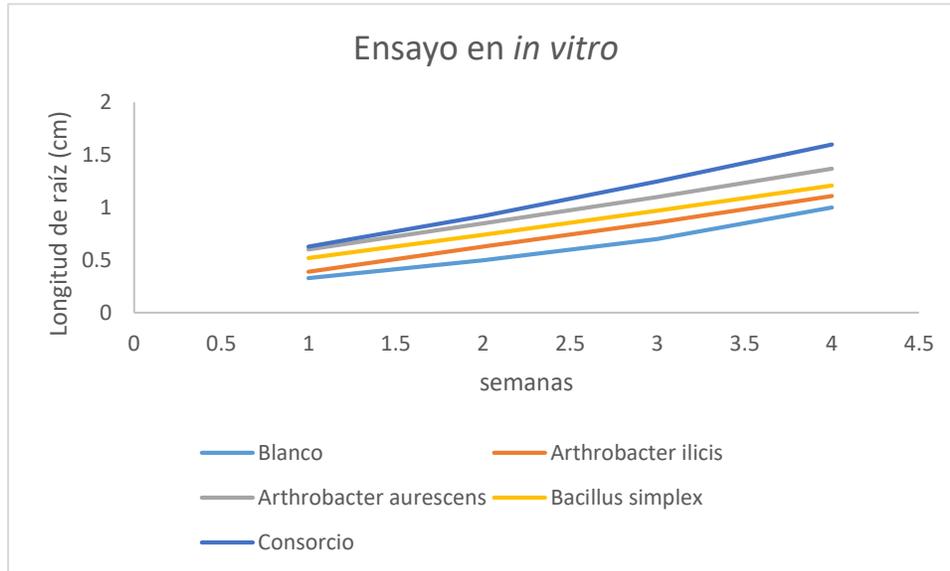
Tratamiento	Longitud de raíz (cm)			
	semana 1	semana 2	semana 3	semana 4
Consorcio	0.63 ± 0.05 a	0.92 ± 0.04 a	1.25 ± 0.04 a	1.6 ± 0.04 a
<i>Arthrobacter ilicis</i>	0.6 ± 0.05 ab	0.85 ± 0.04 a	1.1 ± 0.04 b	1.37 ± 0.04 b
<i>Bacillus simplex</i>	0.52 ± 0.01 b	0.74 ± 0.01 b	0.97 ± 0.01 c	1.21 ± 0.01 c
<i>Arthrobacter aurescens</i>	0.39 ± 0.03 c	0.63 ± 0.03 c	0.86 ± 0.03 d	1.11 ± 0.03 cd

Blanco 0.33 ± 0.03 c 0.5 ± 0.05 d 0.7 ± 0.05 e 1 ± 0.05 d

782

783 Se muestran los promedios para cada uno de los tratamientos en los cuatro tiempos \pm
784 DE (n=3) y letras diferentes indican una diferencia significativa (P =0.05) usando la
785 prueba de Tukey.

786



787 **Figura 4.** Resultados del monitoreo de longitud de raíz de semillas de *N. glauca* en
788 *in vitro* inoculadas con las cepas bacterianas.

789

790 El género *Bacillus* presenta una amplia diversidad fisiológica y por esa razón ha sido de
791 gran interés (Restrepo-Franco *et al.*, 2015), ya que presenta una amplia interacción en
792 diferentes hábitats, acuáticos y terrestres de manera directa, actuando como agente
793 rizosférico, degradador de sustratos derivados de la fauna y flora, compuestos
794 orgánicos, también podría estar involucrado en la producción de antibióticos,
795 crecimiento vegetal e indirectamente como antagonista de patógenos (Angulo-Cortes *et*
796 *al.*, 2012). Con este ensayo se demuestra que las tres especies bacterianas que fueron
797 aisladas de *N. glauca* presentaron la capacidad de promover crecimiento vegetal en *in*
798 *vitro*, sin embargo, en este análisis se puede observar que el consorcio presentó una

799 diferencia cada vez mayor durante el experimento lo cual indica que, el uso de
800 consorcios bacterianos autóctonos podría ser una gran alternativa en los procesos de
801 fitorremediación para la promoción del crecimiento vegetal.

802

803 Prueba en *in vivo* de la relación planta-bacteria expuestas al Cd

804

805 Las plantas fueron colocadas en arena de río caracterizada (cuadro 9) y esterilizada
806 previamente, las colonias bacterianas de *Arthrobacter aurescens*, *A. ilicis*, *Bacillus*
807 *simplex* se inocularon una semana después de contaminar el sustrato. Se midió la altura
808 de las plantas y el diámetro de los tallos una vez por semana durante las cuatro semanas
809 de la fase experimental y los resultados se muestran en los cuadros 10 y 11.

810

811 *Cuadro 9.* Caracterización fisicoquímica de la arena de río
812 utilizada en la prueba *in vivo* planta-bacteria expuestas al Cd

Suelo/Propiedad	Arena de río
Conductividad eléctrica	0.207
p H	8.5
MO (%)	0.9393
Densidad real (g/mL)	2.502
Densidad aparente (g/mL)	1.717
Capacidad de campo %	37.061
Arena (%)	91
Arcilla (%)	3.2
Limo (%)	5.8
Textura	Arenosa

813

814 En cuanto a la altura se puede observar en la figura 5 que, en la semana
815 1 no hubo una diferencia significativa entre el blanco y los tratamientos en los
816 que se inoculó el consorcio y *Bacillus simplex*, mientras que, si hubo una

817 diferencia significativa entre el blanco y los tratamientos en los que se inoculó
 818 *Arthrobacter ilicis*, *A. aurescens* y el control con cadmio. En la semana 2 el
 819 blanco y el consorcio no presentaron una diferencia significativa, sin embargo,
 820 en la semana 3 ninguno de los tratamientos a excepción del blanco presentó
 821 una diferencia significativa con respecto al control con cadmio. En la semana 4
 822 el mayor crecimiento se dio en las plantas que crecieron sin cadmio y con riegos
 823 de solución nutritiva, alcanzando 26.83 cm, mientras que las plantas de
 824 *Nicotiana glauca* a las que se le inocularon las 3 especies seleccionadas en
 825 consorcio alcanzaron una altura de 23.21 cm, estas plantas a las que se les
 826 inoculó el consorcio bacteriano alcanzaron una mayor altura que las plantas a
 827 las que solo se les agregó el cadmio, aunque, menor a las plantas del blanco.
 828 Las plantas inoculadas con *A. ilicis* y *B. simplex* muestran una altura para el
 829 tiempo 4 muy parecida alcanzando 21.52 y 21.40 respectivamente. Sin
 830 embargo, las plantas a las que se les añadió cadmio, pero no se les inoculo
 831 cultivos bacterianos alcanzaron en promedio una altura de 20.19 cm,
 832 demostrando así que, el blanco y el consorcio presentaron una diferencia
 833 significativa con respecto al control con cadmio.

834

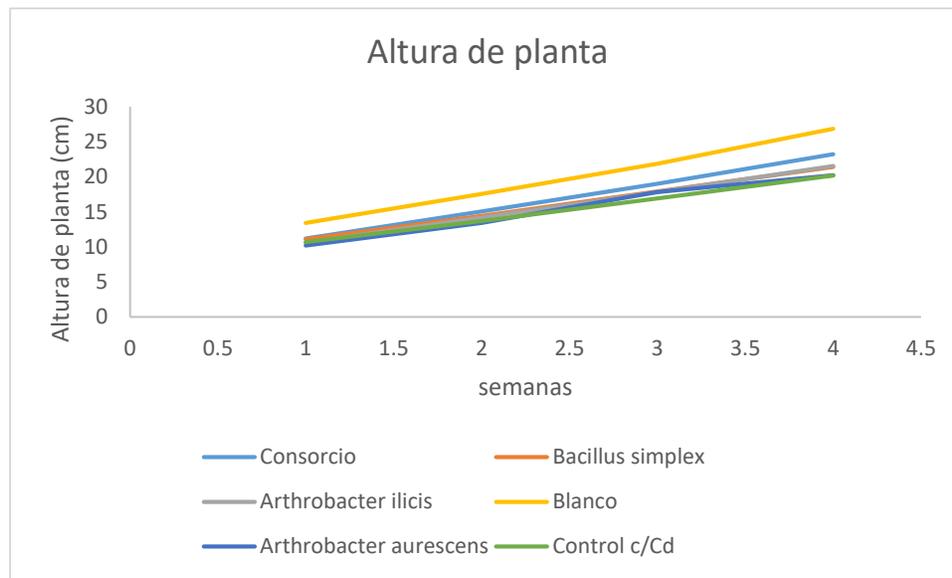
835 *Cuadro 10.* Análisis estadístico de las mediciones de altura de *N. glauca*

836

Tratamientos	Altura de plantas (cm)			
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Blanco	13.40 ± 1.94 a	17.53 ± 2.01 a	21.83 ± 2.10 a	26.83 ± 2.10 a
Consorcio	11.18 ± 1.81 ab	15.04 ± 1.76 ab	19.01 ± 1.73 b	23.21 ± 1.73 b
<i>Bacillus simplex</i>	11.09 ± 1.59 ab	14.41 ± 1.64 b	17.89 ± 1.64 b	21.40 ± 1.64 bc
<i>Arthrobacter ilicis</i>	10.60 ± 2.01 b	14.17 ± 2.04 b	17.82 ± 2.04 b	21.52 ± 2.04 bc
<i>Arthrobacter aurescens</i>	10.20 ± 1.79 b	13.40 ± 1.74 b	17.82 ± 2.13 b	20.21 ± 2.13 c
Control c/Cd	10.71 ± 1.50 b	13.68 ± 1.50 b	16.89 ± 1.52 b	20.19 ± 1.52 c

837

838 Los datos representan la media ± DE (n=3) y letras diferentes indican una diferencia
 839 significativa (P =0.05) usando la prueba de Tukey. Las plantas se colocaron en arena
 840 de río contaminada con Cd durante cuatro semanas de tratamiento inoculando una vez
 841 por semana las bacterias previamente seleccionadas.



843 *Figura 5.* Resultados del monitoreo de la altura de *N. glauca* en *in vivo* inoculadas
844 con las cepas bacterianas.

845

846 Ahora bien, en cuanto al diámetro de los tallos (Figura 6), durante la semana 1 no se
847 observaron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos, mientras que, en
848 la semana 2 no hay una diferencia entre el blanco y los tratamientos en los que se
849 inocularon las cepas bacterianas a las plantas de *N. glauca*, esto podría ser un indicador
850 de que las cepas bacterianas favorecieron la tolerancia de la planta al metal, ya que,
851 únicamente hubo una diferencia entre el blanco y el control con cadmio. En la semana
852 3 hubo diferencias significativas entre el blanco y todos los tratamientos excepto el
853 consorcio, esto se mantuvo también en la semana 4, semana en la que no hubo
854 diferencias significativas entre el control con cadmio y los tratamientos en plantas
855 inoculadas con *B. simplex* y *A. aurescens*. El mayor diámetro fue el del blanco con 1.81
856 cm y seguido de este, el consorcio bacteriano con 1.69 cm tratamiento que presentó una
857 diferencia significativa con respecto al blanco, luego *A. ilicis* con 1.53 cm, este
858 tratamiento y el del consorcio presentaron una diferencia significativa con respecto al
859 control con cadmio, seguido de este, *B. simplex* con 1.44 cm, luego *A. aurescens* con

860 1.42 cm y, por último, las plantas de *N. glauca* con solamente cadmio, las cuales
 861 alcanzaron un espesor de tallo aproximado de 1.31 cm.

862

863 *Cuadro 11.* Análisis estadístico de las mediciones del diámetro tallo de *N. glauca*

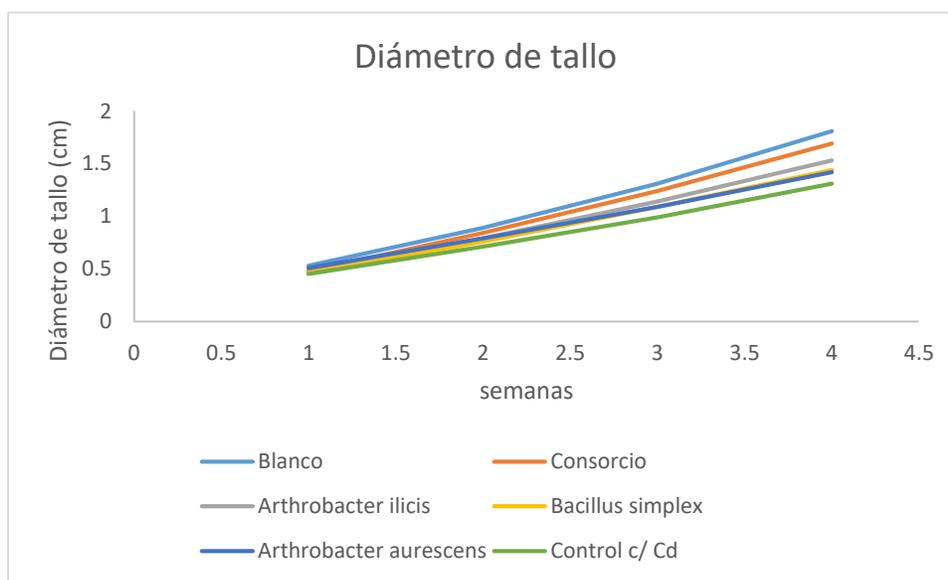
864

Tratamientos	Diámetro de tallo (cm)			
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Blanco	0.53 ± 0.11	0.89 ± 0.12 a	1.31 ± 0.12 a	1.81 ± 0.12 a
Consorcio	0.48 ± 0.13	0.84 ± 0.13 ab	1.24 ± 0.13 ab	1.69 ± 0.13 a
<i>Arthrobacter ilicis</i>	0.46 ± 0.09	0.79 ± 0.09 ab	1.14 ± 0.09 b	1.53 ± 0.09 b
<i>Bacillus simplex</i>	0.46 ± 0.11	0.76 ± 0.11 ab	1.09 ± 0.11 b	1.44 ± 0.11 bc
<i>Arthrobacter aurescens</i>	0.51 ± 0.13	0.79 ± 0.13 ab	1.09 ± 0.13 b	1.42 ± 0.13 bc
Control c/ Cd	0.45 ± 0.10	0.71 ± 0.10 b	0.99 ± 0.10 c	1.31 ± 0.10 c

865

866 Los datos representan la media ± DE (n=3) y letras diferentes indican una diferencia
 867 significativa (P =0.05) usando la prueba de Tukey. Las plantas se colocaron en arena
 868 de río contaminada con Cd durante cuatro semanas de tratamiento inoculando una vez
 869 por semana las bacterias previamente seleccionadas.

870



871 *Figura 6.* Resultados del monitoreo de los diámetros de tallo de *N. glauca* en *in vivo*
 872 inoculadas con las cepas bacterianas.

873

874 Se ha informado con frecuencia de la fitorremediación asistida por bacterias para la
875 eliminación de metales pesados del suelo (Ma *et al.*, 2006). Por ejemplo, la inoculación
876 de *Pseudomonas putida* promovió la biomasa de *Eruca sativa* bajo estrés por Cd
877 (Kamran *et al.*, 2015). La inoculación de SaMR12 bajo exposición a Cd aumentó la
878 biomasa de *S. alfredii* (Zhang *et al.*, 2011; Pan *et al.*, 2016). Con esto podríamos
879 determinar que el efecto de inocular rizobacterias en plantas de *N. glauca* para la
880 extracción de cadmio podría favorecer el crecimiento y desarrollo en sistemas de
881 fitorremediación.

882

883 Cuantificación de Cd en planta y suelo

884

885 Se cuantificó el Cd a la mitad y al final del experimento, es decir, cada 2 semanas, y los
886 resultados se muestran en los cuadros 12 y 13, observando con respecto al Cd en planta
887 que (Figura 7), para el tiempo 1 todos los tratamientos presentaron diferencia
888 significativa, y las plantas inoculadas con *Arthrobacter ilicis* y *Bacillus simplex* mostraron
889 el mejor resultado con 47.91 y 39.57 mg de Cd/Kg de suelo respectivamente, el
890 tratamiento con el consorcio alcanzó una extracción 37.33 mg de Cd/Kg de suelo. Al
891 final del experimento, todos los tratamientos presentaron una diferencia significativa con
892 respecto al control con cadmio, mientras que, en los tratamientos en los que se inoculó
893 *A. ilicis* y el consorcio, no existió una diferencia significativa. De los 200 mg de Cd/Kg de
894 suelo agregados, las plantas de *N. glauca* a las que se les inocularon *B. simplex*
895 alcanzaron la mayor extracción de Cd y acumularon un total de 54.87 mg de Cd/Kg de
896 suelo, el 27.43 % aproximadamente, mientras que, las 3 especies de colonias
897 bacterianas como consorcio, lograron extraer y acumular 51.38 mg de Cd/Kg de suelo,
898 el 25.69 % aproximadamente, y mostrando un resultado similar, el tratamiento en el que
899 se inoculó *A. ilicis* alcanzando 51.01 mg de Cd/Kg de suelo, el 25.50 %, seguido de estos
900 tratamientos se encuentra en el que se inoculó *A. aurescens* alcanzando 33.26 mg de
901 Cd/Kg de suelo, 16.63 % aproximadamente.

902

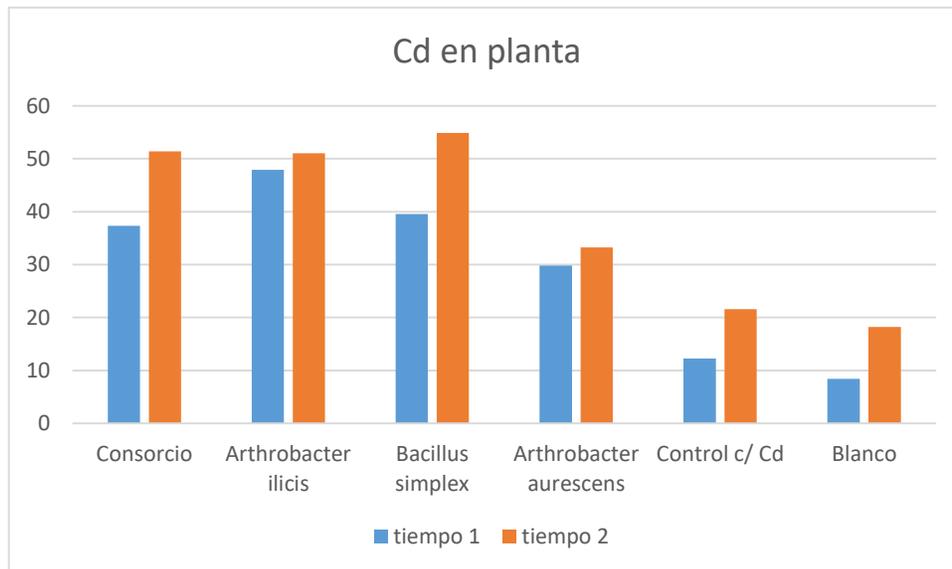
903

904 *Cuadro 12.* Resultados de la cuantificación de Cd en planta para los diferentes
905 tratamientos

Tratamiento	Cd en planta (mg de Cd/Kg suelo)	
	tiempo 1	tiempo 2
Consortio	37.33 ± 0.21 c	51.38 ± 0.09 b
<i>Arthrobacter ilicis</i>	47.91 ± 0.19 a	51.01 ± 0.17 b
<i>Bacillus simplex</i>	39.57 ± 0.19 b	54.87 ± 0.20 a
<i>Arthrobacter aurescens</i>	29.83 ± 0.17 d	33.26 ± 0.15 c
Control c/ Cd	12.27 ± 0.44 e	21.6 ± 0.50 d
Blanco	8.39 ± 0.09 f	18.24 ± 0.67 e

906

907 Los datos representan la media ± DE (n=3) y letras diferentes indican una diferencia
908 significativa (P =0.05) usando la prueba de Tukey. El análisis se hizo completamente al
909 azar por tiempos.



910 *Figura 7.* Resultados de la cuantificación de Cd en planta para los diferentes
911 tratamientos

912 El tratamiento que mostró la mayor diferencia extractiva del tiempo 1 al tiempo 2 fue el
913 del consorcio con 14.05 mg de Cd/ Kg de suelo, lo que podría deberse, principalmente

914 a que, para la absorción y acumulación de metales pesados por plantas es necesaria la
915 biodisponibilidad del metal y aunque depende de factores edáficos, en este caso
916 también se podría señalar la dinámica microbiana en la rizosfera y los exudados (Saeed
917 *et al.*, 2018). Estos resultados demuestran que la aplicación de rizobacterias de plantas
918 hiperacumuladoras utilizadas para la fitoextracción de cadmio puede regenerar suelos
919 contaminados con metales pesados de manera acelerada, efectiva y sostenible. Así
920 como, una selección adecuada de rizobacterias que sean PGPR en consorcio podrían
921 mostrar mejores resultados y aumentar la eficiencia en tecnologías de fitorremediación.

922 En estudios como planta fitorremediadora, *N. glauca*, ha presentado buenos resultados,
923 por ejemplo, se ha experimentado en suelo extraído de la región minera de La Unión de
924 Murcia con una concentración de 50 ± 6.4 mg de Cd/Kg de suelo, acumuló en seis
925 meses, 8 ± 0.6 , el 16 % del cadmio que había en el terreno. En este trabajo se aumentó
926 el porcentaje y podría deberse al uso de las rizobacterias, así como a la biodisponibilidad
927 del metal y al riego con solución nutritiva acidificada. Barajas-Aceves (2015) realizaron
928 un experimento para determinar los efectos de los relaves mineros solos, mezclados
929 con compost, o con compost más biosurfactante crudo, sobre la acumulación de metales
930 pesados (Pb, Zn, Cu, Cr, Cd y Ni) en *Acacia retinodes*, *Nicotiana glauca* y *Echinochloa*
931 *polystachya*. Las plantas se cultivaron un período de siete y cinco meses, las plantas *A.*
932 *retinodes* y *N. glauca* cultivadas en relaves mineros que contienen compost mostraron
933 aumentos en la biomasa seca del 62 al 79% en comparación con las plantas en relaves
934 únicos. Por otro lado, los metales pesados acumulados en las raíces y hojas mostraron
935 altas tasas de translocación de Cr y de Cd en *N. glauca*. Ahora bien, según el mismo
936 estudio, las concentraciones elevadas de Pb en las raíces y la baja tasa de translocación
937 de *N. glauca* indican que es adecuada para la fitoestabilización de Pb y Zn. Con esto se
938 puede comprobar que *Nicotiana glauca* es una planta capaz de ser utilizada para la
939 remediación de suelos contaminados con metales pesados.

940

941 En cuanto al Cd en suelo (Figura 8) se puede observar en el cuadro 13 que, para el
942 tiempo 1 todos los tratamientos presentaron diferencia significativa con respecto al
943 control con cadmio, por otro lado, *A. aurescens*, *B. simplex* y el consorcio no mostraron

944 diferencia significativa, en el suelo de las plantas control con Cd se determinó la mayor
 945 cantidad del contaminante 145.56 mg de Cd/Kg de suelo, seguido de este el suelo de
 946 las plantas a las que se inoculó *A. ilicis* se cuantificó 129.34 mg de Cd/Kg de suelo. Para
 947 el tiempo 2 todos los tratamientos presentaron diferencia significativa, el resultado más
 948 alto de cadmio aparece en el tratamiento contaminado con Cd sin ninguna colonia
 949 bacteriana inoculada con 143.93 mg de Cd/Kg de suelo y seguido de este el tratamiento
 950 en el que se inoculó *A. ilicis* a las plantas de *N. glauca* con 123.45 mg de Cd/ Kg de
 951 suelo, sin embargo, es también el tratamiento que presenta la mayor diferencia, ya que
 952 del tiempo 1 al tiempo 2 hubo una disminución de 5.89 mg de Cd/ Kg de suelo. Lo cual
 953 corresponde a los resultados previamente analizados, ya que al parecer es la especie
 954 que presentó una mejor simbiosis con *N. glauca* en la prueba en *in vitro* durante la
 955 segunda fase experimental.

956 **Cuadro 13.** Resultados de la cuantificación de Cd en suelo para los diferentes
 957 tratamientos

Tratamiento	Cd en suelo (mg de Cd/Kg suelo)	
	tiempo 1	tiempo 2
Consortio	120.81 ± 0.18 c	119.02 ± 0.31 c
<i>Arthrobacter ilicis</i>	129.34 ± 0.29 b	123.45 ± 0.65 b
<i>Bacillus simplex</i>	121.93 ± 0.12 c	117.12 ± 0.29 d
<i>Arthrobacter aurescens</i>	121.93 ± 5.82 c	111.22 ± 0.53 e
Control c/ Cd	145.56 ± 0.65 a	143.93 ± 0.53 a
Blanco	1.74 ± 0.05 d	17.66 ± 0.66 f

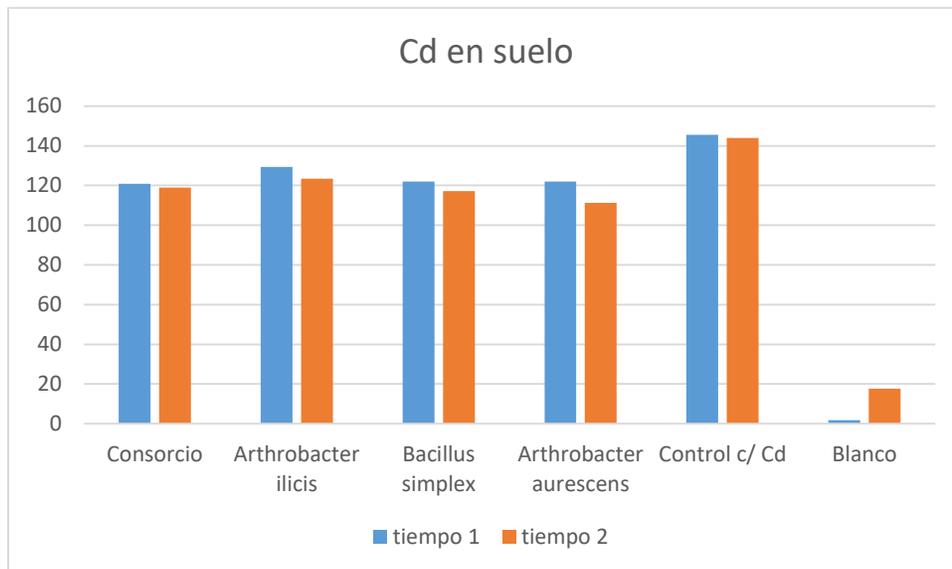
958

959 Los datos representan la media ± DE (n=3) y letras diferentes indican una diferencia
 960 significativa (P =0.05) usando la prueba de Tukey. El análisis se hizo completamente al
 961 azar por tiempos.

962

963

964



965 *Figura 8.* Resultados de la cuantificación de Cd en suelo para los diferentes
966 tratamientos

967 Conteo de especies bacterianas inoculadas

968

969 Los resultados del conteo de las colonias de especies bacterianas inoculadas, luego de
970 la prueba en *in vivo* planta bacteria expuestas al cadmio (cuadro 14), muestran que las
971 colonias bacterianas en conjunto como consorcio presentaron una diferencia significativa
972 con respecto a los demás tratamientos durante todo el experimento, ya que, en el tiempo
973 1 se determinaron 3.21×10^8 UFC/g y para el tiempo 2, 4.88×10^8 , mientras que, *Bacillus*
974 *simplex* y *Arthrobacter aurescens* mostraron resultados similares con 1.31×10^8 y
975 1.27×10^8 respectivamente, y en el tiempo 2, 3.49×10^8 y 3.43×10^8 UFC/g respectivamente.
976 *A. ilicis* presentó un conteo de 1.03×10^8 en el tiempo 1 y en el tiempo 2 3.11×10^8 . Estos
977 tres últimos tratamientos no presentaron diferencia significativa durante el ensayo
978 experimental, así como los tratamientos blanco y control. Estos resultados (figura 9)
979 pueden deberse a que, a pesar de que estas especies presentan una tolerancia alta al
980 Cd por estar presentes de manera natural en jales mineros y, por lo tanto, son más
981 resistentes a la toxicidad del metal, también podría estar inhibiendo el crecimiento y la

982 proliferación de *A. ilicis*. Sin embargo, estas bacterias bajo estrés podrían aumentar la
 983 producción de metabolitos, incluyendo fitohormonas, sideróforos, ácidos orgánicos,
 984 antibióticos y enzimas que reducen la toxicidad de los metales, así como mejorando de
 985 las capacidades de las plantas para una mayor extracción del Cd (Saeed, 2018).

986

987 **Cuadro 14.** Resultados del conteo de colonias bacterianas.

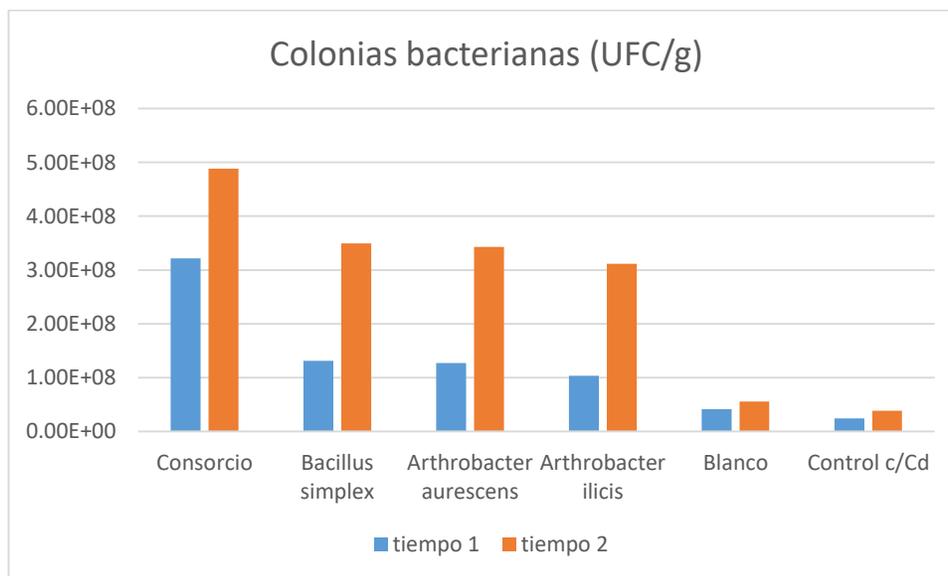
Tratamiento	Conteo de colonias bacterianas (UFC/g)			
	tiempo 1	Desv Est	tiempo 2	Desv Est
Consortio	3.21E+08 a	4.08E+07	4.88E+08 a	2.12E+07
<i>Bacillus simplex</i>	1.31E+08 b	1.21E+07	3.49E+08 b	4.62E+07
<i>Arthrobacter eurescens</i>	1.27E+08 b	2.19E+07	3.43E+08 b	2.66E+07
<i>Arthrobacter ilicis</i>	1.03E+08 b	1.53E+07	3.11E+08 b	2.73E+07
Blanco	4.13E+07 c	5.03E+06	5.60E+07 c	5.29E+06
Control c/Cd	2.47E+07 c	9.02E+06	3.87E+07 c	7.57E+06

988

989 Los datos representan la media \pm DE (n=3) y letras diferentes indican una diferencia
 990 significativa (P =0.05) usando la prueba de Tukey. El análisis se hizo completamente al
 991 azar por tiempos.

992

993



994 *Figura 9.* Resultados del conteo de colonias bacterianas en planta para los
995 diferentes tratamientos

996

997 Por ejemplo, los PGPR producen biosurfactantes que aumentan la movilidad y la
998 absorción de metales y metaloides tóxicos (Ashraf *et al.*, 2017). Estos restos inducen la
999 desorción de metales del suelo y aumentan su solubilidad (Gadd, 2010; Rajkumar *et al.*,
1000 2012). Los biosurfactantes producidos por *Pseudomonas aeruginosa* aumentan la
1001 desorción y la solubilidad tanto del plomo (Pb) como del Cd (Ullah *et al.*, 2015). La
1002 regulación del pH por los inóculos microbianos, *Microbacterium liquefaciens* y *M.*
1003 *arabinogalactanolyticum* aumentó la absorción de Ni mucho más por la planta
1004 hiperacumuladora Sweet alyssum (*Alyssum murale L.*) en comparación con el control no
1005 inoculado (Abou-Shanab *et al.*, 2003). Esta elevada absorción de Ni se atribuyó a la
1006 reducción significativa del pH del suelo por las bacterias de la rizosfera (Abou-Shanab *et*
1007 *al.*, 2003; Rajkumar *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2011). Las bacterias promotoras del
1008 crecimiento de las plantas no solo mejoran el crecimiento y el desarrollo de las plantas
1009 en condiciones estresantes, sino que también reducen la toxicidad de los metales
1010 pesados a través de este sistema neutralizador de ROS (Saeed, 2018). Pueden ser
1011 diversas las funciones y actividades de las cepas bacterianas involucradas en
1012 mecanismos de fitoextracción, sin embargo, es importante un proceso de selección para
1013 generar mayores rendimientos y optimizar esta tecnología.

1014

1015

1016

1017

1018

1019

1020

VII. CONCLUSIONES

1021

1022

1023

1024

1025

1026

1027

1028

1029

La contaminación en suelos por metales pesados plantea serios desafíos. Su persistencia y bioacumulación en nichos ecológicos representa riesgos para la salud humana, así como del medio ambiente, por esto se vuelve cada vez más necesario idear soluciones sostenibles para retirar estos contaminantes del entorno. Diversas tecnologías se han implementado y se siguen desarrollando para regenerar los sitios contaminados con metales pesados, entre esas tecnologías, la fitorremediación ha demostrado ser una alternativa segura e innovadora para la eliminación de metales pesados en suelos.

1030

1031

1032

1033

1034

1035

1036

1037

En este estudio se aislaron 25 cepas bacterianas de la rizosfera de *Nicotiana glauca* de los jales de Maconí, Querétaro, México, lo que representa una biodiversidad disponible para desarrollar estrategias de fitorremediación ya que, estas bacterias demostraron tener la capacidad de tolerar el Cd y ser promotoras de crecimiento vegetal, cualidades importantes que se necesitan para la recuperación de suelos en zonas ampliamente contaminadas por actividades mineras, sin embargo, los resultados indican la necesidad de explorar la microfauna de suelos contaminados con metales pesados para ser utilizados en fitorremediación.

1038

1039

1040

1041

1042

1043

1044

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran a las bacterias *Arthrobacter eurescens*, *A. ilicis* y *Bacillus simplex*, como bacterias capaces de tolerar altas concentraciones de cadmio, además de favorecer el crecimiento vegetal en sistemas de fitorremediación. Esto nos permite concluir que estas especies bacterianas son una alternativa biológica en la remoción de metales en ambientes contaminados con los mismos, ya que podrían participar en simbiosis con plantas metalofitas bioacumuladoras y consecuentemente incrementar la resistencia y absorción de Cd.

1045

1046

1047

Sin embargo, se requiere del entendimiento de los factores químicos, físicos y biológicos que afectan las vías de biotransformación, las dinámicas bacterianas en rizosfera y la bioquímica celular involucrada, lo que exige la participación interdisciplinaria

1048 para la comprensión de los procesos involucrados, para lo cual la realización de ensayos
1049 en *in vitro* ofrece un medio controlado para la obtención de mayor información en la
1050 biorrecuperación de suelos contaminados por metales pesados.

1051 En este estudio se comprobó la capacidad hiperacumuladora de *Nicotiana*
1052 *glauca*, al tolerar una concentración en suelo de 200 mg de Cd/Kg de suelo y logró una
1053 remoción de Cd del 27.43 % del metal en suelo en asociación con *Bacillus simplex*, lo
1054 que indica que la aplicación de sistemas planta bacteria produce una mayor eficiencia de
1055 esta tecnología en entornos controlados, lo que sugiere el uso integrado de estos agentes
1056 biológicos para remediar los sitios contaminados con metales de manera sostenible.

1057 Las bacterias simbióticas presentes en la rizosfera ofrecen un campo de estudio
1058 nuevo con un importante potencial para su uso, sin embargo, se vuelve un requerimiento
1059 indispensable estudiarlas más a profundidad, ya que, como se observa en este estudio
1060 y en reportes anteriores, el empleo de rizobacterias junto con plantas hiperacumuladoras
1061 de metales pesados puede aumentar el potencial de fitorremediación muchas veces más
1062 que el uso exclusivo de cualquiera de estos agentes biológicos. Cabe recalcar que la
1063 utilidad de las bacterias rizosféricas dependerá del nivel de contaminación, del tipo de
1064 contaminante del suelo y de los objetivos establecidos para la recuperación.

1065

1066

1067

1068

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1069

1070

- Aafi NE, Brhada F, Dary M, Maltouf AF, Pajuelo E. (2012). Rhizostabilization of metals in soils using *Lupinus luteus* inoculated with the metal resistant rhizobacterium *Serratia* sp. MSMC 541. *Int J Phytorem.*

1071

1072

1073

1074

1075

- Abou-Shanab, R.A., Angle, J.S., Delorme, T.A., Chaney, R.L. van Berkum, P., Moawad, H., Ghanem, K., Ghozlan, H.A., (2003). Rhizobacterial effects on nickel extraction from soil and uptake by *Alyssum murale*. *New Phytol.* 158, 219-224.

1076

1077

1078

1079

- Agency for Toxic Substances & Disease Registry (ATSDR). 2012. Public Health Statement for Cadmium <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=48&tid=15>
- Ahemad, M.; Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *J. King Saud Univ.-Sci.* 26, 1–20.

1080

1081

1082

1083

- Akcil A, Erust C, Ozdemiroglu S, Fonti V, Beolchini F. (2015). A review of approaches and techniques used in aquatic contaminated sediments: metal removal and stabilization by chemical and biotechnological processes. *J Clean Prod.*

1084

1085

1086

1087

- Angulo-Cortés, J. P., García-Díaz, A., Pedroza, A. M., Martínez-Salgado, M. M., & Gutiérrez-Romero, V. (2012). Diseño de un medio para la producción de un co-cultivo de bacterias fosfato solubilizadoras con actividad fosfatasa. *Universitas Scientiarum*, 17 (1), 43-52.

1088

1089

1090

- Ashraf, M.A., Hussain, I., Rasheed, R., Iqbal, M., Riaz, M., Arif, M.S., (2017). Advances in microbe-assisted reclamation of heavy metal contaminated soils over the last decade: A review. *J. Environ. Manage.* 198, 132-143.

1091

1092

1093

1094

- Barajas-Aceves Martha; Dante Camarillo-Ravelo; Refugio Rodríguez-Vázquez. (2015). Movilidad y translocación de metales pesados de relaves mineros en tres especies de plantas después de la modificación con compost y biosurfactante. *Contaminación de suelos y sedimentos.* DOI: 10.1080/15320383.2015.946593.

1095

1096

1097

1098

1099

- Bhattacharyya, P.; Jha, D. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 1327–1350.

1100

1101

1102

1103

- Belimov AA, Safranova VI, Sergeyeva TA, Egorova TN, Matveyeva VA, Tsyganov VE, et al. (2001). Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Can J Microbiol*; 47:642–52.

1104

1105

1106

1107

1108

- Bolan, N., Kunhikrishnan, A., Thangarajan, R., Kumpiene, J., Park, J., Makino, T., Kirkham, M.B., Scheckel, K., (2014). Remediation of heavy metal(loid)s contaminated soils e to mobilize or to immobilize? *J. Hazard. Mater.* 266, 141e166.

1109

1110

- Bucker-Neto, L.; Paiva, A.L.S.; Machado, R.D.; Arenhart, R.A.; Margis-Pinheiro, M. (2017) Interactions between plant hormones and heavy metals responses. *Genet. Mol. Biol.*, 40 (Suppl. 1), 373–386.

- Burd, G.I., Dixon, D.G., Glick, B.R., (2000). Plant growth promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Can. J. Microbiol.* 46, 237-245.

- Capó Martí M.A., (2007) Principios de ecotoxicología: diagnóstico, tratamiento y gestión del medio ambiente. Editorial Tebar.

- 1111 • Caviedes Rubio, D. I., Muñoz Calderón, R. A., Perdomo Gualtero, A., Rodríguez
1112 Acosta, D., & Sandoval Rojas, I. J. (2015). Tratamientos para la Remoción de
1113 Metales Pesados Comúnmente Presentes en Aguas Residuales Industriales. Una
1114 Revisión. *Ingeniería y Región*, 13(1), 73–90.
- 1115 • Delgado-Baquerizo, M., A. M. Oliverio, T. Brewer, A. Benavent-González, D. J.
1116 Eldridge, R. D. Bardgett, F. T. Maestre, B. K. Singh & N. Fierer (2018). A global
1117 atlas of the dominant bacteria found in soil. *Science*.
1118 DOI:10.1126/science.aap9516
- 1119 • Dell'Amico E, Cavalca L, Andreoni V. (2005). Analysis of rhizobacterial
1120 communities in perennial Graminaceae from polluted water meadow soil, and
1121 screening of metal-resistant, potentially plant growth-promoting bacteria. *FEMS*
1122 *Microbiol Ecol*; 52:153–62.
- 1123 • Detmann, K.C., Araújo, W.L., Martins, S.C.V., Sanglard, L.M., Reis, J.V. (2012).
1124 Silicon nutrition increases grain yield, which, in turn, exerts a
1125 feedforward stimulation of photosynthetic rates via enhanced mesophyll conductance
1126 and alters primary metabolism in rice. *New Phytol.* 196, 752–762. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04299.x>.
- 1127
- 1128 • Dhankher, O.P., Li, Y., Rosen, B.P., Shi, J., Salt, D., Senecoff, J.F., Sashti, N.A.,
1129 Meagher, R.B., Salt, D.E. (2002). Engineering tolerance and hyperaccumulation
1130 of arsenic in plants by combining arsenate reductase and gamma-
1131 glutamylcysteine synthetase expression. *Nature Biotechnol.* 20, 1140–1145.
- 1132 • Dziubanek, G., Piekut, A., Rusin, M., Baranowska, R., Hajok, I. (2015).
1133 Contamination of food crops grown on soils with elevated heavy metals content.
1134 *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 118, 183–189.
- 1135 • Gadd, G.M. (2010). Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and
1136 bioremediation. *Microbiol.* 156, 609–643.
- 1137 • Gamalero, E., Lingua, G., Berta, G., Glick, B. R. (2009). Beneficial role of plant
1138 growth promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on plant responses to
1139 heavy metal stress. *Can. J. Microbiol.* 55, 501–514.
- 1140 • Greenwood N.N., Earnshaw A. *Chemistry of the Elements* 2nd ed. Elsevier
1141 Science, (2012).
- 1142 • Glick, B. R., (2010). Using soil bacteria to facilitate phytoremediation,
1143 *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc., 28(3), pp. 367–374. doi:
1144 10.1016/j.biotechadv.2010.02.001.
- 1145 • González-Chávez, Ma. del Carmen Ángeles (2005). Recuperación de suelos
1146 contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismos
1147 rizosféricos Terra Latinoamericana, Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo,
1148 A.C. Chapingo, México. pp. 29-37
- 1149 • Guarino, C., and Sciarrillo, R. (2017). Effectiveness of in situ application of an
1150 Integrated 920 Phytoremediation System (IPS) by adding a selected blend of
1151 rhizosphere microbes to 921 heavily multi-contaminated soils. *Ecol. Eng.* 99, 70–
1152 82.

- 1153 • Gupta, A.; Joia, J.; Sood, A.; Sood, R.; Sidhu, C.; Kaur, G. (2016). Microbes as
1154 potential tool for remediation of heavy metals: A review. *J. Microb. Biochem.*
1155 *Technol.* 8, 364–372.
- 1156 • Gupta, D.K., Chatterjee, S., Datta, S., Veer, V., Walther, C. (2014). Role of
1157 phosphate fertilizers in heavy metal uptake and detoxification of toxic metals.
1158 *Chemosphere* 108,134–144.
- 1159 • Hammer D., Kayser A., Keller C. (2003). Phytoextraction of Cd and Zn with *Salix*
1160 *viminialis* in field trials. DOI: 0.1079/SUM2002183 URL:
1161 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1475-2743.2003.tb00303.x>
- 1162 • Han, H., Cai, H., Wang, X., Hu, X., Chen, Z., & Yao, L. (2020). Heavy metal-
1163 immobilizing bacteria increase the biomass and reduce the Cd and Pb uptake by
1164 pakchoi (*Brassica chinensis* L.) in heavy metal-contaminated soil. *Ecotoxicology*
1165 *and Environmental Safety*, 195, 110375. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.110375
- 1166 • Hussein HS. (2008). Optimization of plant-bacteria complex for phytoremediation
1167 of contaminated soils. *Internat J Bot*; 4:437–43.
- 1168 • Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC). Fuentes de
1169 contaminación en México (2007) URL:
1170 <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/372/fuentes.html>
- 1171 • Jabeen, R.; Ahmad, A.; Iqbal, M. (2009). Phytoremediation of heavy metals:
1172 Physiological and molecular mechanisms. *Bot. Rev.* 75, 339–364.
- 1173 • Jalili, F., Khavazi, K., Pazira, E., Nejati, A., Rahmani, H. A., Sadaghiani, H. R.,
1174 Miransari, M. (2009). Isolation and characterization of ACC deaminase producing
1175 fluorescent pseudomonads, to alleviate salinity stress on canola (*Brassica napus*
1176 L.) growth. *J. Plant Physiol.* 166, 667–674.
- 1177 • Jan, A.T.; Azam, M.; Ali, A.; Haq, Q.M.R. (2014). Prospects for exploiting bacteria
1178 for bioremediation of metal pollution. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 44, 519–
1179 560.
- 1180 • Jing YX, Yan JL, He HD, Yang DJ, Xiao L, Zhong T, Li SB (2014). Characterization
1181 of bacteria in the rhizosphere soils of *Polygonum pubescens* and their potential in
1182 promoting growth and Cd, Pb, Zn uptake by *Brassica napus*.
- 1183 • Jutsz, A.M.; Gnida, A. (2015). Mechanisms of stress avoidance and tolerance by
1184 plants used in phytoremediation of heavy metals. *Arch. Environ. Prot.* 41, 104–
1185 114.
- 1186 • Kabata-Pendias, A. Trace. (2000). *Elements in Soils and Plants*. 3rd ed., CRC
1187 Press.
- 1188 • Kamran, M.A., Syed, J.H., Eqani, S.A.M.A.S., Munis, M.F.H., Chaudhary, H.J.,
1189 (2015). Effect of plant growth-promoting rhizobacteria inoculation on cadmium
1190 (Cd) uptake by *Eruca sativa*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 9275-9283.
- 1191 • Khan, M.S., Zaidi, A., Wani, P.A., Oves, M. (2009). Role of plant growth promoting
1192 rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils: A Review. *Sus. Agri.*
1193 *Rev.* 1, 319-350.
- 1194 • Khare S, Ahmed N, Pant S, Das R. (2010). Characterization and evaluation of
1195 heavy metal tolerance of bacterial species from soil of waste area near Riyan steel
1196 rolling mills, Muzaffarnagar, India. *Journal of Applied Natural Science.* 2:88–92.

- 1197 • Krumova, E.; Kostadinova, N.; Miteva-Staleva, J.; Gryshko, V.; Angelova, M.
1198 (2016). Cellular response to Cu-and Zn-induced oxidative stress in aspergillus
1199 fumigatus isolated from polluted soils in Bulgaria. CLEAN Soil Air Water 44, 657–
1200 666.
- 1201 • Kuffner, M., Poschenrieder, M., Wieshammer, G., Gorfer, M., Sessitsch, A. (2008).
1202 Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating
1203 willows. Plant Soil. 304, 35–44.
- 1204 • Kumar A, Singh Bisht B, Datt Joshi V. (2010). Biosorption of Heavy Metals by four
1205 acclimated microbial species, Bacillus spp., Pseudomonas spp., Staphylococcus
1206 spp. and Aspergillus niger. Journal of Biological and Environmental Sciences.
1207 4(12):97–108.
- 1208 • Kushwaha, B.K., Singh, S., Tripathi, D.K., Sharma, S., Prasad, S.M., Chauhan,
1209 D.K., Kumar, V., Singh, V.P. (2019). New adventitious root formation and primary
1210 root biomass accumulation are regulated by nitric oxide and reactive oxygen
1211 species in rice seedlings under arsenate stress. J. Hazard. Mater. 361.
- 1212 • Lasat, M.M. (2002). Phytoextraction of toxic metals: a review of biological
1213 mechanisms. J. Environ. Qual. 31, 109–120.
- 1214 • Li WC, Ye ZH, Wong MH. (2007). Effects of bacteria on enhanced metal uptake of
1215 the Cd/Zn hyperaccumulating plant, Sedum alfredii. J Exp Bot 58:4173–82.
- 1216 • Liu, Z.F., Ge, H.G., Li, C., Zhao, Z.P., Song, F.M., Hu, S.B. (2015). Enhanced
1217 phytoextraction of heavy metals from contaminated soil by plant co-cropping
1218 associated with PGPR. Water Air Soil Pollut. 226, 29.
- 1219 • Ma, Y., Prasad, M.N., Rajkumar, M., Freitas, H. (2011). Plant growth promoting
1220 rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils.
1221 Biotechnol. Adv. 29, 248-258.
- 1222 • Ma, Y. (2016) 'Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal
1223 phytoremediation', Journal of Environmental Management. Elsevier Ltd, 174, pp.
1224 14–25. doi: 10.1016/j.jenvman.2016.02.047.
- 1225 • Mahbub, K.R., Krishnan, K., Andrews, S., Venter, H., Naidu, R., Megharaj, M.
1226 (2017). Bio-augmentation and nutrient amendment decrease concentration of
1227 mercury in contaminated soil. Sci. Total Environ. 576, 303e309.
- 1228 • Martínez-Viveros, O.; Jorquera, M.; Crowley, D.; Gajardo, G.; Mora, M. (2010).
1229 Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by
1230 rhizobacteria. J. Soil Sci. Plant Nutr. 10, 293–319.
- 1231 • Mason, Robert P., Wiley-Blackwell. Méndez, L., Salas-Flores, L.M., Arreola-
1232 Lizarraga, A., Alvarez-Castañeda, S.T., Acosta, B. Trace Metals in Aquatic
1233 Systems. 1st ed. (2013).
- 1234 • Nattero, J., Sérsic, A.N., Cocucci, A.A., (2010). Patterns of contemporary
1235 phenotypic selection and flower integration in the hummingbird-pollinated
1236 Nicotiana glauca between populations with different flower-pollinator
1237 combinations. Oikos 119.
- 1238 • NMX-AA-132-SCFI-2016 [nmx-aa-132-scfi-2016.pdf \(economia-nmx.gob.mx\)](http://www.economia-nmx.gob.mx/nmx-aa-132-scfi-2016.pdf)
- 1239 • NOM-021-RECNAT (2000) 'Nom-021-Recnat', Diario Oficial De La Federación.
- 1240 • NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004:
- 1241 http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4964569&fecha=02/03/2007

- 1242 • O'Brien, S. and A. Buckling (2015). The sociality of bioremediation Hijacking the
1243 social lives of microbial populations to clean up heavy metal contamination. EMBO
1244 reports 16: 1241-1245. doi: <https://doi.org/10.15252/embr.201541064>.
- 1245 • Oz Barazani, Peramachi Satiyamoorthy, Utam Manandhar, Raya Vulkan, Avi
1246 Golan-Goldhirsh (2004). Heavy metal accumulation by *Nicotiana glauca* Graham
1247 in. Elsevier, 868.
- 1248 • Pan, F., Meng, Q., Luo, S., Shen, J., Chen, B., Khan, K. Y., Japenga, J., Ma, X.,
1249 Yang, X., Feng, Y. (2017). Enhanced Cd extraction of oilseed rape (*Brassica*
1250 *napus*) by plant growth promoting bacteria isolated from Cd hyperaccumulator
1251 *Sedum alfredii* Hance. *Int. J. Phytoremediation*. 19, 281-289
- 1252 • Pandey, S., Ghosh, P.K., Ghosh, S., De, T.K., Maiti, T.K. (2013). Role of heavy
1253 metal resistant *Ochrobactrum* sp. and *Bacillus* spp. strains in bioremediation of a
1254 rice cultivar and their PGPR like activities. *J. Microbiol*. 51, 11-17.
- 1255 • Peña-Montenegro T, Dussán J. (2013). Genome sequence and description of the
1256 heavy metal tolerant bacterium *Lysinibacillus sphaericus* strain OT4b.31.
1257 *Standards in Genomic Sciences*. 9(1):42–56.
- 1258 • Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M., Freitas, H. (2010). Potential of
1259 siderophoreproducing bacteria 1194 for improving heavy metal phytoextraction.
1260 *Trends Biotechnol*. 28, 142-149.
- 1261 • Rajkumar, M., Sandhya, S., Prasad, M., Freitas, H. (2012). Perspectives of
1262 plantassociated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnol. Adv*. 30,
1263 1562-1574.
- 1264 • Ramadan, E.M.; AbdelHafez, A.A.; Hassan, E.A.; Saber, F.M. (2016). Plant growth
1265 promoting rhizobacteria and their potential for biocontrol of phytopathogens. *Afr.*
1266 *J. Microbiol. Res*. 10, 486–504.
- 1267 • Rascio, N.; Navarilzo, F. (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: How
1268 and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Sci*. 180, 169–
1269 181.
- 1270 • Raskin I, Ensley BD. (2000). *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to*
1271 *Clean Up the Environment*. New York: Wiley-Interscience.
- 1272 • Reeves R D, Baker A J M. (2000). Metal-accumulating plants. In Raskin I, Ensley
1273 B D (eds.) *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean Up the*
1274 *Environment*. John Wiley & Sons, Hoboken. pp. 193–221.
- 1275 • Restrepo-Franco, G. M., Marulanda-Moreno, S., FePérez, Y. D. L., Díaz-de la Osa,
1276 A., Baldani, V., & Hernández-Rodríguez, A. (2015). Bacterias solubilizadoras de
1277 fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos
1278 de importancia económica. *Embrapa Agrobiologia-Artigo en periódico indexado*
1279 (ALICE).
- 1280 • Rodríguez M, Martínez N, Romero M., Del Río L, Sandalio M. (2008). Toxicología
1281 del cadmio en plantas. *Rev. Cientif y Tecn de Ecol y Med Am*.
- 1282 • Rojas-triviño, A. (2011). 'Conceptos Y Práctica General'.
- 1283 • Saeed Ahmad Asad, Muhammad Farooq, Aftab Afzal, Helen West (2018).
1284 Integrated phytobial heavy metals remediation strategies for sustainable clean
1285 environment - A review, *Chemosphere*, doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.11.021

- 1286
1287
1288
1289
1290
1291
1292
1293
1294
1295
1296
1297
1298
1299
1300
1301
1302
1303
1304
1305
1306
1307
1308
1309
1310
1311
1312
1313
1314
1315
1316
1317
1318
1319
1320
1321
1322
1323
1324
1325
1326
1327
1328
1329
- Sangthong, C., Setkit, K., Prapagdee, B. (2016). Improvement of cadmium phytoremediation after soil inoculation with a cadmium resistant *Micrococcus* sp. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23.
 - Santana-Flores, A., A. Sánchez-Ayala, Y. Romero-Ramírez, E. Toledo-Hernández, S. Á. Ortega-Acosta y J. Toribio-Jiménez (2020). Aislamiento e identificación de bacterias tolerantes y bioacumuladoras de metales pesados, obtenidas de los jales mineros El Fraile, México. *Terra Latinoamericana* 38: 67-75. DOI: <https://doi.org/10.28940/terra.v38i1.430>
 - Santos J. (2013). Influencia de jales mineros sobre el río Maconí, Querétaro, y evaluación del proceso de atenuación natural por dispersión. *Boletín de la sociedad Geológica Mexicana*. Volumen 65; Núm. 3. p 645-660 URL: <http://www.ojs-igl.unam.mx/index.php/bsgm/article/viewFile/483/245>
 - Sarwar, N. et al. (2017). 'Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: Modifications and future perspectives', *Chemosphere*. Elsevier Ltd, 171, pp. 710–721. doi: 10.1016/j.chemosphere.
 - SEMARNAT (2016) [Programa Nacional Remediación Sitios Contaminados.pdf \(www.gob.mx\)](http://www.gob.mx).
 - Sheoran A S, Sheoran V, Poonia P. (2008). Rehabilitation of mine degraded land by metallophytes. *Min Eng J*.
 - Skoog D, Holler F, Stanley R. (2008). *Principios de Análisis Instrumental*. México. Edamsa Impresiones.
 - Sontakke s, Cadenas mb, Maggi rg, Diniz pp, Breitschwerdt eb. (2009). Use of broad range 16S rDNA PCR in clinical microbiology. *J Microbiol Methods*; 76.
 - Thiem, D., Złoch, M., Gadzała-Kopciuch, R., Szymańska, S., Baum, C., Hryniewicz, K. (2018). Cadmium-induced changes in the production of siderophores by a plant growth promoting strain of *Pseudomonas fulva*. *J. Basic Microbiol.* 58, 623–632.
 - Tirry, N. (2018) 'Screening of plant growth promoting traits in heavy metals resistant bacteria: Prospects in phytoremediation', *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. Academy of Scientific Research & Technology, 16(2), pp. 613–619. doi: 10.1016/j.jgeb.2018.06.004.
 - Tuzen M, Dogan O, Usta C, Soylak M. (2007). Biosorption of copper (II), lead (II), iron (III) and cobalt (II) on *Bacillus sphaericus* -loaded Diaion SP-850 resin. *Analytica Chimica Acta*; 581(2):241-246.
 - Ullah, A., Heng, S., Munis, M.F.H., Fahad, S., Yang, X. (2015). Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: a review. *Environ. Exp. Bot.* 117.
 - Van der Ent A, Baker A J M, Reeves R D, Pollard A J, Schat H. (2013). Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: Facts and fiction. *Plant Soil*.
 - Wang, Q. (2019). 'Inoculation of plant growth promoting bacteria from hyperaccumulator facilitated non-host root development and provided promising agents for elevated phytoremediation efficiency', *Chemosphere*. Elsevier Ltd, 234, pp. 769–776. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.

1330
1331
1332
1333
1334
1335
1336
1337
1338
1339
1340
1341
1342
1343
1344
1345
1346
1347
1348
1349
1350
1351
1352
1353
1354
1355
1356
1357
1358
1359
1360
1361
1362
1363
1364
1365
1366

- Wenzel WW. (2009). Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Plant Soil*.
- Whiting, S.N., deSouza, M.P., Terry, N. (2001). Rhizosphere bacteria mobilize Zn for 1382 hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens*. *Environ. Sci. Technol.* 35, 3144–3150
- Wu CH, Wood TK, Mulchandani A, Chen W. (2006). Engineering plant-microbe symbiosis for rhizoremediation of heavy metals. *Appl Environ Microbiol*; 72:1129–34.
- Yang Q, Tu S, Wang G, Liao X, Yan X. (2012). Effectiveness of applying arsenate reducing bacteria to enhance arsenic removal from polluted soils by *Pteris vittata* L.. *Int J Phytorem*;14.
- Yohey Suzuki & Jillian F. Banfield (2004) Resistance to, and Accumulation of, Uranium by Bacteria from a Uranium-Contaminated Site, *Geomicrobiology Journal*, 21:2, 113-121, DOI: 10.1080/01490450490266361.
- Yu, X., Y. Li, C. Zhang, H. Liu, J. Liu., W. Zheng, X. Kang, X. Leng, K. Zhao, Y. Gu, X. Zhang, Q. Xiang, and Q. Chen. (2014). Culturable heavy metal-resistant and plant growth promoting bacteria in V-Ti magnetite mine tailing soil from Panzhihua, China. *Plos One* 9: e106618. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106618>.
- Zhang, X., Xia, H., Li, Z., Zhuang, P., Gao, B., (2011). Identification of a new potential Cd hyperaccumulator *Solanum photeinocarpum* by soil seed bank metal concentration gradient method. *J. Hazard. Mater.* 189, 414–419.

1367

1368

1369

1370

1371

1372

1373

1374

1375

1376

1377

1378

1379

1380

1381

1382

1383

1384

IX. ANEXOS

1385

1386

Anexo 1 secuenciación de los aislados seleccionados

1387

3

1388

3-U1_D08_01julio2021_Sec_2021-07-01-17-01-47

1389

1390

1391 GGTTCCGGCATATTGGGCGTAAGAGCTCGTAGGCCGTTTGTCCGCTCTGCTGTGAA
1392 AGACCGGGGCTCAACTCCGGTTCTGCGGGGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGT
1393 AGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCACGAGGAA
1394 CACCGATGGCGAAGGCCGGTCTCTGGGCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGC
1395 ATGGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGTTGGGG
1396 ACTAGGTGTGGGGGACATTCCACGTTTTCCGCGCCGTATCTAACGCATTAAGTGC
1397 CCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAGTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
1398 CGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACC
1399 AAGGCTTGACATGAACCGGAAAGACCTGGAAACAGGTGCCCCGCTTGCGGTTCGG
1400 TTTACAGGTGGTGCATGGTTGTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGT
1401 CGCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCTATGTTGCCAGCGCGTTATGGCGGGGACT
1402 CGTAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCCAATCAT
1403 CATGCCCTTATGTCTTGAGCTTCAGGCATGCTACGATGGCCGGTACAGATGGTT
1404 GCGATACTGTGAGGTGGAGCTAATCACAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGG
1405 TCTTGCAACTCGATGACATGAGCTCGGATTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATCTC
1406 TGCTAGTGAATATCGTATCTCTGCCCGTAGTACACAGCAGCACCGTTCGAGTCGAG
1407 ACACGTTGGTATCACCCCGAAAGCCCGACGACTCAGCTCTATGTGTGCGTGTAGC
1408 CCGTCAAAGTGCGAACTGACGATGCGACGAATCGTACGCGGGCCGCCCTAATAT
1409 AA

1410

1411

15

1412

15-U1_E08_01julio2021_Sec_2021-07-01-17-01-47

1413

1414

1415 GGGTTTCCGGCATATTGGGCGTAAGAGCTCGTAGGCCGTTTGTCCGCTCTGCTGTG
1416 AAGACCGGGGCTCAACTCCGGTTCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAG
1417 TAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCCGATATCACGAGGA
1418 ACACCGATGGCGAAGGCCGGTCTCTGGGCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAG

1419 CATGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGG
1420 GACTAGGTGTGGGGGACATTCCACGTTTTCCGCGCCGTAGCTAACGCATTAAGTG
1421 CCCCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGC
1422 CCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTGATGCAACGCGAAGAACCTTAC
1423 CAGGGCTTGACATGAACCGGTAATGCCTGGAAACAGGTGCCCCGCTTGCGGTGCG
1424 GTTTACTGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAG
1425 TCCCGCAACGAGCGCAACCTTCGTTCTATGTTGCCAGCGGTTTCGGCCGGGGACT
1426 CATAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCCATCATC
1427 ATGCCCTTATGTCTTGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTG
1428 CGATACTGTGAGGTGGAGCTAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGCGGT
1429 CTGCAACTCGACCCCATGAACGTGCGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGGACTCT
1430 CCTACTGAATACGTTTTCTGCCCGTAGTACACTGCAGCACCGTGAGTCGACGCAC
1431 CGTTGGTATCACCCGAAGCGCGGATGGACTAACCCACTGATGGTCGTTAGCCCGT
1432 CAATAGTGGGGGACTGGCGATGCGACGTACTCATACGCGGCGCCCTCGATAGTA
1433

A

1434

1435

21

1436

21-U1_G08_01julio2021_Sec_2021-07-01-17-01-47

1437

1438

1439 GCTCGTCGGATATTGGGCGTAAGCGCGCGCAGGTGGTTCCTTAAGTCTGATGGG
1440 AAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACGGGGGGACTTGAATGCA
1441 CAAGAGGAAGGAGGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCTTATAGATTTGGAGGA
1442 AACCTGGGCGAAGGCTGATAATGGGTTTATGGGATTCGCTTACCTTCGCAGGTT
1443 TGCAGCCCTTTGTACCATCCATTGTAGGCGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCA
1444 TGATGATTTGACGTCCTCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAC
1445 AGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAATATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACT
1446 TAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCT
1447 GTCCCCCGAAGGGGAAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTACAGGATGTCAAGACCTG
1448 GTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCCAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGG
1449 CCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGAGTG
1450 CTTAATGCGTTAACTGCAGCACTAAAGGGGCGGAAACCCCTCTAACACTTACCACT
1451 CATCGTTTACGGCGTGGACTACCAAGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTT
1452 CACGCCTCAGTGTCACTTACAGACCATAAAGTCTCCTTCTCCACTGGTGTTCCTCC
1453 CATCTCTACGCATTTACCGCTACACTTGGAAATCCACTTTCCTCGTCTGCACTCA
1454 TCTTCGCCAGTTTCCAATGACCGCTCCACCAGTTGAGACGTGTTGCTTTCACATCA
1455 GACTCATGAGAGCAACCTTCGCGCGCTCTATGCCCCATAAATGCTGCGGAGAACAC
1456 CTTGGCGAGCATAACGTAATACCGGGCTGCCTGGATAGAAA

1457

1458

1459

1460

1461