

# DESARROLLO DE MICROECONOMÍAS REGIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

## COSECHADOS EN SUELOS MINEROS - ATN/RF 16110

### Producto 5: Informe con la colección de cepas rizosféricas aisladas

Saran Anabel  
Fernández Lucia  
Merini Luciano

2020





Códigos JEL: Q16

FONTAGRO (Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria) es un programa de cooperación administrado por el Banco Interamericano de Desarrollo (BID), pero con su propia membresía, estructura de gobernabilidad y activos. Las opiniones expresadas en esta publicación son de los autores y no necesariamente reflejan el punto de vista del Banco Interamericano de Desarrollo, FONTAGRO, de sus Directorios Ejecutivos ni de los países que representan.

El presente documento ha sido preparado por la Lic. Anabel Saran, la Lic. Lucia Fernandez y el Dr. Luciano Merini.

Copyright © 2021 Banco Interamericano de Desarrollo. Esta obra se encuentra sujeta a una licencia Creative Commons IGO 3.0 Reconocimiento-NoComercial-SinObrasDerivadas (CC-IGO 3.0 BY-NC-ND) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/igo/legalcode>) y puede ser reproducida para cualquier uso no comercial otorgando el reconocimiento respectivo al BID. No se permiten obras derivadas. Cualquier disputa relacionada con el uso de las obras del BID que no pueda resolverse amistosamente se someterá a arbitraje de conformidad con las reglas de la CNUDMI (UNCITRAL). El uso del nombre del BID para cualquier fin distinto al reconocimiento respectivo y el uso del logotipo del BID no están autorizados por esta licencia CC-IGO y requieren de un acuerdo de licencia adicional. Note que el enlace URL incluye términos y condiciones adicionales de esta licencia.

Esta publicación puede solicitarse a:

**FONTAGRO**

Correo electrónico: [fontagro@fontagro.org](mailto:fontagro@fontagro.org)

[www.fontagro.org](http://www.fontagro.org)



## Resumen

El suelo cercano a las raíces de las plantas (rizosfera) es un hábitat y ecosistema importante para los microorganismos, incluidas las bacterias, hongos, algas y protozoos (Zubair *et al.*, 2016). Las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR) son una importante comunidad microbiana que ayuda a las plantas a remediar los suelos contaminados con metales pesados (Seth, 2012). Estas bacterias pueden aumentar el crecimiento de las plantas mediante diversos mecanismos como la reducción de la producción de etileno, la producción de fitohormonas, el biocontrol de fitopatógenos, la síntesis de agentes quelantes y sideróforos, la actividad enzimática específica y la fijación de nitrógeno atmosférico (Glick *et al.*, 1998). Las bacterias PGP también aumentan la movilidad y la disponibilidad de elementos traza, inducen cambios redox, mejoran la solubilización de fosfato, la acidificación y la producción de agentes quelantes (Gadd, 2010). Estas bacterias PGP poseen diferentes mecanismos para la tolerancia a metales, incluido la eliminación activa por mecanismos de flujo de salida, biosorción, exclusión, bioacumulación intracelular o precipitación tanto en espacios intracelulares internos como externos, secuestro extracelular (Glick *et al.*, 2012). El objetivo del presente producto fue aislar e identificar microorganismos rizosféricos de especies vegetales aromáticas, con especial interés en aquellos capaces de reducir el estrés por toxicidad de los metales pesados y/o promover el crecimiento vegetal, constituyendo así un banco de cepas tolerantes. Este producto se enmarca en las actividades propuestas para el año 2018.

### Palabras Clave:

Metales pesados, bacterias tolerantes, promoción del crecimiento vegetal.

## Información de Relevancia con una discusión técnica

Las estrategias de remediación de áreas contaminadas con metales pesados que utilizan plantas, como lo son la fitoestabilización y la fitoextracción dependen en gran medida de las bacterias promotoras del crecimiento (PGPB), que habitan la rizósfera y los tejidos internos de las plantas. Algunas de las características que poseen estas bacterias incluyen la producción de fitohormonas, sideróforos y ACC deaminasa, así como la fijación de nitrógeno, la solubilización fosforo insolubles y la producción de antibióticos. A través de estos mecanismos, estos microorganismos PGP pueden mejorar la tolerancia de la planta al estrés generado por estos metales y aumentar la producción de biomasa (Płociniczak *et al.*, 2016).

Además, cuando se inoculan en el suelo (bioaugmentación) estas bacterias pueden influir en la biodisponibilidad de los metales mediante transformaciones redox, lo que lleva a la movilización, disolución, lixiviación o inmovilización de estos elementos a través de la unión y precipitación con molécula orgánica (Gadd, 2014).

Los microorganismos han desarrollado varios mecanismos de resistencia para tolerar la presencia de los metales pesados y organometales. Uno de los mecanismos comunes es la inducción de proteínas de unión a elementos específicos que facilitan el secuestro/bioacumulación de elementos tóxicos dentro de la célula. Estas proteínas de unión a elementos se denominan metalotioneínas (MT) (Hamer, 1986). Está demostrada la inducción de estas proteínas en respuesta a la presencia de metales específicos como Cd, Pb, Zn y Cu en el suelo (Nanda *et al.*, 2019).

Entre los mecanismos de flujo de salida, las ATPasas de tipo P que transportan metales son un grupo de proteínas involucradas en el transporte de elementos traza fuera de la membrana celular y que rigen la resistencia bacteriana a los metales. Estas proteínas transportadoras evitan la acumulación excesiva de iones de elementos altamente tóxicos y reactivos como Pb, Cu, Ag, Zn y Cd. (Taghavi *et al.*, 2009).

Los microorganismos también aplican una estrategia de inmovilización de metales mediante la secreción de exopolisacáridos (EPS). Los EPS son polímeros que se acumulan en la superficie celular. El EPS desempeña un papel activo en diversos mecanismos biológicos en bacterias, como la supervivencia, la adhesión, la agregación celular, la floculación, la transducción de señales y la formación de biopelículas (Caruso *et al.*, 2018). Sin embargo, la producción de EPS es una característica esencial de varias bacterias, ya que actúa como barrera protectora para las células durante condiciones ambientales adversas como la toxicidad generada por la presencia de metales pesados y la desecación (Hassan e Ibrahim, 2017). Estudios han demostrado que el exopolisacárido producido por *Paenibacillus jamilae* puede biosorber 303.03 mg de plomo por g de EPS (Morillo *et al.*, 2008).

La biosorción de metales pesados en la superficie bacteriana es otro mecanismo de secuestro extracelular para evitar su entrada dentro de las células bacterianas, manteniendo así la homeostasis. La biosorción de elementos está mediada por varios mecanismos, como el intercambio iónico, la quelación por grupos carboxilo, la adsorción y la difusión a través de las paredes y membranas celulares (Chang *et al.*, 1997). Estudios realizados en *P. aeruginosa* 4EA una cepa resistente a metales pesados aislada de suelo contaminado con residuos de baterías de automóviles en Goa, India, han demostrado

que tolera el nitrato de Pb 0,8 mM mediante la biosorción de Pb en la superficie celular como lo revela la microscopía electrónica de barrido junto con la espectrometría de rayos X dispersiva de energía (SEM– EDX) (Naik y Dubey, 2011).

La precipitación de oligoelementos en complejos insolubles es otra herramienta que reduce la biodisponibilidad y toxicidad de los metales. Varias bacterias han sido reportadas como capaces de precipitar  $Pb_3(PO_4)_2$  y PbS (De *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2011a). La recuperación de ambientes contaminados con plomo utilizando el método de precipitación microbiana ha sido una solución tecnológica efectiva, asequible y ecológica en varias aéreas (Naik *et al.*, 2013).

En diferentes cultivos, como el arroz, se han llevado a cabo estudios sobre la mejora de la toxicidad del arsénico (As) mediante el uso de un consorcio sintético de rizobacterias (*Pseudomonas putida*) y algas (*Chlorella vulgaris*) (Awasthi *et al.*, 2018). También se ha encontrado que algunas bacterias tolerantes a Pb juegan un papel específico en el crecimiento de plantas expuestas a Pb. Por ejemplo, el endófito *Bacillus* sp. MN3-4 aumenta la acumulación de Pb (II) en *Alnus firma*, y la combinación de *Pseudomonas fluorescens* G10 y *Mycobacterium* sp. G16 promueven el crecimiento de las plantas y reducen la toxicidad de Pb en *Brassica napus* (Sheng *et al.*, 2008; Shin *et al.*, 2012).

## OBJETIVOS

El objetivo de este estudio fue aislar y caracterizar bacterias rizosféricas tolerantes a Cd y Pb y analizar su capacidad de promover el crecimiento vegetal, así como, su interacción con los metales y se enmarca dentro de las actividades propuestas para el año 2018.

## METODOLOGÍA

### ***Aislamiento de bacterias tolerantes a metales pesados endofíticas y rizosféricas***

Se aislaron bacterias endofíticas de raíces esterilizadas de plantas de *H. petiolaris* que crecían en suelos enriquecidos con  $1000 \text{ mg kg}^{-1}$  de Pb y  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cd procedentes del trabajo Saran *et al.* (2019). Para la esterilización de la superficie, las raíces se sumergieron en etanol al 70% durante 10 segundos, luego en hipoclorito de sodio al 2.5% durante 30 minutos, y finalmente se enjuagaron cinco veces en agua destilada estéril. Para evaluar la esterilidad, 100 ml del agua utilizada para enjuagar los tejidos vegetales se colocaron en placas sobre extracto sólido de glucosa-levadura (glucosa:  $10 \text{ g l}^{-1}$ ; levadura:  $5 \text{ g l}^{-1}$ ; agar:  $15 \text{ g l}^{-1}$ ). Las placas GY se incubaron a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  durante dos días. Se maceró 1 g de tejido radicular en mortero estéril con 200  $\mu\text{l}$  de tampón de fosfato estéril (PBS 10 mM, pH 7,4). Los extractos de tejido (100  $\mu\text{L}$ ) y sus diferentes diluciones se colocaron en placas con medio sólido GY suplementado con  $10 \text{ mg l}^{-1}$  Cd o  $100 \text{ mg l}^{-1}$  Pb (usando  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  respectivamente). Después de la incubación a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  durante dos días, se obtuvieron colonias de morfología variable, las que se repicaron repetidamente en medio sólido GY-Metal hasta que las cepas se identificaron como puras. Se seleccionaron 22 aislamientos tolerantes a Cd y 34 aislamientos tolerantes a Pb, los que se almacenaron en glucosa isotónica (5%) glicerol (40%) para su posterior estudio.

El aislamiento de las bacterias rizosféricas se realizó lavando 1 g de raíces con soluciones de NaCl 0.85% y NaCl 0.85% / Tween 80 0.01%. Estos lavados se inocularon en medio líquido GY estéril suplementado con  $10 \text{ mg l}^{-1}$  Cd o  $100 \text{ mg l}^{-1}$  Pb. Después de varias rondas de cultivo de enriquecimiento en medio líquido GY-Metal se realizó el aislamiento y purificación en placas con medio sólido GY-Metal. Se seleccionaron 28

aislamientos tolerantes a Cd y 21 aislamientos tolerantes a Pb, los que se almacenaron en glucosa isotónica (5%) glicerol (40%) para su posterior estudio.

### **Caracterización genotípica de cepas tolerantes a Cd y Pb**

Las bacterias se cultivaron durante 24 h a 30 °C en placas con medio sólido GY-Metal. Posteriormente, se extrajo el ADN total usando un kit comercial (E.Z.N.A; kit de ADN bacteriano, VWR, Lovaina, Bélgica). La amplificación del gen 16S rRNA se realizó en un volumen final de 25 µL con 1× tampón de PCR de alta fidelidad Roche, MgCl<sub>2</sub> 1.8 mM, 0.2 mM de cada dNTP, 0.2 µM cebador directo e inverso (27F, 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' Y 1492R, 5'-TACGGCTACCTTGTTACGAC-3'), 1.2U Roche Taq Polimerasa ADN de alta fidelidad (Sigma, Lovaina, Bélgica) y 1 µL de ADN (1 ng µL<sup>-1</sup>). Las condiciones de reacción de PCR fueron: una desnaturalización inicial durante 5 minutos a 95 °C, 32 ciclos cada uno consistentes en desnaturalización durante 1 minuto a 94 °C, recocido de cebador durante 30 segundos a 52 °C y extensión a 72 °C durante 3 minutos. Por último, el alargamiento final de 10 min a 72 °C (Biorad T100, Bruselas, Bélgica). La calidad del ADN obtenido luego de la PCR se evaluó mediante electroforesis (100 V, 30 min) en gel de agarosa al 2% teñido con GelRed (Biotium, EE. UU.). Los productos de PCR purificados se enviaron a Macrogen (Amsterdam, Países Bajos) para la secuenciación de Sanger. Las secuencias de genes de ARNr 16S parciales obtenidas se recortaron para mejorar la calidad en Geneious v4.8 y se contrastaron contra secuencias de nucleótidos de referencia presentes en GenBank, NCBI.

### **Actividad PGP in vitro de las cepas**

La producción de sideróforos se determinó en placas de Petri con agar CAS (Chrome Azurol S) (Shin *et al.*, 2001). Las placas se incubaron durante siete días a 29 °C. Las bacterias que producen sideróforos muestran un halo naranja alrededor de sus colonias. La eficiencia de solubilización de fosfato de las bacterias se calculó en base a los halos producidos alrededor de las colonias que crecen en placas con medio sólido fosfato del Instituto Nacional de Investigación Botánica preparado según Nguyen *et al.* (1992) en placas de Petri. La producción de ácido orgánico bacteriano se evaluó de acuerdo con el método colorimétrico de Cunningham y Kuyack (1992) después de inocular 800 µL de medio triptona-sacarosa en placas de cloruro de polivinilo (PVC) de 48 pocillos. Se evaluó la producción bacteriana de indol-3-acético (IAA) en 1 ml de caldo de cultivo 1/10 con 0,5 g de L-1 triptófano. Después de la incubación en placas de 48 pocillos, se indujo una reacción colorimétrica con el reactivo Salkowski (Gordon y Weber, 1951). Para identificar las cepas que utilizan la vía del butilenglicol y producen acetoina, se inocularon bacterias en medio Methyl Red-Voges Proskauer (MRVP). Después de 48 h de incubación en placas de 48 pocillos, se indujo una reacción colorimétrica según Romick y Fleming (1998). La actividad 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC)-deaminasa se evaluó mediante el protocolo de Belimov *et al.*, (2005). Las células bacterianas lavadas se resuspendieron en 1 ml de medio de sales mínimas con 1,5 µL de ACC 0,5 M como única fuente de nitrógeno en placas de 48 pocillos. Después de 3 días a 30 °C, las células bacterianas se resuspendieron en 0,1 ml de tampón Tris-HCl (pH 8,5, 0,1 M) y se detuvo la reacción agregando 0,5 ml de HCl 0,56 N para verificar visualmente la presencia de ACC desaminasa. La formación de biopelículas se examinó siguiendo el método descrito por O'Toole *et al.*, (2000). Las cepas seleccionadas se cultivaron en medio de cultivo específico para el crecimiento de biopelículas (Luria-Bertani, más

MgSO<sub>4</sub> 1 mM y glucosa al 0,1%) en placas de 24 pocillos, las cuales luego fueron incubadas a 29 °C sin agitar durante 48 h. Las biopelículas se detectaron por tinción con cristal violeta al 0,1% p/v. Para todos los ensayos, los medios no inoculados se usaron como control negativo y se realizaron tres réplicas por cepa probada.

#### ***Absorción de metales in vitro por la biomasa bacteriana en cultivo líquido - Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM-EDX)***

Se realizaron estudios de captación de los metales por parte de la biomasa bacteriana utilizando tubos Falcon de 50 ml que contenían 25 ml de medio líquido GY suplementado con 10 mg l<sup>-1</sup> de Cd y 100 mg l<sup>-1</sup> de Pb (CdCl<sub>2</sub>, Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). Todos los tubos se inocularon con 1 ml de una suspensión de células bacterianas (densidad óptica a 600 nm = 1), que se cultivó previamente en medio GY a 28 °C durante 24 h. Las muestras se incubaron a 28 °C y 100 rpm en un agitador orbital. Para estimar la cantidad de metal pesado retenido por las células bacterianas, las concentraciones de metales se determinaron en el sobrenadante después de 72 h de incubación mediante espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES, Agilent Technologies, serie 700, Bélgica). Los cultivos se centrifugaron 15 min a 4800 rpm. Se filtró una alícuota de sobrenadante (0,22 µm) y se usó para la determinación de los elementos. Medios sin metal y medio con metal no inoculados con bacterias se usaron como controles negativos (Sheng et al., 2008). Para la visualización de la estructura bacteriana, los sedimentos bacterianos se lavaron 3 veces con tampón salino fosfato 0,01 M (PBS, pH 7,0) para eliminar restos de metales, azúcares y proteínas no unidos. Los gránulos se resuspendieron en glutaraldehído al 2% durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras bacterianas se centrifugaron durante 3 min a 3000 rpm y los gránulos se lavaron 3 veces con agua milli-Q. Se colocó 1 µL de muestra en un soporte de muestra, en cinta conductora de carbono. Luego, las muestras se recubrieron 30 segundos con una capa de oro de 15 nm y se analizaron utilizando un microscopio electrónico de barrido (FEI Quanta 200F FEG-SEM con sistema EDS Thermo Fisher Pathfinder Alpine con detector EDD UltraDry Premium (área activa de 60 mm<sup>2</sup>)). Las imágenes fueron tomadas usando un voltaje de aceleración de 12.5 kV.

#### ***Inoculación in vitro en placas de agar vertical (VAP), germinación y promoción del crecimiento***

Semillas de *H. annuus* se esterilizaron antes de la inoculación agitándolas en etanol al 70% durante 5 minutos, seguidas de hipoclorito al 5% durante 5 minutos y enjuagando cinco veces en agua desionizada estéril. Los inoculantes se prepararon haciendo crecer las cepas en medio líquido GY-Metal a 30 °C durante 48 h. Los cultivos se centrifugaron y los pellets bacterianos se lavaron dos veces en tampón MgSO<sub>4</sub> 10 mM estéril antes de resuspenderlos completamente en 10 ml de tampón salino hasta una densidad óptica de 1 a 600 nm (≈109 UFC ml<sup>-1</sup>) (Lessl et al., 2014). Se incubaron quince semillas sumergidas en 10 ml de cultivo bacteriano durante 60 minutos a 29 °C en agitación orbital. Luego se descartó el líquido de cultivo y se sembraron en placas de Petri que contenían una capa de papel estéril y 10 ml de agua desionizada estéril. La germinación se evaluó después de 48 h. Tres semillas germinadas se transfirieron a placas de agar vertical que contenían un medio de sales basales Murashige y Skoog y se mantuvieron verticalmente durante dos semanas en cámara de crecimiento (16:8 claro/oscuras, fotoperíodo; 25 °C/19 °C; 400 µM cm<sup>-2</sup> seg<sup>-1</sup> PAR; 60% de humedad relativa). Se

realizaron tres réplicas por cepa. Los parámetros de biomasa como la longitud de la raíz y tallo y el peso fresco y seco (DW) se determinaron después de este tiempo de incubación.

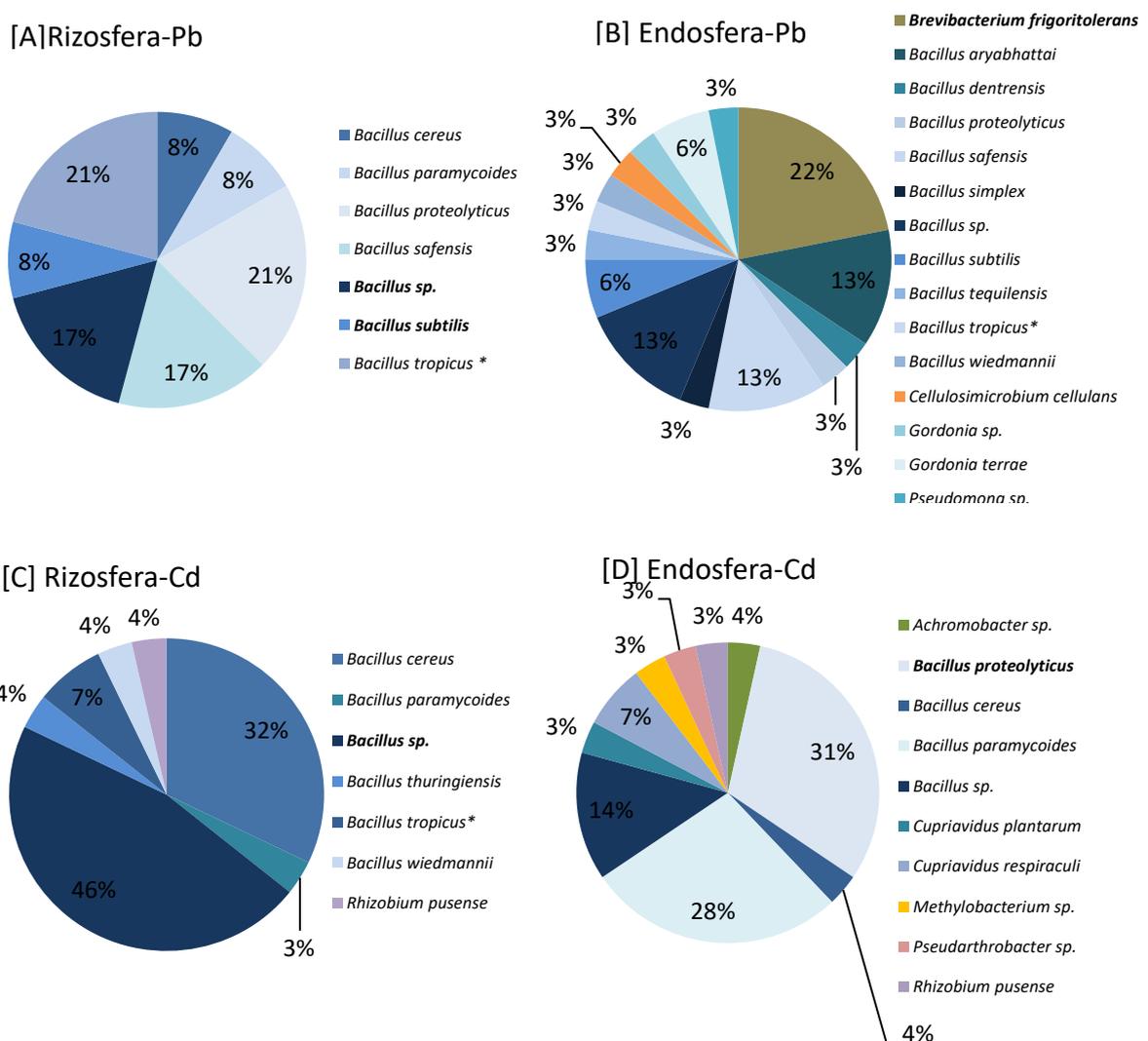
## RESULTADOS

Se aislaron un total de 105 cepas morfológicamente diferentes, identificadas genotípicamente y posteriormente caracterizadas. Cincuenta y tres cepas fueron tolerantes a  $100 \text{ mg l}^{-1}$  Pb, 22 de la rizósfera y 31 endófitos de raíz. Cuarenta y nueve cepas fueron tolerantes a  $10 \text{ mg l}^{-1}$  Cd, de los cuales 28 de la rizósfera y 21 endófitos de raíz.

Entre los 105 morfotipos aislados, se identificaron 29 bacterias diferentes. Quince eran tolerantes a Pb y 14 tolerantes a Cd. La **figura 1** muestra los porcentajes de presencia de cada cepa en el compartimento del que se aisló.

Se identificaron nueve géneros, que incluyeron *Bacillus* (68%), *Brevibacterium* (3%), *Cellulosimicrobium* (3%), *Gordonia* (2%), *Pseudobacter* (5%), *Rhizobium* (3%), *Cupriavidus* (3%), *Klebsiella* (2%) y *Methylobacterium* (3%).

Algunas cepas pertenecientes a la familia *Bacillaceae*, incluidas *B. cereus* ST10/ST60, *B. paramycoides* ST9/ST98, *B. tropicus* ST22/ST77, *B. proteoliticus* ST4/ST89 muestran tolerancia a ambos elementos Cd y Pb, mientras que *B. proteoliticus* ST4, *B. safensis* ST11, *B. subtilis* ST7 y *B. tropicus* ST22 se aislaron tanto de la rizosfera como de la endosfera radicular.



**Figura 1.** Bacterias tolerantes a Pb A) rizosféricas B) endofíticas; Bacterias tolerantes a Cd C) rizosféricas y D) endofíticas; aisladas en medio heterotrófico glucosa-levadura, a partir de raíces de plantas de *H. petiolaris* cultivadas en suelos contaminados

Las capacidades PGP *in vitro* de 28 aislamientos bacterianos se muestran en la **Tabla 1**. Doce cepas fueron positivas para todas las capacidades cualitativas PGP testeadas. *Bacillus aryabhattai* ST25, *Brevibacterium frigoritolerans* ST30 y *Klebsiella varicola* ST106 exhibieron las capacidades más altas para solubilizar fosfato tricálcico. Solo dos cepas, *Bacillus cereus* ST10 y *Bacillus wiedmannii* ST29 fueron capaces de producir sideróforos. La producción de IAA se detectó en seis aislamientos, que van desde 25.94 a 81.47  $\mu\text{g ml}^{-1}$  y *Bacillus cereus* ST10 fue una de los mayores productoras de biopelículas.

**Tabla 1. Capacidades de promoción de crecimiento vegetal de las cepas tolerantes a metales pesados aisladas.**

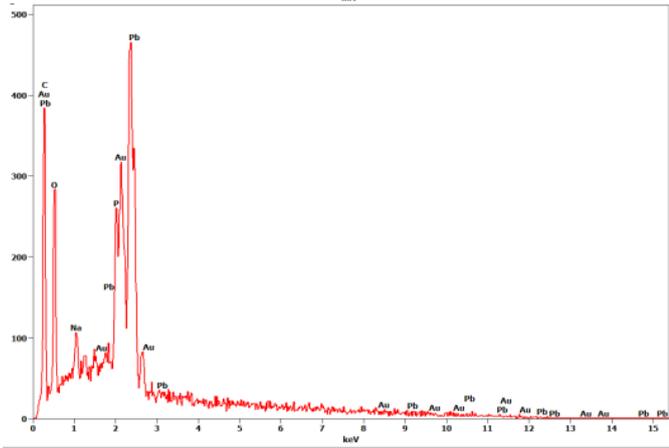
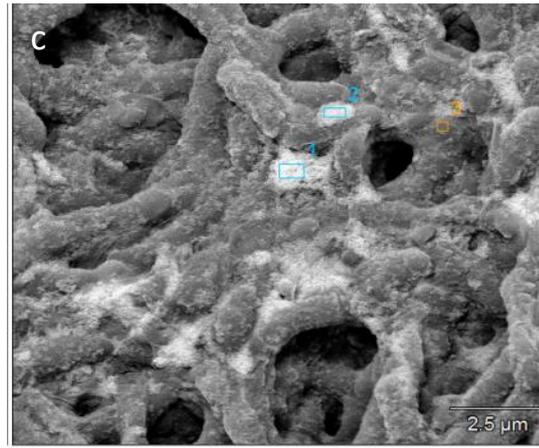
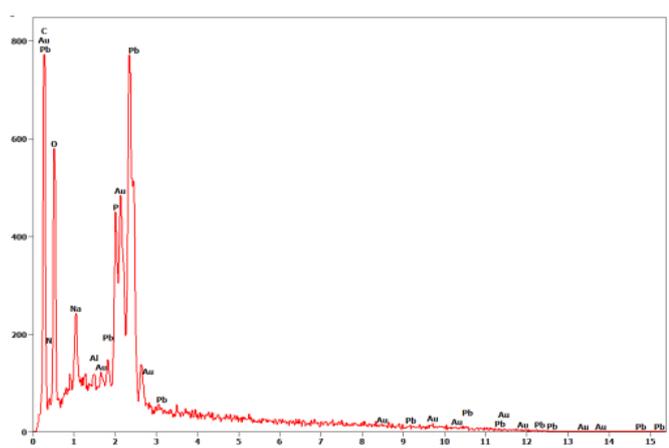
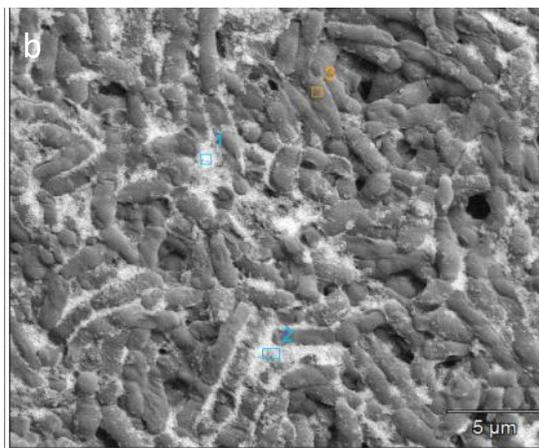
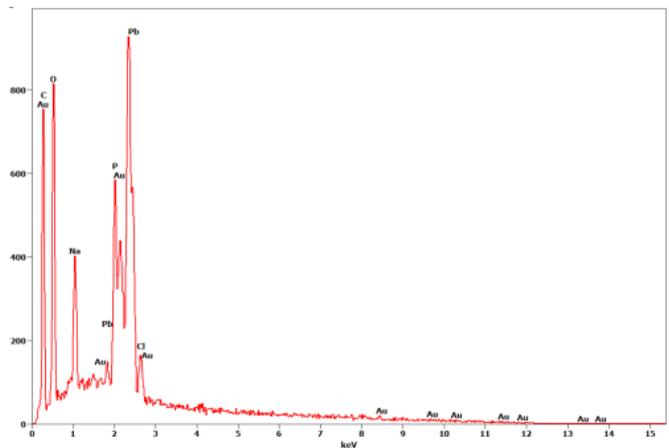
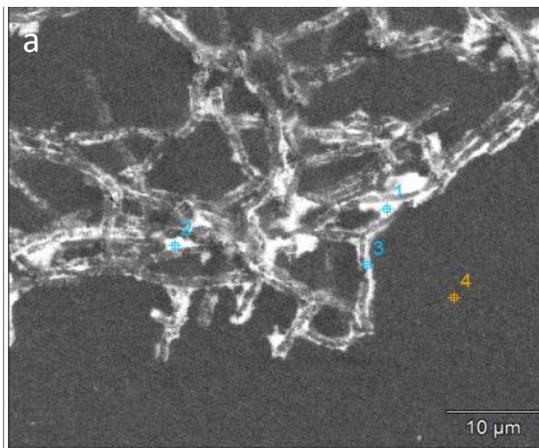
Cepas	ACC D	Acet oína	<sup>a</sup> AO	<sup>b</sup> P- Solub.	<sup>b</sup> SID	<sup>c</sup> IAA	<sup>d</sup> Biofilm	pH	<sup>e</sup> Conc. Metal
<b>Lead tolerant</b>									
<i>Bacillus</i> sp. ST1	+	+	+	0.06 ± 0.01*	0.16 ± 0.01**	0.00±0. 00	0.01 ± 0.00	4.27 ± 0.18*	5.91 ± 0.05**
<i>Bacillus proteoliticus</i> ST4	+	+	+	0.06 ± 0.01*	0.26 ± 0.02**	43.61 ± 1.03*	0.03 ± 0.00*	4.23 ± 0.28*	5.67 ± 0.05*
<i>Bacillus subtilis</i> ST7	-	+	-	0.23 ± 0.01**	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.08 ± 0.02*	4.22 ± 0.08*	6.31 ± 0.09**
<i>Bacillus paramycoides</i> ST9	+	+	+	0.19 ± 0.01**	0.16 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.00	4.20 ± 0,15*	5.85 ± 0.07**
<i>Bacillus cereus</i> ST10	+	+	+	0.09 ± 0.01*	0.18 ± 0.01**	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.00	4.16 ± 0.07*	6.19 ± 0.05**
<i>Bacillus safensis</i> ST11	-	+	+	0.08 ± 0.01*	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	4.15 ± 0.07*	6.02 ± 0.04**
<i>Bacillus tropicus</i> ST22	+	+	+	0.06 ± 0.01*	0.20 ± 0.01**	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00	4.21 ± 0.18*	6.01 ± 0.07**
<i>Bacillus aryabhatai</i> ST25	+	-	+	0.34 ± 0.02**	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.00	4.21 ± 0.32*	6.03 ± 0.05**
<i>Brevibacterium frigoritolerans</i> ST30	-	+	+	0.37 ± 0.02**	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.00	4.26 ± 0.18*	5.20 ± 0.12*
<i>Bacillus wiedmannii</i> ST29	+	+	+	0.05 ± 0.01*	0.53 ± 0.04**	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00	4.25 ± 0.04*	5.09 ± 0.08*
<i>Bacillus tequilensis</i> ST34	-	+	-	0.04 ± 0.00*	0.14 ± 0.01**	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.00*	4.254 ± 0.08*	5.30 ± 0.10*
<i>Bacillus dentrensis</i> ST38	-	+	-	0.05 ± 0.01*	0.11 ± 0.01*	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.00	4.17 ± 0.07*	6.58 ± 0.22**
<i>Bacillus simplex</i> ST43	+	-	+	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00	54.30 ± 2.08*	0.02 ± 0.00	4.24 ± 0.08*	5.79 ± 0.53*
<i>Gordonia terrae</i> ST51	+	-	+	0.08 ± 0.01*	0.22 ± 0.02**	0.00 ± 0.00	0.04 ± 0.00*	4.18 ± 0.07*	8.22 ± 0.432**
<i>Cellulosimicrobium cellulans</i> -ST54	+	+	+	0.10 ± 0.01*	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.07 ± 0.02*	4.21 ± 0.27*	6.22 ± 0.12**
Negative control (GYPb)	-	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00	6.08 ± 0.02	0.49 ± 0.08
<b>Cadmium tolerant</b>									
<i>Bacillus cereus</i> ST60	+	+	+	0.01 ± 0.00	0.10 ± 0.01*	0.00 ± 0.00	0.29 ± 0.06**	5.08 ± 0.35*	7.67 ± 0.33*
<i>Bacillus tropicus</i> ST77	+	+	+	0.00 ± 0.00	0.38 ± 0.03**	50.08 ± 2.00**	0.03 ± 0.00*	4.97 ± 0.027*	7.89 ± 0.09
<i>Rhizobium pusense</i> ST80	-	-	+	0.15 ± 0.01**	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.05 ± 0.00*	6.83 ± 0.44	3.48 ± 0.05**
<i>Methylobacterium</i> ST85	+	+	+	0.20 ± 0.01**	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00	6.98 ± 0.42	5.00 ± 0.12**
<i>Pseudobacter</i> sp. ST86	+	+	+	0.26 ± 0.02**	0.00 ± 0.00	30.25 ± 1.98*	0.03 ± 0.00*	6.05 ± 0.26	4.08 ± 0.13**
<i>Bacillus</i> sp. ST87	-	+	+	0.08 ± 0.01*	0.10 ± 0.01*	0.00 ± 0.00	0.04 ± 0.00*	4.70 ± 0,15*	7.98 ± 0.21
<i>Bacillus proteolyticus</i> ST89	+	+	+	0.03 ± 0.00	0.38 ± 0.03**	0.00 ± 0.00	0.13 ± 0.02*	4.99 ± 0.28*	7.74 ± 0.21*
<i>Bacillus cereus</i> ST90	+	+	+	0.12 ± 0.01*	0.60 ± 0.04**	0.00 ± 0.00	0.04 ± 0.00*	4.89 ± 0.019*	6.29 ± 0.14*
<i>Achromobacter</i> sp. ST95	-	+	+	0.10 ± 0.01*	0.24 ± 0.02**	0.00 ± 0.00	0.10 ± 0.02*	6.98 ± 0.38	4.87 ± 0.28**
<i>Bacillus paramycoides</i> ST98	+	+	+	0.02 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.05 ± 0.00*	4.97 ± 0.15*	7.87 ± 0.14*
<i>Cupravidus plantarum</i> ST102	+	+	+	0.09 ± 0.01*	0.31 ± 0.02**	25.94 ± 1.02*	0.02 ± 0.00	4.86 ± 0.13*	7.87 ± 0.9*
<i>Klebsiella varicola</i> ST106	+	+	+	0.36 ± 0.02**	0.00 ± 0.00	81.47 ± 4.55**	0.07 ± 0.02*	3.57 ± 0,17**	7.95 ± 0.12
Negative control (GYCd)	-	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	6.6 ± 0.03	8.27 ± 0.12

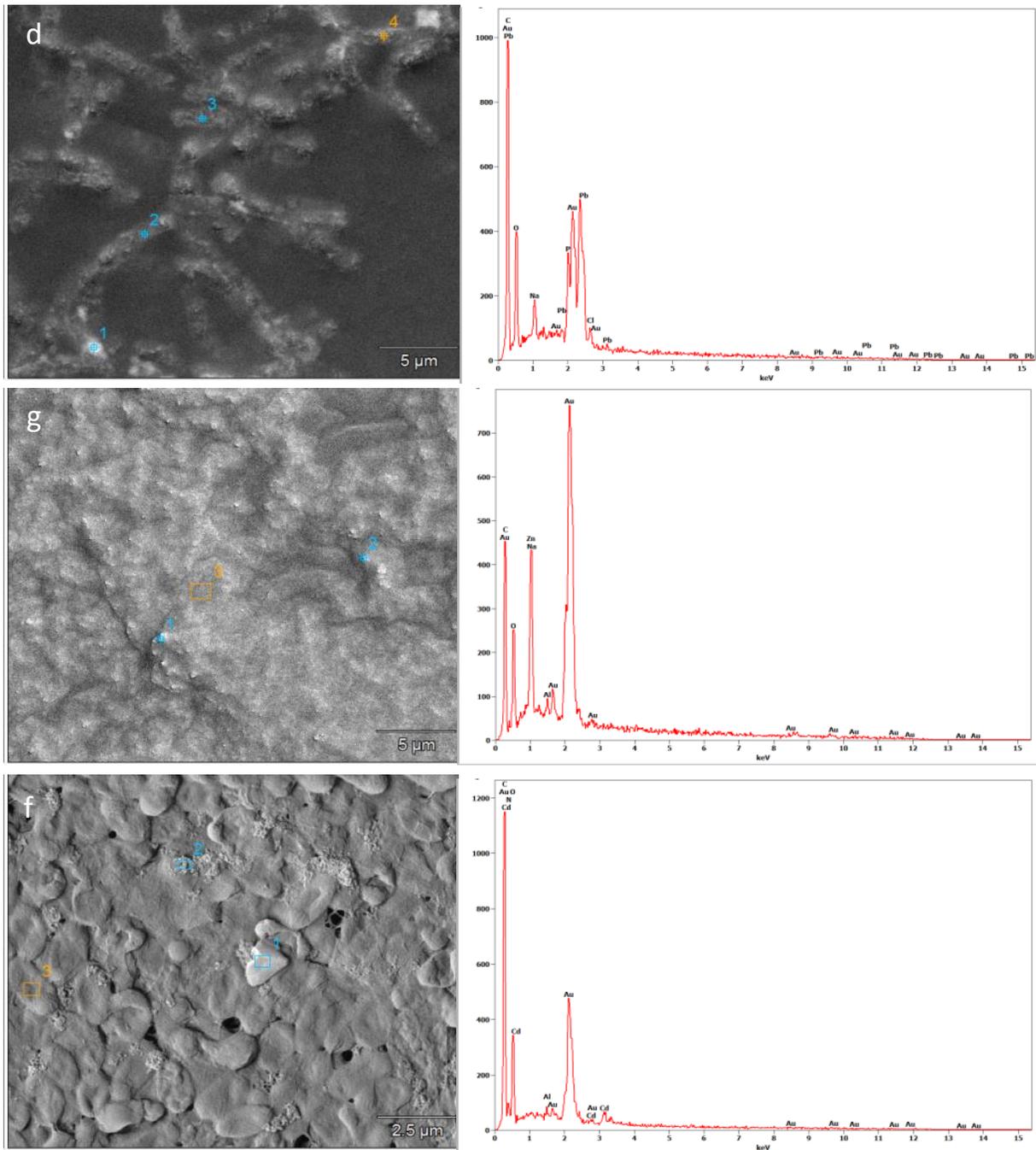
Valores promedio ± desvió estándar. (n = 3). <sup>a</sup>Acidos orgánicos; <sup>b</sup>Area de solubilización (cm<sup>2</sup>); <sup>c</sup>µg IAA mL<sup>-1</sup> de medio; <sup>d</sup>Medido a través de densidad óptica (OD600); <sup>e</sup>µg mL<sup>-1</sup> metal en sobrenadante; + positivo; - negativo. Valores en la misma columna seguidos por diferente número de \* son significativamente diferentes al control  $p \leq 0.05$  Anova y test de Tukey.

Todas las cepas tolerantes a Pb disminuyeron el pH del medio después de 48 h de incubación. Debido a esto, la solubilidad de Pb y su concentración en sobrenadante aumentaron (**Tabla 1**). *Gordonia terrae* ST51 fue la cepa que solubilizó más Pb, ocho veces más que el control negativo y entre 2 y 3 veces más que las otras cepas ( $p < 0.05$ ). Algunas cepas tolerantes a Cd (por ejemplo, *Klebsiella varicola* ST106 y *Cupriavidus plantarum* ST102) acidificaron el medio y aumentaron la concentración de Cd en el sobrenadante. Mientras que otras (por ejemplo, *Rhizobium pusense* ST80, *Pseudobacter* sp. ST89 y *Achromobacter* sp. ST95) aumentaron la concentración de Cd en el sobrenadante en aproximadamente un 50% en comparación con el control negativo, sin modificar el pH.

La interacción entre los metales y otros componentes del medio de cultivo juega un papel importante en el secuestro de los metales. Si comparamos las concentraciones nominales en el medio de cultivo no inoculado,  $10 \text{ mg l}^{-1}$  Cd y  $100 \text{ mg l}^{-1}$  Pb, con las concentraciones medidas de metal en el sobrenadante de estos controles negativos (**Tabla 1**), solo el 0.5% del Pb agregado a la el medio está disponible en el sobrenadante en las condiciones establecidas.

*Bacillus paramycooides* ST4, *Brevibacterium frigoritolerans* ST30, *Bacillus wiedmannii* ST29, *Cellulosimicrobium cellulans* ST54, *Methylobacterium* sp ST85 y *Bacillus proteolyticus* ST9 fueron seleccionadas para visualizar su estructura y interacción con el metal mediante SEM-EDX (**Figura 2**). Estas cepas fueron la que mejores capacidades de promoción del crecimiento vegetal presentaron, no tuvieron efectos adversos sobre la germinación de las semillas y se desarrollaron bien in vitro. Se detectó Cd y Pb presentes en/sobre la pared celular bacteriana. La intensidad de señal más alta de Pb se encontró alrededor de las colonias de *B. paramycooides* ST4, mientras que alrededor de *Brevibacterium frigoritolerans* ST30 la intensidad de señal de Pb fue la mitad. No se detectó Pb solo en el cultivo de *Cellulosimicrobium cellulans*. La capacidad de biopelícula de *Cellulosimicrobium cellulans* dificultaba la visualización de células individuales.

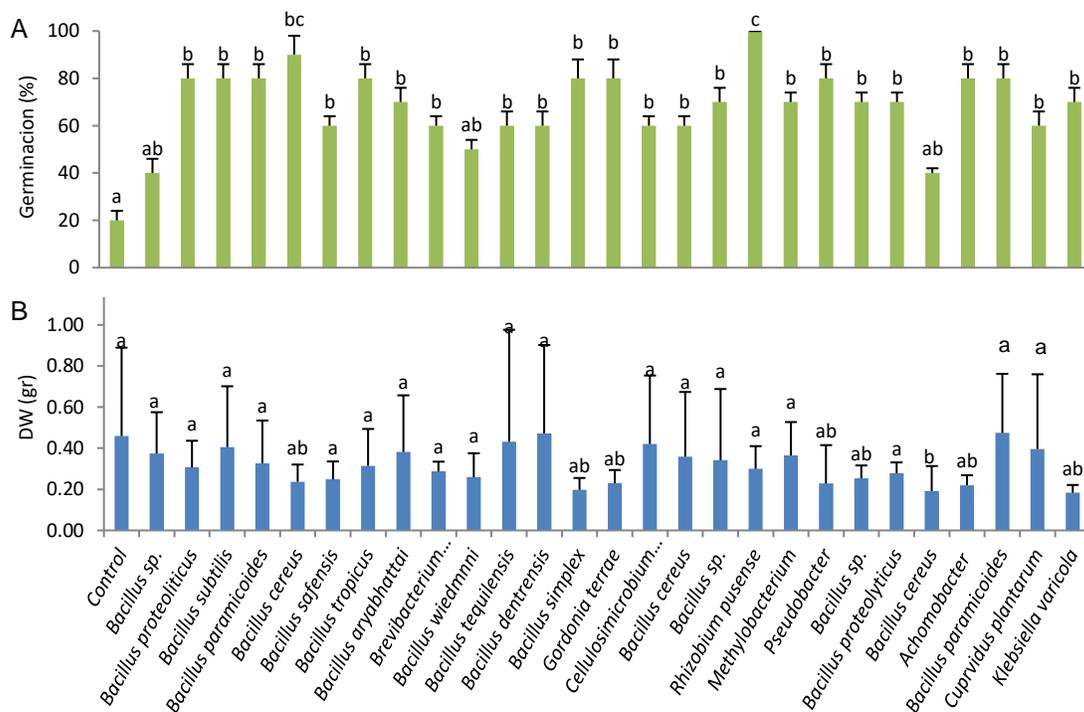




**Figura 2.** Imágenes SEM de colonias bacterianas (a) *B. paramycoides* ST4, (b) *B. proteolyticus* ST9, (c) *B. wiedmni* ST29, (d) *Brevibacterium frigoritolerans* ST30, (e) *Cellulosimicrobium cellulans* ST54, (f) *Methylobacterium* ST85. Los números en color azul seguidos de cuadrados o puntos representan las ubicaciones específicas donde se tomaron los espectros EDX, caracterizados por más densidad de electrones (brillo) debido a la presencia del metal en las células bacterianas, mientras que el área naranja es una ubicación de referencia, ya sea de fondo o de células bacterianas fuera de un área luminosa. Al lado de cada imagen SEM se encuentra el espectro correspondiente a la ubicación número uno.



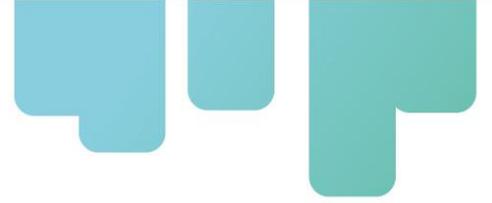
Después de 48 h de incubación, la germinación de las semillas de *H. annuus* inoculadas con las diferentes cepas fue entre 20-80% mayor en comparación con las semillas no inoculadas control (**Figura 3**). Sin embargo, algunas cepas bacterianas inhibieron el desarrollo de la biomasa vegetal a la concentración de inóculo de  $10^9$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  utilizada. Después de dos semanas, las plántulas inoculadas con *Klebsiella varicola* ST106, *Achromobacter* sp. ST95, *Bacillus cereus* ST90, *Pseudobacter* sp. ST86, *Gordonia terrae* ST51 y *Bacillus simplex* ST43 mostraron un peso seco 50% menor en comparación con los controles negativos.



**Figura 3.** (A) Porcentaje de germinación de semillas de *H. annuus* inoculadas con cepas individuales y (B) desarrollo de biomasa expresada en peso seco total (DW) de planta por placa después de dos semanas de incubación en sistemas VAP. Las barras de error corresponde a los desvíos estándar ( $n = 15$ ); Valores seguidos de la(s) misma(s) letra(s) no son significativamente diferentes  $p \leq 0.05$  por la prueba de Anova y Tukey.

## DISCUSIÓN

Se aislaron ciento cinco bacterias tolerantes a metales endofíticas y rizosféricas de raíces de *H. petiolaris*, cultivado en suelos contaminados con Pb/Cd (**Figura 1**). Hasta donde sabemos, no hay informes anteriores sobre el aislamiento de bacterias endofíticas y rizosféricas de esta especie vegetal. Sin embargo, existen varios estudios que informan el aislamiento de bacterias tolerantes



a metales de otras especies vegetales como *Arabidopsis* (Truyens *et al.*, 2014), *Brassica napus* (Croes *et al.*, 2013; Montalban *et al.*, 2016), *Thlaspi caerulescens* (Lodewyckx *et al.*, 2002), *Nicotiana tabacum* (Mastretta *et al.*, 2009). Algunos géneros de bacterias aislados en nuestro estudio (*Bacillus*, *Mhetylobacterium*, *Cellulosimicrobium* y *Rhizobium*) ya se han informado en estudios realizados en otras especies de plantas cosechadas de suelos contaminados con metales (Srikakolapu *et al.*, 2014; Idris *et al.*, 2006; Fomina *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2016; Cardoso *et al.*, 2018; Remans *et al.*, 2006).

La mayoría de los informes anteriores encontraron que la densidad/diversidad bacteriana disminuye desde el exterior hacia el interior de la raíz (Fisher *et al.*, 1992; Benizri *et al.*, 2001), mientras que en nuestro estudio el número de cepas tolerables a metales cultivables aisladas de la endosfera de la raíz de Las plantas de *H. petiolaris* eran casi el doble que las aisladas de la rizósfera.

Las capacidades PGP de los aislamientos bacterianos se determinaron para identificar las cepas más prometedoras para mejorar la supervivencia de las plantas y promover la fitoestabilización o extracción de elementos. Casi el 90% de los aislamientos acidificaron el medio de cultivo, lo que influyó directamente en la solubilidad de los elementos (**Tabla 1**). Estas cepas eran productoras de ácido orgánico o productoras de biopelículas y la mayoría de ellas también solubilizadoras de fosfato. Varios autores relacionan la solubilización de fosfato insoluble inorgánico por microorganismos con la producción de ácidos orgánicos y oxoácidos quelantes a partir de azúcares (Mehta y Nautiyal, 2001). La producción de sideróforos fue otra capacidad encontrada en aquellas cepas que modificaron el pH del medio y la biodisponibilidad de los elementos. Se ha demostrado que los sideróforos pueden formar complejos con varios iones de metales y biosurfactantes lo que mejora la movilidad de estos elementos de los suelos contaminados (Mulligan, 2005). *B. proteolyticus* ST89 aumentó significativamente la biomasa de *H. annuus* en el invernadero e *in vitro* fue una de las cepas que produjo más IAA. La producción de IAA por cepas de la rizósfera y la endosfera de diferentes cultivos, maní, maíz, trigo y arroz ya se ha informado en varios estudios (Montalban *et al.*, 2017; Tuyens *et al.*, 2014). Se buscaron cepas productoras de biopelículas debido a su capacidad para mejorar la unión bacteriana a las raíces y concentrar metales en su estructura polimérica extracelular (Das *et al.*, 2012; Sessitsch *et al.*, 2013). Sin embargo, en nuestro informe, una de las cepas que *in vitro* era una de las mayores productoras de biopelículas (*Cellulosimicrobium cellulans* ST54) no pudo colonizar la rizósfera de *H. annuus* en invernadero.

La interacción entre los metales y los componentes del medio jugó un papel importante en el secuestro de los metales en nuestro estudio *in vitro*. La precipitación de Pb es común en los medios de cultivo, ya que el Pb forma complejos con fosfatos e hidróxidos (Fomina *et al.*, 2014). La absorción *in vitro* de Pb y Cd por nuestros aislamientos en medios de cultivo indicó que las cepas modifican el pH y por lo tanto la solubilidad del elemento, haciéndolos más o menos biodisponibles para su secuestro o internalización. Se ha informado que algunas *Pseudomonas* y *Bacillus* son capaces de secuestrar metales en un rango de pH de 6–8 (Alkan *et al.*, 2015; Oh *et al.*, 2009). Prapagdee *et al.*, 2013 informo que *Klebsiella* sp. es capaz de secuestrar el 62% de Cd en una concentración de iones de 25 mg l<sup>-1</sup>.



La inoculación *in vitro* de semillas de *H. annuus* en VAP mostro la capacidad de algunas de nuestras cepas para mejorar la germinación y el desarrollo de las plántulas. Se informó que el aumento del crecimiento de las plantas después de la inoculación bacteriana se debe principalmente a la síntesis de compuestos de crecimiento vegetal, como IAA y ACC-deaminasa, que estimulan el alargamiento de los brotes y las raíces (Zhuang *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2009). Sin embargo, las concentraciones demasiado altas de IAA pueden provocar un crecimiento desequilibrado de la planta o efectos nocivos para el desarrollo de las raíces (Persello Cartieaux *et al.*, 2003). En nuestro estudio, *Klebsiella varicola* ST106 produjo las concentraciones más altas de IAA (**Tabla 1**), pero inoculada esta cepa tuvo algunos efectos deletéreos en el desarrollo de la biomasa vegetal (**Figura 3**).

Este es el primer reporte que describe las capacidades de *Bacillus paramycoides* y *Bacillus proteolyticus* para promover el crecimiento vegetal y la absorción de metales por las plantas en sistemas de microcosmos. Chen *et al.* (2018) reporto a *Bacillus wiedmanni* aislada de un vertedero con desechos eléctricos en China como una especie capaz de reducir el Pd (II) en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. *Methylobacterium* sp. fue aislada por Koo *et al.* (2007) de la rizósfera de plantas que crecen en petróleo crudo y suelo contaminado con metales y Madhaiyan *et al.* (2007) informo que la inoculación con esta bacteria metilotrófica disminuyó la absorción de metales por plantas de tomate y al mismo tiempo aumentó la biomasa vegetal. *Cellulosimicrobium* sp. fue informada por Karthik *et al.* (2017) como una bacteria reductora de Cr capaz de promover el crecimiento de plantas de alfalfa y mejorar la absorción de metales. Sin embargo, nuestro estudio es el primer informe sobre la tolerancia a Pb de *Cellulosimicrobium cellulans*.

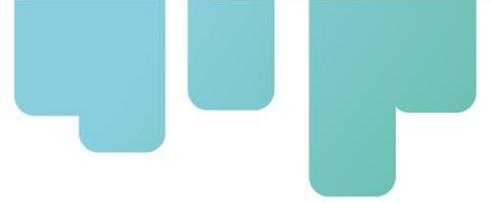
## CONCLUSIONES

Esta investigación proporciona una colección de cepas bacterianas PGP tolerantes a Pb y Cd; entre ellas, seleccionamos seis cepas, *Bacillus paramycoides* ST9, *Bacillus wiedmanni* ST29, *Bacillus proteolyticus* ST89, *Brevibacterium frigoritolerans* ST30, *Cellulosimicrobium cellulans* ST54, *Methylobacterium* sp ST85 y mediante experimentos *in vitro* determinamos la localización celular de los oligoelementos. Estas cepas son prometedoras para su inoculación tanto en especies vegetales aromáticas cultivadas en suelos altamente contaminados con metales pesados, como en especies comerciales que se cultivan en suelos moderadamente contaminados con metales para mejorar el crecimiento de las plantas en condiciones agrícolas adversas y garantizan la seguridad alimentaria. Su capacidad para retener estos elementos en la pared celular, sumada a sus múltiples capacidades de promoción del crecimiento vegetal hacen de estas bacterias de gran interés biotecnológico para la producción de inoculantes ya que su aplicación podría solucionar las problemáticas ambientales que conlleva la presencia de estos metales en el suelo. Evitando la lixiviación de los mismos, el movimiento con el viento, la acumulación en la biomasa aérea vegetal y fundamentalmente la entrada a la cadena alimentaria.

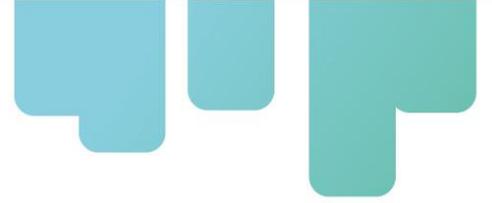


## Referencias Bibliográficas

- Abbas, M. H. H., Abdelhafez, A. A. (2013). Role of EDTA in arsenic mobilization and its uptake by maize grown on an As-polluted soil. *Chemosphere*, 90, 588–594.
- Adamidis, G. C., Aloupi, M., Mastoras, P., Papadaki, M. I. (2017). Dimitrakopoulos, P.G. Is annual or perennial harvesting more efficient in Ni phytoextraction? *Plant Soil*, 418, 205–218.
- Ahmad, M. S. A., Ashraf, M., Hussain, M. (2011). Phytotoxic effects of nickel on yield and concentration of macro- and micro-nutrients in sunflower (*Helianthus annuus* L.) achenes. *J Hazard Mater*, 185, 1295–1303.
- Alaboudi, K. A., Ahmeda, B., Brodiec, G. (2018). Phytoremediation of Pb and Cd contaminated soils by using sunflower (*Helianthus annuus*) plant. *Ann Agr Sci*, 63, 123–127.
- Ali, H., Khan, E., Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. *Chemosphere*, 91, 869–881.
- Alkan, H., Gul-Guven, R., Guven, K., Erdogan, S., Dogru, M. (2015). Biosorption of Cd, Cu, and Ni Ions by a Thermophilic *Haloalkalitolerant* Bacterial Strain (KG9) Immobilized on Amberlite XAD-4. *Pol J Environ Stud*, 24, 1903–1910.
- Awasthi, S., Chauhan, R., Dwivedi, S., Srivastava, S., Srivastava, S., Deo Tripath, R. (2018). A consortium of alga (*Chlorella vulgaris*) and bacterium (*Pseudomonas putida*) for amelioration of arsenic toxicity in rice: A promising and feasible approach. *Environ Exp Bot*, 150, 115–126. doi:10.1016/j.envexpbot.2018.03.001.
- Belimov, A. A., Hontzeas, N., Safronova, V. I., Demchinskaya, S. V., Piluzza, G., Bullitta, S., Glick, B. R. (2005). Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biol Biochem*, 37, 241–250.
- Benizri, E., Baudoin, E., Guckert, A. (2001). Root colonization by inoculated plant growth rhizobacteria. *Biocontrol Sci Techn*, 11, 557–574.
- Cardinale, M., Brusetti, L., Quatrini, P., Borin, S., Puglia, A. M., Rizzi, A., Zanardini, E., Sorlini, C., Corselli, C., Daffonchio, D. (2004). Comparison of Different Primer Sets for Use in Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Complex Bacterial Communities. *Ap Env Microb*, 70, 6147–6156.
- Cardoso, P., Corticeiro, S., Freitas, R., Figueira, E. (2018). Different efficiencies of the same mechanisms result in distinct Cd tolerance within Rhizobium. *Ecotoxicol Environ Saf*, 150, 260–269.
- Caruso, C., Rizzo, C., Mangano, S., Poli, A., Di Donato, P., Finore, I., Lo Giudice, A. (2018). Production and biotechnological potential of extracellular polymeric substances from sponge-associated antarctic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(4), 01624-17. doi:10.1128/AEM.01624-17.
- Chang, J. S., Law, R., Chang, C. C. (1997). Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU21. *Water Research*, 31, 1651–1658.
- Chen, Y., Chen, Y., Wu, J., Zhang, J. (2018). The effect of biotic and abiotic environmental factors on Pd(II) adsorption and reduction by *Bacillus wiedmannii* MSM. *Ecotoxicol Environ Saf*, 162, 546–553.
- Croes, S., Weyens, N., Janssen, J., Vercampt, H., Colpaert, J. V., Carleer, R., Vangronsveld, J. (2013).



- Bacterial communities associated with *Brassica napus* L. grown on trace element-contaminated and non-contaminated fields: a genotypic and phenotypic comparison. *Microb Biotechnol*, 6, 371–384.
- Cunningham, J. E, Kuiack, C. (1992). Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium-phosphate by *Penicillium bilaii*. *Appl Environ Microbiol*, 58, 1451–1458.
- Das, N., Basak, L. V. G., Salam, J. A., Abigail, E. A. (2012). Application of biofilms on remediation of pollutants, an overview. *J Microbiol Biotechnol*, 2,783–790.
- De, J., Ramaiah, N., Vardanyan, L. (2008). Detoxification of toxic heavy metals by marine bacteria highly resistant to mercury. *Marine Biotechnology*, 10,471–477.
- FAO. (2017). The future of food and agriculture – Trends and challenges. Rome. ISBN 978-92-5-109551-5
- Farinati, S., DalCorso, G., Bona, E., Corbella, M., Lampis, S., Cecconi, D., Polati, R., Berta, G., Vallini, G., Furini A. (2009). Proteomic analysis of *Arabidopsis halleri* shoots in response to the heavy metals cadmium and zinc and rhizosphere microorganisms. *Proteomics*, 9 (21), 4837-4850.
- Fisher, P. J., Petrini, O., Scott, H. M. L. (1992). The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize. *New Phytol*, 122, 299–305.
- Fomina, M., Gadd, G. M. (2014). Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. *Bioresour Technol.*, 160, 3–14.
- Gadd, G. M. (2004). Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma*, 122, 109-119. doi: 10.1016/j.geoderma.2004.01.002.
- Ghasemi, Z., Ghaderian, S. M., Rodríguez-Garrido, B., Prieto-Fernández, A., Kidd, P. S. (2018). Plant species-specificity and effects of bioinoculants and fertilization on plant performance for nickel phytomining. *Plant Soil*, 425, 265–285
- Glick, B. (2012). Plant Growth-promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*, Cairo.
- Glick, B. R., Penrose, D. M., Li, J. (1998). A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. *J Theor Biol.* 190, 63-68.
- Gordon, S. A., Weber, R. P. (1951). Colorimetric estimation of indole acetic acid. *Plant Physiol*, 26, 192–195.
- Govarthanana, M., Mythilib, R., Selvankumarb, T., Kamala-Kannanc, S., Kima, H. (2018). Myco-phytoremediation of arsenic- and lead-contaminated soils by *Helianthus annuus* and wood rot fungi, *Trichoderma* sp. isolated from decayed wood. *Ecotoxicol Environ Saf*, 151, 279–284.
- Greipsson, S. (2011). Phytoremediation. *Nat Educ Knowl*, 2,7–12.
- Hamer, D. H. (1986). Metallothioneins. *Annual Review of Biochemistry*, 55,913–951.
- Hassan, S. W. M., Ibrahim, H. A. H. ( 2017). Production, characterization and valuable applications of exopolysaccharides from marine *Bacillus subtilis* SH1. *Polish Journal of Microbiology*, 66 (4),449-461.
- Idris, R., Kuffner, M., Bodrossy, L. (2006). Characterization of Ni-tolerant methylbacteria associated with the hyperaccumulating plant *Thlaspi goesingense* and description of *Methylobacterium goesingense* sp. nov. *Syst Appl Microbiol*, 29, 634–644.
- Jocic, S., Miladinovic, D., Kaya, Y. (2015). Breeding and genetics of sunflower. Sunflower: Chemistry, Production, Processing and Utilization. *AOCS Press, Urbana, IL, USA*, 187–226.
- Kalderis, D., Juhasz, AL., Boopathy, R., Comfort, S. (2011). Soils contaminated with explosives: environmental fate and evaluation of state-of-the-art remediation processes (IUPACtechnical



- report). *Pure Appl Chem*, 83,1407–1484.
- Karthik, C., Barathi, S., Pugazhendhi, A., Ramkumar, S. R., Dung Thi, N. B., Arulselvi, P. I. (2017). Evaluation of Cr(VI) reduction mechanism and removal by *Cellulosimicrobium funkei* strain AR8, a novel haloalkaliphilic bacterium. *J Hazard Mater*, 333, 42–53.
- Khazaei, M., Nasserli, S., Ganjali, M. R., Khoobi, M., Nabizadeh, R., Mahvi, A. H. (2016). Response surface modeling of lead, removal by graphene oxide-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposite using central composite design. *J Environ Heal Sci Eng*, 14, 1–14.
- Koo So-Yeon, Cho Kyung-Suk. (2007). Characterization of a Heavy Metal-Resistant and Plant Growth-Promoting Rhizobacterium, *Methylobacterium* sp. SY-NiR1. *Korean J Microbiol Biot*, 35, 58–65.
- Lessl, J. T., Luo, J., Ma, L. Q. (2014). *Pteris vittata* continuously removed arsenic from non-labile fraction in three contaminated-soils during 3.5 years of phytoextraction. *J Hazard Mater*, 279, 485–492.
- Lodewyckx, C., Mergeay, M., Vangronsveld, J., Clijsters, H., van der Lelie, D. (2002). Isolation, characterization, and identification of bacteria associated to the zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* subsp. *calaminaria*. *Int J Phytoremediat*, 4, 101–115.
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., Grill, E. (2009). Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science*, 324, 1064–1068.
- Madhaiyan, M. S., Poonguzhali, S., Sa, T. (2007). Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Chemosphere*, 69, 220–228.
- Mastretta, C., Taghavi, S., van der Lelie, D., Mengoni, A., Galardi, F., Gonnelli, C., Barac, T., Boulet, J., Weyens, N., Vangronsveld, J. (2009). Endophytic bacteria from seeds of *Nicotiana tabacum* can reduce cadmium phytotoxicity. *Int J Phytoremediat*, 11, 251–267.
- Mehta, S., Nautiyal, C. S. (2001). An Efficient Method for Qualitative Screening of Phosphate-Solubilizing Bacteria. *Curr Microbiol*, 43, 51–56.
- Mendez, M. O., Maier, R. M. (2008). Phytostabilization of mine tailings in arid and semiarid environments - an emerging remediation technology. *Environ Health Persp*, 116, 278–283.
- Michelland, R. J., Dejean, S., Combes, S., Fortun-Lamothe, L., Cauquil, L. (2009). StatFingerprints: A friendly graphical interface program for processing and analysis of microbial fingerprint profiles. *Mol Ecol Resour*, 9, 1359–1363.
- Montalban, B., Croes, S., Weyens, N., Lobo, M., Perez-Sanz, A., Vangronsveld, J. (2016). Characterization of bacterial communities associated with *Brassica napus* L. growing on a Zn-contaminated soil and their effects on root growth. *Int J Phytoremediat*, 18(10), 985–993.
- Montalban, B., Thijs, S., Lobo, M. C., Weyens, N., Ameloot, M., Vangronsveld, J., Perez-Sanz, A. (2017). Cultivar and Metal-Specific Effects of Endophytic Bacteria in *Helianthus tuberosus* Exposed to Cd and Zn. *Int J Mol Sci*, 18(10), 2026–2049.
- Morillo, J. A., Garcia Ribera, R., Quesada, T., Aguilera, M., Ramos Cormenzana, A., Naees, M., Ali, Q., Shahbaz, M., Ali, F. (2011). Role of rhizobacteria in phytoremediation of heavy metals: an overview. *Int Res J Plant Sci*, 2, 220-232.
- Mulligan, C. N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environ Pollut*, 133, 183–198.
- Naik, M. M., Dubey, S. K. (2011). Lead-enhanced siderophore production and alteration in cell morphology in a Pb-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain 4EA. *Curr Microbiol*, 62(2),409–



414. doi:10.1007/s00284-010-9722-2.
- Naik, M. M., Khanolkar, D. S., Dubey, S. K. (2013). Lead resistant *Providentiaal califaciens* strain 2EA bioprecipitates Pb<sup>2+</sup> as lead phosphate. *Letters in Applied Microbiology*, 56, 99-104.
- Nanda, M., Kumar, V., Sharmac, D. K. (2019). Multimetal tolerance mechanisms in bacteria: The resistance strategies acquired by bacteria that can be exploited to 'clean-up' heavy metal contaminants from water. *Aquatic Toxicology*, 212, 1-10.
- Nguyen, C., Yan, W., Le Tacon, F., Lapayrie, F. (1992). Genetic variability of phosphate solubilising activity by monocaryotic and dicaryotic mycelia of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) P.D. *Orton Plant Soil*, 143, 193–199.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., Kolter, R. (2000). Biofilm formation as a microbial development. *Annu Rev Microbiol*, 54, 49–79.
- Oh, S. E., Hassan, S. H., Joo, J. H. (2009). Biosorption of heavy metals by lyophilized cells of *Pseudomonas stutzeri*. *World J Microb Biot*, 25, 1771–1778.
- Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G. A., Piotrowska-Seget, Z. (2016). Monitoring the changes in a bacterial community in petroleum-polluted soil bioaugmented with hydrocarbon-degrading strains. *Appl Soil Ecol*, 105, 76–85.
- Parab, H., Joshi, S., Sudersanan, M., Shenoy, N., Lali, A., Sarma, U. (2010). Removal and recovery of cobalt from aqueous solutions by adsorption using low cost lignocellulosic biomass-coir pith. *J Environ Sci and Heal*, 45, 603–611.
- Park, J. H., Bolan, N., Meghraj, M., Naidu, N. (2011a). Concomitant rock phosphate dissolution and lead immobilization by phosphate solubilising bacteria (*Enterobacter* sp.). *Journal of Environmental Management*, 92, 1115–1120.
- Persello Cartieaux, F., Nussaume, L., Robaglia, C. (2003). Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant Cell Environ.*, 26, 189–199.
- Płociniczak, T., Chod, M., Pacwa-Płociniczak, M., Piotrowska-Seget, Z. (2016). Metal-tolerant endophytic bacteria associated with *Silene vulgaris* support the Cd and Zn phytoextraction in non-host plants. *Chemosphere*, 219, 250–260.
- Płociniczak, T., Sinkkonen, A., Romantschuk, M., Sułowicz, S., Piotrowska-Seget, Z. (2016). Rhizospheric Bacterial Strain *Brevibacterium casei* MH8a Colonizes Plant Tissues and Enhances Cd, Zn, Cu Phytoextraction by White Mustard. *Front Plant Sci.*, 7, 101–122.
- Prapagdee, B., Chanprasert, M., Mongkolsuk, S. (2013). Bioaugmentation with cadmium-resistant plant growth-promoting rhizobacteria to assist cadmium phytoextraction by *Helianthus annuus*. *Chemosphere*, 92, 659–666.
- Ramzani, P. M. A., Khan, W. D., Iqbal, M., Kausar, S., Ali, S., Rizwan, M., Virk, Z. A. (2016). Effect of different amendments on rice (*Oryza sativa* L.) growth, yield, nutrient uptake and grain quality in Ni-contaminated soil. *Environ Sci Pollut Res Int.*, 23, 18585-18595.
- Remans, T., Nacry, P., Pervent, M., Girin, T., Tillard, P., Lepetit, M., Gojon, A. (2006). A central role for the nitrate transporter NRT2.1 in the integrated morphological and physiological responses of the root system to nitrogen limitation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 140, 909–921.
- Rizwan, M., Ali, S., Rizvi, H., Rinklebe, J., Tsang, D. C., Meers, E., Ok, Y. S., Ishaque, W. (2016). Phytomanagement of heavy metals in contaminated soils using sunflower: A review. *Crit Rev Environ Sci Technol*, 46, 1498–1528.
- Romick, T. L., Fleming, H. P. (1998). Acetoin production as an indicator of growth and metabolic



- inhibition of *Listeria monocytogenes*. *J Appl Microbiol*, 84, 18–24.
- Saran, A., Fernandez, L., Cora, F., Savio, M., Thijs, S., Vangronsveld, J., Merini, L. J. (2019). Phytostabilization of Pb and Cd polluted soils using *Helianthus petiolaris* as pioneer aromatic plant species. *Int J Phytoremediat*, 11, 1–9
- Sessitsch, A., Kuffner, M., Kidd, P., Vangronsveld, J., Wenzel, W., Fallmann, K., Puschenreiter, M. (2013). The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. *Soil Biol Biochem*, 60, 182–194.
- Seth, C. S. (2012). A review on mechanisms of plant tolerance and role of transgenic plants in environmental cleanup. *Bot Rev*, 78, 32–62.
- Shen, L., Xia, J. L., He, H., Nie, ZY. (2008). Comparative study on biosorption of Pb(II) and Cr(VI) by *Synechococcus* sp. *Trans Nonferr Metal Soc*, 18(6), 1336–1342. doi:10.1016/S1003-6326(09)60006-6.
- Sheng, X. F., Xia, J. J., Jiang, C. Y., He, L. Y., Qian, M. (2008). Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. *Environ Pollut*, 156, 1164–1170.
- Shin, S. H., Lim, Y., Lee, S. E., Yang, N. W., Rhee, J. H. (2001). CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids. *J Microbiol Meth*, 44, 89–95.
- Shin, M. N., Shim, J., You, Y., Myung, H., Bang, K. S., Cho, M., Kamala- Kannan, S., Oh, B. T. (2012). Characterization of lead resistant endophytic *Bacillus* sp. MN3-4 and its potential for promoting lead accumulation in metal hyperaccumulator *Alnus firma*. *J Hazard Mater*, 199–200, 314–320. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.11.010.
- Srikakolapu, M. S. (2014). Heavy metal tolerance of *Bacillus* spp. *Society Sci Dev Agric Tech*, 8, 315–318.
- Sun, Z., Lv, Y., Liu, Y., Ren, R. (2016). Removal of nitrogen by heterotrophic nitrificationaerobic denitrification of a novel metal resistant bacterium *Cupriavidus* sp. S1. *Bioresour Technol*, 220, 142–150.
- Taghavi, S., Lesaulnier, C., Monchy, S., Wattiez, R., Mergeay, M., vanderLelie, D. (2009). Lead (II) resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34: inter play between plasmid and chromosomally-located functions. *Antonievan Leeuwenhoek*, 96, 171–182.
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., Sutton, D. J. (2012). Heavy Metals Toxicity and the Environment. *Springer: Basel, Switzerland*, 101, 133–164.
- Truyens, S., Jambon, I., Croes, S., Janssen, J., Weyens, N., Mench, M., Carleer, R., Cuypers, A., Vangronsveld, J. (2014). The effect of long-term Cd and Ni exposure on seed endophytes of *Agrostis capillaris* and their potential application in phytoremediation of metal-contaminated soils. *Int J Phytoremediat*, 16, 643–659.
- Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., Thewys, T., Vassilev, A., Meers, E., Nehnevajova, E., Van der Lelie, D., Mench, M. (2009). Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environmental Science and Pollution Research*, 16, 765–794. doi: 10.1007/s11356-009-0213-6
- Zhuang, L., Zhang, J., Xiang, X. (2007). Point mutations in the stem region and the fourth AAA domain of cytoplasmic dynein heavy chain partially suppress the phenotype of NUDF/LIS1 loss in *Aspergillus nidulans*. *Genetic*, 175, 1185–1196.
- Zubair, M., Shakir, M., Ali, Q., Rani, N., Fatima, N., Farooq, S., Shafiq, S., Kanwal, N., Ali, F., Nasir, I. A.,



(2016). Rhizobacteria and phytoremediation of heavy metals. *Environ Technol Rev*, 5, 112-119.  
doi:10.1080/21622515.2016.1259358.



## Instituciones participantes



Secretaría Técnica Administrativa



Con el apoyo de:



[www.fontagro.org](http://www.fontagro.org)

FONTAGRO  
Banco interamericano de Desarrollo  
1300 New York Avenue, NW, Stop  
W0502, Washington DC 20577  
Correo electrónico: [fontagro@iadb.org](mailto:fontagro@iadb.org)