



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**

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

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

**“EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN BACTERIAS ENDÓFITAS – *Typha latifolia* (ESPADAÑA) EN LA REMOCIÓN DE Cd (II) EN SOLUCIÓN”**

**PRESENTA:**

**BQ. SILVIA KARINA NETRO SOTO**

**CODIRECTORES DE TESIS:**

**DRA. CANDY CARRANZA ÁLVAREZ**

**DR. ALEJANDRO HERNÁNDEZ MORALES**

**ASESORES:**

**DR. JUAN CARLOS GARCÍA LÓPEZ**

**San Luis Potosí, S.L.P., octubre de 2018**

## **CRÉDITOS INSTITUCIONALES**

**PROYECTO REALIZADO EN:**

**LABORATORIO DE CIENCIAS AMBIENTALES DE LA UNIDAD ACADÉMICA  
MULTIDISCIPLINARIA ZONA HUASTECA (UAMZH), UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ (UASLP). MÉXICO.**

**CON FINANCIAMIENTO DE:  
CONACYT 2016 No. 269491**

**A TRAVÉS DEL PROYECTO DENOMINADO:  
“EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN BACTERIAS ENDÓFITAS – *Typha  
latifolia* (ESPADAÑA) EN LA REMOCIÓN DE Cd (II) EN SOLUCIÓN”**

**AGRADEZCO A CONACyT EL OTORGAMIENTO DE LA BECA-TESIS  
Becario No. 606239**

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

## **DEDICATORIA**

La presente tesis la dedico principalmente a Dios por permitirme llegar a esta culminación con salud y por ayudarme a lograr mis objetivos y nunca dejarme sola en los momentos más difíciles que se me presentaron, ayudándome a saber que todo iba a estar bien y ayudarme a darme cuenta de que soy capaz de lograr muchas cosas a la vez y que siempre tendré su amor infinito.

### **A mis padres**

Dora, Filemón y Silvia que siempre creyeron en mí y me brindaron su apoyo incondicional, por sus consejos, sus valores y la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien y lo más importante, el amor que nos tenemos.

### **A mi esposo**

Que, si bien dentro del desarrollo de esta tesis se presentaron muchos momentos en los cuales parecía que los deberes y compromisos fueran a acabar por completo con mi vida y mi existencia, siempre me apoyó en cada decisión que tomara, por su paciencia y entrega para conmigo, te dedico esta tesis y te agradezco por todo lo que haces por mí. Te amo con todo mi corazón.

### **A mis tíos y primos.**

A mis tíos Nora y Ricardo por brindarme su apoyo y un hogar en el cual vivir dentro de mi estancia en SLP. Por creer en mí y nunca dejarme sola. Los quiero mucho.

A Mabel, Ricky, Nora Luz y mi Mariquita, porque fueron parte muy fundamental para salir a delante y por siempre sacarme una sonrisa porque saben lo difícil que fue para mí estar en SLP lejos de mi mamá y lalo. Los amo mucho.

### **A mis gordas**

Porque siempre me hacen feliz, su presencia solo me da alegría y me anima a mantener la cabeza en alto, porque para ustedes mi felicidad es lo primordial. L@s amo Princesa, Morita, Bella (QEPD), Coco y Arusha.

### **A mis compañeros**

Eli y compañeros del laboratorio de Ciencias Ambientales, a los chicos de servicio por su ayuda. Gracias por ser parte de este proyecto.

### **A mi comité tutelar**

A la Dra. Candy, Dr. Juan Carlos y Dr. Alejandro, por ser parte de mi comité y por siempre brindarme su apoyo, por ayudarme a resolver dudas y siempre estar conmigo. Gracias.

## ABSTRACT

Cadmium is a metal for which there is no biological or chemical degradation in nature, due to the above, there are technologies that are used to remove or immobilize heavy metals. "Phytoremediation" uses plants to extract pollutants. In addition, the plants can interact with endophytic bacteria of the rhizosphere that favor the mobilization of metals. Therefore, the objective of this study is to evaluate the interaction of *Pseudomonas rhodesiae* in the removal of Cd (II) with *Typha latifolia* under controlled conditions. The *in vitro* culture of *Typha latifolia* seeds was carried out, an initial experiment with bacteria (*Pseudomonas rhodesiae*), as well as two treatments (plant + bacteria + metal and plant + metal), in which the plant-bacteria interaction was evaluated in the removal of 0, 5, 10, 25, and 50 ppm of Cd, and finally the verification of the internalization of the bacterium in the seedling.

As results, it was found that *P. rhodesiae* can tolerate concentrations of 5 and 10 ppm of Cd without the presence of *Typha latifolia* in Hoagland medium with 1% sucrose; On the other hand, the highest percentage of cadmium removal occurred at a concentration of 5 ppm of cadmium with the presence of *P. rhodesiae* on day 9 of the experiment with a 97.66% removal; same concentration at which there was greater accumulation of the metal in the stem of the seedlings of *T. latifolia* with 1059.82 mg of cadmium per kilogram of stem and it was possible to verify the internalization of *P. rhodesiae* in concentrations of 0 and 5 ppm of Cd (II), only in root.

Key words: phytoremediation, endophytic bacteria, *P. rhodesiae*, *Typha latifolia*, cadmium.

## RESUMEN

El cadmio es un metal para el que no existe degradación biológica o química en la naturaleza, debido a lo anterior, existen tecnologías que se utilizan para remover o inmovilizar a los metales pesados. Entre ellas se encuentra la “fitorremediación” que utiliza plantas para extraer contaminantes. Además, las plantas pueden interactuar con bacterias endófitas de la rizósfera que favorecen la movilización de los metales. Por ello, el objetivo de este estudio fue evaluar la interacción de *Pseudomonas rhodesiae* en la remoción de Cd (II) con *Typha latifolia* bajo condiciones controladas. Se llevó a cabo el cultivo *in vitro* de semillas de *Typha latifolia*, un experimento inicial con bacterias (*Pseudomonas rhodesiae*), así como dos tratamientos (planta+bacteria+metal y planta+metal), en los que se evaluó la interacción planta-bacteria en la remoción de 0, 5, 10, 25, y 50 ppm de Cd, y por último la comprobación de la internalización de la bacteria en la plántula. Como resultados se encontró que *P. rhodesiae* puede tolerar concentraciones de 5 y 10 ppm de Cd sin la presencia de *Typha latifolia* en medio Hoagland con 1 % de sacarosa; por otro lado el mayor porcentaje de remoción de cadmio ocurrió a una concentración de 5 ppm de cadmio con la presencia de *P. rhodesiae* al día 9 del experimento con un 97.66% de remoción; misma concentración a la cual hubo mayor acumulación del metal en el tallo de las plántulas de *T. latifolia* con 1059.82 mg de cadmio por kilogramo de tallo y se logró comprobar la internalización de *P. rhodesiae* en concentraciones de 0 y 5 ppm de Cd (II), únicamente en raíz.

Palabras clave: fitorremediación, bacterias endófitas, *P. rhodesiae*, *Typha latifolia*, cadmio.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>11</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>12</b>
2.1. OBJETIVO GENERAL .....	12
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	12
<b>3. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>13</b>
3.1. Características físicas y biológicas de <i>Typha latifolia</i> .....	13
3.2. Elementos potencialmente tóxicos (EPT) .....	13
3.2.1. Cadmio .....	14
3.3. Fitorremediación .....	14
3.3.1. Plantas hiperacumuladoras .....	16
3.3.2. Toxicidad del Cadmio en plantas .....	19
3.3.3. Estrategias de tolerancia al Cadmio por plantas.....	22
3.4. Bacterias endófitas.....	22
3.4.1. Bacterias endófitas y fitorremediación .....	23
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>26</b>
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	<b>27</b>
<b>6. METODOLOGÍA</b> .....	<b>28</b>
6.1 Cultivo <i>in vitro</i> de semillas de <i>Typha latifolia</i> .....	28
6.1.1. Evaluación de protocolos de asepsia aplicados a las semillas de <i>T. latifolia</i> .....	28
6.1.2. Preparación del medio de cultivo MS.....	28
6.1.3. Inicio del cultivo <i>in vitro</i> de <i>T. latifolia</i> .....	29
6.2. Evaluación del tiempo de germinación de cada protocolo de asepsia probado en las semillas de <i>T. latifolia</i> . .....	30
6.3. Selección de plántulas de <i>T. latifolia</i> .....	30
6.4. Diseño experimental .....	31
6.5. Digestión ácida para el medio nutritivo Hoagland .....	32
6.6. Digestión ácida a temperatura ambiente para plántulas de <i>Typha latifolia</i> .	32
6.7. Determinación y cuantificación de clorofila .....	33
6.8. Determinación de metales en muestras vegetales.....	33

6.9. Evaluación con el aislado <i>P. rhodesiae</i> a concentraciones de 0, 5 y 10 ppm de cadmio .....	34
6.10. Comprobación de la internalización de la bacteria en los tejidos radiculares de <i>Typha latifolia</i> .....	34
6.11. Análisis estadístico.....	34
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>35</b>
7.1. Viabilidad y germinación de la semilla de <i>Typha latifolia</i> .....	35
7.1.1. Evaluación de protocolos de asepsia aplicados a las semillas de <i>T. latifolia</i> .....	36
7.2. Evaluación del aislado <i>P. rhodesiae</i> a concentraciones de 0, 5 y 10 ppm de cadmio .....	41
7.3. Determinación del número de raíces iniciales y finales, así como brotes nuevos de las plántulas de <i>T. latifolia</i> expuestas a Cd (II) con y sin la presencia de <i>Pseudomonas rhodesiae</i> .....	42
7.6. Evaluación del proceso de fitoextracción de Cd (II) por <i>T. latifolia</i> en presencia y ausencia de <i>Pseudomonas rhodesiae</i> .....	44
7.7. Evaluación del contenido de Cd (II) acumulado en el tejido vegetal de <i>T. latifolia</i> en el proceso de fitoextracción en presencia y ausencia de <i>Pseudomonas rhodesiae</i> .....	46
7.8 Determinación del contenido de clorofila inicial y final de las plántulas de <i>T. latifolia</i> expuestas a Cd (II), con y sin la presencia de <i>Pseudomonas rhodesiae</i> .....	48
7.9 Comprobación de la internalización de la bacteria en los tejidos radiculares de <i>Typha latifolia</i> .....	52
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>53</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>54</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de mecanismos de remoción en fitorremediación (Mentaberry A., 2008).....	16
Figura 2. Respuesta celular al cadmio: producción de ROS, daños oxidativos y señalización. Modificado de (Romero-Puertas, 2002) HSP 71,2, proteína de estrés térmico de 71,2 kDa; PrP4A, proteína relacionada con la patogénesis. C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> , etileno. ....	21
Figura 3. Siembra de semillas de <i>Typha latifolia</i> en condiciones asépticas. ....	30
Figura 4. Semilla de <i>Typha latifolia</i> teñida con tetrazolio al 10% con el fin de observar la viabilidad y tiempo de germinación de la semilla; A) en el día uno observamos como la semilla se encuentra viable al teñirse de color rojo, B) Día 2 empieza la germinación y C) Día 3 se realiza la germinación de la semilla. ....	36
Figura 5. Porcentaje de germinación de las semillas de <i>T. latifolia</i> con los dos protocolos de asepsia probados.....	39
Figura 6. Proceso de germinación de las semillas de <i>T. latifolia</i> con el protocolo de asepsia realizado por Moctezuma-Granados (2017). A) semillas al día cero, B) semillas al séptimo día; C) plántulas al día 12 con una longitud de 5 cm y D) plántulas al tercer mes con una longitud de 15 a 20 cm.....	40
Figura 7. Proceso de germinación de las semillas de <i>Typha latifolia</i> con el protocolo de asepsia realizado con el fotoperiodo de luz (3 días de oscuridad a 4 °C). A) semillas al día 0, B) semillas al tercer día, C) plántulas al séptimo día con una longitud de 5 cm y D) plántulas al tercer mes con una longitud de 20 a 25 cm.....	40
Figura 8. Raíces iniciales y finales de las plántulas expuestas a Cd (II) con y sin la presencia de <i>P. rhodesiae</i> . Las barras indican el error estándar. (p< 0.05).....	43
Figura 9. Número de brotes nuevos en las plántulas de <i>T. latifolia</i> a lo largo de la experimentación. Las barras indican el promedio de brotes para cada tratamiento y concentración utilizados y su error estándar. (p< 0.05).....	44
Figura 10. Comparación del aspecto de las plántulas de <i>T. latifolia</i> expuestas a diferentes concentraciones de Cd (II) en ausencia y presencia de <i>P. rhodesiae</i> . A) día 1 sin bacteria, B) día 12 sin bacteria, C) día 1 con bacteria D) día 12 con bacteria. ....	45

Figura 11. Porcentaje de remoción de cadmio por plántulas de <i>T. latifolia</i> con y sin la presencia de <i>P. rhodesiae</i> en medio de cultivo Hoagland enriquecido con 1 % de sacarosa en función del tiempo. Las barras muestran el error estándar de cada tratamiento. ( $p < 0.05$ ).....	46
Figura 12. Concentración en mg/kg de Cd (II) en la raíz y tallo de <i>T. latifolia</i> . ....	48
Figura 13. efectos de Cd como un potente inhibidor de la fotosíntesis. La inhibición de la fotosíntesis puede atribuirse a la disminución de la biosíntesis de la clorofila, la interrupción del $O_2$ - reacciones de PSII y alteración del flujo de electrones alrededor de PSI y PSII (Parmar, Kumari, & Sharma., 2013).....	50
Figura 14. Contenido de clorofila inicial y final de las plántulas de <i>T. latifolia</i> expuestas a Cd (II), con la presencia de <i>P. rhodesiae</i> . ....	51
Figura 15. Contenido de clorofila inicial y final de las plántulas de <i>T. latifolia</i> expuestas a Cd (II), sin la presencia de <i>P. rhodesiae</i> . ....	51

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de plantas implicadas en procesos de fitorremediación de metales pesados. Tomado de (Pineda & Rodríguez, 2016). .....	18
Tabla 2. Características de promoción de crecimiento vegetal del aislado tolerante a 500 y 750 ppm de Cd (II).....	25
Tabla 3. Composición del medio de cultivo para la siembra de las semillas de <i>Typha latifolia</i> . .....	29
Tabla 4. Evaluación de dos protocolos de asepsia aplicados a las semillas de <i>T. latifolia</i> y evaluación del porcentaje de germinación y contaminación de cada uno de ellos.....	37
Tabla 5. Resultados de la presencia de <i>P. rhodesiae</i> a diferentes concentraciones del experimento piloto. ....	42

## 1. INTRODUCCIÓN

La contaminación de origen antropogénico suele aparecer cuando existen concentraciones superiores a las encontradas naturalmente en cualquier ecosistema, la cual es producida por sustancias contaminantes provenientes de actividades industriales, domésticas, agropecuarias, entre otras, generando impactos negativos en los seres vivos.

Actualmente, existen diferentes procesos fisicoquímicos que ayudan a mitigar las consecuencias de dicha contaminación, los cuales son muy efectivos, pero al mismo tiempo de elevado costo. Por lo anterior, actualmente se han propuesto diferentes técnicas naturales que cuentan con la misma eficacia, pero a un costo relativamente bajo y con un menor impacto en el ecosistema.

Uno de ellos es la fitorremediación, alternativa sustentable y de bajo costo para la limpieza de sitios contaminados con químicos peligrosos, que “se basa en la aplicación de una serie de tecnologías que utilizan plantas vasculares fotoautótrofas para la remediación de sitios contaminados con contaminantes inorgánicos y orgánicos” (Reichenauer & Germida, 2008).

Investigaciones previas han demostrado que la interacción simbiótica que existe entre plantas y bacterias, aumentan la fitoextracción de metales pesados; por lo tanto, el objetivo de este proyecto consistió en evaluar la interacción entre bacterias de la especie *Pseudomonas spp.* y *Typha latifolia*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la interacción de *Pseudomonas rhodesiae* con *Typha latifolia*, en la remoción de Cd (II) en condiciones controladas.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer las condiciones de cultivo *in vitro* que favorecen el crecimiento de *Pseudomonas rhodesiae* asociadas a *Typha latifolia*.
- Evaluar el efecto *in vitro* de *Pseudomonas rhodesiae* en la fitoextracción de distintas concentraciones de Cd (II) por plántulas de *Typha latifolia*.
- Determinar los parámetros de fitotoxicidad durante la fitoextracción de Cd (II) en plantas asociadas a *Pseudomonas rhodesiae* y plantas libres de bacterias.
- Comprobar la internalización de la bacteria en las raíces de las plántulas de *Typha latifolia*.

### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1. Características físicas y biológicas de *Typha latifolia***

El género *Typha* pertenece a la familia Typhaceae, incluye a 24 especies que crecen en hábitats acuáticos y semiacuáticos. Su distribución abarca todos los continentes a excepción de la Antártida, y se pueden encontrar en humedales, lagos, lagunas y a las orillas de los ríos (Hamdi, 2010).

Entre dichas especies se encuentra *Typha latifolia*, cuyas características son: polen en tétrades (cuatro granos unidos) en femenina contigua a la masculina y de color oscuro (Cirujano & Morales, 1995).

Es una planta herbácea perenne, monocotiledónea, que se enraíza firmemente bajo el agua, en el fondo de espejos o cursos de agua lentos. Desarrolla rizomas subterráneos que le permiten extenderse y constituir grandes poblaciones. Sus hojas basales tienen forma de cinta larga y pueden medir hasta 2 metros de altura por 2 centímetros de ancho, sus largos tallos culminan en una inflorescencia constituida en su parte más baja por una espiga cilíndrica compacta de color marrón, porción que alberga a las flores femeninas. En la parte inmediatamente superior se encuentran las flores masculinas, reunidas en un tramo final más delgado y de tono más claro.

Es considerada como una planta de rápido crecimiento y propagación, por lo que puede convertirse en una especie invasora si no se controla su desarrollo o si se le cultiva en áreas poco extensas. *T. latifolia* no es exigente en materia de suelos y es capaz de tolerar una amplia variedad de temperaturas (Flor de Planta, 2016).

#### **3.2. Elementos potencialmente tóxicos (EPT)**

El desarrollo tecnológico, el consumo masivo e indiscriminado y la producción de desechos principalmente urbanos, ha provocado la presencia de muchos metales en cantidades importantes en el ambiente, provocando numerosos efectos sobre la salud y el equilibrio de los ecosistemas. Si bien, algunos metales son indispensables en bajas concentraciones, ya que forman parte de sistemas enzimáticos, como el

cobalto, zinc, molibdeno, o como el hierro que forma parte de la hemoglobina. Su ausencia causa enfermedades y su exceso intoxicaciones (Fergusson, 1990).

Los elementos más importantes por su toxicidad son: Arsénico (As), Cadmio (Cd), Cobalto (Co), Cromo (Cr), Cobre (Cu), Mercurio (Hg), Níquel (Ni), Plomo (Pb), Estaño (Sn) y Zinc (Zn). Éstos se incorporan con los alimentos o como partículas que se respiran y se van acumulando en el organismo, hasta llegar a límites de toxicidad. Si la incorporación es lenta se producen intoxicaciones crónicas, que dañan los tejidos u órganos en los que se acumulan (Fergusson, 1990).

### **3.2.1. Cadmio**

El cadmio se considera un metal y un EPT para el que no existe minería específica por encontrarse siempre en cantidades traza. Se encuentra asociado a la Greenockita (CdS) y a la esfarelita (ZnS) (Tapia, 2010). Su presencia en el ambiente se debe principalmente a la contaminación antropogénica, ya que se recupera como subproducto de la minería, fundición y refinado del zinc, plomo y cobre (Bernhoft, 2013).

No existe degradación biológica o química en la naturaleza para este elemento como ocurre con todos los EPT. Además, su peligrosidad radica en que puede ser transferido a considerables distancias, produciendo en organismos acuáticos procesos de bioacumulación y biomagnificación (Tapia, 2010).

### **3.3. Fitorremediación**

Actualmente existen estudios tendientes a resolver la contaminación originada por metales pesados en suelos, mediante el uso de plantas que tienen la propiedad de acumular metales pesados; proceso denominado fitorremediación que consiste en la remoción, transferencia, estabilización y/o degradación y neutralización de compuestos orgánicos, inorgánicos y radioactivos que resultan tóxicos en suelos y agua. Rodríguez O. (2006) estudiaron la extracción de Cd y Pb en plantas de tabaco encontrando potencial en dicha planta.

La fitorremediación tiene como objetivo modificar la especie química y/o asimilar los metales pesados presentes en el suelo, lo cual tiene muchas ventajas con respecto a los métodos convencionales de tratamientos en lugares contaminados.

Es una tecnología de bajo costo, que tiene impacto regenerativo en lugares en donde se aplica, debido a que la capacidad extractiva es proporcional al crecimiento vegetal (Harvey, 2002). La fitorremediación representa una estrategia técnicamente eficiente y económicamente viable. Sin embargo, hay algunas limitaciones que deben ser superadas. Por ejemplo, los mecanismos moleculares, bioquímicos y fisiológicos, son pocos conocidos e insuficientemente entendidos; sin embargo, a pesar de esto, un gran número de plantas definidas como hiperacumuladoras, todavía pueden darse a conocer e identificarse (Freitas, 2004).

La fitorremediación de suelos contaminados es una técnica con grandes posibilidades. El uso de especies vegetales tolerantes a altos niveles de metales en suelos y agua permite actividades de restauración con menor impacto ambiental sobre los terrenos que otras técnicas tradicionales, más invasivas y con efectos secundarios adversos (Robinson, 1997). Las enmiendas orgánicas pueden utilizarse igualmente para la remediación de suelos contaminados. La unión entre la materia orgánica y los metales (formación de moléculas complejas de elevada estabilidad), puede disminuir la capacidad de fitoextracción, disminuyendo así la fitotoxicidad y permitir que se pueda reestablecer la vegetación de sitios contaminados (Robinson, 1997).

La fitorremediación contempla seis procesos básicos a través de los cuales las plantas pueden contribuir a la recuperación de suelos, sedimentos y aguas contaminadas (Figura 1). Dependiendo de la estrategia de recuperación, estos procesos darán lugar a la contención o a la eliminación de los contaminantes del suelo. La fitoestabilización y la fitoinmovilización corresponden a la primera de las dos estrategias, mientras que la fitoextracción, fitodegradación, fitovolatilización y rizofiltración representan procesos de eliminación (Bernal, Clemente, Vazquez, & Walker, 2007).

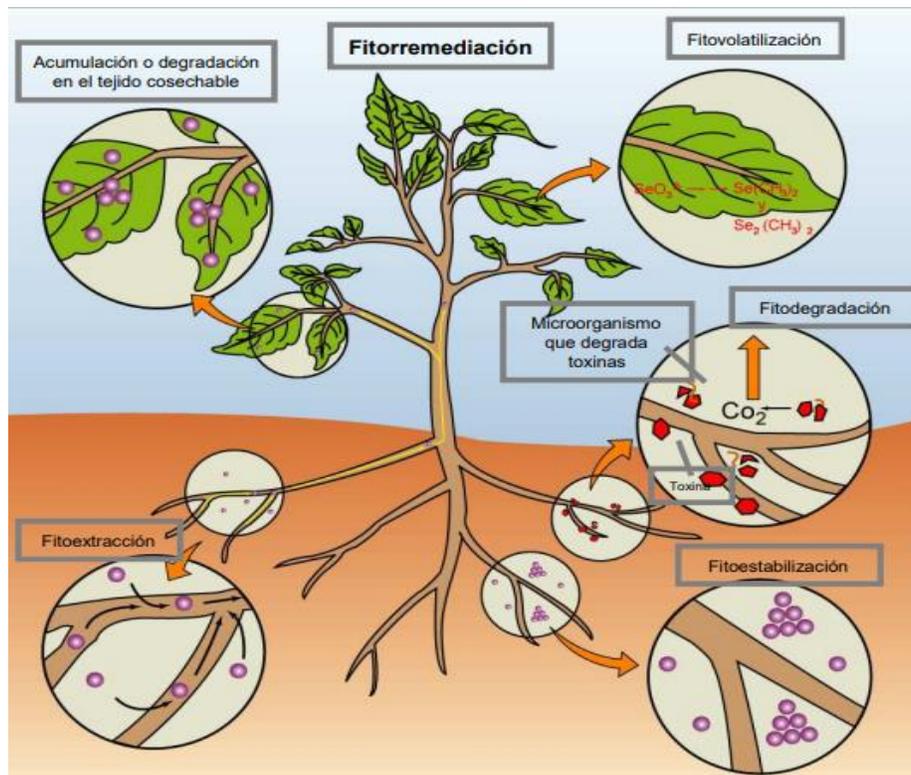


Figura 1. Esquema de mecanismos de remoción en fitorremediación (Mentaberry A., 2008).

### 3.3.1. Plantas hiperacumuladoras

Todas las plantas absorben metales del suelo donde se encuentran, pero en distinto grado, dependiendo de la especie vegetal, y de las características y contenido en metales del suelo. Las plantas pueden adoptar distintas estrategias frente a la presencia de metales en su entorno (Baker, 1981; Barceló & Poschenrieder, 2003). Algunas plantas basan su resistencia a los metales con la estrategia de una eficiente exclusión del metal, restringiendo su transporte a la parte aérea. Otras acumulan el metal en la parte aérea en una forma no tóxica para la planta. La exclusión es más característica de especies sensibles y tolerantes a los metales, y la acumulación es más común de especies que aparecen siempre en suelos contaminados. Algunas plantas son capaces de acumular cantidades excesivas de metales pesados, y se les conoce con el término "hiperacumuladoras" que fue introducido primero por (Brooks, 1977), refiriéndose originalmente a las plantas que adquirieron una

concentración excesiva del níquel (1000 mg/g) sobre una base del peso seco. El concepto fue ampliado más adelante a otros elementos tales como cadmio, cobalto, cobre, plomo, selenio y zinc. Las plantas hiperacumuladoras generalmente tienen poca biomasa debido a que ellas utilizan más energía en los mecanismos necesarios para adaptarse a las altas concentraciones de metal en sus tejidos (Kabata-Pendias, 2000).

La capacidad de las plantas para bioacumular metales y otros posibles contaminantes varía según la especie vegetal y la naturaleza de los contaminantes. Estas diferencias en la absorción de metales pueden ser atribuidas precisamente a la capacidad de retención del metal en cuestión, por el suelo de cultivo y a la interacción planta-raíz-metal y al metabolismo vegetal propio (Vig, 2003). De acuerdo con la estrategia de acumulación, las plantas hiperacumuladoras pueden superar en 100 o más veces los valores normales de metales acumulados (Baker A., 1981).

Estas plantas son especies muy tolerantes a uno o más metales pesados y a menudo su distribución está restringida a suelos ricos en un amplio rango de concentraciones de metales, dado que no son competitivas en zonas no contaminadas. La hiperacumulación ha evolucionado en más de 400 especies de plantas repartidas en 45 familias botánicas, siendo la familia *Brassicaceae* una de las que cuenta con más géneros de este tipo; familia que se encuentra distribuida por todo el mundo, predominando en Nueva Caledonia, Cuba y la región Mediterránea, entre otros lugares (Baker A. M., 2000).

En la Tabla 1 se puede observar diferentes plantas implicadas en el proceso de fitorremediación de metales pesados.

Tabla 1. Ejemplos de plantas implicadas en procesos de fitorremediación de metales pesados. Tomado de (Pineda & Rodríguez, 2016).

PLANTA	METAL	REFERENCIA
<i>Salvinia natans</i> Kunth.	Cd	Buta et al, 2014
<i>Eichhornia crassipes</i> Mart.	Cd, Cr	Zhu et al, 1999; Dos Santos y Lenzi, 2000; Prasand y Freitas, 2003; Jafari, 2010; Kumar, 2010; Mane et al, 2010; Carrión et al, 2012; Chattopadhyay et al, 2012; Saleh, 2012; Sood et al, 2012; Borker et al, 2013; Buta et al, 2014, Swain et al, 2014.
<i>Lemna minor</i> L.	Cd, Cr, Hg	Prasand y Freitas, 2003; Kumar, 2010, Bharti y Banerjee, 2013, Ücücü et al, 2013; Buta et al, 2014.
<i>Elodea canadensis</i> Michx.	Cd	Buta et al, 2014.
<i>Pistia stratiotes</i> L.	Cd	Prasand y Freitas, 2003; Buta et al, 2014; Kumar et al, 2012; Akinbile et al, 2012.
<i>Limnocharis flava</i> , <i>Thalia geniculata</i> , <i>Typha latifolia</i>	Hg	Anning et al, 2013.
<i>Azolla pinnata</i>	Cr, Hg, Cd	Kumar, 2010; Bharti y Banerjee, 2013.
<i>Spirulina platensis</i>	Cd	Solisio et al, 2007; Rangsayatorn et al, 2002.

<i>Brassica sp, Alyssum sp, Arabidopsis sp, Petrisis sp</i>		Cr	Kamnev y van der Lelie, 2000.
<i>Thlapsi sp</i>		Cd	Prasand y Freitas, 2003.
<i>Ipomoe aquatica</i>		Cr	Weerasinghe et al, 2008.
<i>Helianthus annuus</i>		Cd, Cr	Buta et al, 2014
<i>Spirulina platensis</i>		Cd	Zhu et al, 1999; Dos Santos y Lenzi, 2000; Prasand y Freitas, 2003; Jafari, 2010; Kumar, 2010; Mane et al, 2010; Carrión et al, 2012; Chattopadhyay et al, 2012; Saleh, 2012; Sood et al, 2012; Borker et al, 2013; Buta et al, 2014, Swain et al, 2014.

### 3.3.2. Toxicidad del Cadmio en plantas

Los efectos tóxicos del cadmio sobre las plantas han sido ampliamente estudiados (Benavides, 2005), sin embargo, los mecanismos de su toxicidad aún no se conocen completamente. En general el Cd interfiere en la entrada, transporte y utilización de elementos esenciales (Ca, Mg, P y K) y del agua, provocando desequilibrios nutricionales e hídricos en la planta (Singh & Tewari, 2003). El Cd también reduce la absorción de nitratos y el transporte de estos de la raíz al tallo, además de inhibir la actividad nitrato reductasa en tallos (Gouia, 2000). Las plantas expuestas a suelos contaminados con cadmio presentan modificaciones en la apertura estomática, fotosíntesis y transpiración (Sandalio, 2001). Uno de los síntomas más extendidos de la toxicidad por cadmio es la clorosis producida por una deficiencia en hierro (Benavides, 2005), fosfatos o por la reducción del transporte de Mn (Goldbol, 1985).

La exposición a cadmio reduce la actividad ATPasa de la membrana plasmática, (Astolfi, 2005), alteraciones en la funcionalidad de la membrana plasmática (Sandalio, 2001) y desequilibrios en el metabolismo del cloroplasto, inhibiendo la síntesis de clorofila y reduciendo la actividad de enzimas implicadas en la fijación de CO<sub>2</sub> (Maksymiec, 2007)). La toxicidad por metales pesados se debe en parte al estrés oxidativo producido por las especies de oxígeno reactivo (ROS) generadas a través de diferentes mecanismos dependiendo del metal de que se trate (Stohs & Bagchi). Los cationes metálicos Cd<sup>2+</sup> y Pb<sup>2+</sup> no experimentan cambios redox y, por lo tanto, a diferencia del Fe<sup>2+</sup> o Cu<sup>2+</sup>, no actúan directamente en la generación de ROS. Sin embargo, pueden actuar como prooxidantes a través de la reducción del contenido de glutatión, necesario para la síntesis de fitoquelatinas, disminuyendo así su disponibilidad para la defensa antioxidante (Pinto, 2003).

El estrés oxidativo producido por el cadmio se manifiesta por daños oxidativos a membranas tales como peroxidación lipídica (Sandalio, 2001), y también se han descrito daños oxidativos a proteínas por formación de grupos carbonilo (Romero-Puertas, 2002). Las actividades de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa (GR), ascorbato peroxidasa (APX), peroxidasa (POD) y la catalasa (CAT), encargadas de la defensa celular frente a las ROS, experimentan reducciones o incremento de su actividad en función de la concentración de cadmio incluida en el medio de crecimiento, la duración del tratamiento, el tipo de tejido y la especie vegetal de que se trate (Benavides, 2005) (Sandalio, 2001). En los últimos años se ha incrementado el interés por el estudio de los mecanismos íntimos implicados en la producción de ROS en respuesta al Cd. Como consecuencia de ello, se ha demostrado la producción de ROS en distintos compartimentos celulares (membrana plasmática, mitocondrias y peroxisomas) siendo la NADPH oxidasa una de las principales fuentes de ROS (Romero-Puertas, 2002).

En la Figura 2 se muestra un esquema que resume la respuesta al Cd de la planta, teniendo en cuenta los resultados obtenidos por distintos autores. De acuerdo con este esquema, el Cd podría inducir la NADPH oxidasa de membrana y las ROS que se formarían (O<sup>2-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) podrían intervenir en la lignificación de la

pared celular que actúa como barrera de entrada del metal (Sanitá di Toppi & Gabbrielli, 1999). Las ROS pueden ser eliminadas por los sistemas antioxidantes, pero cuando la intensidad y duración del tratamiento superan la barrera antioxidante, se produce un exceso de ROS que se traduce en daños oxidativos a membranas y proteínas. Los daños a membranas van acompañados de un incremento en la síntesis de etileno y jasmónico (JA), que junto con el  $H_2O_2$  van a regular la expresión de un gran número de proteínas de defensa (HSPs, quitinasa o antioxidantes, entre otras). Recientemente se ha demostrado un importante papel regulador del NO en distintos procesos de desarrollo en vegetales (Del Río, 2004). El papel de esta molécula está siendo estudiado y parece ser que el Cd reduce considerablemente la acumulación de NO en tratamientos largos, a pesar de que no se conocen los mecanismos implicados en este proceso (Rodríguez-Serrano, 2006).

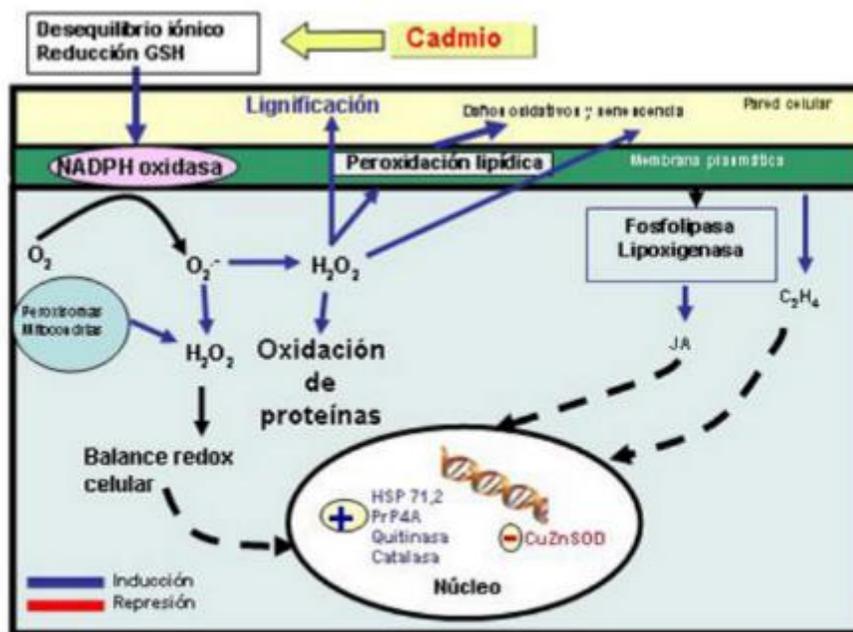


Figura 2. Respuesta celular al cadmio: producción de ROS, daños oxidativos y señalización. Modificado de (Romero-Puertas, 2002) HSP 71,2, proteína de estrés térmico de 71,2 kDa; PrP4A, proteína relacionada con la patogénesis.  $C_2H_4$ , etileno.

### **3.3.3. Estrategias de tolerancia al Cadmio por plantas**

Las plantas han desarrollado distintas estrategias para evitar la toxicidad de metales pesados. En general, la tolerancia a metales está determinada por la reducción del transporte de este al interior de la célula y/o una mayor capacidad para secuestrar estos metales. La raíz constituye una de las principales barreras de defensa mediante la inmovilización del Cd por pectinas de la pared celular. Los carbohidratos extracelulares (mucílago y calosa) de la raíz también pueden intervenir en la inmovilización del metal (Benavides, 2005).

La acumulación del metal en los tricomas de la superficie foliar también es un mecanismo de inmovilización y defensa celular (Salt, 1995). Otro mecanismo consiste en la reducción del transporte o aumento de la extrusión del Cd por transportadores de cationes de la membrana plasmática (Thomine, 2000). Una vez dentro de la célula, el Cd u otros metales, pueden ser secuestrados por ácidos orgánicos, aminoácidos, fitoquelatinas y metalotioneínas, y posteriormente compartimentalizados en la vacuola para prevenir su toxicidad. Las fitoquelatinas constituyen uno de los principales mecanismos de defensa frente a metales pesados. Su síntesis tiene lugar a partir del glutatión y se induce en presencia de metales pesados (Clemens, 2006). Plantas que sobreexpresan la enzima fitoquelatina sintasa muestran una mayor tolerancia frente al Cd (Pomponi, 2006). Otras posibles moléculas responsables de la acumulación del cadmio son las metalotioneínas (MTs), pequeñas proteínas ricas en cisteína, si bien en las plantas no son las principales responsables de la detoxificación del cadmio, como ocurre en células animales (Hamer, 1986).

### **3.4. Bacterias endófitas**

Prácticamente todas las plantas están colonizadas por una diversidad de bacterias conocidas como endófitas. Estas bacterias endófitas pueden ser detectadas en un momento particular dentro de los tejidos de plantas aparentemente sanos. La mayoría de las endófitas colonizan diferentes compartimentos de la planta como apoplasto, incluyendo los espacios intercelulares de las paredes de las células y vasos de la xilema. Algunos de ellas son capaces de colonizar los órganos

reproductores de las plantas, por ejemplo, flores, frutos y semillas (Stone, Bscón, & White, 2000). Forman infecciones discretas dentro de los tejidos de plantas sanas para todo o casi todo su ciclo vida (Limsuwan, y otros, 2009). Los estudios han demostrado que, alrededor de 300.000 especies de plantas están asociada con una o varias poblaciones de especies de bacterias (Strobel & Daisy, 2003). En los últimos años, ha despertado interés cada vez los aspectos relacionados con la composición, estructura y función de comunidades bacterianas y en particular las unidades fundamentales de las cuales están compuestas.

Existe una relación compleja entre las bacterias endófitas y la planta hospedera, se cree que estas estimulan el crecimiento de plantas a través de la movilización de nutrientes del suelos, produciendo numerosos reguladores del crecimiento vegetal, protección de plantas a fitopatógenos por el control o inhibición de estos, mejorar la estructura del suelo, los procesos de biorremediación de los suelos contaminados por el secuestro de metales pesados tóxicos y compuestos xenobióticos dentro los tejidos vegetales (Ahemad, 2012).

### **3.4.1. Bacterias endófitas y fitorremediación**

Todas las interacciones entre los microorganismos y los metales u otros elementos como carbono, nitrógeno, azufre y fósforo son componentes fundamentales de los ciclos biogeoquímicos. Las interacciones metal-microbiota son estudiadas entonces en profundidad en el contexto de la biotecnología ambiental, con el objeto de implementar métodos de remoción, recuperación o detoxificación de metales pesados y radionúclidos (Gadd, 2000).

Dependiendo del estado de oxidación que se presente un metal y la especie que esté conformando, un microorganismo puede realizar dos transformaciones posibles. Una correspondería a la movilización del metal, es decir el pasaje de un estado insoluble inicial (metales asociados a suelos, sulfuros u óxidos metálicos) correspondiente a una fase sólida, a un estado soluble final, en fase acuosa. Este proceso se conoce con el nombre de lixiviación microbiana. El otro corresponde a la inmovilización del metal, es decir el pasaje de un estado soluble inicial en fase acuosa a uno insoluble final en fase sólida. A su vez existen en la naturaleza

diferentes mecanismos por los cuales la inmovilización del metal puede llegar a ocurrir.

Dentro de la amplia diversidad microbiana, existen microorganismos resistentes y microorganismos tolerantes a metales. Los resistentes se caracterizan por poseer mecanismos de detoxificación codificados genéticamente, inducidos por la presencia del metal (Silver, 1988) En cambio, los tolerantes son indiferentes a la presencia o ausencia de metal. Tanto los microorganismos resistentes como tolerantes son de particular interés como captadores de metales en sitios contaminados, debido a que ambos pueden extraer los contaminantes. La resistencia o tolerancia experimentada por microorganismos es posible gracias a la acción de diferentes mecanismos (Lovley, 2000). Estos fenómenos son: biosorción, bioacumulación, biomineralización, biotransformación y quimiosorción mediada por microorganismos.

En la actualidad, se han realizado diferentes estudios que implican el uso de plantas y microorganismos para la remediación de sitios contaminados por EPT, entre ellos se encuentra el realizado por Rolón (2015), quien aisló y caracterizó 205 bacterias endófitas de la raíz de *Typha latifolia*, de ellas determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de Cd (II) y las caracterizó a nivel bioquímico mediante su actividad ACC desaminasa, producción de AIA y sideróforos y su capacidad de solubilizar fosfatos; en donde la bacteria que mejores resultados obtuvo fue al que llamó aislado GRC-140 (Tabla 2) que en 2017 la caracterizó bioquímica y molecularmente la cual resultó ser la especie *Pseudomonas rhodesiae*; de la cual se realizó otro estudio por Moctezuma G. (2017), quien evaluó la capacidad de fitoextracción de cadmio en plántulas de *Typha latifolia* en presencia de *P. rhodesiae* en donde se observó un aumento de la fitoextracción de Cd (II) en 5 y 10 ppm, siendo mayor el porcentaje de remoción del metal cuando se adicionó dicha bacteria (50%).

Tabla 2. Características de promoción de crecimiento vegetal del aislado tolerante a 500 y 750 ppm de Cd (II).

Características de promoción de crecimiento vegetal				
Aislado bacteriano	Solubilización de fosfatos	Producción Sideróforos	Producción AIA (ppm)	ACC desaminasa
GRC140 <i>P. rhodesiae</i>	+	+	43.9 ± 6.6	+

#### 4. JUSTIFICACIÓN

La presencia de metales pesados en los componentes abióticos ha ido aumentando significativamente, afectando principalmente a todos los seres vivos; por ello, y debido a la magnitud del problema y los efectos negativos que éstos tienen, se ha optado por llevar a cabo diferentes alternativas naturales que ayuden a remediar dicho problema, a un relativo bajo costo.

Diferentes estudios han demostrado que la especie *Typha latifolia* tiene la capacidad de remover y acumular metales pesados en raíces y tallos; la cual, a su vez se relaciona simbióticamente a bacterias endófitas, que presentan la capacidad de tolerar altas concentraciones de metales pesados, así como también de favorecer el crecimiento y adaptación de las plantas a condiciones de estrés causadas por la presencia de metales en el medio abiótico, favoreciendo la fitoextracción y fitorremediación de sitios contaminados por metales pesados y otros compuestos.

Con base a lo anterior se desea saber si *P. rhodesiae* con *Typha latifolia* incrementa la fitoextracción de Cd (II), como una alternativa a remediación de sitios contaminados.

Es importante mencionar que en este proyecto se desea corroborar la participación de *Typha latifolia* en la remoción de cadmio, probando diferentes condiciones, entre ellas, concentraciones del metal en un rango de 0 a 50 ppm, así como la utilización del medio Hoagland enriquecido con 1 % de sacarosa; parámetros que marcan diferencia en lo anteriormente realizado por (Moctezuma, 2017) con el fin de maximizar las condiciones de laboratorio a las posiblemente encontradas en un sistema natural, así como comprobar la internalización de *P. rhodesiae* en los tejidos de las plántulas de *T. latifolia*.

## 5. HIPÓTESIS

La interacción entre *P. rhodesiae* y *Typha latifolia* incrementa la capacidad de tolerar y bioacumular Cd (II) a través de la promoción del crecimiento radicular de la planta, y, por lo tanto, al bioacumularse los metales pesados en la estructura de la planta, se ve favorecido el proceso de fitoextracción.

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1 Cultivo *in vitro* de semillas de *Typha latifolia***

Para poder realizar un eficiente cultivo *in vitro* de las semillas de *Typha latifolia*, se llevaron a cabo diferentes procedimientos que serán explicados de manera individual en los siguientes apartados.

#### **6.1.1. Evaluación de protocolos de asepsia aplicados a las semillas de *T. latifolia***

Para eliminar cualquier bacteria, hongo o partícula que pudiera interferir en la contaminación del cultivo de semillas de *Typha latifolia* se probaron dos tratamientos de asepsia para las semillas. En el primero se colocaron las semillas de *Typha latifolia* previamente recolectadas, en un tubo cónico de 50 mL, enseguida se adicionó solución fungicida al 1 %, AgNO<sub>3</sub> al 0.5 %, Bacterín al 5 %, Cloro al 10 %, Tween al 1 %, Etanol al 70 % y se agitó de manera vigorosa durante 5 minutos con cada solución. Al término de este tiempo se retiró la solución con ayuda de una pipeta Pasteur estéril. Por último, se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril, agitando vigorosamente durante 5 minutos por cada lavado y se decantó la solución residual (Moctezuma, 2017). El segundo tratamiento consistió en los mismos pasos anteriores, pero en lugar de colocar los frascos directamente al cuarto de cultivo, primero se colocaron por tres días en obscuridad y refrigeración a 4 °C.

#### **6.1.2. Preparación del medio de cultivo MS**

Posterior a la asepsia de las semillas se procedió a preparar los frascos con medio de cultivo en donde se sembraron las semillas previamente tratadas; se colocó 1 litro de agua destilada en un vaso de precipitado y se le adicionó la sacarosa hasta disolverla en placa de calentamiento. Enseguida, se le agregó medio MS (Murashige & skoog 1962, Phytotechnology®) y se midió el pH hasta ajustarlo a 5.7. Una vez ajustado se procedió a agregar el agar plant, calentando hasta disolver (sin ebullición). Por último, se dispensaron 30 mL de medio de cultivo en frascos de

cultivo de 500 mL los cuales se taparon y sellaron con papel aluminio y parafilm, y finalmente se esterilizaron durante 20 min a 14 de psi. En la Tabla 3 se presenta la composición utilizada para la preparación de los medios de cultivo.

Tabla 3. Composición del medio de cultivo para la siembra de las semillas de *Typha latifolia*.

<b>SACAROSA</b>	30.0 gr/L
<b>MS</b>	2.21 gr/L
<b>AGAR PLANT C</b>	8.0 gr/L

### **6.1.3. Inicio del cultivo *in vitro* de *T. latifolia***

Después de haber preparado los medios de cultivo y haber realizado la asepsia de las semillas, se procedió a sembrar las semillas de *Typha latifolia*; llevando todo el procedimiento a cabo en la campana de flujo laminar con luz UV (ESCO Laminar Flow Cabinet) con el fin de evitar cualquier contaminación posible (Figura 3). Posteriormente, se colocaron los frascos con las semillas sembradas bajo condiciones de fotoperiodo en el cuarto de cultivo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 25 °C).

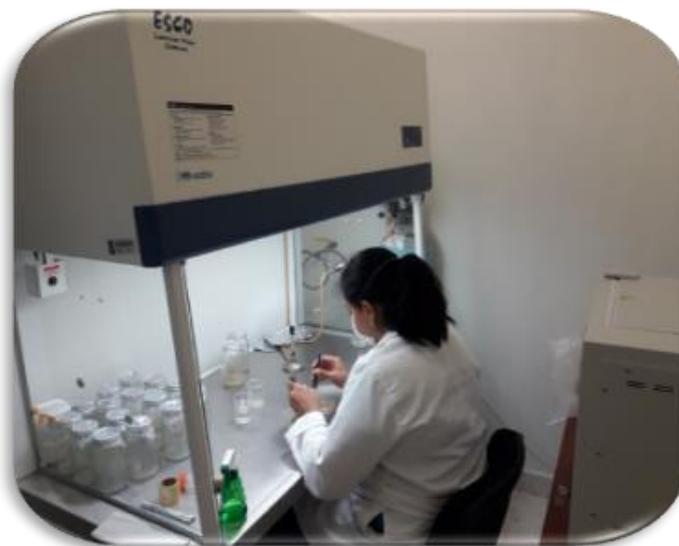


Figura 3. Siembra de semillas de *Typha latifolia* en condiciones asépticas.

## **6.2. Evaluación del tiempo de germinación de cada protocolo de asepsia probado en las semillas de *T. latifolia***

Después de haber realizado el cultivo *in vitro* de las semillas, se llevó a cabo el proceso de evaluación de la germinación de las semillas en cada uno de los frascos de cultivo. Para ello, se realizaron observaciones semanales durante cinco semanas; registrando el porcentaje de contaminación, y germinación, así como el número y crecimiento de las plántulas.

## **6.3. Selección de plántulas de *T. latifolia***

Una vez germinadas las semillas, se seleccionaron plántulas a partir del tercer mes con el fin de permitir un buen desarrollo de la raíz antes de cada tratamiento. Para los tratamientos se utilizaron plantas de peso y longitud similar (raíces: 5 cm y partes aéreas: 20 cm)

## 6.4. Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2 x 2, donde el factor 1 (con y sin *P. rhodesiae*) y factor 2 (0,5,10,25 y 50 ppm de cadmio); para lo cual se utilizaron plántulas de *Typha latifolia* con un peso y altura similar. Las plántulas se distribuyeron aleatoriamente entre los 10 tratamientos. En estos tratamientos, se utilizó el medio de cultivo líquido de Hoagland enriquecido con 1 % de sacarosa a un pH de 5.7. Se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento, y se utilizaron dos plántulas por cada repetición.

T1=Planta + Bacteria + Cadmio

T2=Planta + Cadmio

Las plántulas se insertaron en posición vertical en tubos de ensaye de 25 cm de altura y se cubrieron con un tapón y parafilm para evitar cualquier tipo de contaminación. Todo lo anterior se realizó por un lapso de 12 días, incluyendo un control para cada uno de los tratamientos, así como una repetición para la evaluación de clorofila. Las muestras se recolectaron cada tercer día en alícuotas de 3 mL. Todo ello, se realizó en una campana de flujo laminar y con ayuda de una micropipeta. Las alícuotas se almacenaron en refrigeración para su posterior digestión ácida.

La bacteria que fue utilizada en los tratamientos fue previamente aislada y caracterizada por Rolón (2015), en el Laboratorio de Biotecnología de la Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca. Dicha bacteria fue caracterizada como *Pseudomonas rhodesiae*. Se eligió esta bacteria debido a que mostró los mayores niveles de actividad en los ensayos bioquímicos realizados.

En los tratamientos en los que se utilizó *P. rhodesiae*, se contabilizaron las UFC/mL al día 0 y 12, con el fin de observar el comportamiento bacteriano a lo largo del experimento, así como para comprobar la internalización de la bacteria en raíces y tallos de las plántulas de *Typha latifolia*.

De igual manera se midieron el número de brotes nuevos, raíces nuevas, con el fin de determinar diferencias en el crecimiento para ambos tratamientos; los

cuales son parámetros de fitotoxicidad que participan durante la fitoextracción de Cd (II) en plantas asociadas a bacterias tolerantes y plantas libres de bacterias.

### **6.5. Digestión ácida para el medio nutritivo Hoagland**

Para cuantificar la concentración de Cd remanente en el medio de cultivo, se colocaron 500 µL del medio Hoagland y 2 mL de HNO<sub>3</sub> al 50 % en tubos cónicos (Falcon) de 15 mL. Posteriormente, se colocaron los tubos en la autoclave para realizar la digestión ácida propuesta por CEN (2005) con modificaciones, a 121 °C, 14 psi por 30 minutos. Por último, las muestras digeridas se aforaron a 15 mL con agua desionizada y se almacenaron en refrigeración a 8 °C para su posterior análisis.

### **6.6. Digestión ácida a temperatura ambiente para plántulas de *Typha latifolia***

Después de 12 días de exposición, se retiraron las plántulas de las soluciones y se lavaron con abundante agua destilada; se separaron las raíces y tallos y se llevaron a secar en la estufa de convección a 70 °C por 24 horas. Transcurrido el tiempo se trituraron con ayuda de un mortero y se pesaron cada uno de los tejidos.

Se adicionaron 100 µL de HNO<sub>3</sub> concentrado por cada 2 mg de muestra vegetal. Los recipientes se cerraron con su tapa correspondiente y se dejaron en reposo al abrigo de la luz y del polvo durante 5 días a temperatura ambiente. Pasado los 5 días, se adicionaron 0.5 mL de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 %) para optimizar la oxidación de la materia orgánica y se continuó un día más la digestión en las mismas condiciones, hasta que se observó un aspecto traslúcido en las muestras. Al final el volumen de las muestras se completó a 10 mL con agua desionizada, y se preservaron en recipientes de HPDE de 30 mL en refrigeración a 8 °C para su posterior análisis.

## 6.7. Determinación y cuantificación de clorofila

Al finalizar la parte experimental, se extrajeron las plántulas colocadas para la determinación de clorofila de cada uno de los tratamientos y sus respectivas concentraciones, y se trituró a cada una en un mortero, en donde se colocaron 8 mL de acetona grado reactivo, sobre baño de hielo y en oscuridad, acto seguido se recuperó el extracto y se aforó a 10 ml en un matraz volumétrico, manteniendo la muestra en una solución de acetona al 80 %. Se determinó la absorbancia de la clorofila a una longitud de onda de 652 nm.

Una vez que se determine la absorbancia, se calculó el porcentaje de clorofila por gramo de planta, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Clorofila total (mg/L)} = 27.8 * A_{652\text{nm}}$$

$$\text{mg clorofila} = \frac{\text{Vol. Aforo (L)} * \text{clorofila total (mg/L)}}{1\text{L}}$$

$$\text{mg clorofila / g de muestra} = \frac{\text{mg de clorofila} * 1 \text{ g muestra}}{\text{g muestra pesados}}$$

Donde:

A: absorbancia de la muestra a 652 nm.

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

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

g muestra: peso utilizado de la muestra

## 6.8. Determinación de metales en muestras vegetales

Los contenidos de Cd en material vegetal se determinaron mediante un espectrofotómetro de absorción atómica (AAS) utilizando una llama de aire-acetileno.

### **6.9. Evaluación con el aislado *P. rhodesiae* a concentraciones de 0, 5 y 10 ppm de cadmio**

Esta evaluación inicial consistió en colocar tubos de ensaye con medio de cultivo Hoagland enriquecido con 1 % de sacarosa y con concentraciones de 0, 5 y 10 ppm de Cd (II) en los que se adicionaron 250  $\mu$ L y 500  $\mu$ L de una suspensión de *P. rhodesiae* a una densidad óptica de 0.1 a 600 nm, durante 15 días, donde cada tercer día se tomaron 500  $\mu$ L de cada unidad experimental y se realizaron siembras en estría para observar presencia o ausencia del aislado bacteriano *P. rhodesiae*.

### **6.10. Comprobación de la internalización de la bacteria en los tejidos radiculares de *Typha latifolia***

Para comprobar la internalización de la bacteria en los tejidos radiculares de las plántulas de *Typha latifolia* del T2, se contabilizaron las UFC/mL al día cero en el medio de cultivo Hoagland al 1 % de sacarosa y al día 12 en la raíz y tallo de las plántulas, lo cual se realizó en condiciones de esterilidad, triturando en un mortero 1 gramo del tejido y realizando diluciones en una placa de medio LB (Luria Bertani) a 1/5 de concentración.

### **6.11. Análisis estadístico**

Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2 x 2, donde el factor 1 (con y sin *P. rhodesiae*) y factor 2 (0,5,10,25 y 50 ppm de cadmio). Los datos fueron analizados mediante un ANOVA con el procedimiento PROC MIXED de SAS (1991). El valor de significancia fue establecido a  $P < 0.05$ . Cuando se encontraron diferencias significativas se utilizó la prueba de Tukey (SAS, 1991).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Viabilidad y germinación de la semilla de *Typha latifolia*

La germinación de semillas *in vitro* permite obtener material para el establecimiento de protocolos de propagación masiva. De esta manera las plántulas obtenidas pueden ser empleadas como fuente de explantes asépticos para la multiplicación a gran escala de plantas libres de enfermedades y como un medio de propagación para comenzar la explotación biotecnológica de esta especie (Samudio *et al.*, 2014).

Para la germinación de una semilla deben cumplirse tres condiciones (Hartman & Krester, 1980): que el embrión sea viable, que los factores externos sean favorables y que no presente factores internos que impidan la germinación. Para la realización de este ensayo, fueron utilizadas semillas consideradas 100% viables.

En los embriones de las semillas, se diferencian los tejidos vivos de los muertos sobre la base de la actividad de enzimas deshidrogenasas (enzimas de la respiración). Al ser hidratadas las semillas, la actividad de las deshidrogenasas incrementa, resultando en la liberación de iones hidrógeno, lo que reduce a la solución de tetrazolio (incolore) a formazán (color rojo). El formazán tiñe a las células vivas de color rojo, en tanto que las muertas permanecen sin colorear. La viabilidad de las semillas se determina en función del patrón de tinción del embrión y la intensidad de la coloración. Que una semilla sea viable, nos indica que es capaz de germinar y producir una plántula normal, sin embargo, podría estar dormida, y en ese caso no germinaría inmediatamente.

En la Figura 4 se observa el lote de semillas que fueron teñidas con tetrazolio al 10 % con el objetivo de poder estimar su comportamiento una vez sembradas en el medio de cultivo *in vitro*. Una vez elegidas las semillas viables, se observó la germinación de estas al tercer día de la siembra como se observa en la Figura 4, permitiendo seguir con la metodología para la evaluación de los protocolos de asepsia aplicados en este experimento.



Figura 4. Semilla de *Typha latifolia* teñida con tetrazolio al 10% con el fin de observar la viabilidad y tiempo de germinación de la semilla; A) en el día uno observamos como la semilla se encuentra viable al teñirse de color rojo, B) en el día dos empieza la germinación y C) en el día tres se observa la germinación de la semilla.

### 7.1.1. Evaluación de protocolos de asepsia aplicados a las semillas de *T. latifolia*

Una vez seleccionadas las semillas viables, se evaluó el proceso de asepsia entre ambos protocolos de asepsia, en los que la única diferencia que hubo entre los agentes químicos y las condiciones ambientales a las que fueron expuestas, fue el fotoperiodo de luz y oscuridad que se mencionó en el apartado de metodología. Los dos protocolos de asepsia probados en las semillas de *Typha latifolia*, presentaron un 100 % de germinación y solo el tratamiento 1 presentó un 20 % de contaminación, esta última ocasionada por hongos; a pesar de que el hongo no causó síntomas aparentes de enfermedad a las semillas, probablemente existía una relación simbiótica planta-microorganismo, que mediante la producción de metabolitos le confirió una mayor sobrevivencia a la planta (Sánchez, 2013) obteniendo una germinación exitosa, pero al mismo tiempo un porcentaje de contaminación muy alto (Tabla 4). En cuanto al tiempo de germinación, el protocolo de asepsia 2 presentó un tiempo de germinación más corto (3 y 7 días respectivamente) en comparación al protocolo 1; mismos resultados obtuvo Cheng

et al., (2015), en el cultivo *in vitro* de semillas de *Arabidopsis thaliana*, respecto al protocolo 2 con un fotoperiodo a 4 °C.

Tabla 4. Evaluación de dos protocolos de asepsia aplicados a las semillas de *T. latifolia* y evaluación del porcentaje de germinación y contaminación de cada uno de ellos.

<b>PROTOCOLOS DE ASEPSIA</b>	<b>EFICIENCIA DE GERMINACIÓN*</b>	<b>% DE CONTAMINACIÓN</b>	<b>TIEMPO</b>
PROTOCOLO 1 (Moctezuma Granados, 2017)	<b>100%</b>	<b>20%</b>	<b>7 DÍAS</b>
PROTOCOLO 2 (obscuridad a 4°C) (Mei-Chun Cheng, 2015)	<b>100%</b>	<b>0%</b>	<b>3 DÍAS</b>

\*Número de frascos germinados.

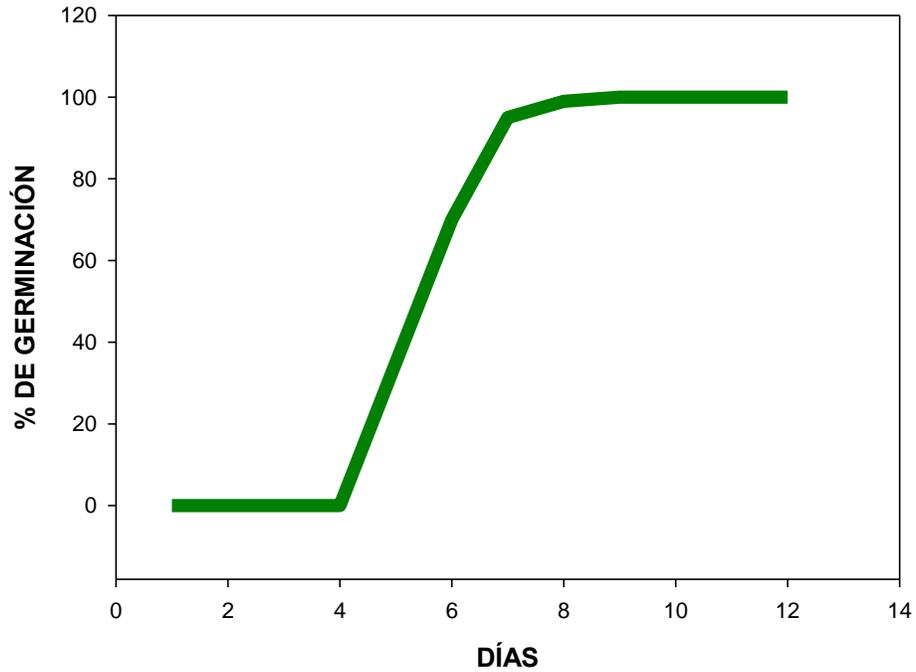
En comparación con el protocolo 1, resultados similares obtuvo Frank Aponte (2008), cuando determinó un procedimiento para la esterilización de semillas de Bolaina blanca (*Guazuma crinita*) y Cedro (*Cedrela odorata*), para su germinación *in vitro*, la cual realizó con hipoclorito de sodio al 2 % durante 40 minutos y no obtuvo contaminación para las semillas de cedro (*C. odorata*), mientras que para la Bolaina blanca (*G. crinita*) se necesitaron 30 minutos para similares resultados. Por otro lado, Sánchez et al., (2012), lograron un cero porcentaje de contaminación en semillas de Volantín (*Gyrocarpus americanus H.*), en donde primero lavaron las plantas con jabón líquido, colocándolas posteriormente en una solución de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) al 10 % durante 15 minutos y sumergiéndolas más tarde en etanol al 70 % durante 5 minutos.

De igual manera, el baño con Hipoclorito de sodio (1 % de cloro activo, durante un minuto) arrojó buenos resultados en el tratamiento de semillas de tomate

(Walasek, 2012), logrando cero contaminación y germinación del 100 %. Resultados similares obtuvieron Díaz y Hernández (2003), en semillas de tomate (infectadas con *Fusarium oxysporum*) y baño con hipoclorito de sodio al 1 % durante 15 minutos.

En la Figura 5, se presentan los resultados del análisis de las dos primeras semanas de germinación de las plántulas de *T. latifolia*; el protocolo de asepsia 1 presentó la máxima germinación al día 7, se obtuvieron en promedio 7 brotes por frasco (no contaminados) y 0 % de oxidación. El crecimiento promedio que presentaron las plántulas de *Typha latifolia* al finalizar las dos semanas fue de 5 cm. En cambio, en el protocolo de asepsia 2, se obtuvo la germinación del 100 % de los frascos al tercer día, obteniendo en promedio 12 brotes por frasco no contaminado y 0 % de oxidación y una altura de las plántulas de 7 cm (Figura 7). Por lo tanto, el protocolo que se procedió a utilizar para la realización del experimento fue el protocolo de asepsia número 2, con un fotoperiodo de obscuridad a 4 °C por 3 días.

### PROTOCOLO DE ASEPSIA 1



### PROTOCOLO DE ASEPSIA 2

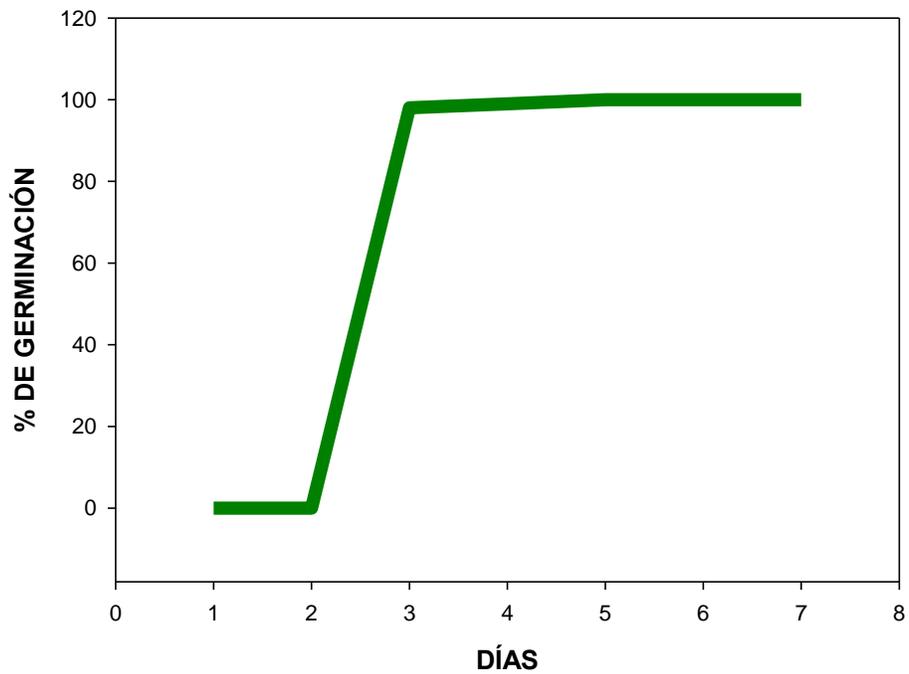


Figura 5. Porcentaje de germinación de las semillas de *T. latifolia* con los dos protocolos de asepsia probados.

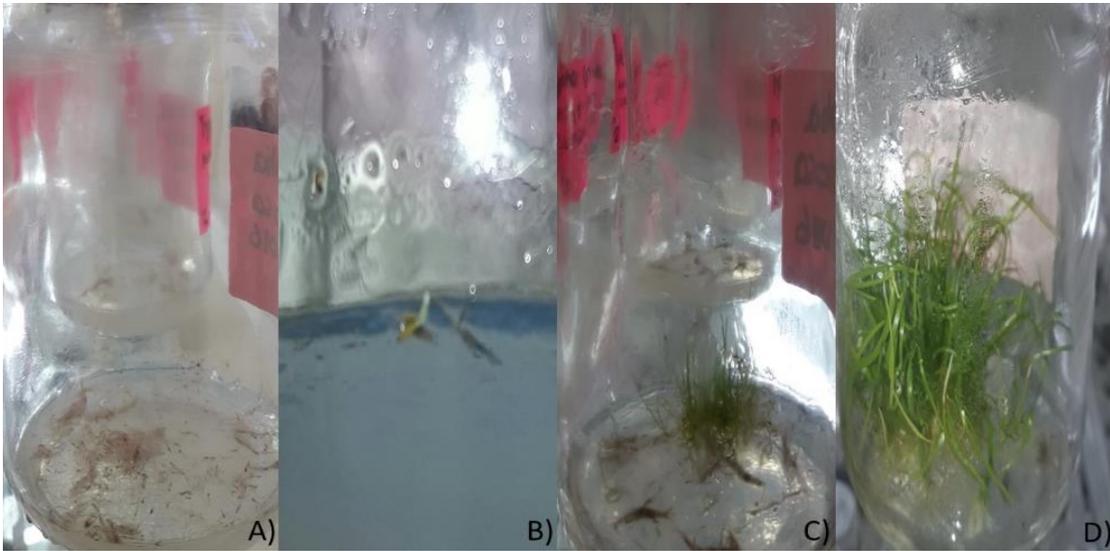


Figura 6. Proceso de germinación de las semillas de *T. latifolia* con el protocolo de asepsia realizado por Moctezuma-Granados (2017). A) semillas al día cero, B) semillas al séptimo día; C) plántulas al día 12 con una longitud de 5 cm y D) plántulas al tercer mes con una longitud de 15 a 20 cm.

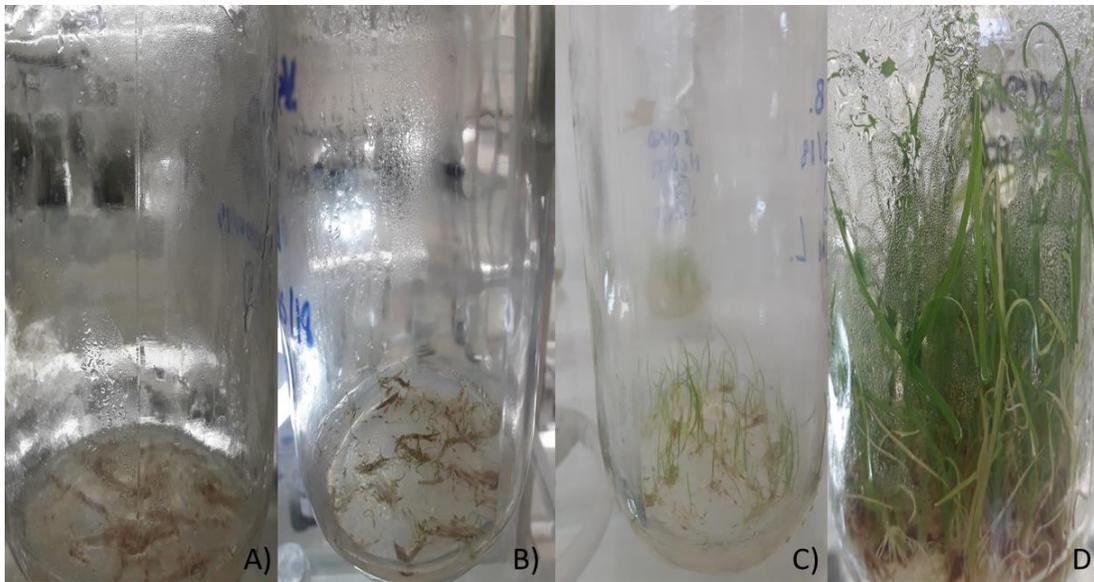


Figura 7. Proceso de germinación de las semillas de *Typha latifolia* con el protocolo de asepsia realizado con el fotoperiodo de luz (3 días de oscuridad a 4 °C). A) semillas al día 0, B) semillas al tercer día, C) plántulas al séptimo día con una longitud de 5 cm y D) plántulas al tercer mes con una longitud de 20 a 25 cm.

Se observó el proceso de germinación de *T. latifolia* durante las dos primeras semanas; resultados que concuerdan con Ramos (2012); que menciona que después de la desinfección superficial y de haber colocado el material en un medio de cultivo estéril; aproximadamente en un período de una semana a quince días, comienza el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando así el ciclo del cultivo *in vitro*.

## **7.2. Evaluación del aislado *P. rhodesiae* a concentraciones de 0, 5 y 10 ppm de cadmio**

En esta evaluación inicial, se encontró que hasta el tercer día *P. rhodesiae* (Rolón, 2015), fue capaz de tolerar concentraciones de 5 y 10 ppm de Cd, sin la presencia de *T. latifolia* en medios de cultivo Hoagland enriquecidos con 1 % de sacarosa, mismas concentraciones a las cuales Moctezuma Granados (2017), encontró que dicha bacteria remueve un mayor porcentaje de Cd<sup>2+</sup> en un 50 % en presencia de *T. latifolia*.

A partir del cuarto día *P. rhodesiae*, no se encontró presente en el medio de cultivo; es importante considerar que, para esta investigación, la bacteria fue inoculada en un medio de cultivo específico para las plántulas de *T. latifolia*, el cual no es suficiente para mantener el crecimiento óptimo de la bacteria; por lo que la sensibilidad observada en este estudio se debe a la falta de nutrientes, y no a los mecanismos propios de la bacteria (Ponce, 2017).

A pesar de que Rolón Cárdenas (2017), encontró que *P. rhodesiae* es capaz de tolerar altas concentraciones de Cd<sup>2+</sup> (CMT ≥ 500 µL/mL) por sí sola, en este trabajo se considera que es necesaria la introducción de *T. latifolia* al sistema, con el fin de llevar a cabo la fitoextracción con las plántulas obtenidas del cultivo *in vitro*, y a su vez, se encuentre presente la bacteria, con el fin de optimar la remoción de Cd<sup>2+</sup> (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados de la presencia de *P. rhodesiae* a diferentes concentraciones del experimento piloto.

Experimento inicial con 250 µL de una suspensión de *P. rhodesiae* con D.O. de 0.1 a 600 nm.

CONCENTRACIÓN	DÍA 1	DÍA 2	DÍA3
0	PRESENCIA	PRESENCIA	PRESENCIA
5	AUSENCIA	AUSENCIA	PRESENCIA
10	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA

Experimento inicial con 500 µL de una suspensión de *P. rhodesiae* con D.O. de 0.1 a 600 nm.

CONCENTRACIÓN	DÍA 1	DÍA 2	DÍA3
0	PRESENCIA	PRESENCIA	PRESENCIA
5	PRESENCIA	PRESENCIA	AUSENCIA
10	PRESENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA

### 7.3. Determinación del número de raíces iniciales y finales, así como brotes nuevos de las plántulas de *T. latifolia* expuestas a Cd (II) con y sin la presencia de *Pseudomonas rhodesiae*

En lo que respecta a la determinación de raíces iniciales y finales se observó que ambos tratamientos con y sin bacteria en el día inicial y a diferentes concentraciones no presentan diferencias significativas en las raíces iniciales presentando una media de 8 raíces para todas las plántulas y tratamientos, resultados que se tomaron como control; en cambio en el día final (día 12), hubo diferencias significativas con una  $p < 0.01$  en ambos tratamientos, con una media de 12 raíces para el tratamiento sin bacterias (T1) y 17 raíces para el tratamiento con bacteria (T2) (Figura 8). El tratamiento que mayor número de raíces finales obtuvo fue el tratamiento 2, con bacteria a una concentración de 10 ppm de cadmio con un total de 18 raíces finales.

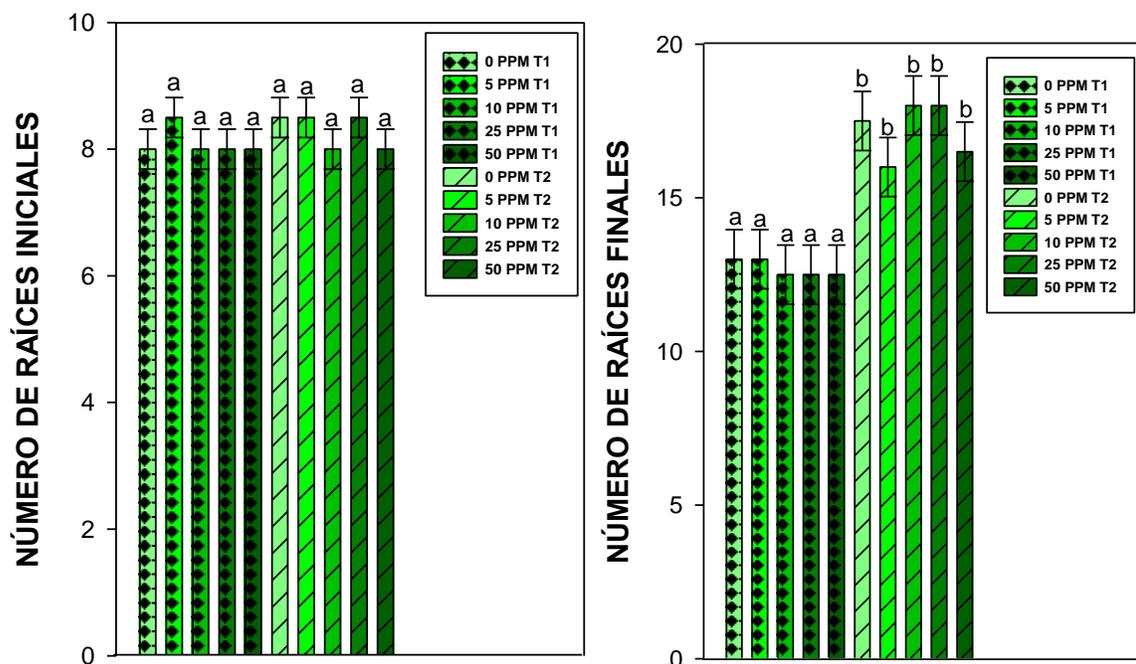


Figura 8. Raíces iniciales y finales de las plántulas expuestas a Cd (II) con y sin la presencia de *P. rhodesiae*. Las barras indican el error estándar. ( $p < 0.05$ ).

En la Figura 9, se observan los resultados de los promedios obtenidos de los brotes nuevos que se presentaron a lo largo de los 12 días de experimentación, se observa que existe una relación entre el número de brotes nuevos y el resultado de raíces finales presentadas en la Figura 8; se observan diferencias significativas entre ambos tratamientos y concentraciones con una  $p < 0.01$ , donde la media para el tratamiento 1 fue de 4.5 brotes nuevos y para el tratamiento 2, de 8.5 brotes. En la concentración en la que mayor número de brotes se presentaron (10) fue en el tratamiento con bacteria (T2) a una concentración de 10 ppm de cadmio; misma concentración a la cual Moctezuma Granados (2017), encontró que *P. rhodesiae* remueve un mayor porcentaje de  $Cd^{2+}$  en un 50% en presencia de *T. latifolia*. Por otro lado, en el tratamiento con bacteria, a una concentración de 5 ppm fue en donde menos brotes se presentaron, con una media de 7.5 brotes nuevos.

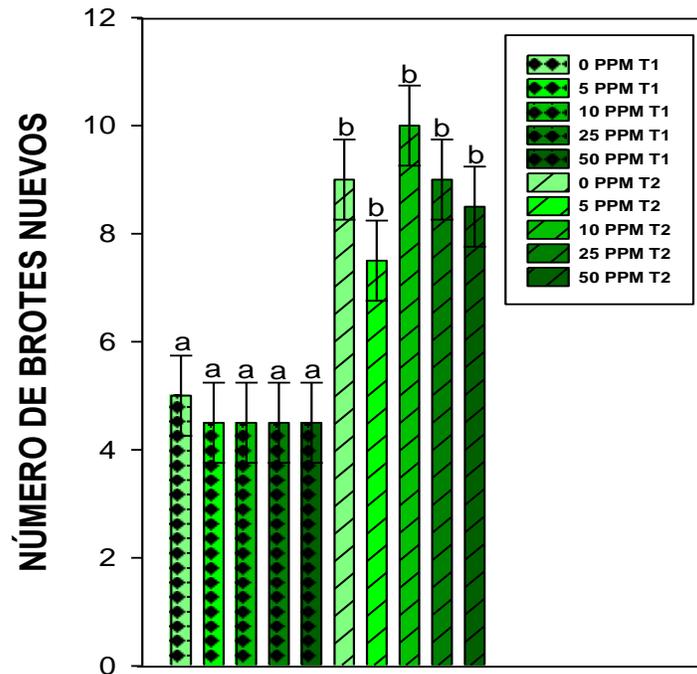


Figura 9. Número de brotes nuevos en las plántulas de *T. latifolia* a lo largo de la experimentación. Las barras indican el promedio de brotes para cada tratamiento y concentración utilizados y su error estándar. ( $p < 0.05$ ).

### 7.6. Evaluación del proceso de fitoextracción de Cd (II) por *T. latifolia* en presencia y ausencia de *Pseudomonas rhodesiae*

Para poder evaluar la fitoextracción de cadmio en ambos tratamientos con y sin bacteria a la cual estuvieron sometidos a concentraciones de cadmio de 0, 5, 10, 25 y 50 ppm, utilizando plántulas de *T. latifolia* con un peso y altura similar; se colocó el diseño del experimento como se me muestra en la Figura 10, en donde se compararon ambos tratamientos que fueron montados en un medio de cultivo Hoagland enriquecido con 1 % de sacarosa a un pH de 5.7. En esta figura se

observa el aspecto inicial y final de las plántulas a lo largo del experimento, en donde claramente el aspecto de cada una de ellas al paso de los 12 días de experimentación es cambiante.



Figura 10. Comparación del aspecto de las plántulas de *T. latifolia* expuestas a diferentes concentraciones de Cd (II) en ausencia y presencia de *P. rhodesiae*. A) día 1 sin bacteria, B) día 12 sin bacteria, C) día 1 con bacteria D) día 12 con bacteria.

Por otro lado, en la Figura 11 se puede observar el porcentaje de remoción de cadmio por las plántulas de *T. latifolia* a diferentes concentraciones y los días 3, 6, 9 y 12 del experimento. En este apartado es importante resaltar que el porcentaje al cual se obtuvo mayor remoción de cadmio por las plántulas de *T. latifolia* fue con el tratamiento 2 a una concentración de 10 ppm de cadmio en el medio Hoagland y en el día 9 del experimento; obteniendo un 97.66 % de remoción. Hubo diferencias significativas entre ambos tratamientos con y sin la presencia de *P. rhodesiae*, en los cuatro días evaluados con una probabilidad menor a 0.05.

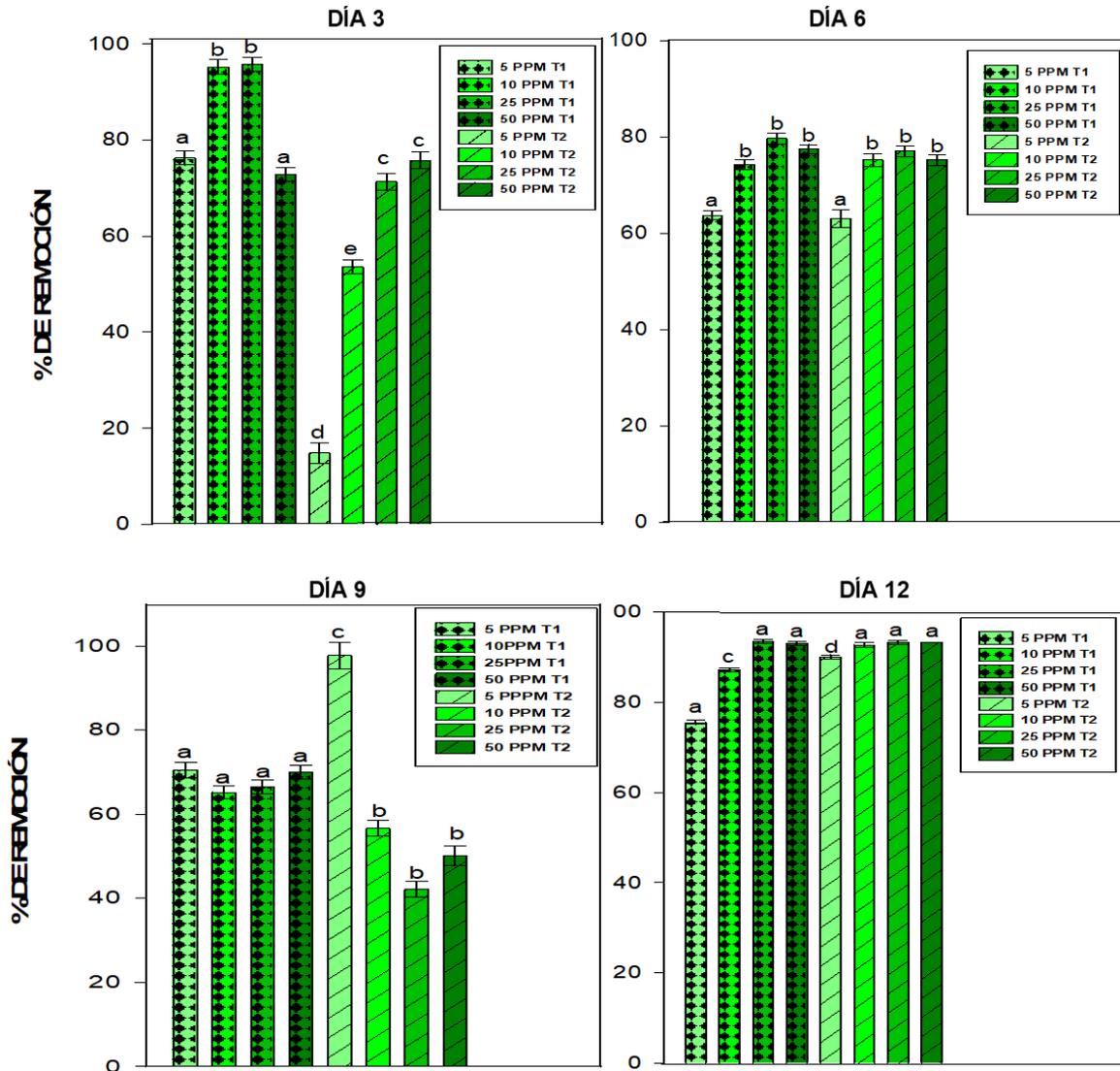


Figura 11. Porcentaje de remoción de cadmio por plántulas de *T. latifolia* con y sin la presencia de *P. rhodesiae* en medio de cultivo Hoagland enriquecido con 1 % de sacarosa en función del tiempo. Las barras muestran el error estándar de cada tratamiento. ( $p < 0.05$ ).

### 7.7. Evaluación del contenido de Cd (II) acumulado en el tejido vegetal de *T. latifolia* en el proceso de fitoextracción en presencia y ausencia de *Pseudomonas rhodesiae*

En relación a la acumulación de cadmio en los tejidos vegetales de las plántulas de *T. latifolia*, en la Figura 12 se observa claramente que el segmento de la plántula en el cual hubo mayor acumulación de cadmio fue en el tallo a una concentración de 5 ppm de cadmio en el medio Hoagland con la presencia de *P. rhodesiae*; acumulando 1059.82 mg/kg. Lo que concuerda con los resultados de la Figura 11 en donde también a la misma concentración hubo un mayor porcentaje de remoción de cadmio que estaba presente en el medio, a esa misma concentración sin la presencia de la bacteria se encontró que en raíz y tallo están las concentraciones más bajas de acumulación, siendo 68.5 mg/kg en raíz y 81.68 en tallo, lo que comprueba que la bacteria favorece la acumulación de cadmio preferentemente en tallo. En las demás concentraciones de 10, 25 y 50 ppm no hubo diferencias significativas entre tratamientos.

Los factores que pudieron influenciar en el incremento de la acumulación de Cd se relacionan con las diferencias en la morfología de las raíces y tallos de las plántulas de *T. latifolia*. Otros estudios demuestran que numerosas raíces delgadas pueden acumular más metales que otras plantas con raíces más gruesas y suculentas (Schierup, 1981). Además, se ha comprobado que raíces de la lechuga translocan hacia los brotes la mayor cantidad del Cd absorbido comparado con otras especies (Jarvis & Hopper., 1976).

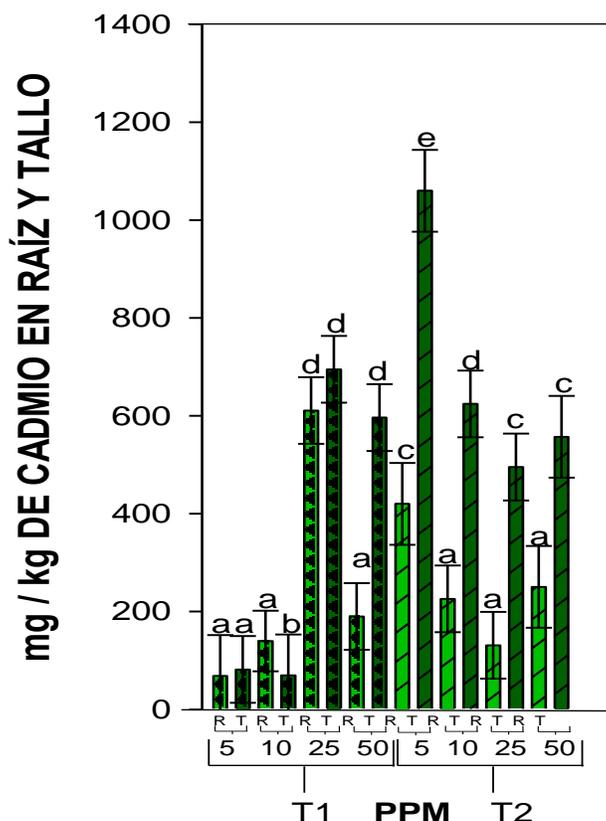


Figura 12. Concentración en mg/kg de Cd (II) en la raíz y tallo de *T. latifolia*.

### 7.8 Determinación del contenido de clorofila inicial y final de las plántulas de *T. latifolia* expuestas a Cd (II), con y sin la presencia de *Pseudomonas rhodesiae*

Se determinó el contenido de clorofila de las plántulas de *T. latifolia* con y sin la presencia de *P. rhodesiae* con el fin de observar el daño causado por la presencia del metal (Cd (II)) en diferentes concentraciones.

Los resultados obtenidos se presentan en las Figura 14 y Figura 15, en donde se observan todas las concentraciones del metal utilizadas incluyendo el control (0 ppm). En ambos tratamientos se observó disminución de la clorofila respecto al resultado inicial (12.9 mg/gr). Resultados que se deben al daño fitotóxico de la planta, así como a las condiciones ambientales a las que fueron sometidas las plántulas, ya que cuando las plántulas se encuentran expuestas a altas

concentraciones de elementos potencialmente tóxicos, se manifiestan grandes cantidades de efectos tóxicos en ellas.

El cadmio es un metal pesado potencialmente tóxico que dificulta la productividad de la planta al interferir con su fotoquímica. El cadmio causa alteraciones en una variedad de procesos fisiológicos de las plantas, como la fotosíntesis, las relaciones hídricas, el metabolismo iónico y la absorción de minerales, también afecta notablemente la fotosíntesis por la alteración de su maquinaria vital en todos los aspectos. La fotosíntesis es un proceso bien organizado y secuencial fundamental para todas las plantas verdes y microorganismos que involucra varios componentes, incluidos los pigmentos y fotosistemas fotosintéticos, el sistema de transporte de electrones y las vías de reducción de CO<sub>2</sub>. Cualquier daño en cualquier nivel causado por Cd, afecta críticamente la capacidad fotosintética general.

El cadmio distorsiona la ultraestructura de los cloroplastos que causan una forma alterada y tilacoides inflados (Najeeb U., 2011). La alteración de la estructura del cloroplasto se manifiesta en parte por una notable disminución en el número y tamaño de cloroplastos, apilamiento de grana, contenido de almidón y acumulación de plastoglobulos, esto se ha observado en diversas plantas como *Picris divarticata* (75 µM, 14 días después del tratamiento), *Hordeum vulgare* (5 µM, 15 DAT) y *Brassica* (Elhiti M., 2012).

Por otro lado, en los pigmentos fotosintéticos se han llevado a cabo enormes estudios hasta la fecha sobre la reducción de clorofila y carotenoides en plantas expuestas al estrés del Cd. Se sabe que la destrucción de la clorofila en las hojas más viejas y su inhibición de la biosíntesis en las más nuevas son la causa principal de la clorosis foliar en las plantas que crecen en suelos tratados con Cd (Xue XC., 2013).

La inhibición de las enzimas de biosíntesis de la clorofila y la activación de su degradación enzimática juegan un papel crucial en la pérdida neta en el contenido de clorofila. El aminolevulinato (ALA) es un compuesto crucial en la biosíntesis de la clorofila y su síntesis es el paso limitante y regulatorio. El Cd inhibe la síntesis de ALA en el sitio de disponibilidad de glutamato para la síntesis de ALA

e interfiere al interactuar con el grupo SH de enzimas,  $\delta$ -ácido aminolevulínico deshidratasa (Strzalka, 2002) y porfobilinógeno desaminasa (Skrebsky EC, 2008) que conduce a la acumulación de intermedios de biosíntesis de clorofila como ALA y porfirinas.

En algunas plantas expuestas al estrés por cadmio, el PSI en lugar del PSII es el principal lugar de daño (Figura 13). Estudios previos sugirieron que la deficiencia de hierro inducida por Cd en los orgánulos celulares posiblemente sea una razón para un mayor daño a la PSI (Timperio, 2007).

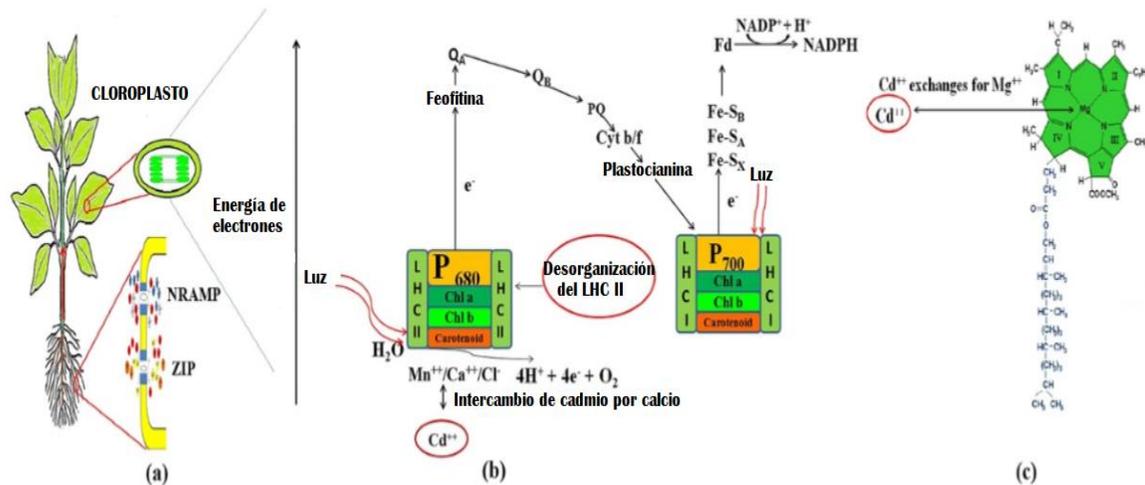


Figura 13. efectos de Cd como un potente inhibidor de la fotosíntesis. La inhibición de la fotosíntesis puede atribuirse a la disminución de la biosíntesis de la clorofila, la interrupción del O<sub>2</sub> - reacciones de PSII y alteración del flujo de electrones alrededor de PSI y PSII (Parmar, Kumari, & Sharma., 2013).

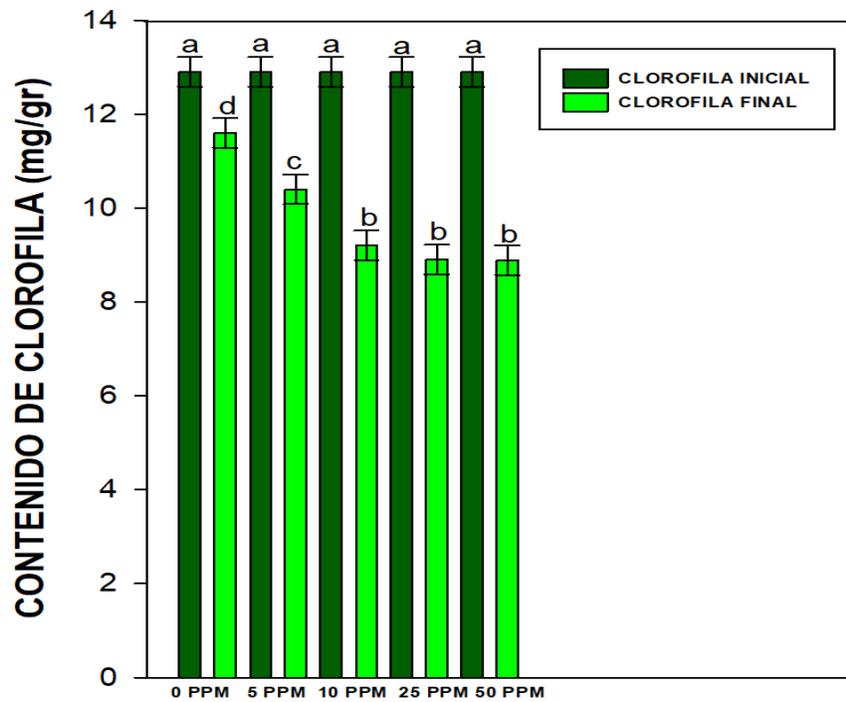


Figura 14. Contenido de clorofila inicial y final de las plántulas de *T. latifolia* expuestas a Cd (II), con la presencia de *P. rhodesiae*.

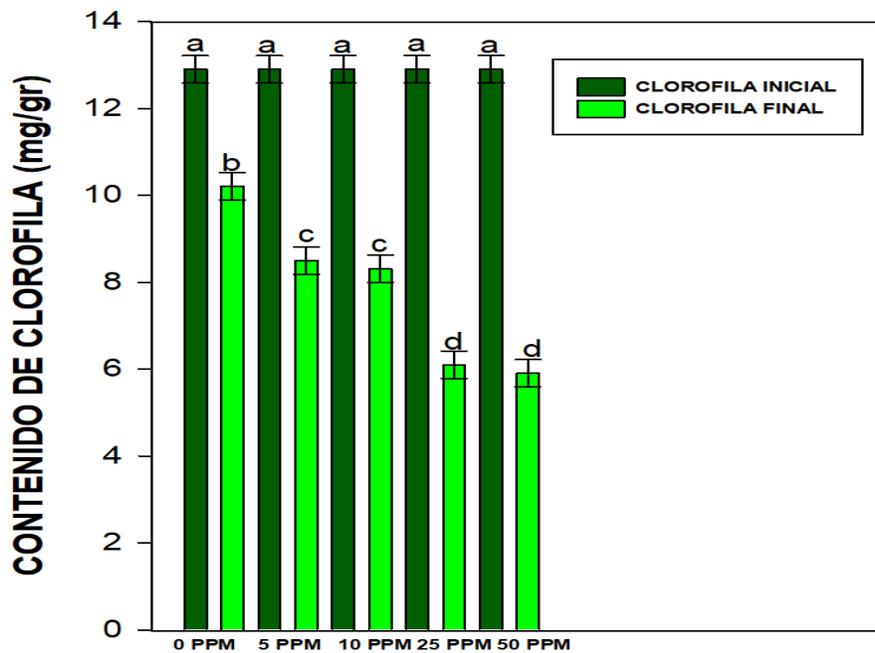


Figura 15. Contenido de clorofila inicial y final de las plántulas de *T. latifolia* expuestas a Cd (II), sin la presencia de *P. rhodesiae*.

## **7.9 Comprobación de la internalización de la bacteria en los tejidos radiculares de *Typha latifolia***

Para comprobar la internalización de la bacteria en los tejidos radiculares de las plántulas de *Typha latifolia* del T2, se contabilizaron las UFC/mL al día cero en el medio de cultivo Hoagland con 1 % de sacarosa en donde se obtuvo  $1 \times 10^6$  UFC/mL, resultado que fue similar para todas las concentraciones de Cd de los diferentes tratamientos, incluyendo el control. Al finalizar el experimento, en el día 12 los resultados que se obtuvieron respecto a la raíz fueron los siguientes: en el control se obtuvieron  $1 \times 10^6$  UFC/gr de raíz, lo cual indica que se mantiene la carga microbiana utilizada en el estudio y sugiere que la bacteria endófito ingresó al interior de las raíces. En la concentración de 5 ppm se obtuvieron 156 UFC/gr de raíz, sugiriendo que la bacteria endófito a pesar de coloniza el interior de las raíces, muestra sensibilidad al Cd. Los resultados en tallo no fueron favorables para todos los tratamientos, ya que ninguno presentó colonización bacteriana por *P. rhodesiae* en las partes aéreas, sugiriendo que la bacteria no se transloca al tallo, dada su naturaleza endófito en las raíces de la planta, donde encuentra las condiciones óptimas para sobrevivir.

## 8. CONCLUSIONES

- Se establecieron las condiciones ambientales necesarias para el crecimiento de *P. rhodesiae* utilizando el medio de cultivo Hoagland enriquecido con 1 % de sacarosa, con el fin de tener una fuente de carbono que aportara los nutrientes necesarios para el desarrollo de la bacteria y la planta.
- Se encontró que *P. rhodesiae* puede tolerar concentraciones de 5 y 10 ppm de Cd sin la presencia de *Typha latifolia* en medio Hoagland con 1 % de sacarosa.
- El mayor porcentaje de remoción de cadmio ocurrió a una concentración de 5 ppm de cadmio con la presencia de *P. rhodesiae* al día 9 del experimento con un 97.66% de remoción; misma concentración a la cual hubo mayor acumulación del metal en el tallo de las plántulas de *T. latifolia* con 1059.82 mg de cadmio por kilogramo de tallo.
- Se logró comprobar la internalización de *P. rhodesiae* en concentraciones de 0 y 5 ppm de Cd (II), únicamente en raíz a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/gr y 156 UFC/gr respectivamente.

Como conclusión final, se encontró que *P. rhodesiae* promueve el crecimiento radicular de *T. latifolia*, aumentando así la superficie de captación de cadmio por esta especie vegetal.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Ahemad, M. (2012). Implications of bacterial resistance against heavy metals in bioremediation: a review. . *IIOABJ*, 39-46.
- Aponte, F. (2008). Determinación del protocolo de desinfección de semillas de Bolaina blanca (*Guazuma crinita* Matr.) y Cedro (*Cedrela odorata* L.) para germinación in vitro. . *Universidad Nacional de Ucayali. Facultad de Ciencias Forestales. Pucalca, Perú.* .
- Astolfi, S. Z. (2005). Effect of cadmium on H(+)ATPase activity of plasma membrane vesicles isolated from roots of different S-supplied maize (*Zea mays* L.) plants. . *Plant Science*, 361-368.
- Atlas, R. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. . *Microbiol Rev.* .
- Baker, A. (1981). Accumulators and excluders strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal Plant Nutrition*.
- Baker, A. M. (2000). Metal hyperaccumulator plants: a review of he ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. *hytoremediation of Contaminated Soil and Water* .
- Baker, K. (1994). Bioremediation of surface and subsurface soils. . *New York: McGraw-Hill*.
- Barceló, J., & Poschenrieder, C. (2003). Phytoremediation: principles and perspectives. . *Contributions to Science*.
- Benavides, M. G. (2005). Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* , 21-34.
- Bernal, M., Clemente, R., Vazquez, S., & Walker, D. (2007). Aplicación de la fitorremediación a los suelos contaminados por metales pesados en Aznalcóllar. *Asociación Española de Ecología Terrestre*.
- Bossert, I., & Bartha, R. (1984). The fate of petroleum in soil ecosystems. In: R.M. Atlas Ed. *Petroleum microbiology. New York: Macmillan Publishing Co.*
- Bréant, D. J. (2002). Optimisation of the cell release from immobilised cells of *Bacillus simplex* cultivated in culture media enriched with Cd<sup>2+</sup>: influence of

- Cd<sup>2+</sup>, inoculum size, culture medium and alginate beads characteristics. . *Biotechnology Letters*, 1237-1241.
- Brooks, R. L. (1977). Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants. . *Journal Geochemical Exploration*, 49-57.
- Carranza Álvarez, C. A.-C. (2008). Accumulation and distribution of heavy metals in *Scirpus americanus* and *Typha latifolia* from an artificial lagoon in San Luis Potosi, Mexico. *Water Air Soil Pollut*, 297-309.
- Casellas, M. G. (1998). Isolation and characterization of a 9- fluorenone-degrading bacterial strain and its role in synergistic degradation of fluorene by a consortium. *Can J Microbiol*. .
- Cirujano, S., & Morales, R. (1995). Las espadañas y sus utilidades. *Plantas y cultura popular: Laetnobotánica en España*.
- Clemens, S. (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. . *Biochimie*, 1707-1719.
- Del Río, L. C. (2004). Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. . *Phytochemistry*, 783-792.
- Díaz, T. y. (2003). Comportamiento de la germinación de semillas de tomate tratadas con cloro. . *Instituto de Investigaciones Hortícolas: Liliana Dimitrova. La Habana. Cuba*. .
- Dibble JT, B. R. (1979). Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. . *Appl Environ Microbiol*. .
- Elhiti M., Y. C. (2012). Altered seed oil and glucosinolate levels in transgenic plants over expressing the Brassica napus shoot meristem less gene. *J Exp Bot*.
- Ercoli, E. G. (2017). *Análisis y evaluación de parámetros críticos en biodegradación de hidrocarburos en suelo*.
- Fergusson, J. (1990). The heavy Elements. Chemistry, Environmental Impact and Health Effects. *Pergamon Press*.
- Flor de Planta*. (2016, Junio 09). Retrieved Marzo 05, 2017, from <http://www.flordeplanta.com.ar/acuaticas/totora-typha-latifolia-caracteristicas-cultivo-y-cuidados/>

- Freitas, H. P. (2004). Heavy Metals in the Plant Community of Sao Domingo an Abandoned Mine in SE Portugal: Possible Applications in Mine Remediation. . *Enviromental International*, 65.72.
- Gadd, G. (2000). Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. . *Current Opinion in Biotechnology* , 271-279.
- Goldbol, D. H. (1985). Effect of zinc, cadmium and mercury on root elongation on *Picea abies* (Karst.) seedlings and the significance of these metals to forest die-back. *Environmental Pollution*, 375-381.
- Gouia, H. G. (2000). Effects of cadmium on activity of nitrate reductase and on other enzymes of nitrate assimilation pathway in bean. *Plant Physiology and Biochemistry* , 629-638.
- Haigler, B. P. (1992). Biodegradation of mixtures of substituted benzenes by *Pseudomonas* strain JS150. . *Appl Environ Microbiol.* .
- Hamer, D. (1986). Metallothionein. . *Annual Review of Biochemistry* , 913-951.
- Hartman, H., & Krester, D. (1980). Propagación de plantas. Principios prácticos. México: Compañía Editorial Continental S.A.
- Harvey, P. C.-R. (2002). Phytoremediation of Polyaromatic Hydrocarbons, Anilines and Phenols. . *Environmental Science and Pollution Research* , 29-47.
- Jarvis, S., & Hopper., L. J. (1976). Cadmium uptake from solution by plants and its transport from roots do shoots. *Panta Soil*.
- Jianlong, W. X. (2001). Bioadsorption of lead (II) from aqueous solution by fungal biomass of *Aspergillus niger*. . *Journal of Biotechnology*, 273-277.
- Kabata-Pendias, A. (2000). *Trace elements in soils and plants*. Boca Raton. USA.: CRC Press, Inc.
- Leahy JG, C. R. (1990). Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment . *Microbiol Mol Bio*.
- Limswan, S., Trip, E., Kouwenc, T., Piersmac, S., Hiranrat, A., Mahabusarakam, W., & Etal, R. (2009). A new candidate as natural antibacterial drug from *Rhodomyrtus tomentosa*. . *Phytomedicine* , 645-651.
- Lovley, D. (2000). *American Society for Microbiology*. Washington D.C: Ed. Environmental Microbe-Metal Interactions.

- Maksymiec, W. W. (2007). Variation in oxidative stress and photochemical activity in *Arabidopsis thaliana* leaves subjected to cadmium and excess copper in the presence or absence of jasmonate and ascorbate. *Chemosphere*, 421-427.
- Mei-Chun Cheng, K. K.-L.-C.-H.-P. (2015). Increased glutathione contributes to stress tolerance and global translational changes in *Arabidopsis*. *The plant journal*, 937.
- Mentaberry A. (2008). Fitorremediación. *Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Biología Molecular y Celular*.
- Moctezuma, G. C. (2017). *Evaluación de Pseudomonas endófitas de la raíz de Typha latifolia en la fitoextracción de Cd (II)*. Programa Multidisciplinario de Posgrados en Ciencias Ambientales. Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales.
- Najeeb U., J. G. (2011). Insights into cadmium induced physiological and ultra-structural disorders in *Juncus effusus* L. and its remediation through exogenous citric acid. *J. Hazard Mater.*
- Parmar, P., Kumari, N., & Sharma, V. (2013). Structural and functional alterations in photosynthetic apparatus on plants under cadmium stress. *Botanical Studies. Springer*.
- Pellini, A. (2017). *Biorremediación estimulada por efluentes cloacales tratados de suelos contaminados con hidrocarburos*. Retrieved from <http://www.tesis.bioetica.org/lp.htm>.
- Pineda, M. E., & Rodríguez, A. M. (2016). BIORREMEDICATION OF HEAVY METAL CADMIUM (Cd), CHROME (Cr) AND MERCURY (Hg), BIOCHEMICAL MECHANISMS AND GENETIC ENGINEERING: A REVIEW. *Universidad Militar Nueva Granada*.
- Pinto, E. S.-K. (2003). Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *Journal of Phycology*, 1008-1018.
- Pomponi, N. C. (2006). Overexpression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase in tobacco plants enhances Cd<sup>2+</sup> tolerance and accumulation but not translocation to the shoot. *Planta*, 180-190.

- Ponce, A. J. (2017). Efecto de *Pseudomonas* sp. Sobre la fitoextracción de PB (II) por *Typha latifolia* (Espadaña). *UAMZH- UASLP. Tesis de Licenciatura*.
- Pucci, G. H. (2004). Influence of salinity and temperature on fatty acid composition of *Pseudomonas fluorescens* GNP-OHP-3 membrane. *Rev Argent Microbiol*.
- Ramos, A. J. (2012). Avances de la propagación in vitro de plantas leñosas. *Especialización en Biotecnología agraria. Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD)*.
- RD., S. (1998). Biodegradation of aromatic hydrocarbons in an extremely acidic environment. . *Appl Environ Microbiol* .
- Reichenauer, T., & Germida, J. (2008). Phytoremediation of Organic Contaminants in Soil and Groundwater. *ChemSusChem*.
- Robinson, B. C. (1997). The nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii* as a potential agent for phytoremediation and phytomining of nickel. . *Journal Geochemical Exploration*, 75-86.
- Rodríguez O., J. R. (2006). Capacidad de seis especies vegetales para acumular plomo en suelos. *Fitotecnia Mexicana*, 239-245.
- Rodríguez-Serrano, M. R.-P. (2006). Cadmium effect on the oxidative metabolism of pea roots. Imaging of ROS and NO production in vivo. *Plant Cell and Environment*, 1532-1544.
- Rolón, C. G. (2015). Aislamiento y caracterización de bacterias endófitas de la raíz de *Typha latifolia* tolerantes a cadmio. . *UAMZH- UASLP. Tesis de Licenciatura*. . Ciudad Valles, S.L.P.
- Rolón, C. G. (2017). Caracterización bioquímica y molecular de bacterias endófitas de *Typha latifolia* tolerantes a cadmio. *Facultad de Ciencias Químicas Centro de Investigación y Estudios de Posgrado. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas*.
- Romero-Puertas, M. (2002). *Metabolismo de especies de oxígeno reactivo en plantas de guisante (Pisum sativum L.) y en peroxisomas de hojas en condiciones de estrés por cadmio*. . Universidad de Granada. España.: Tesis Doctoral.

- Salt, D. P. (1995). Mechanism of cadmium mobility and accumulation in indian mustard. . *Plant Physiology*, 1427-1433.
- Samudio, A., Nakayama, H., Peralta, I., & Cardozo, C. (2014). CALIDAD FISIOLÓGICA DE SEMILLAS DE *Typha domingensis* Pers. (TOTORA Y SU PROPAGACIÓN EN CONDICIONES CONTROLADAS. *ROJASIANA*, 58-59.
- Sánchez, L. R. (2012). Cultivo in vitro de *Gyrocarpus americanus* (Hernandiaceae). *Universidad del Tolima. Ibagué.* .
- Sánchez, R. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 133-145.
- Sandalio, L. D.-P. (2001). Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. . *Journal of Experimental Botany*, 2115-2126.
- Sanità di Toppi, L., & Gabrielli, R. (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*.
- Schierup, H. y. (1981). Macrophyte cycling of Zn, Cu, Pb and Cd in the littoral zone of a polluted and non-polluted lake. I. Availability, uptake and translocation of heavy metals in *Phragmites australis*. *Trin. Aquatic Bot.*
- Sharma, P. B. (2000). A new *Klebsiella planticola* Strain (Cd-1) Grows Anaerobically at High Cadmium Concentrations and Precipitates Cadmium Sulfide. . *Applied and Environmental Microbiology* .
- Silver, S. A. (1988). Plasmid-mediated Heavy Metal Resistances. . *Annual Reviews on Microbiology* .
- Singh, B. W. (2003). Effects of soil pH on the biodegradation of chlorpyrifos and isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium. *Appl Environ Microbiol.* .
- Singh, P., & Tewari, R. (2003). Cadmium toxicity induced changes in plant water relations and oxidative metabolism of *Brassica juncea* L. plants. *Journal of Environmental Biology*, 107-112.
- Skrebsky EC, T. L. (2008). Effect of cadmium on growth, micronutrient concentration and aminolevulinic acid dehydratase and acid phosphatase activities in plants of *Puffinia glomerata*. *Braz J Plant Physiol.*

- Srinath, T. V. (2002). Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. *Chemosphere* .
- Staunton, S. (1996). Effect of pH and some organic anions on the solubility of soil phosphate: implications for P bioavailability. *Eur J Soil Sci*.
- Stohs, S., & Bagchi, D. (n.d.). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. . *Free Radical Biology and Medicine*, 321-336.
- Stone, J., Bsccon, C., & White, J. (2000). An overview of endophytic microbes: endophytism defined [J]. *Becon CW, White Jr JF, editors.*, 3-29.
- Strobel, G., & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 491-502.
- Strzalka, M. C. (2002). Influence of metals on the byosynthesis of photosintetic pigments. *Springer*.
- Tapia, J. V.-C. (2010). Study of the content of cadmium,chromium and lead in bivalve molluscs of the Pacific Ocean.
- Thomine, S. W. (2000). Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in Arabidopsis with homology to Nramp genes. . *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* , 4991-4996.
- Timperio, A. (2007). Proteomics pigment composition and organization on thylakoid membranes in iron deficient apinach leaves. *J Exp Bot*.
- Verstraete, W. V. (1976). Modeling of the breackdown and the molbilization of hydrocarbons in unsaturated soil layers. . *En: Proceedings of the 3rd International En: Proceedings of the 3rd International* .
- Vig, K. M. (2003). Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil: a review. *Advances in Environmental Research*.
- Viñas, C. M. (2005). Biorremediación de suelos contaminadospor hidrocarburos: Caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica. . *Tesis Doctoral*. Barcelona: Universidad de Barcelona.
- Walasek, D. (2012). Evaluación de métodos para desinfectar semillas de tomate contra cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*). *Revista Agrociencia Uruguay. Volumen 16, Nº1. Montevideo. Junio*.

- Wang, C. M. (1997). Cadmium Removal by a new strain of *Pseudomonas aeruginosa* in Aerobic Culture. . *Applied and Environmental Microbiology* .
- Wilkinson, S. G. (1998). Gram-negative bacteria. . *London: Academic Press*.
- Xue XC., G. H. (2013). effects of cadmium on growth photosintetic rate and chloropyll content in leaves of soybean seedlings. *Bio Plant*.
- Zayed A, S. G. (1998). Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: I. Duckweed. . *J Environ Qual*, 715-721.