



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



INSTITUTO DE CIENCIAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

Bacillus cereus MH778713 asiste a la
fitorremediación a *Prosopis laevigata* mediante
la producción de compuestos orgánicos
volátiles.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)

PRESENTA:

M C VERÓNICA LILIANA RAMÍREZ FALCÓN

DIRECTOR DE TESIS:

D C JOSÉ ANTONIO MUNIVE HERNÁNDEZ

CODIRECTOR DE TESIS:

D C ANTONINO BAEZ ROGELIO

AGRADECIMIENTOS



A la BUAP, VIEP y el Instituto de Ciencias BUAP, por el apoyo en la realización de esta tesis.

Al D C José Antonio Munive Hernández asesor de esta tesis, por su apoyo y dirección de esta tesis.

Al D C Antonino Báez Rogelio por su apoyo, durante los cuatro años de realización de esta tesis y su dedicación a este proyecto.

Al D C Javier Martínez Juárez por su apoyo, dedicación y soporte brindado durante la realización de esta tesis.

A la D C Verónica Quintero Hernández por su apoyo, consejos, tips y amistad.

ÍNDICE	
ÍNDICE DE FIGURAS	5-7
ÍNDICE DE TABLAS.....	8
REUMEN.....	9-10
OBJETIVO GENERAL.....	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
HIPOTEIS.....	11
JUSTIFICACIÓN	12
ESQUEMA DE TRABAJO.....	13
CAPÍTULO 1 “<i>Bacillus cereus</i> MH778713 hipertolerante a cromo asiste a la fitorremediación de metales pesados a <i>Prosopis laevigata</i>”.	
INTRODUCCIÓN.....	14-15
MATERIALES Y METODOS.....	18-19
RESULTADOS.....	19-27
DISCUSIÓN.....	28-30
CONCLUSIÓN.....	30
CAPÍTULO 2 “Alcanos de cadena larga (C21, C24 Y C31) producidos por <i>Bacillus cereus</i> MH778713 asisten en la ruptura de la dormancia a semillas de mezquite expuestas a estrés por cromo”.	
INTRODUCCIÓN.....	31-33
MATERIALES Y METODOS.....	34-36
RESULTADOS.....	36-42
DISCUSIÓN.....	43-44
CONCLUSIÓN.....	44
CAPÍTULO 3 “Actividad antifúngica de alcanos volátiles producidos por <i>Bacillus cereus</i> MH778713”.	
INTRODUCCIÓN.....	45-46
MATERIALES Y METODOS.....	46-47
RESULTADOS.....	47-51
DISCUSIÓN.....	51-52
CONCLUSIÓN.....	53

REFERENCIAS.....	54-69
FIGURAS SUPLEMENTARIAS.....	70-75
TABLAS SUPLEMENTARIAS.....	76

ÍNDICE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Fig. 1. Test de nodulación en *Macropitium atropurpureum*, muestra como a pesar de que las 89 cepas no lograron hacer nodular a la planta, en un medio libre de nitrógeno estas son capaces de crecer y desarrollarse, lo cual sugiere que estas bacterias son capaces de llevar a cabo el proceso de fijación de nitrógeno.

Fig. 2. *Bacillus* sp. MH778713 (A, B, and C) y *Pseudomonas putida* KT2440 (D, E and F) en agar YMA sin cromo (VI). Cr (VI) tolerancia de *Bacillus* sp. MH778713 en agar YMA with 15000 mg/kg of Cr (VI) usando un estampado en placa masivo (G, H and I) comparado con *Pseudomonas putida* KT2440 (J, K, and L).

Fig. 3. Remoción de cromo (VI) con *Bacillus* sp. MH778713 usando el método de determinación de cromo hexavalente en agua con 1,5-Diphenyl carbazida 37°C, 130 rpm y durante 420 min. El ensayo de bioabsorción es representado mediante la isoterma del tipo Lagmuir el cual muestra una $A_s = 116$ mg/g de biomasa.

Fig. 4. Representa el porcentaje de cromo captado por *Bacillus* sp. MH778713 en un medio acuoso y expuesto a diferentes concentraciones de cromo VI. La concentración en donde se presentó la mejor remoción de cromo VI fue la de 91%, la tabla representa la diferencia entre tres mediciones diferentes.

Fig. 5. Ensayo de tolerancia de plántulas de *Prosopis laevigata* inoculadas con *Bacillus* sp. MH778713 crecido en medio hidropónico. A) Plántulas no inoculadas en medio Jensen's libre de nitrógeno como control negativo, B) Plántulas inoculadas con *Bacillus* sp. MH778713 en medio Jensen's libre de nitrógeno, C) Plántulas inoculadas con *Bacillus* sp. MH778713 en medio Jensen's libre de nitrógeno y expuestas a 10 mg/kg de cromo VI, D) Plántulas inoculadas con *Bacillus* sp. MH778713 en medio Jensen's libre de nitrógeno y expuestas a 25 mg/kg de cromo VI. Esta es una figura representativa de 20 plantas diferentes por cada tratamiento.

Fig. 6. Parámetros de crecimiento de las plántulas inoculadas y no inoculadas con *Bacillus* sp.

MH778713 expuestas a 0,10,25 mg/kg de cromo VI en medio Jensen's libre de nitrógeno. Las barras de error muestran la diferencia entre 12 plantas las cuales fueron medidas durante 2 meses de tratamiento.

CAPÍTULO 2

Fig. 1. Co-cultivación of *Bacillus cereus* MH778713 y *Prosopis laevigata*/*Arabidopsis thaliana* en cajas bipartidas, incubadas en oscuridad a 28°C, durante 72 horas para su germinación en agar agua el cual contiene una concentración de 2500 mg L⁻¹ of Cr (VI), las cuales estuvieron expuestas a *Escherichia coli* BL21 (DE3) como control negativo (b), *Bacillus cereus* MH778713 (c) o sin ningún compuesto o cepa (a). De la misma manera las semillas de *Arabidopsis thaliana* fueron expuestas por 72 horas en cajas bipartidas, incubadas en oscuridad a 28°C, para su germinación en agar agua el cual contiene una concentración de 2500 mg L⁻¹ of Cr (VI) las cuales estuvieron expuestas a *Escherichia coli* BL21 (DE3) como control negativo (b), *Bacillus cereus* MH778713 (c) o sin ningún compuesto o cepa (a). cada experimento fue hecho por quintuplicado en tres experimentos diferentes.

Fig. 2. Perfil de los compuestos producidos por *Bacillus cereus* MH778713 detectados mediante el análisis de GC-MS después de 24 y 48 h de incubación.

Fig. 3. Análisis de la promoción de la germinación de *Bacillus cereus* MH778713 y los compuestos tetracosane, heneicosane, hentriacontane y 2,4-Di-tert-butyl phenol en semillas expuestas al estrés por cromo. Semillas de *Prosopis laevigata* en cajas bipartidas, incubadas en oscuridad a 28°C, para su germinación en agar agua el cual contiene una concentración de 2500 mg L⁻¹ of Cr. *Escherichia coli* BL21 (DE3) como control negativo (a), *Bacillus cereus* MH778713 como control positivo (b), tetracosane (c), heneicosane (d), hentriacontane (e), y 2,4-Di-tert-butyl fenol (f). El análisis de la promoción de la germinación de los diferentes compuestos orgánicos volátiles (VOCs) fue hecho por quintuplicado en tres experimentos diferentes.

Fig. 4. Análisis de la promoción de la germinación de semillas estimuladas por los compuestos volátiles orgánicos heneicosane, tetracosane, hentriacontane, 2,4-Di-tert-butyl fenol y compuestos volátiles producidos por *Bacillus cereus* MH778713. Semillas de *Prosopis laevigata* en cajas bipartidas, incubadas en oscuridad a 28°C, para su germinación en agar agua el cual contiene una concentración de 2500 mg L⁻¹ of Cr. El análisis de la promoción de la germinación de los diferentes VOCs fue hecho por quintuplicado en tres experimentos diferentes. Diferentes letras indican la

diferencia significativa entre los diferentes tratamientos a los que fueron sometidas las semillas de *Prosopis laevigata*, con un nivel de confianza de $P= 0.05$.

Fig. 5. Análisis de la promoción del crecimiento de las plántulas estimuladas por los compuestos volátiles orgánicos heneicosane, tetracosane, hentriacontane, 2,4-Di-tert-butyl fenol y compuestos volátiles producidos por *Bacillus cereus* MH778713. Semillas de *Prosopis laevigata* en cajas bipartidas, incubadas en oscuridad a 28°C, para su germinación las semillas fueron embebidas en agar agua. El análisis de la promoción de la germinación de los diferentes VOCs fue hecho por quintuplicado en tres experimentos diferentes. Las diferentes letras indican la diferencia significativa entre los diferentes tratamientos a los que fueron sometidas las semillas de *Prosopis laevigata*, con un nivel de confianza de $P= 0.05$.

CAPÍTULO 3

Fig 1. Muestra la actividad antifúngica de *Bacillus cereus* MH778713, a) muestra el crecimiento miceliar de *Fusarium* sp.; b) Muestra la inhibición del crecimiento de *Bacillus cereus* MH778713 frente a *Fusarium* sp.

Fig 2. Muestra la actividad antifúngica de *Bacillus cereus* MH778713 (C) y los controles negativos (A) placas de Petri bipartidas sin inocular y placas de Petri bipartidas inoculadas con *E. coli* BL21 DE3 (B).

Fig 3. Muestra la actividad antifúngica de los COVs producidos por *Bacillus cereus* MH7787133, (d) Hentriacontane, (e) Heneicosane, (f) Tetracosane y los controles negativos (a) placas de Petri bipartidas sin inocular y placas de Petri bipartidas inoculadas con *E. coli* BL21 DE3 (b) y el control positivo placas de Petri bipartidas inoculadas con *Bacillus cereus* MH778713 (c).

Fig 4. Diferencia en la medición del crecimiento radial de la colonia de *Fusarium* sp. al ser co-cultivado durante tres días en cajas bipartidas con *Bacillus cereus* MH778713; n=15.

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO 1

Tabla 1. Contenido de metales pesados en sedimento, suelo y tejidos de la árboles maduros de Mesquite. La concentración de metales pesados esta dada en mg/kg. El sedimento corresponde a las muestras del río Nexapa, el contenido del suelo rhizosferico tomado a 300 metros de el río Nexapa, suelo no rhizosferico las muestras fueron tomadas a 200 metros del río Nexapa y el suelo rhizosferico tomado de el lugar de toma de muestra. Los difractogramas se muestran en las figuras S1-S7. Los valores de referencia de los metales pesados se muestran en las columnas R planta y R suelo en la tabla (Kabata y Pendias. 2010).

Tabla 2. Tolerancia a hierro. Los 88 aislados son tolerantes a 500 ppm de hierro, 19 aislados son tolerantes a 1000 ppm. Los valores representan las UFC en 1 ml de medio YMA.

Tabla 3. Tolerancia a cromo VI, todos nuestros aislados toleran hasta 300 ppm de Zinc. Los valores representan las UFC en 1 ml medio YMA. 15 de nuestros aislados toleran hasta 2000 ppm de Zn.

Tabla 4. Los valores representan las UFC en 1 ml de medio YMA. Los 88 aislados son tolerantes

CAPÍTULO 3

Tab 1. Muestra el perfil de producción de Compuestos orgánicos volátiles de *Bacillus cereus* MH778713 extraídos con éter etílico y obtenidos mediante la técnica CG-EM después de 24 horas de co-cultivación con *Fusarium* sp.

RESUMEN

Los organismos presentes en un nicho ecológico son capaces de entablar una estrecha comunicación entre ellos mediante la síntesis y emisión de compuestos orgánicos e inorgánicos, de los cuales su actividad biológica se ha estudiado y se ha establecido de manera reciente, estos compuestos juegan un papel muy importante en la interacción de todos los individuos de un nicho ecológico.

Las plantas son capaces de entablar una estrecha comunicación entre ellas y con bacterias que se encuentran presentes en determinado nicho ecológico cuando estas producen compuestos orgánicos volátiles (COVs), los cuales son considerados como desencadenantes de una cascada de señalización en las plantas, este proceso está directamente relacionado con el desarrollo de la raíz, el desarrollo de la planta, la regulación hormonal, la obtención de nutrientes, la inducción de la respuesta sistémica y la producción de compuestos antifúngicos.

Un solo compuesto volátil orgánico es capaz de desencadenar varias respuestas en la planta, por ejemplo estimular el crecimiento vegetal y desencadenar la respuesta sistémica inducida en estas, estos compuestos modulan el encendido y apagado de diferentes procesos esenciales para la planta, pasando del encendido de la actividad de promoción de crecimiento, el desarrollo, el apagado de esta función y el encendido del proceso de defensa frente a fitopatógenos.

Las plantas tienen la capacidad de entablar comunicación entre ellas y las bacterias del suelo mediante la producción de COVs los cuales son producidos en la raíz de estas, estos compuestos llevan a cabo funciones como metabolitos de defensa, fuentes de carbono y quimioatrayentes, la producción de estos compuestos permite la interacción entre las Rizobacterias y las plantas a larga distancia, procurando la atracción de microorganismos benéficos para estas, sin embargo todavía no está bien dilucidado el mecanismo, quizás la concentración y la mezcla de estas moléculas podría ser la clave en este proceso.

En la subcuenca del río Nexapa en Puebla, México, crece una población de árboles de *Prosopis laevigata*, esta población de árboles es capaz de crecer y desarrollarse a pesar de que la zona se encuentra contaminada con altas concentraciones de metales pesados como Aluminio, Hierro, Titanio, Zinc y Cromo, *Prosopis laevigata* es una planta hiperacumuladora de metales pesados

como Al, Fe, Ti y Zn. De nódulos de árboles jóvenes de esta población de *Prosopis laevigata* fue aislado *Bacillus cereus* MH778713, una bacteria hipertolerante a altas concentraciones de Cromo VI (15 000 mg Kg⁻¹), Aluminio (10 000 mg Kg⁻¹), Hierro (1500 mg Kg⁻¹) y Zinc (300 mg Kg⁻¹). La germinación de semillas de *Prosopis laevigata* es inhibida cuando estas se encuentran embebidas en altas concentraciones de cromo VI (2500 mg L⁻¹). *Bacillus cereus* MH778713 brinda protección y promueve la ruptura de la dormancia de la semilla de Mezquite mediante la producción de compuestos volátiles orgánicos (COVs), *Bacillus cereus* MH778713 mostró mediante un análisis de CG-EM un perfil de 33 compuestos volátiles orgánicos, de los cuales fueron probados cuatro de los compuestos más abundantes presentes en el perfil de producción de COVs de *Bacillus cereus* MH778713, se realizaron ensayos del efecto de estos compuestos en la ruptura de la dormancia de la semilla expuesta a estrés por cromo VI y su efecto de promoción de crecimiento en plántulas de *Prosopis laevigata*. El tetracosane, hentriacontane y heneicosane fueron los más efectivos, estos compuestos son de origen alquílico y cadena larga.

Los COVs además de promover el crecimiento vegetal pueden ejercer un efecto antagónico frente a organismos fitopatógenos, por lo tanto el aislado *Bacillus cereus* MH778713 fue probado frente a un hongo patógeno de interés económico como *Fusarium* sp.

Bacillus cereus MH778713 y los compuestos tetracosane, hentriacontane y heneicosane, fueron evaluados en su potencial como inhibidores del crecimiento micelial de *Fusarium* sp., mostrando una mayor eficacia los compuestos hentriacontane y heneicosane en la inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium* sp.

Bacillus cereus MH778713 es una bacteria benéfica para *Prosopis laevigata*, asiste al Mesquite mediante la producción de compuestos orgánicos volátiles, los cuales son los responsables de desencadenar la cascada de señalización que es responsable de la ruptura de la dormancia de semillas de *Prosopis laevigata* a pesar del estrés por metales pesados, por lo tanto esto explica que una población de Mesquite se haya desarrollado en un nicho ecológico contaminado con altas concentraciones de metales pesados. Los COVs de *Bacillus cereus* MH778713 son capaces de promover el crecimiento vegetal y de inhibir el crecimiento de fitopatógenos como *Fusarium* sp., por lo tanto esta asociación bacteria planta son una buena alternativa para la fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados. Mientras que *Bacillus cereus* MH778713 es una propuesta atractiva como inoculante para la promoción del crecimiento vegetal y agente de biocontrol de fitopatógenos.

OBJETIVO GENERAL

Conformación de una colección de aislados tolerantes a metales pesados (Cr, Fe y Zn) de nódulos de una población de árboles jóvenes de *Prosopis laevigata* los cuales se encuentran en una zona contaminada con altas concentraciones de metales pesados.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analizar la tolerancia de los aislados a altas concentraciones de metales pesados y determinar los aislados hipertolerantes a Cr, Fe y Zn.

Analizar el género al que pertenecen los aislados hipertolerantes a Cr, Fe y Zn.

Analizar la tolerancia del asilado *Bacillus cereus* MH778713 a altas concentraciones de Aluminio.

Analizar la promoción de la germinación *Bacillus cereus* MH778713 en semillas de *Prosopis laevigata* embebidas en altas concentraciones de cromo.

Analizar el perfil de producción de Compuestos volátiles orgánicos (COVs) de *Bacillus cereus* MH778713 mediante la técnica CG-EM, frente a semillas de *Prosopis laevigata* embebidas en altas concentraciones de cromo.

Analizar actividad de promoción de la germinación y crecimiento de COVs del perfil de *Bacillus cereus* MH778713 en semillas de *Prosopis laevigata* embebidas en altas concentraciones de cromo.

Analizar el efecto de *Bacillus cereus* MH778713 en la inhibición del crecimiento miceliar de *Fusarium* sp.

Analizar el perfil de producción de Compuestos volátiles orgánicos (COVs) de *Bacillus cereus* MH778713 mediante la técnica CG-EM frente a *Fusarium* sp.

Analizar el efecto de COVs de *Bacillus cereus* MH778713 en la inhibición del crecimiento miceliar de *Fusarium* sp.

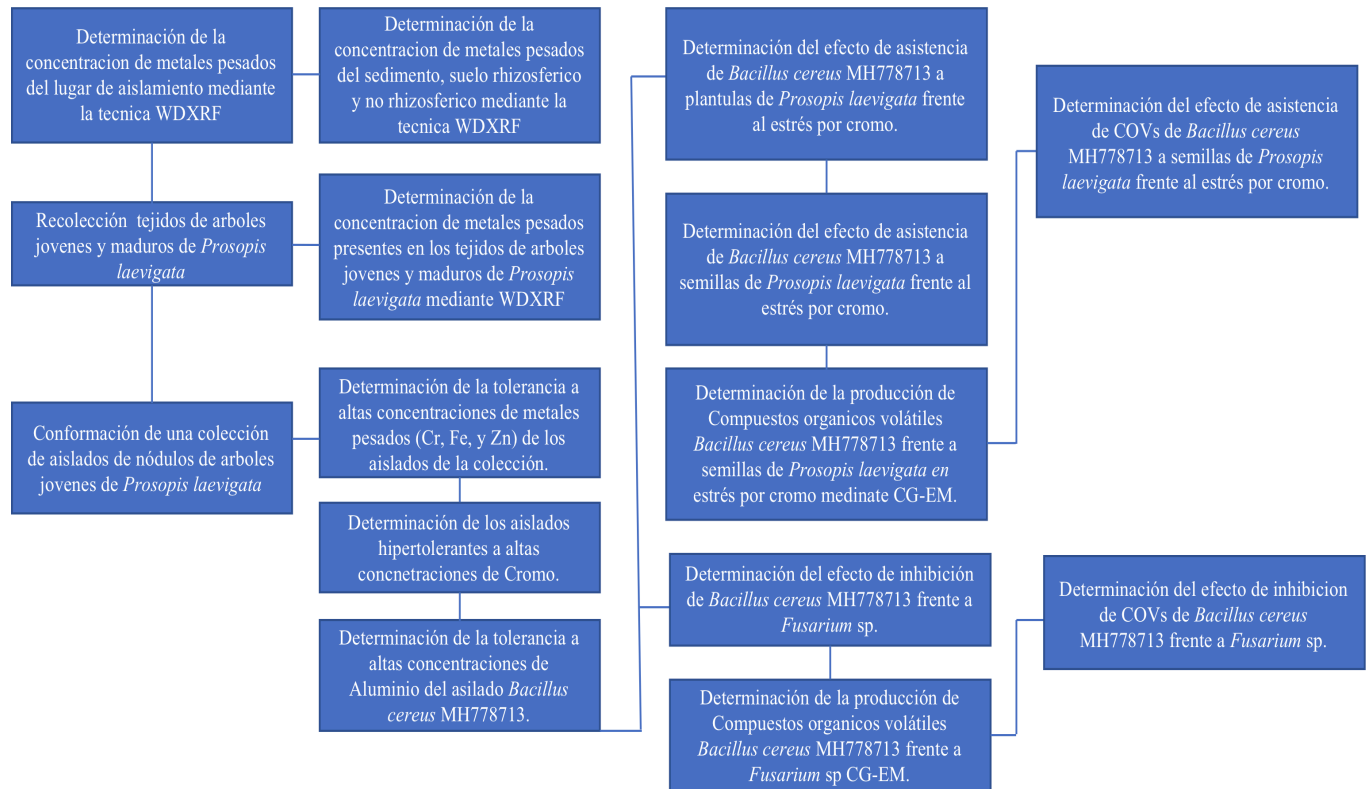
HIPOTESIS

Bacterias aisladas de una población de árboles de *Prosopis laevigata* son hipertolerantes a altas concentraciones de metales pesados y podrían tener un rol importante en la adaptación y el desarrollo de esta población de árboles en una zona contaminada con altas concentraciones de metales pesados.

JUSTIFICACIÓN

La contaminación por metales pesados es un grave problema para la salud humana a nivel mundial, el aumento en la incidencia de algunos tipos de cáncer en el mundo esta directamente relacionada con este problema, existen plantas que se han descrito como acumuladoras de altas concentraciones de metales pesados como el género *Prosopis*, las plantas de mezquite son flora nativa de 30 de los 33 estados de la Republica Mexicana, es un planta que representa un valioso recurso natural de esta zonas y es capaz de crecer y desarrollarse en altas concentraciones de metales pesados, sin embargo existe muy poca literatura acerca de los microorganismos que se encuentran en asociación a esta planta, los cuales le podrían ayudar a adaptarse y protegerse frente a las altas concentraciones de metales pesados.

ESQUEMA DE TRABAJO



“*Bacillus cereus* MH778713 hipertolerante a cromo asiste en la fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados”.

CAPÍTULO 1.

INTRODUCCIÓN

Con el rápido desarrollo de la industria y el mal manejo de los residuos, el suelo y el agua se encuentran contaminados con compuestos orgánicos y metales pesados, los cuales tienen un efecto tóxico permanente para los ecosistemas y la salud humana (Kalbitz y Wennrich, 1998; Clarent et al., 2011; Mahar et al., 2016). En las zonas áridas y semiáridas la mayor fuente de metales pesados son el uso de pesticidas para el control de plagas en las plantas, la minería y el inadecuado manejo de los residuos industriales. La vulnerabilidad de estos ecosistemas está directamente relacionada con la falta de agua (Everst, 1997), la escasez de agua característica de las zonas áridas y semiáridas hacen que estos ecosistemas sean fácilmente afectados por la presencia de elementos tóxicos. Metales pesados se le denomina a un grupo de elementos con una densidad atómica más grande de 6g/cm^3 (Álvarez et al., 2003). Estos metales incluyen al Plomo (Pb), Cadmio (Cd), Níquel (Ni), Cobalto (Co), Hierro (Fe), Zinc (Zn), Cromo (Cr), Plata (Ag), Titanio (Ti) y Cobre (Cu). El cromo es usado en el proceso de galvanizado, el curtido del cuero y el teñido textil. La concentración en los efluentes contaminados con cromo puede alcanzar entre 20000-75000 ng/mL (Goed y Govil, 2018). Las formas más estables y abundantes de cromo en la naturaleza son el cromo III y cromo VI siendo este último el más tóxico (Kotas y Satasicka, 2000).

Las técnicas convencionales de remediación del suelo como la excavación, lixiviación, extracción y lavado del suelo son técnicas inadecuadas, costosas y comúnmente involucran el almacenamiento de efluentes contaminados en áreas designadas, posponiendo más que resolviendo el problema. (Ullah et al., 2015; Wang et al., 2017). El uso de plantas para la extracción de metales (fitorremediación) es una alternativa segura costo/efectivo para remoción del exceso de metales pesados de suelo y agua (Caney et al., 1997; Glass 1999; Mulligan et al., 2001). Hay dos tipos de plantas aptas para la fitorremediación, las productoras de biomasa y las hiperacumuladoras; ambas remueven los metales pesados, por medio de la raíz y posteriormente los movilizan a las partes aéreas de las plantas. Las plantas hiperacumuladoras pueden acumular uno a más elementos inorgánicos tóxicos en cantidades hasta 100 veces superior al de otras especies que crecen bajo las mismas condiciones (Cappa y Pilon-Smit, 2014) por su capacidad

como interceptores y acumuladores de químicos, estas especies vegetales pueden ser usadas como monitores pasivos en áreas contaminadas con metales pesados (Alvarez et al., 2003; Marques et al., 2003).

Prosopis sp. comúnmente conocido como Mesquite, puede tolerar sequia, pH alcalino, temperaturas extremas y altas concentraciones de sal. El Mesquite es flora nativa en áreas con déficit hídrico, donde son un recurso económico valioso. Estos árboles producen una cantidad muy grande de biomasa de hasta 14.5 T/ha/yr en condiciones áridas (Felker et al., 1983). En diversos ensayos se ha demostrado la habilidad de *Prosopis* sp para tolerar, traslocar e hiperacumular metales pesados como Plomo (Jayaram y Prasad, 2009), Arsénico (Aldrich et al., 2003, 2007; Gardea-Torresdey et al., 2004; Mokgalaka et al., 2008), Cobre (Nivethitha et al., 2002; Zappala et al., 2014), Zinc (Nivethitha et al., 2002) y la capacidad de reducir Cromo (VI) a cromo (III) (Aldrich et al., 2003). *Prosopis juliflora*, es un árbol perene nativo de Sudamérica (Saijad et al., 2012), ha sido estudiado como posible bioindicador de la contaminación del suelo (Senthikumar et al., 2005).

Diversos microorganismos tienen una habilidad excepcional para adaptarse a ambientes contaminados por metales pesados, estos microorganismos han desarrollado la capacidad de protegerse a si mismos de la toxicidad de los metales pesados mediante mecanismos como la absorción, metilación y reducción del metal pesado en cuestión. La reducción de cromo VI a cromo III es una de las estrategias empleada por bacterias como *Acinetobacter* sp, *Pseudomonas* sp y *Bacillus* sp. (Francisco et al., 2002; Rajkumar y Nagendran, 2005; Rehman et al., 2008), estos microorganismos tienen la capacidad de remediar suelos contaminados con metales pesados (Park et al., 2011). El sinergismo entre plantas y los microorganismos asociados a la rizosfera puede ser usado para remover contaminantes tóxicos, realizando así el proceso de fitorremediación (Ashaf et al., 2017).

La interacción entre microorganismos tolerantes a metales y plantas hiperacumuladoras trabajando juntos en un ambiente natural es escasamente estudiada, en este trabajo describimos los niveles de metales pesados prevalentes en un suelo rizosférico y no rizosférico de una zona semiárida, la capacidad natural del Mesquite de hiperacumular metales pesados y los niveles de acumulación en diferentes tejidos de plantas que crecieron en una zona contaminada con metales pesados, la diversidad microbiana de bacterias tolerantes a metales pesados como Fe, Zn y Cr, la capacidad

de remoción de cromo VI que exhibe un aislado de la colección y la asistencia que podría proveer a la planta frente al estrés por metales pesados.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Sitio de muestreo.

El sitio de muestreo se encuentra sobre la subcuenca del río Nexapa en la localidad de Chietla, Puebla, México. Los suelos que se caracterizaron y las plantas de *Prosopis laevigata* que fueron caracterizadas pertenecen a esta región, los árboles jóvenes se encontraban nódulados, mientras que los árboles adultos no se encontraban nódulados; de los árboles nódulados se obtuvieron los aislados de este trabajo. Las muestras de hojas de los árboles fueron obtenidas a 2 metros de los suelos de las ramas principales del árbol, las muestras de tallo fueron obtenidas a 1.2 metros del tronco del árbol, las muestras de raíz fueron obtenidas a 50 centímetros de profundidad del suelo, mientras que las muestras de suelo rizosférico y no rizosférico fueron obtenidas a 20 cm de profundidad.

Realización de una colección de aislados de nódulos de *Prosopis laevigata*

89 aislados fueron recuperados de nódulos de *Prosopis laevigata* en agar YMA (Vincent., 1970) a 28°C durante 24 horas. Los cuales fueron analizados en su pureza y examinadas al microscopio.

Análisis de nodulación.

El análisis de nodulación se evaluó en *Macroptilium atropurpureum*, las semillas se escarificaron con H₂SO₄ al 98% durante 20 minutos y se enjuagaron 10 veces con agua destilada estéril, para su germinación se colocaron en agar agua (0.75% v/v) en cajas de Petri durante tres días. Después fueron transferidas a tubos con medio Jensen libre de nitrógeno (20 ml agar/30 ml medio) y fueron inoculadas con 1x10⁶ UFC de un aislado de la colección.

Para la inoculación de las plántulas se colocó una colonia pura de cada aislado en medio YM para realizar un cultivo o/n, las células fueron centrifugadas y lavadas con agua destilada estéril 1x10⁶ UFC fueron colocadas en cada tubo para determinar la capacidad de nodulación de cada aislado, este análisis se realizó por triplicado para cada aislado.

Tinción de Schaeffer-Fulton

La tinción de Schaeffer-Fulton se realizó para el aislado MH778713 de la colección con verde de malaquita para la observación de las endósporas (Schaeffer y Fulton. 1933).

Amplificación del gen 16S rRNA

El DNA total se extrajo de un cultivo de los aislados MH778713, MH778712, LEM1004, LEM1080, LEM1083 y LEM1085 o/n a 28°C en 15 ml de medio YM, usando el Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega, corporation, USA) usando las instrucciones de la casa comercial, el DNA fue guardado a 4°C.

La amplificación del gen 16S rRNA se realizó usando los oligonucleótidos UN27F (5'-TAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'); UN1392(5'-CAGGGCGGTGTGTACA-3') (Morales et al., 2011), en un volumen de reacción de 25µL, usando la enzima de alta fidelidad Phusion DNA polimerasa (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante, en un termociclador 2400 GeneAmp PCR System, Perkin Elmer thermocicler. Las condiciones de PCR fueron una activación a 95°C por 3 min, desnaturalización a 95°C por 30 s, alineamiento a 57°C por 1 min, primera extensión a 72°C por 70 s y una extensión a 72°C por 1 min en 26 ciclos. Los productos de amplificación fueron visualizados en el transiluminador con luz UV en un gel de electroforesis teñido con bromuro de etidio, se determinó el tamaño de los productos en 1365 pb usando el marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). Los productos fueron purificados con el kit Quick PCR Purification Kit (Quiagen Hilden, Germany). Las secuencias se obtuvieron en la unidad de servicios del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Alineamiento de la secuencias nucleotídicas.

Las secuencias obtenidas para 6 aislados fueron comparadas con otras especies del género *Bacillus* en el GenBank/EMBL/DDBJ database, *Bacillus cereus* MH778713 tiene el número de acceso MH778713.

Análisis de Espectrometría de fluorescencia de longitud de onda dispersiva (FRX)

Las muestras de vaina, hoja, tallo y raíz fueron preparadas para el análisis FRX elemental; lavando con agua destilada estéril todos los tejidos para eliminar impurezas, enjuagadas con agua tridestilada estéril y secadas a 50 °C por 15 días, después fueron incinerados 10 g de muestra y colocados a 500 °C durante 48 horas en una mufla (THERMO CIENTIFICO TERMOLINE F47954). Las muestras fueron cernidas en un tamiz para obtener partículas de ~ 63 µm, después cada muestra fue homogeneizada y se preparó un gramo de esta para formar el pellet, cada pellet

tiene 13 mm de diámetro y fue prensado a una presión de 100-110 kg/cm² en una prensa mecánica frontal (BIMEX).

La composición química de las tabletas fue analizada por Espectrometría de fluorescencia en un espectrómetro de fluorescencia de longitud de onda dispersiva, de la marca BRUKER S8 TIGGER con Rh radiación y contador de cintilación (elementos pesados). El tiempo de análisis por cada muestra fue de 20 min. Los parámetros fundamentales. La cuantificación de los elementos fue obtenida usando el software Quant exprés, usando un estándar certificado denominado STG2.

Evaluación de la tolerancia de los aislados a Cromo, Hierro, Zinc y Aluminio.

Los 89 aislados fueron evaluados en cuanto a su tolerancia a diferentes concentraciones de Cromo (10-15000 mg Kg⁻¹), Hierro (10-1500 mg Kg⁻¹), Zinc (10-300 mg Kg⁻¹) y Aluminio (1000-10000 mg Kg⁻¹), en placas de Petri con YMA adicionado con las diferentes concentraciones de metales pesados, para conocer la concentración mínima inhibitoria de cada uno de los metales, este procedimiento fue evaluado usando un estampado masivo Drop Plate, basado en diluciones seriadas del cultivo o/n, este análisis se realizó por triplicado para cada aislado y para cada metal.

Ensayos de bioabsorción

Los ensayos de bioabsorción se realizaron para la cepa *Bacillus cereus* MH778713, estos ensayos se hicieron usando diferentes concentraciones de cromo VI (55, 218, 664, 905, 998 y 1474 mg Kg⁻¹), agua tridestilada estéril y 1 g (3x 10¹³ UFC) de biomasa (*Bacillus cereus* MH778713), cada matraz se mantuvo en agitación constante durante todo el experimento a 130 rpm, la concentración residual de Cromo VI se monitoreo durante 7 horas, midiendo dicha concentración mediante la densidad óptica de la solución con la ayuda de un acomplejante (1,5 difenil carbaziba) a 540 nm en un espectrofotómetro JENWAY UV-VIS 6305 usando el método descrito por Bankar en (Bankar et al., 2009). Para determinar el aislado *Bacillus cereus* MH778713 era capaz de sobrevivir a altas concentraciones de cromo se realizó la determinación de supervivencia celular haciendo diluciones seriadas al final del experimento, de cada concentración se tomaron 100µl para determinar las UFC/g usando la ecuación descrita por Schell and Beermann (Schell y Beermann. 2014). Usando como controles negativos una solución con una concentración conocida de cromo a la cual no se le adicionó biomasa y la cual se monitoreo durante todo el experimento, usando la misma técnica.

Ensayos de tolerancia de las plantas a Cromo.

Los ensayos en plantas se hicieron utilizando plántulas de *Prosopis laevigata*, las semillas se escarificaron con H₂SO₄ al 98% durante 20 minutos y se enjuagaron 10 veces con agua destilada estéril, las semillas para su germinación se colocaron en agar agua (0.75% v/v) en cajas de Petri durante tres días, para después ser transferidas a tubos con medio Jensen libre de nitrógeno en botellas de 250 ml con medio líquido. Una colonia pura de *Bacillus cereus* MH778713 fue inoculada en medio YM en un cultivo o/n y después 1x10⁶ UFC fueron colocadas en cada botella midiendo la tolerancia de las plantas a diferentes concentraciones de cromo (0-1500 mg Kg⁻¹), este análisis se realizó por triplicado para cada aislado y para cada concentración, con un total de 20 plántulas. Las plántulas fueron incubadas a 20°C con un ciclo de 16 horas de luz x 8 horas de oscuridad por 2 meses, después de dos meses de mantenimiento de las plantas fueron medidas las longitudes de las hojas, tallos y raíces, además se determinó su peso fresco y seco.

RESULTADOS

Los análisis de rayos x- de fluorescencia de longitud de onda dispersiva son una poderosa herramienta cualitativa y cuantitativa, de análisis elemental. Los árboles en vida libre de *Prosopis laevigata* son capaces de crecer en suelos contaminados con metales pesados, en la **Tabla 1** se observan las elevadas concentraciones de elementos encontrados en el suelo del sitio de muestreo, así como los valores de los elementos encontrados en los diferentes tejidos del árbol (raíz, tallo, hojas y vaina) y los valores de referencia encontrados en la bibliografía (Kabata., 2001). Los elementos como Fe, Zn, Al, Cr y Ti fueron encontrados en altos niveles en suelo rizosférico y no rizosférico. El Al, Cr y Ti en altas concentraciones confirma que el terreno se encuentra contaminado con metales pesados. Mientras que los análisis realizados a los tejidos de árboles adultos muestra la capacidad de *Prosopis laevigata* de hiperacumular metales pesados como Al, Fe, Ti y Zn, mientras que la vaina es el tejido que muestra una muy alta concentración de estos metales, el elemento cromo no fue detectado de manera cuantitativa en ningún tejido de la planta a pesar de que en el suelo rizosférico se encontraba en una muy alta concentración de hasta 208 mg kg⁻¹ y en el suelo no-rizosférico hasta 435 mg kg⁻¹. Resultados similares fueron encontrados en árboles jóvenes de la misma zona de muestreo (**Tabla suplementaria 1**), los difractogramas de rayos x- de fluorescencia de longitud de onda dispersiva se muestran en las **figuras suplementarias 1-7**.

Tabla 1. Contenido de metales pesados en sedimento, suelo y tejidos de la arboles maduros de Mesquite. La concentración de metales pesados esta dada en mg/kg. El sedimento corresponde a las muestras del rio Nexapa, el contenido del suelo rizosferico tomado a 300 metros de el rio Nexapa, suelo no rizosferico las muestras fueron tomadas a 200 metros del rio Nexapa y el suelo rizosferico tomado de el lugar de toma de muestra. Los difractogramas se muestran en las figuras S1-S7. Los valores de referencia de los metales pesados se muestran en las columnas R plant y R soil en la tabla (Kabata y Pendias. 2010).

Elemento	Sedimento (mg/Kg)	Suelo no rizosférico (mg/Kg)	Suelo Rizosférico (mg/Kg)	Raíz (mg/Kg)	Tallo (mg/Kg)	Hoja (mg/Kg)	Vaina (mg/Kg)	R Planta (mg/Kg)	R Suelo (mg/Kg)
Al	5.29 x10 ⁴	4.43 x10 ⁴	6.18 x10 ⁴	4.1 x10 ³	-----	3.4 x10 ³	-----	1x10 ³	1x10 ⁵
Fe	4.55x10 ⁴	4.36 x10 ⁴	5.13 x10 ⁴	9.6 x10 ³	3.2 x10 ³	4.3 x10 ³	1.4 x10 ⁴	1200	500
Ti	5 x10 ³	4.9 x10 ³	5.3 x10 ³	<20	-----	<20	1.6 x10 ³	80	9x10 ³
Cr	862	435	208	<20	-----	-----	-----	0.2	50
Zn	154	108	174	638	<20	928	2.5 x10 ³	20	120
Cu	135	<20	66.9	729	-----	-----	765	1500	100
Ni	218	<20	-----	<20	-----	-----	-----	100	90
Zr	-----	<20	-----	-----	-----	-----	47.5	12	500

Los árboles de *Prosopis laevigata* son la flora dominante en este terreno contaminado con metales pesados, lo cual sugiere una capacidad de adaptación de esta planta en este ambiente hostil. *Prosopis laevigata* y sus microorganismos asociados podrían ser la respuesta de la adaptación de esta planta al estrés por metales pesados, por lo cual se decidió estudiar la biodiversidad asociada a los nódulos de árboles jóvenes de *Prosopis laevigata* y la tolerancia de estos a diferentes metales pesados, como Aluminio, Hierro, Cromo y Zinc. Se obtuvieron 88 aislados los cuales no son capaces de inducir la nodulación, pero si de fijar nitrógeno ya que las plantas inoculadas crecieron en medio libre de nitrógeno **Figura 1.**



Fig 1. Test de nodulación en *Macropitulum atropurpureum*, muestra como a pesar de que las 89 cepas no lograron hacer nodular a la planta, en un medio libre de nitrógeno estas son capaces de crecer y desarrollarse, lo cual indica que estas son capaces de llevar a cabo el proceso de fijación de nitrógeno.

La interacción de bacterias metal-tolerantes con plantas hipertolerantes a metales pesados, puede ser la clave para el desarrollo de nuevas herramientas para la fitorremediación, *Bacillus cereus* MH778713 es tolerante a altas concentraciones de metales pesados como Al, Fe, Zn y Cr **Tablas 2-4**, así como otros aislados de la colección **Tablas 2-4**. Todos los aislados son tolerantes a 300 mg/kg de Zn, mientras que *Bacillus cereus* MH778713 es tolerante a 2000 mg/kg **Tabla 2**; todos los aislados son tolerantes a 500 mg/kg de Fe, mientras que *Bacillus cereus* MH778713 es tolerante a 1000 mg/kg de Fe **Tabla 3**; toda la colección es tolerante a 1500 mg/kg de Cr, mientras que *Bacillus cereus* MH778713 es tolerante a 15000 mg/kg de Cr VI **Tabla 4**. *Bacillus cereus* MH778713 es tolerante a 1000 mg/kg de Al **Figura suplementaria 10**.

Tabla 2. Tolerancia a hierro. Los 88 aislados son tolerantes a 500 ppm de hierro, 19 aislados son tolerantes a 1000 ppm. Los valores representan las UFC en 1 ml de medio YMA.

Número de aislado	100 mg/l	200 mg/l	300 mg/l	400 mg/l	500 mg/l	750 mg/l	1000 mg/l
1001	+++	+++	+++	+++	+++	+++	3x10 ⁷
1004	+++	+++	+++	+++	+++	+++	6x10 ⁷
1005	+++	+++	+++	+++	+++	+++	3x10 ⁷
1010	+++	+++	+++	+++	+++	+++	1x10 ⁷
1012	+++	+++	+++	+++	+++	+++	5x10 ²

1013	+++	+++	+++	+++	+++	+++	1×10^7
1014	+++	+++	+++	+++	+++	+++	1×10^7
1017	+++	+++	+++	+++	+++	+++	1×10^7
1020	+++	+++	+++	+++	+++	+++	1×10^7
1022	+++	++	+++	+++	+++	+++	1×10^7
1037	+++	+++	+++	+++	+++	+++	15×10^7
1041	+++	+++	+++	+++	+++	+++	4×10^7
1083	+++	+++	+++	+++	+++	+++	19×10^7
1085	+++	+++	+++	+++	++	+++	16×10^7
1086	+++	+++	+++	+++	+++	+++	15×10^7
1088	+++	+++	+++	+++	+++	+++	3×10^3
1089	+++	+++	+++	+++	+++	+++	14×10^7

Tabla 3. Tolerancia a cromo VI, todos nuestros aislados toleran hasta 300 ppm de Zinc. Los valores representan las UFC en 1 ml medio YMA. 15 de nuestros aislados toleran hasta 2000 ppm de Zn.

Número de aislado	100 mg/l	250 mg/l	500 mg/l	1000 mg/l	1500 mg/l	2000 mg/l
1004	+++	+++	+++	6×10^9	1.2×10^7	6×10^5
1009	+++	+++	+++	6×10^9	2.4×10^7	2×10^5
1034	+++	+++	+++	1×10^9	1.2×10^9	1.4×10^5
1036	+++	+++	+++	2×10^9	2×10^9	4×10^7
1046	+++	+++	+++	1×10^9	8×10^7	6×10^5
1058	+++	+++	+++	1.8×10^9	2.2×10^9	2×10^5
1059	+++	+++	+++	4×10^9	2.4×10^9	4×10^9
1069	+++	+++	+++	1.2×10^{19}	8×10^7	2×10^5
1080	+++	+++	+++	1.6×10^9	1×10^9	1.4×10^7
1082	+++	+++	+++	1.7×10^9	4×10^7	6×10^5
1083	+++	+++	+++	1.7×10^7	6×10^8	1.6×10^7
1084	+++	+++	+++	6×10^9	6×10^7	6×10^5

1085	+++	+++	+++	1.2×10^9	1.6×10^8	3×10^7
1086	+++	+++	+++	2×10^9	1.4×10^8	1.2×10^7
1088	+++	+++	+++	1.6×10^{10}	1.8×10^9	4×10^7

Tabla 4. Los valores representan las UFC en 1 ml de medio YMA. Los 88 aislados son tolerantes a 1500 ppm. 9 de nuestros aislados toleran hasta 10,000 ppm de Cr (VI).

Aislado	10000 mg/l	10500 mg/l	11000 mg/l	11500 mg/l	12000 mg/l	13000 mg/l	14000 mg/l	15000 mg/l
1004	2×10^5	1×10^3	4×10^3	2×10^2	NG	NG		
1054	2×10^2	1×10^2	NG	NG	NG	NG		
1080	6×10^6	4×10^3	NG	NG	NG	NG		
1083	1×10^6	2×10^2	NG	NG	NG	NG		
1085	2×10^2	NG	NG	NG	NG	NG		
1088	2×10^{11}	1.5×10^{11}	1×10^{11}	1.8×10^{10}	1.4×10^{10}	1×10^{10}	1×10^{10}	8×10^9

El crecimiento de *Bacillus cereus* MH778713 se comparó con el de *Pseudomonas putida* KT2440 ya que en un análisis *in silico* se demostró la presencia de genes de relacionados con la resistencia a metales pesados en esta bacteria (Canovas et al., 2003). En medio con agar YMA adicionado con 15000 mg/kg de Cromo VI, se encontró que *Pseudomonas putida* KT2440 no es capaz de crecer en esta muy elevada concentración de cromo VI, mientras que *Bacillus cereus* MH778713 es capaz de crecer y desarrollarse hasta en una concentración de 1×10^9 UFC **Figura 2**.

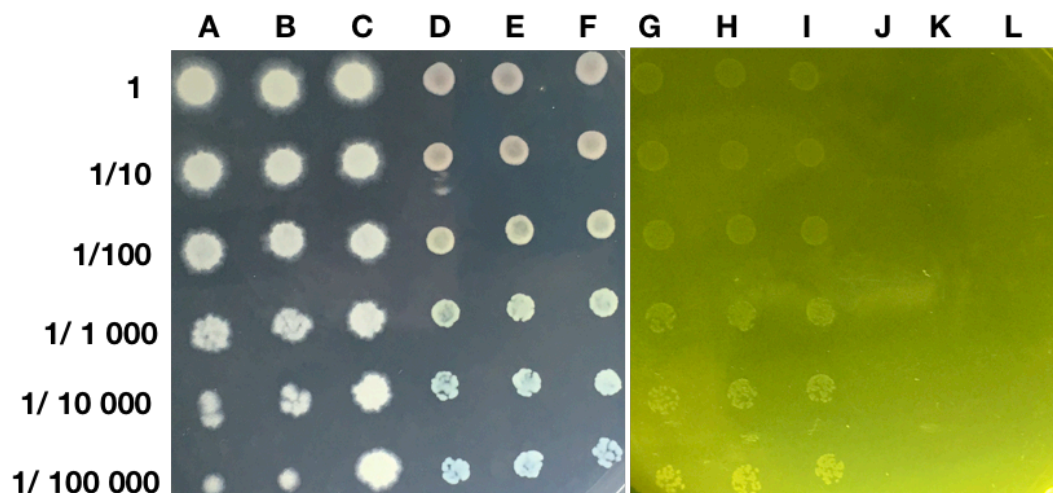


Fig 2. *Bacillus cereus* MH778713 (A, B, and C) y *Pseudomonas putida* KT2440 (D, E and F) en agar YMA sin cromo (VI). Cr (VI) tolerancia de *Bacillus cereus* MH778713 en agar YMA con 15000 mg/kg of Cr (VI) usando un estampado en placa masivo (G, H and I) comparado con *Pseudomonas putida* KT2440 (J, K, and L).

Se determinó la capacidad de absorción de cromo VI en *Bacillus cereus* MH778713 mediante el método colorimétrico de la 1,5 – Difenil carbazida, el control negativo nunca cambio su DO durante todo el experimento(el control negativo consto de un matraz con una concentración conocida de cromo, el cual no contenía biomasa y que fue colocado bajo las mismas condiciones del experimento y su DO fue monitoreada durante 7 horas), la determinación de la concentración absorbida de cromo se muestra en la **Figuras suplementarias 9 a, b y c**. La determinación de la concentración bioabsorbida en el equilibrio se muestra en la **Figura 4**, en la cual se muestra la isoterma de tipo Lagmuir con una $R^2 = 0.99$ lo cual demuestra que se ajusta perfectamente, con una capacidad de absorción de (As)116 mg de Cr VI/g de célula. La supervivencia de las células después de 7 horas exposición a cromo VI fue de un 85% (3×10^{11} UFC) **Figura suplementaria S8**, en todas las concentraciones *Bacillus cereus* MH778713 fue capaz de absorber más del 65% del cromo a las diferentes concentraciones a las que se expuso, con un máximo de absorción de un 95% a la concentración de 218 mg/L **Figura 5 y Figura suplementaria S9**.

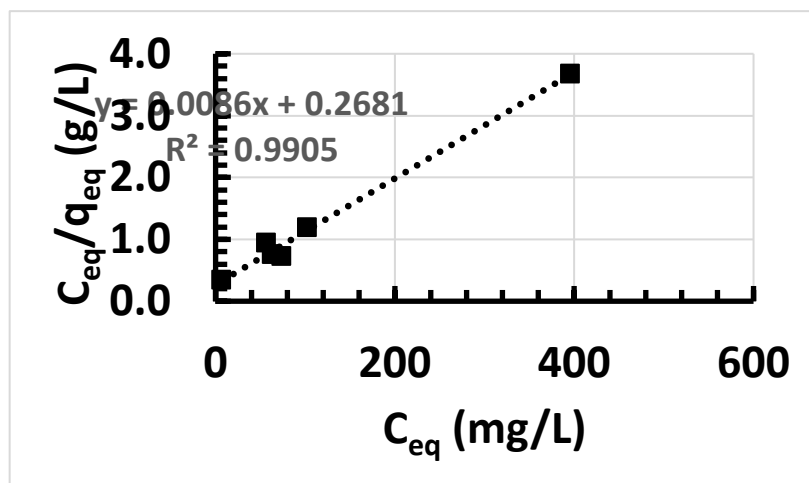


Fig 3. Remoción de cromo (VI) con *Bacillus* sp. MH778713 usando el método de determinación de cromo hexavalente en agua con 1,5-Diphenyl carbazida 37°C, 130 rpm y durante 420 min. El ensayo de bioabsorción es representado mediante la isoterma del tipo Lagmuir el cual muestra una $As = 116$ mg/g de biomasa.

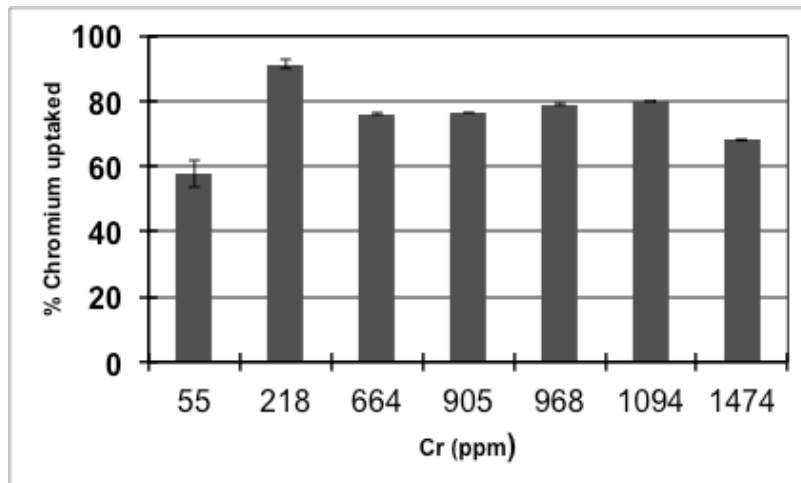


Fig 4. Representa el porcentaje de cromo captado por el aislado *Bacillus cereus* MH778713 en un medio acuoso y expuesto a diferentes concentraciones de cromo VI. La concentración en donde se presentó la mejor remoción de cromo VI fue de 91%, la tabla representa la diferencia entre tres mediciones diferentes.

La capacidad de fijación de nitrógeno se realizó *in vitro* en plantas de *Prosopis laevigata* no inoculadas e inoculadas con *Bacillus cereus* MH778713, expuestas a 0,10 y 25 mg/L de cromo VI, las plantas que no fueron inoculadas con *Bacillus cereus* MH778713 no se desarrollaron después de tres días en exposición a cromo VI, mientras que aquellas que no fueron inoculadas pero no se expusieron a Cr VI murieron al estar en medio Jensen's libre de nitrógeno, las plantas que fueron inoculadas con *Bacillus cereus* MH778713 y se expusieron a cromo VI sobrevivieron y pudieron desarrollar hojas verdaderas, aquellas que no se expusieron a Cr VI pero fueron inoculadas también sobrevivieron y se desarrollaron mejor que las expuestas a Cr VI, el tamaño y el peso de las plantas inoculadas versus las no inoculadas fue mayor, como se puede observar en la **Figura 6 y 7**.

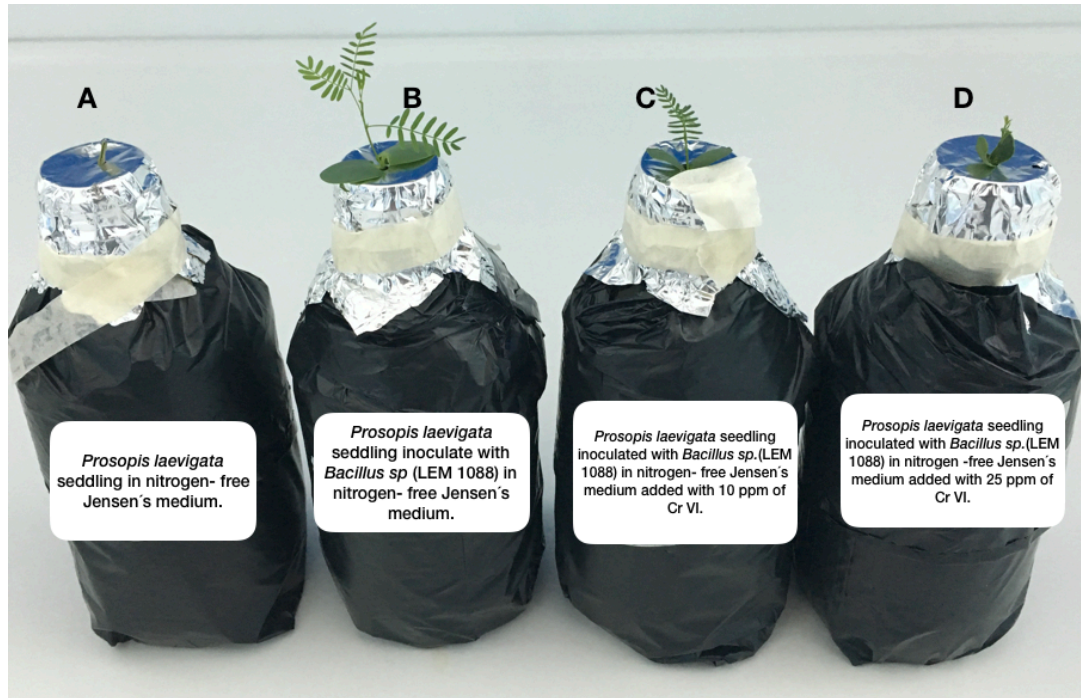


Fig 5. Ensayo de tolerancia de plántulas de *Prosopis laevigata* inoculadas con *Bacillus cereus* MH778713 crecido en medio hidropónico. A) Plántulas no inoculadas en medio Jensen's libre de nitrógeno como control negativo, B) Plántulas inoculadas con *Bacillus cereus* MH778713 en medio Jensen's libre de nitrógeno, C) Plántulas inoculadas con *Bacillus cereus* MH778713 en medio Jensen's libre de nitrógeno y expuestas a 10 mg/kg de cromo VI, D) Plántulas inoculadas con *Bacillus cereus* MH778713 en medio Jensen's libre de nitrógeno y expuestas a 25 mg/kg de cromo VI. Esta es una figura representativa de 20 plantas diferentes por cada tratamiento.

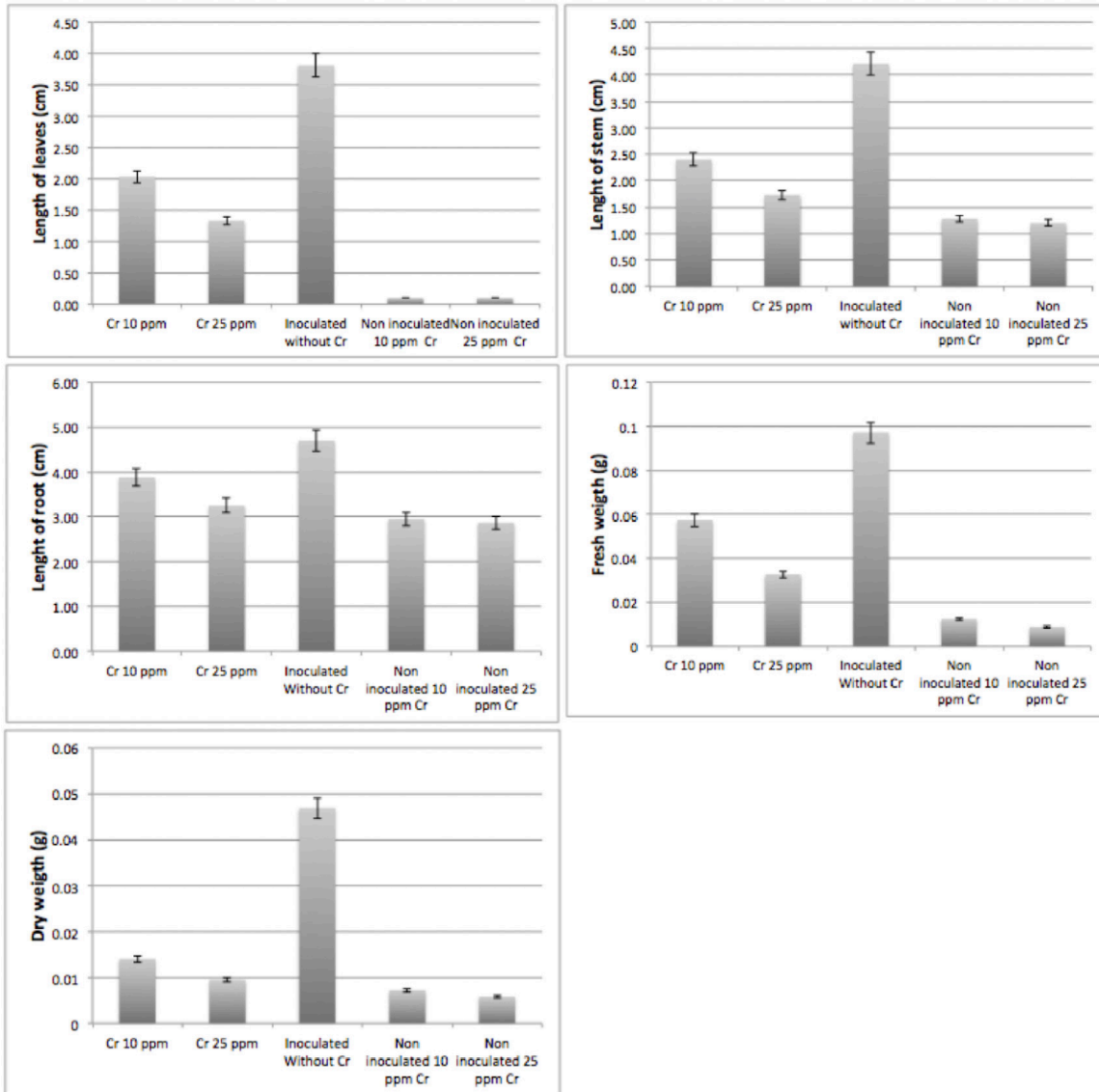


Fig 6. Parámetros de crecimiento de las plántulas inoculadas y no inoculadas con *Bacillus cereus* MH778713 y 0,10,25 mg/kg de cromo VI en medio Jensen´s libre de nitrógeno. Las barras de error muestran la diferencia entre 12 plantas las cuales fueron medidas durante 2 meses de tratamiento.

DISCUSIÓN

El análisis de WDXRF indica que los suelos muestreados contienen una considerable concentración de metales pesados como aluminio, hierro, titanio, zinc, cobre y cromo (Tabla 2). El aluminio es considerado un metal tóxico en concentraciones de 4.5×10^3 - 1×10^5 mg/kg, en altas concentraciones el aluminio (Al), en plantas expuestas a este metal se producen cambios en la división celular, en la nutrición y clorosis (Nilson y Bergkvist., 1983; Taylos et al., 1998). El contenido normal de aluminio en las plantas es de 1×10^3 mg/kg (Slaski. 1994). *Prosopis laevigata* acumula 3.8×10^3 mg/kg of Al en hojas y 4.1×10^4 mg/kg en raíz (Tabla 2). Lo cual indica la capacidad de hiperacumulación por parte de la planta, la acumulación no se lleva a cabo en el tallo, esta discrepancia se puede deber a diferencias en la tasa de transpiración de los órganos de la planta lo cual afecta la distribución del aluminio en los tejidos de la planta (Sheen y Ma. 2001), las altas de concentraciones aluminio en las raíces y las hojas forman un complejo no fitotóxico, Al-oxalato el cual puede acumularse en estos órganos (Sheen y Ma., 2001). Cuando el complejo aluminio oxalato es traslocado de raíces a hojas, el aluminio -oxalato es convertido en un nuevo complejo aluminio-citrato el cual es transportado a xilema con bajas concentraciones es probablemente indetectable por métodos analíticos (Sheen y Ma., 2001).

El hierro es el mayor componente de la litosfera (Kabata y Pendias., 2010). Los niveles de hierro en suelos son de 30-550 mg/kg (Wuana y Okieimen., 2011), la concentración común encontrada en plantas es de 220-1200 mg/kg (Kabata y Pendías., 2010). Nosotros encontramos 51300 mg/kg en suelo rizosférico y 9000 mg/kg en raíz, 4800 mg/kg en hojas y 3200 mg/kg en el tallo de *Prosopis laevigata* excediendo por mucho las concentraciones encontradas en otras plantas por lo tanto queda en evidencia la capacidad de acumulación de Hierro de *Prosopis laevigata*.

El titanio se encuentra en los suelos en concentraciones de 1000-9000 mg/kg (Kiser et al., 2009). Este elemento participa en la fijación de nitrógeno en microorganismos como *Anabaena variabilis* (Cherchi y Gu., 2010) y estimula el crecimiento de Rizobia en concentraciones de nano gramos (Simon et al. 1990). La concentración típica de titanio en plantas va desde 0.15 a 80 mg/kg, en altas concentraciones el titanio produce clorosis y puntos necróticos en las hojas (Wallace et al., 1977). La concentración de titanio en el suelo que fue examinada y tiene una concentración de 5300 mg/kg lo cual se encuentra en el rango de concentración reportado para suelos, el titanio se encontró en altas concentraciones en las hojas de árboles adultos de *Prosopis laevigata* lo cual demuestra que es un buen acumulador de Titanio.

La concentración normal de Zinc en plantas es de 10-20 mg/kg, otras plantas como *Solarum nigrum* puede acumular altas concentraciones de Zinc en raíz, tallo y hojas (Marques et al. 2006). Las plantas de *Prosopis laevigata* sobrepasan la concentración de zinc que puede acumular *Solarum nigrum*, lo cual muestra su capacidad para tolerar altas concentraciones zinc y de acumular en sus tejidos este metal.

En suelos la concentración típica de cromo VI es de 5-120 mg/kg (Kabata y Pendías. 2010). En la mayoría de las plantas las concentraciones de cromo son de 0.002-0.2 mg/kg. *In vitro* de *Prosopis* sp. en asociación con *Glomus deserticola* crece a 80-160 mg /Kg de Cromo VI, lo cual muestra una hiperacumulación de cromo VI de hasta 1000 mg/kg. En el suelo que muestreamos existen concentraciones de 435 y 208 mg/kg, mientras que en los tejidos de la planta no se muestran concentraciones detectables de cromo a pesar de la sensibilidad del equipo de hasta (1mg/kg), lo cual nos llevó a investigar si organismos endófitos pudiesen jugar un papel en la detoxificación del suelo.

Se conformo una colección de 88 aislados bacterianos de nódulos de *Prosopis laevigata*, seis de ellos son cromo-tolerantes resistiendo de 10000 a 15000 mg/kg de cromo VI, siendo el aislado MH778713 el más tolerante. Los organismos hipertolerantes a cromo reportados en la bibliografía son *Streptomyces* sp. CG52 que es capaz de tolerar 500 mg/kg de cromo VI, *Stafilococcus aureus* y *Pediococcus pentosae* 2000 mg/kg 88, 89 (Quintelas et al., 2008). Comparado con *P. pentosae*, el aislado MH778713 puede tolerar hasta 7.5 veces más cromo. Los seis aislados hipertolerantes a cromo VI pertenecen al género *Bacillus*. Bacterias del género *Bacillus* se han aislado de una gran variedad de plantas como endófitos incluyendo leguminosas como *Medicago polymorfa* (Chinsaswany et al., 2018), *Glycine max* (Hong et al., 2007), *Cajanus cajan* (Rajendran et al., 2007) y algunas especies de Mesquite. Las bacterias pertenecen al género *Bacillus* y fueron aislados de la endosfera, la rizosfera y nódulos de *Prosopis juliflora* y *Prosopis facta* (Khan et al., 2014; Abdelmoteled et al., 2017; Ftterich., 2011), los aislados de *Bacillus* no son capaces de nodular plantas de *Macroptilium artropurpureum*.

Los ensayos de bioabsorción de cromo VI fueron realizados usando al aislado MH778713 el cual es el más tolerante de la colección, los resultados mostraron la remoción de 1116 mg/kg de cromo VI por la biomasa cuando las células se encuentran expuestas a una concentración de 1474 mg/L de cromo VI *Bacillus circulans* y *Bacillus megaterium* pueden bioacumular 34.5 y 32.0 mg de cromo VI /g en peso seco (Canovas et al.,2003). Una mezcla bacteriana de *Pseudomonas*

aeruginosa y *Bacillus subtilis* muestra una absorción de 1.44 mg Cr (VI)/g por parte de la biomasa en una solución acuosa (10 mg/kg) (Quintelas et al., 2008). Comparado con otras especies de *Bacillus*, *Bacillus cereus* MH778713 muestra una eficiencia superior en la bioabsorción de cromo VI.

La habilidad del género *Bacillus* para producir compuestos asociados con un incremento en la talla y el tamaño en las plantas está bien documentado, por ejemplo ácido indol acético (Sethuraman y Balasubramanian. 2010). *Bacillus cereus* MH778713, es probablemente una bacteria endofítica, la cual podría producir sustancias que promueven el crecimiento vegetal o sistemas que neutralizan el efecto negativo de cromo VI como sistemas de eflujo de cromo VI, la reducción de cromo VI a cromo III, la activación de enzimas envueltas en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno y la reparación del ADN producida por los ROS (Bitas et al., 2013; Viti et al., 2014). Todos estos procesos podrían estar envueltos en la asistencia que le provee *Bacillus cereus* MH778713 al Mesquite.

CONCLUSIÓN

En este estudio *Prosopis laevigata* flora nativa de ecosistemas con déficit hídrico, mostró la capacidad de hiperacumular metales pesados como Al, Fe, Ti y Zn, en asociación con bacterias pertenecientes al género *Bacillus*. El aislado *Bacillus cereus* MH778713 muestra una alta capacidad de remover cromo VI de medio acuoso, lo cual podría beneficiar el crecimiento de las plantas en suelos contaminados con metales pesados. Futuros trabajos se podrían centrar en la búsqueda de los mecanismos que tiene *Bacillus cereus* MH778713 para promover el crecimiento vegetal cuando la planta está sometida a estrés por cromo VI.

“Alcanos de cadena larga (C21, C24 Y C31) producidos por *Bacillus cereus* MH778713 asisten en la ruptura de la dormancia a semillas de mezquite expuestas a estrés por cromo”.

CAPÍTULO 2

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos de la rizosfera juegan un papel importante en la ecología de las plantas proveyendo las condiciones necesarias para su crecimiento y desarrollo (Vacheron et al., 2013; Liu y Zhang., 2015). Estas bacterias se encuentran íntimamente relacionadas con las plantas jugando un rol importante en procesos como patogénesis, defensa y adaptación al estrés ambiental (Bitas et al., 2013). Las bacterias de la rizosfera son capaces de promover el crecimiento vegetal mediante varias vías como la quelación de hierro (Valencia-Cantero et al., 2007), la síntesis de compuestos muy importantes como AIA, ABA y citoquininas (Idris et al., 2007; Arkhipova et al., 2005). Algunas bacterias PGPR son capaces de producir compuestos orgánicos volátiles (COVs) que ayudan en el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Los compuestos orgánicos volátiles son compuestos lipofílicos, los cuales poseen un potencial como compuestos bioactivos, entre ellos encontramos terpenoides, fenilpropanoides, ácidos grasos y sus derivados, algunos de ellos en conjunto pueden exhibir una actividad antimicrobiana (Elshafie et al., 2013). Los compuestos orgánicos volátiles (COVs) producidos por bacterias PGPR se han reportado como mediadores de una cascada de señalización importante para las plantas, entre ellos se pueden nombrar algunos ácidos orgánicos los cuales desempeñan un papel en la adquisición de minerales importantes como el fósforo y la quelación de metales pesados (Bonfante y Anca 2009).

Bacterias del género *Bacillus* como *Bacillus amyloliquefaciens* mediante la producción de COVs es capaz de producir un efecto estimulador del crecimiento, un aumento de la biomasa y protector del estrés causado por cloruro de sodio en *Arabidopsis thaliana* (Zhu., 2001). La co-cultivación de esta misma planta con otros microorganismos como *Erwinia carotova* induce una resistencia inducida con la aplicación de estos compuestos volátiles como lo es el 2,3-butanediol (Ryu et al., 2004). La tolerancia al estrés salino de *A. thaliana* usando a *Bacillus subtilis* como productor de compuestos orgánicos volátiles también se ha demostrado (Zhang et al., 2008). Aislados del género *Bacillus* pueden sintetizar compuestos orgánicos volátiles de cadena larga como el Hexadecano de

Paenibacillus lo cual provee a la planta de resistencia contra estrés biotrófico y necrofítico (Bee et al., 2013). *Bacillus* COVs se han usado para el control de nematodos como el 2- Undecanona, 2- Octanol, ciclohexene y decanal (Li et al., 2012).

La dormancia de la semilla es un importante componente del “fitness” de la planta, lo cual causa una disminución en la tasa de germinación, hasta que en el medio ambiente se encuentren las condiciones favorables para que se lleve a cabo la misma, la dormancia de la semilla es un causada por un conjunto factores genéticos que se encuentran influenciados por el medio ambiente (Graeber et al., 2012). El cromo VI es tóxico para las plantas de interés agrícola en niveles de 5-100 mg/Kg en el suelo (Hosser., 1996), en las plantas en condiciones normales la concentración es de 5-100 µg/kg (Mortvedt y Giordano., 1975). La exposición a bajas concentraciones de cromo VI (2.5-300 mg/L) en semillas de *Cucumis melo* limita la tasa de germinación, el índice de germinación, el tiempo de germinación y los niveles de germinación (Akinci et al., 2010).

Cuando se produce en las plantas un estrés por altas concentraciones de cromo en el ambiente, se lleva a cabo la producción de enzimas antioxidantes como monooxigenasas, fitoquelatinas, glutamil sintasas y todo un sistema antioxidante que les provee a las plantas de tolerancia contra el estrés por cromo (Graeber et al., 2012). Las plantas pueden sobreponerse a los efectos tóxicos del cromo mediante la adición de una hormona como 28-homobrasinilida (28-HBL) la cual es una hormona perteneciente a los brasinoesteroides (Sharma et al., 2011). Moléculas como los Brassinosteroids (BRs), representan una clase de hormonas de las plantas, las cuales se encuentran involucradas en el metabolismo celular de estas; Los brasinoesteoides (BRs) son compuestos capaces de sufrir cambios o adaptaciones estructurales que les confieren una mayor actividad y función en las células de las plantas. Los Brs son los análogos de los esteroides del reino animal pero adaptados a las plantas, estas hormonas se clasifican de acuerdo a su número de carbonos en C₂₇, C₂₈ o C₂₉.

Las plantas pueden captar del medio ambiente hidrocarburos como el isopreno de emisiones antropogénicas y biogénicas, en la planta el isopreno es oxidado y la concentración en la atmósfera y biosfera es reducida notablemente (Jardine et al., 2011). Los organismos pueden metabolizar alcanos mediante la oxidación por una enzima denominada alcano hidroxilasa y mediante el citocromo p450 la cual cataliza la oxidación en la parte media de la cadena del alcano a oxidarse (Austin et al., 2013). Los alcanos pueden ser oxidados para formar otros compuestos con una mayor actividad biológica como alcoholes, alquenos, aldehídos, ácidos carboxílicos y sus

derivados. La oxidación de alcanos es selectiva y puede clasificarse en tres tipos básicamente: La catálisis heterogénea a altas temperaturas, catálisis enzimática o biomimetic catálisis y la activación órgano metálica. En los organismos vivos la oxidación por alcanos se lleva a cabo mediante la catálisis biológica y la activación órgano metálica (Labinger., 2004). La catálisis enzimática es una forma de oxidación de alcanos selectiva que se lleva a cabo mediante la acción de metaloenzimas en condiciones aerobias y a condiciones ambientales (25 °C y una atmosfera de presión) (Lawrence y Tolman., 2008). En perfil de *Bacillus cereus* MH778713 se muestra la producción de compuestos orgánicos volátiles en su mayoría alcanos. Para determinar el perfil de producción de COVs usamos la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-SM), es una técnica de alta precisión que nos permite evaluar distintos componentes de una mezcla, en este caso de compuestos orgánicos volátiles presentes en una placa bipartida en la cual se encuentra un cultivo bacteriano. Esta técnica posee dos grandes ventajas, la primera es la capacidad de separar una muestra y todos sus constituyentes en una columna capilar, con lo cual se obtiene la estructura y la huella molecular de cualquier molécula, lo cual brindará una mayor precisión y exactitud en la identificación de los compuestos o moléculas que componen a la mezcla. La sensibilidad de la técnica es de concentraciones menores a 1 mg L⁻¹(Sushma et al., 2016; Bihana et al., 2018).

Bacillus cereus MH77813 puede sintetizar compuestos orgánicos volátiles como alcoholes, alcanos, alquenos, éteres, ésteres, cetonas, amidas y compuestos que contienen azufre, estos compuestos se encuentran presentes en todas las condiciones de co-cultivación of *Bacillus cereus* MH778713.

Los compuestos encontrados en mayor abundancia fueron 3,7-dimetil decane; Tetratriacontane, Heneicosane, 2,4-Di tertbutilfenol; Hexadecane; Eicosane; Hentriacontane; Heptacosane; Octacosane; Tetracosane. De los cuales cuatro de ellos fueron analizados en su capacidad para promover la ruptura de la dormancia de semillas de *Prosopis laevigata* y *Arabidopsis thaliana* expuestas a altos niveles de cromo VI y su capacidad de promoción del crecimiento en plántulas de *Prosopis laevigata*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Determinación de la concentración mínima inhibitoria de la germinación de semillas de *Prosopis laevigata*

La dosis mínima inhibitoria de la germinación se llevó a cabo mediante la exposición de estas a diferentes concentraciones de Cromo VI (0-2500 mg Kg⁻¹), las semillas fueron escarificadas y expuestas a diferentes concentraciones de cromo en cajas de Petri, a cada caja se le adicionó agar agua (75% v/v) y una concentración conocida de Cromo VI, cada concentración se evaluó tres veces y por quintuplicado cada vez.

Determinación de la promoción del germinación en semillas de *Arabidopsis thaliana* expuestas a 100 mg kg⁻¹ de *Bacillus cereus* MH778713

La dosis mínima inhibitoria de la germinación de las semillas de *Arabidopsis thaliana* se llevó a cabo mediante la exposición de estas a diferentes concentraciones de Cromo VI (0-100 mg Kg⁻¹), las semillas fueron escarificadas y expuestas a diferentes concentraciones de cromo en cajas de Petri, a cada caja se le adicionó agar agua (75% v/v) y una concentración conocida de Cromo VI, cada concentración se evaluó tres veces y por quintuplicado.

En cajas Petri con una división para evitar el contacto físico entre la semilla y la bacteria, en una de las divisiones se colocaron 25 ml de agar YMA para incubar a *Bacillus cereus* MH778713, en otra división de la placa de Petri se colocó agar agua (75% v/v) al cual se le adicionó una concentración de 100 mg Kg⁻¹ de Cromo VI, tres semillas escarificadas de *Arabidopsis thaliana* por caja en la fracción que corresponde al agar agua y 100 mg Kg⁻¹ de Cromo VI, en el agar YMA se colocaron 10 µl (1x 10¹⁰ UFC) de *Bacillus cereus* MH778713 y se inoculó por estría masiva, las cajas fueron incubadas a 28°C por 72 h para observar la geminación, se uso como control negativo cajas inoculadas con *E. coli* BL21 DE3 y cajas no inoculadas. Cada ensayo se hizo por triplicado con cinco cajas por cada repetición.

Determinación de la expresión de compuestos orgánicos volátiles por *Bacillus cereus* MH778713 que promueven la germinación.

En cajas Petri con una división para evitar el contacto físico entre la semilla y la bacteria, en una de las divisiones se colocaron 25 ml de agar YMA para incubar a *Bacillus cereus* MH778713, en otra división de la placa de Petri se colocó agar agua (75% v/v) al cual se le adicionó una concentración de 2500 mg Kg⁻¹ de Cromo VI, una semilla escarificada se colocó por caja, en la

fracción que corresponde al agar agua con 2500 mg Kg⁻¹ de Cromo VI, en el agar YMA se colocaron 10 µl (1x 10¹⁰ UFC) de *Bacillus cereus* MH778713 y se inoculó por estría masiva, las cajas fueron incubadas a 28°C por 72 h para observar la geminación, se uso como control negativo cajas inoculadas con *E. coli* BL21 DE3 y cajas no inoculadas. Cada ensayo se hizo por triplicado con cinco cajas por cada repetición.

Análisis de Cromatografía de gases/Espectrometría de masas

Las semillas de *Prosopis laevigata* fueron escarificadas y colocadas en cajas con una división en co- cultivación con *Bacillus cereus* MH778713, para el análisis de cromatografía de gases masas se colocaron 3 ml de benceno en cada caja y estas se agitaron concéntricamente, se retiró el sobrenadante, mismo se colocó en tubos de 1.5 ml estériles que se centrifugaron a 12000 g por 5 min a temperatura ambiente, el sobrenadante se transfirió a otro tubo de 1.5 ml y se llevó a analizar. Los controles negativos constan de muestras que se mantuvieron en co-cultivación con *E. coli* BL21 DE3. Cada ensayo se hizo por triplicado con cinco cajas por cada repetición.

Para la realización del análisis de cromatografía y espectrometría de masas se colocaron las muestras en un cromatógrafo de gases 7820^a Agilent. 1 µl de muestra fue tomada con el inyector automatizado Agilent G4513A. Cada muestra fue analizada durante 25 minutos, con una temperatura inicial de 40°C por 5 min, seguido de una rampa de 15°C/min a 240 °C y se mantuvo por 6.667 min, el espectrómetro de masas opera a 70 eV con una fuente de temperatura de 220°C, con un escáner continuo de 50-500 m/z. La base de datos con la que opera este espectrómetro es la NIST08. L. Los controles negativos constan del solvente solo y controles con *E. coli* BL21 DE3. Los compuestos encontrados en el solvente y en *E. coli* BL21 DE3 fueron retirados de las tablas de resultados.

Determinación de la promoción de la germinación de los compuestos 2,4 Diterbutilfenol, Heneicosane, Hentriacontane y Tetracosane.

La co-cultivación de *Prosopis laevigata*- *Bacillus cereus* MH778713 se realizó como control positivo para la promoción de la germinación, en placas bipartidas con agar agua adicionado con 2500 mg kg⁻¹ de Cromo VI, además que se realizarón ensayos con 50 y 500 µg de los diferentes VOCS encontrados en los perfiles de producción de VOCS de *Bacillus cereus* MH778713, se utilizarón al 2,4 diterbutilfenol, heneicosane, hentriacontane y tetracosane. Todos los reactivos fueron disueltos en benceno. En este experimento se usaron como control negativo cajas

inoculadas con *E. coli* BL21 DE3, cajas sin inocular y algunas semillas fueron expuestas solo al benceno sin ningún compuesto (**Figura suplementaria 1**). Este análisis se realizó por triplicado con cinco semillas de cada una de las condiciones anteriormente descritas.

Determinación de la promoción de la germinación de los compuestos 2,4 Diterbutilfenol, Heneicosane, Hentriacontane y Tetracosane.

La co-cultivación de *Prosopis laevigata*- *Bacillus cereus* MH778713 se realizó como un control positivo para la promoción de la germinación, en placas con agar agua adicionado con 2500 mg kg⁻¹ de Cromo VI, además que se realizaron ensayos con los diferentes VOCS encontrados en los perfiles de producción de VOCS de *Bacillus cereus* MH778713, se utilizaron 5 y 500 µg de 2,4 diterbutilfenol, heneicosane, hentriacontane y tetracosane. Todos los reactivos fueron disueltos en benceno. En este experimento se usaron como control negativo semillas en co-cultivación con *E. coli* BL21 DE3 y semillas que fueron expuestas solo al benceno sin ningún compuesto. Este análisis se realizó por triplicado con cinco semillas de cada una de las condiciones anteriormente descritas.

RESULTADOS

VOCS emitidos por *Bacillus cereus* MH778713 induce la ruptura de la dormancia de la semilla

El cromo es altamente tóxico para las plantas y dañino para su crecimiento y desarrollo. La determinación de la concentración inhibitoria de la germinación de *Prosopis laevigata* y de *Arabidopsis thaliana* fue realizada en placas con agar agua y la concentración inhibitoria fue de 100-2500 mg L⁻¹ de K₂CrO₄ respectivamente en los ensayos de germinación, confirmando el efecto fitotóxico que ejerce el cromo sobre las semillas de *Prosopis laevigata* y de *Arabidopsis thaliana* evitando la germinación de estas. *Bacillus cereus* MH778713 tiene la capacidad de producir compuestos orgánicos volátiles (COVs) y asistir a la germinación de semillas expuestas a elevadas concentraciones de cromo VI; La co-cultivación de las semillas de ambas plantas en ensayos hechos por separado muestran que los compuestos orgánicos volátiles producidos por *Bacillus cereus* MH778713 tienen un efecto en la semilla de ayudarla a sobreponerse al estrés por cromo. Dos tipos de agar fueron usados en cada caja bipartida en donde se realizaron los ensayos en un lado de la caja de Petri se colocó agar YMA y en el otro lado agar agua con una concentración

de 2500 mgL^{-1} de cromo VI, este agar se tiñe de color amarillo fluorescente por la alta concentración de cromo presente en el medio, como se muestra en las figuras (1a, b y c). Las cajas bipartidas evitan todo contacto físico entre la bacteria y las semillas o la difusión de metabolitos no volátiles a través del medio. Sin ninguna estimulación *Bacillus cereus* MH778713 COVs muestran un efecto visible en la ruptura de la dormancia de la semilla, por lo tanto le atribuimos esta actividad directa a los compuestos procedentes de la bacteria y que se transportan vía aérea en el ensayo. Los resultados muestran que la presencia *Bacillus cereus* MH778713 en Cr-agar tiene un efecto directo en las semillas, las cuales son capaces de germinar y desarrollarse después de 72 horas de ensayo (Fig. 1c), en comparación con los controles negativos que no son capaces de germinar después de 72 horas (Figura 1a). Resultados similares fueron observados en semillas de *Arabidopsis thaliana* (Figura 1d y f), lo cual sugiere que *Bacillus cereus* MH778713 produce COVs que promueven la germinación y el desarrollo de la plántula pese a la presencia de cromo en el medio. *Escherichia coli* BL21 (DE3) es capaz de producir COVs, sin embargo estos compuestos no son capaces de inducir la germinación de las semillas de *Prosopis laevigata* y de *Arabidopsis thaliana*, esta cepa fue usada como un segundo control negativo (Figura 1b y e). Estos resultados muestran que *Bacillus cereus* MH778713 COVs podrían tener un efecto directo en la ruptura de la dormancia de la semilla y el desarrollo de esta al estadio de plántula.

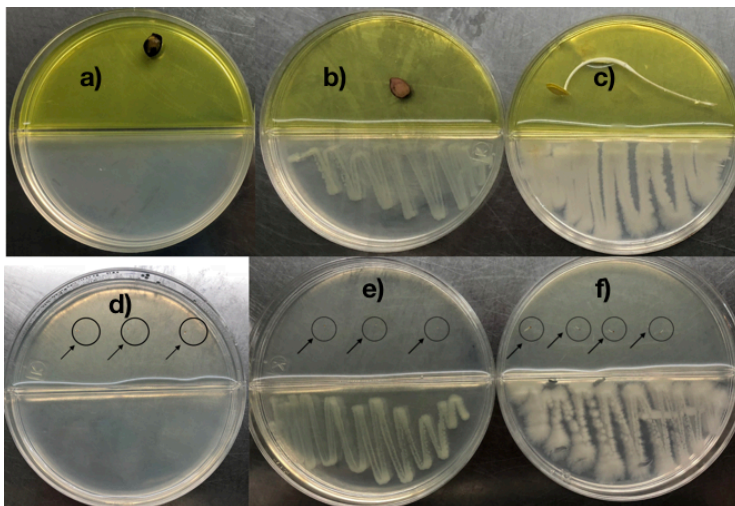


Fig 1. Co-cultivación of *Bacillus cereus* MH778713 y *Prosopis laevigata*/*Arabidopsis thaliana* en cajas bipartidas, incubadas en oscuridad a 28°C , durante 72 horas para su germinación en agar agua el cual contiene una concentración de 2500 mg L^{-1} of Cr (VI), las cuales estuvieron expuestas a *Escherichia coli* BL21 (DE3) como control negativo (b), *Bacillus cereus* MH778713 (c) o sin ningún compuesto o cepa (a). De la misma manera las semillas de *Arabidopsis thaliana* fueron

expuestas por 72 horas en cajas bipartidas, incubadas en oscuridad a 28°C, para su germinación en agar agua el cual contiene una concentración de 2500 mg L⁻¹ of Cr (VI) las cuales estuvieron expuestas a *Escherichia coli* BL21 (DE3) como control negativo (b), *Bacillus cereus* MH778713 (c) o sin ningún compuesto o cepa (a). cada experimento fue hecho por quintuplicado en tres experimentos diferentes.

Alcanos de larga cadena y el 2,4- diterbutilfenol son los compuestos más abundantes compuestos volátiles producidos por *Bacillus cereus* MH778713

Para determinar los compuestos volátiles emitidos por *Bacillus cereus* MH778713, las muestras se tomaron a las 24 y 48 horas, usando como solvente benceno para extraer los compuestos producidos por la bacteria como se muestra en la figura 1c y determinar el perfil de producción de COVs mediante el análisis CG-EM. La naturaleza de los compuestos producidos por *Bacillus cereus* MH778713 incluye alcoholes, alcanos, alquenos, éteres, ésteres, cetonas, amida y compuestos que contienen azufre (Figura 2). Un total de 33 compuestos fueron identificados, 23 de ellos solo se encuentran presentes a las 24 horas y 10 están presentes a las 24 y 48 horas. Los compuestos más abundantes producidos a 48 h de cultivo fueron tetratriacontane, 2,4-ditertbutilfenol, hexadecane, eicosane, hentriacontane, heneicosane, heptacosane, octacosane y tetracosane.

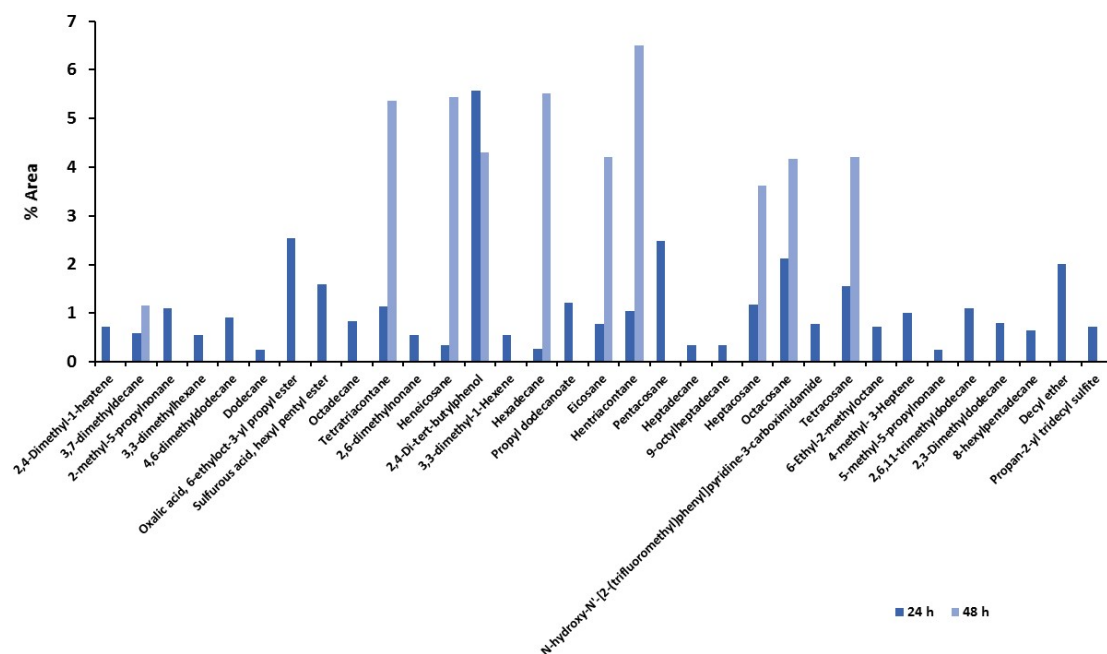


Fig 2. Perfil de los compuestos producidos por *Bacillus cereus* MH778713 detectados mediante el análisis de GC-MS después de 24 y 48 h de incubación.

Heneicosane, 2,4-ditertbutilfenol, hentriacontane y tetracosane pueden romper la dormancia de semillas de *Prosopis laevigata*.

Los compuestos Heneicosane, 2,4-ditertbutilfenol, hentriacontane y tetracosane fueron seleccionados para explorar su habilidad para inducir la ruptura de la dormancia de semillas de *Prosopis laevigata*. 2,4-ditertbutilfenol fue elegido por que se ha descrito como un buen antioxidante y antifúngico COV producido por *Shewanella algae* YM17, *Trichoderma harzianum* TE5 y *Artrobater agilis*. *Bacillus cereus* MH778713 produce alcanos de cadena de entre 17 y 34 átomos de carbono, nosotros escogimos al heneicosane ($C_{21}H_{44}$) que fue elegido como representativo de compuestos alcanos de 20 carbonos y el Hentriacontane ($C_{31}H_{64}$) como un alcano representativo de los alcanos de 30 carbonos. Mientras que el compuesto Tetracosane ($C_{24}H_{50}$) fue incluido en el ensayo ya que se encontraron otros alcanos con una formula molecular similar ($C_{21}H_{44}$ y $C_{24}H_{50}$). Considerando la concentración de VOCs reportada en la literatura como optima entre (0.001 y 100 μ g), nosotros realizamos ensayos usando una concentración de 50 μ g y de 500 μ g. Los compuestos Heneicosane, 2,4-ditertbutilfenol, hentriacontane y tetracosane inducen la germinación de la semilla y el desarrollo de la plántula en las dos diferentes dosis en las que fueron realizados los ensayos. La Figura 3 (**Fig 3**) es representativa del efecto de todos los compuestos sobre semillas de *Prosopis laevigata*, este ensayo también conto con *E. coli* BL21DE3 como control negativo (**Fig 3a**), al aislado *Bacillus cereus* MH778713 como control positivo y los compuestos orgánicos incluidos en este ensayo los cuales se muestran en la figura 3 (**Fig 3 c, d, e y f**). Las soluciones stock de los compuestos fueron preparadas usando benceno como solvente, el cual se incluyo como un control negativo en este ensayo como se muestra en la **Fig suplementaria 1**.

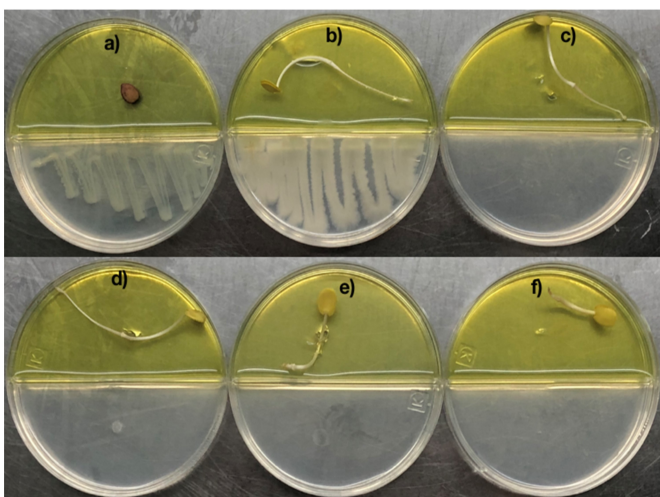


Fig 3. Análisis de la promoción de la germinación de *Bacillus cereus* MH778713 y los compuestos tetracosane, heneicosane, hentriacontane y 2,4-Di-tert-butyl phenol en semillas expuestas a estrés por cromo. Semillas de *Prosopis laevigata* en cajas bipartidas, incubadas en oscuridad a 28°C, para su germinación en agar agua el cual contiene una concentración de 2500 mg L⁻¹ of Cr. *Escherichia coli* BL21 (DE3) como control negativo (a), *Bacillus cereus* MH778713 como control positivo (b), tetracosane (c), heneicosane (d), hentriacontane (e), y 2,4-Di-tert-butyl fenol (f). El análisis de la promoción de la germinación de los diferentes VOCs fue hecho por quintuplicado en tres experimentos diferentes.

La estimulación del crecimiento de plántulas de *Prosopis laevigata* las cuales se encuentran en exposición a 2500 mg L⁻¹ de cromo VI se muestran en la **Fig 4**. El tamaño de la raíz de las plántulas tratadas con heneicosane, tetracosane y hentriacontane es significativamente más grande que el que mostraron aquellas tratadas con el 2,4-ditertbutilfenol, sin embargo el mayor efecto en el crecimiento lo mostraron aquellas tratadas con el aislado *Bacillus cereus* MH778713. Se realizaron ensayos de promoción del crecimiento con los compuestos heneicosane, tetracosane, hentriacontane y 2,4-ditertbutilfenol sin usar cromo, en la figura 5 (**Fig 5**) se muestran el tamaño de la raíz y el tallo de las plántulas expuestas a los diferentes compuestos. El tamaño de la raíz y del tallo fue más grande que el de la planta que no fue expuesta a ningún compuesto, lo cual indica que estos compuestos alcanos de cadena larga inducen el crecimiento vegetal y asisten a la semilla de *Prosopis laevigata* a sobreponerse a la fitotoxicidad causada por cromo VI.

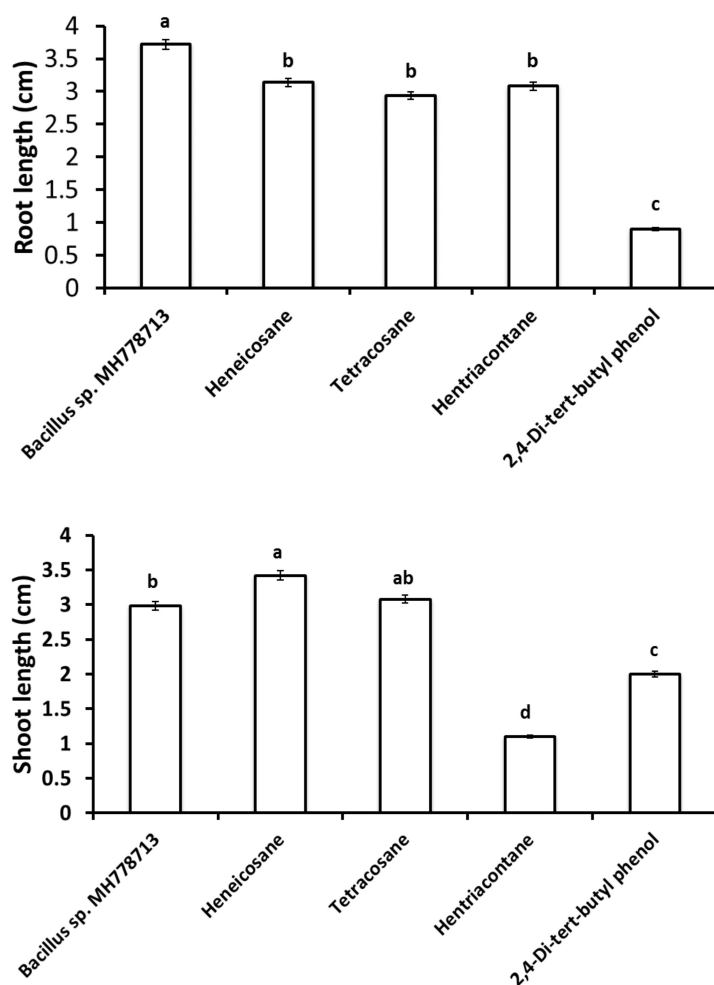


Fig 4. Análisis de la promoción de la germinación de semillas estimuladas por los compuestos volátiles orgánicos heneicosane, tetracosane, hentriacontane, 2,4-Di-tert-butyl fenol y compuestos volátiles producidos por *Bacillus cereus* MH778713. Semillas de *Prosopis laevigata* en cajas bipartidas, incubadas en oscuridad a 28°C, para su germinación en agar agua el cual contiene una concentración de 2500 mg L⁻¹ de Cr. El análisis de la promoción de la germinación de los diferentes VOCs fue hecho por quintuplicado en tres experimentos diferentes. Las diferentes letras indican la diferencia significativa entre los diferentes tratamientos a los que fueron sometidas las semillas de *Prosopis laevigata*, con un nivel de confianza de P= 0.05.

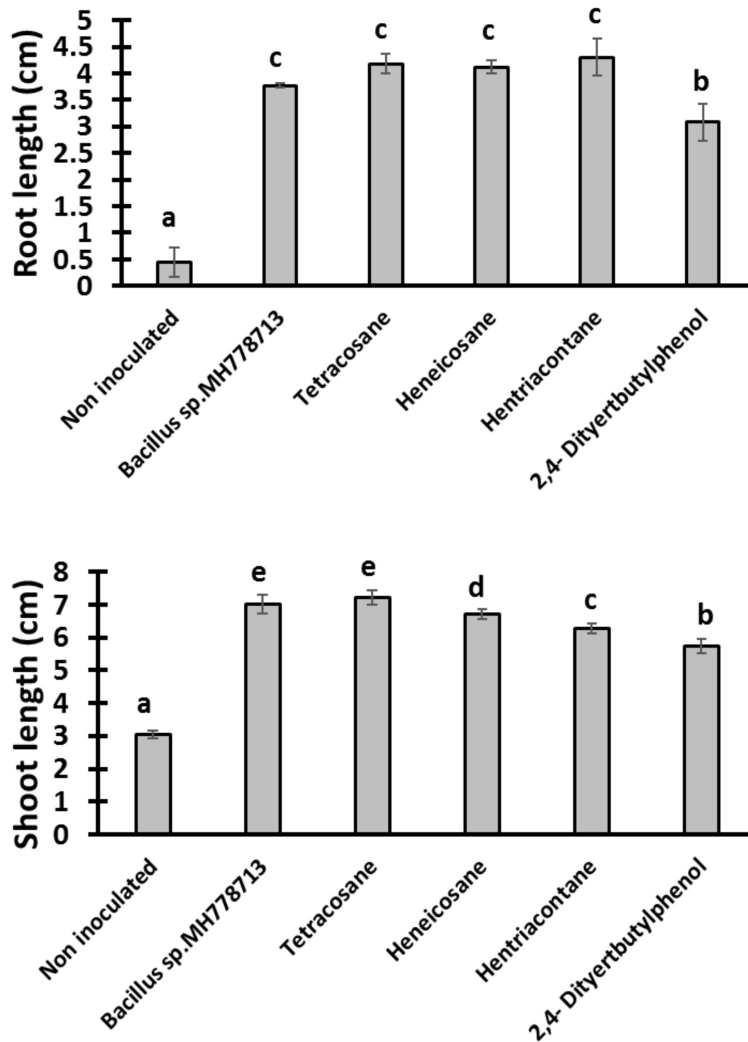


Fig 5. Análisis de la promoción del crecimiento de las plántulas estimuladas por los compuestos volátiles orgánicos heneicosane, tetracosane, hentriacontane, 2,4-Di-tert-butyl fenol y compuestos volátiles producidos por *Bacillus cereus* MH778713. Semillas de *Prosopis laevigata* en cajas bipartidas, incubadas en oscuridad a 28°C, para su germinación las semillas fueron embebidas en agar agua. El análisis de la promoción de la germinación de los diferentes VOCs fue hecho por quintuplicado en tres experimentos diferentes. Las diferentes letras indican la diferencia significativa entre los diferentes tratamientos a los que fueron sometidas las semillas de *Prosopis laevigata*, con un nivel de confianza de $P=0.05$.

DISCUSIÓN

Compuestos como 2,3-butanediol, 1,3- propanediol, indoles, 2- nonanona, 2-undecanona, 2- tridecanona, hexadecane y otros hidrocarburos, cetonas, alcoholes, terpenoides, ácidos y compuestos que contienen azufre y estimulan el crecimiento vegetal, además que tienen la capacidad de controlar patógenos e inducir resistencia sistémica en las plantas (Audrain et al., 2015; Ficheira et al., 2017; Ryu et al., 2003). En este trabajo se estableció la habilidad de el aislado *Bacillus cereus* MH778713 el cual puede producir una mezcla de compuestos orgánicos, los cuales pueden inducir la ruptura de la dormancia de las semillas de *Prosopis laevigata* sometidas al estrés por cromo. Diferentes señales del medio ambiente pueden inducir la germinación de la semillas en condiciones desfavorables para el desarrollo de la planta (Arc et al., 2013; Huang et al., 2015; Nishimura et al., 2018). Sin embargo la toxicidad de los metales pesados activa una cascada de señalización que inhibe la germinación de la semilla. A pesar de que la testa de la semilla le provee una cubierta protectora, algunos metales son capaces de permear e introducirse a la semilla alterando el metabolismo de carbohidratos, la absorción de agua, accionando el mecanismos de estrés oxidativo y la germinación (Kranter y Colville., 2011; Yildiz y Terzi., 2016; Kaszycki et al., 2018).

Las altas concentraciones de Cr VI ($75\text{-}100\text{ mg kg}^{-1}$) son capaces de inhibir la germinación, reducir el contenido de clorofila y afectan el crecimiento de las plantas (Amin et al., 2019). En semillas de *Prosopis laevigata* se inhibió su germinación con una concentración de 2500 mg kg^{-1} de cromo VI. Los compuestos COVs emitidos por *Bacillus cereus* MH778713 ayudan a las semillas de *Prosopis laevigata* a germinar y sobreponerse al estrés generado por la alta concentración de cromo VI (**Fig. 1**). El efecto de los COVs afecta a las semillas que fueron sometidas al estrés por cromo.

Compuestos alcanos de cadena larga como el aceite mineral en combinación con otros compuestos como dinitrocresol (DNOC), Cinamida, thiourea y nitrato de potasio muestran una actividad estimuladora de la ruptura de la dormancia en brotes de manzana (Samish., 1945; Erez y Zur., 1981; Erez et al., 1971; Erez., 1995; Sagredo et al., 2005). La oxidación selectiva de alcanos vía catálisis enzimática u organometalica (Labinger., 2004), podrían ser la respuesta a al mecanismo por el cual los compuestos orgánicos volátiles de cadena larga podrían estimular la ruptura de la dormancia de las semillas de *Prosopis laevigata*. Explicado desde el punto de vista de la catálisis biológica, en los sistemas biológicos la oxidación selectiva de alcanos es catalizada por enzimas

en condiciones de medio ambiente normales es decir 25 °C y una atmosfera de presión, la enzima citocromo P450 se comporta como una monooxigenasa y reacciona frente oxidantes fuertes como peróxidos, hipoclorito, y otras especies reactivas de oxígeno como N-Óxidos, catalizando la oxidación regio selectiva de alcanos, modificando a moléculas de alcanos y volviéndolas químicamente activas (Wei et al., 2018; Rajjou et al., 2012; Wojtyla et al., 2016; Ishibashi et al., 2017; Mhamdi y Breusegem., 2018). Las modificaciones estructurales cambian la actividad de brasinoesteroides, estas modificaciones ocurren al final de las cadena de carbono, las modificaciones en estas moléculas son capaces de cambiar su actividad biológica, haciendo que algunas moléculas sean más activas que otras dependiendo del grupo funcional de la modificación; estas moléculas son capaces intervenir en la modulación y la regulación del ciclo celular. El cromo VI es absorbido por las plantas para ser reducido, lo cual induce estrés oxidativo en estas (Mishra et al., 1995; Oliviera., 2012). La cascada de señalización desencadenada por los ROS es bien documentada y el rol esencial que desempeña la presencia en la fisiología de las plantas (Bailly et al., 2008). Los experimentos que realizamos en los cuales expusimos a altas concentraciones de cromo VI a las semillas de *Prosopis laevigata* generan elevados niveles de ROS, los cuales impiden la germinación de la semilla, reprimiendo la señalización hormonal.

Bacillus cereus MH778713 emite compuestos volátiles de cadena larga (heneicosane, hentriacontane, tetracosane) los cuales podrían desempeñar un rol de activación de las vías celulares responsables de que la semilla pueda sobreponerse al estrés causado por la exposición a altas concentraciones de cromo y se lleve a cabo la germinación.

CONCLUSIÓN

Los compuestos que produce *Bacillus cereus* MH778713 les permiten a las semillas de *Prosopis laevigata* superar el estado de dormancia que induce la fitotoxicidad del cromo VI en estas, además de que estimulan el crecimiento de el tallo y la raíz de plántulas de *Prosopis laevigata* que no se encuentran expuestas a estrés por cromo, mostrando una diferencia significativa entre las que fueron tratadas con estos compuestos y las que no fueron tratadas con los COVs alcanos de cadena larga producidos por *Bacillus cereus* MH778713.

“Actividad antifúngica de alcanos volátiles producidos por *Bacillus cereus* MH778713”.

CAPÍTULO 3

INTRODUCCIÓN

Algunas especies del género *Bacillus* han sido usados como agentes de biocontrol (ABC) (Khan et al., 2018). Las especies más estudiadas son *Bacillus amyloquefaciens* (Fernando et al., 2007; arrebola et al. 2010) y *Bacillus subtilis* (Krebs et al., 1998). *Bacillus amyloquefaciens* ha sido usado como agente de biocontrol frente a patógenos fúngicos de frutas, *Bacillus subtilis* es otra especie usada en la promoción del crecimiento vegetal y como agente de biocontrol (Ma et al., 2015). Algunas especies del género *Bacillus* son capaces de producir compuestos orgánicos volátiles y no volátiles que pueden actuar como antagonistas e inhibidores del crecimiento de microorganismos patógenos para los cultivos de interés económico (Yogeswari et al. 2012). Metabolitos como los compuestos orgánicos volátiles (COVs) producidos por bacterias del género *Bacillus* exhiben actividad antimicrobiana, nematicida y son capaces de iniciar la respuesta sistémica inducida en las plantas (Wang et al., 2009; Lu et al., 2014). Los COVs son capaces de prevenir la formación del micelio, el crecimiento miceliar y la germinación de las esporas de algunos hongos fitopatógenos (Chen et al., 2008).

Fusarium es un ascomiceto el cual se ha descrito como uno de los patógenos con un gran impacto económico, este hongo fitopatógeno es capaz de invadir las semillas y los tallos causando daños en las partes vasculares, causando la marchitez, ruptura en las raíces, manchas amarillas y parches necróticos en las hojas (Khan et al., 2018).

Varias especies de *Bacillus* muestran la capacidad de inhibir hongos patógenos para las plantas como *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus clavatus*, *Fusarium oxysporum* y *Moniliophthora perniciosa*. *Bacillus cereus* AR156 ha sido usado como un buen agente de biocontrol frente a hongos como *Rhizopus stolonifer* y *Colletotrichum acutatum*, debido a la producción de compuestos orgánicos volátiles los cuales desencadenan, en frutas de durazno y níspero, una respuesta sistémica inducida y estimulan la producción de enzimas como la quitinasa y peroxidasa, además de la generación de peróxido de hidrogeno. *Bacillus subtilis* G8 puede producir hasta treinta diferentes COVs los cuales tienen una actividad biológica y antagonista frente a microorganismos patógenos del suelo (Liu et al., 2008); *Bacillus subtilis* C9 es capaz de inhibir el crecimiento de fitopatógenos como *Rhizoctonia solani* mediante la emisión de compuestos orgánicos volátiles (Islam et al., 2012). *Bacillus amyloquefaciens* produce

compuestos como el 3-pentadieno, 3 hidroxy-2-butanona y tiofeno los cuales tienen una actividad antifúngica (Gotor-Vila et al., 2017).

En este trabajo se encontró que *Bacillus cereus* MH778713 puede inhibir el crecimiento de *Fusarium* sp. en ensayos *in vitro* mediante la producción de compuestos orgánicos volátiles los cuales fueron identificados mediante el análisis de cromatografía de gases- espectrometría de masas, la mayoría de los compuestos encontrados en el perfil de metabolitos volátiles producidos por *Bacillus cereus* MH778713 son alcanos de cadena larga, tres de estos alcanos son capaces de inhibir el crecimiento radial de *Fusarium* sp. , lo cual convierte a estos compuestos en una alternativa para la protección de los cultivos, frente a fitopatógenos como *Fusarium*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Evaluación de la actividad antifúngica de *Bacillus cereus* MH778713 contra *Fusarium* sp.

Bacillus cereus MH778713 y *Fusarium* sp. se seleccionaron para determinar la capacidad antifúngica de *Bacillus* en una placas Petri sin división, después de 5 días se evaluó la capacidad de inhibir el crecimiento de *Fusarium* sp. cada ensayo fue realizado por quintuplicado con tres repeticiones.

Evaluación de la actividad antifúngica de Compuestos orgánicos volátiles producidos por *Bacillus cereus* contra *Fusarium* sp.

En cajas Petri con una división para evitar el contacto físico entre el hongo y la bacteria se realizaron los ensayos de evaluación antifúngica de los COVs producidos por *Bacillus cereus*, en una de las divisiones se colocaron 25 ml de agar YMA para incubar a *Bacillus cereus* MH778713, en otra división de la placa de Petri se colocó PDA y se inocularon 1×10^{10} UFC de *Fusarium* sp. las cajas fueron incubadas a 28°C por 12 h para observar la geminación del hongo, después de 12 h en el agar YMA se colocaron 10 μ l (1×10^{10} UFC) de *Bacillus cereus* MH778713. Se uso a *E. coli* BL21 DE3 control negativo y cajas no inoculadas. Cada ensayo se realizó por triplicado con 5 cajas en cada repetición.

CG/EM

El análisis de cromatografía de gases masas se realizó después de 12 h de co-cultivación de *Bacillus cereus* MH778713 y *Fusarium* sp. Se colocaron 3 ml de éter etílico en cada caja en la parte que contenía a *Bacillus cereus* y estas se agitaron concéntricamente, se retiró el sobrenadante y se colocó en tubos de 1.5 ml estériles que se centrifugaron a 12000 g por 5 min a temperatura

ambiente, el sobrenadante se transfirió a otro tubo de 1.5 ml y se llevó a analizar. Los controles negativos constan de muestras que se mantuvieron en co-cultivación con *E. coli* BL21 DE3 y de muestras del solvente solo. Cada ensayo se hizo por triplicado con cinco cajas por cada repetición. Para la realización del análisis de cromatografía y espectrometría de masas se colocaron las muestras en un cromatógrafo de gases 7820^a Agilent. 1 µl de muestra fue tomada con el inyector automatizado Agilent G4513A. Cada muestra fue analizada durante 25 minutos, con una temperatura inicial de 40°C por 5 min, seguido de una rampa de 15°C/min a 240 °C y se mantuvo por 6.667 min, el espectrómetro de masas opera a 70 eV con una fuente de temperatura de 220°C, con un escáner continuo de 50-500 m/z. La base de datos con la que opera este espectrómetro es la NIST08. L. Los controles negativos constan del solvente solo y controles con *E. coli* BL21 DE3. Los compuestos encontrados en el solvente y en *E. coli* BL21 DE3 fueron retirados de las tablas de resultados.

Evaluación de la actividad antifúngica de compuestos orgánicos volátiles producidos por *Bacillus cereus* en *Fusarium* sp., Hentriacontane, Heneicosane, tetracosane y 1,4-Ditertbutilfenol.

La co-cultivación de *Bacillus cereus* MH771873 -*Fusarium* sp. se realizó como un control positivo para la promoción de la germinación, en placas pre-cultivadas por 12 h con *Fusarium* sp., además que se realizaron ensayos con 50 µg de diferentes VOCS encontrados en los perfiles de producción de VOCS de *Bacillus cereus*, se utilizaron los compuestos heneicosane, hentriacontane y tetracosane. Todos los reactivos fueron disueltos en éter etílico. En este experimento se usaron como control negativo *E. coli* BL21 DE3, placas con *Fusarium* sp. que fueron expuestas solo al éter etílico sin ningún compuesto. Este análisis se realizó por triplicado con 5 semillas cada uno de cada una de las condiciones anteriormente descritas.

RESULTADOS

La actividad antifúngica producida por *Bacillus cereus* MH778713 en *Fusarium* sp. fue determinada en usando placas de Petri con agar PDA, en las cual se mostro la habilidad de esta bacteria para inhibir el crecimiento del hongo (**Fig. 1**).

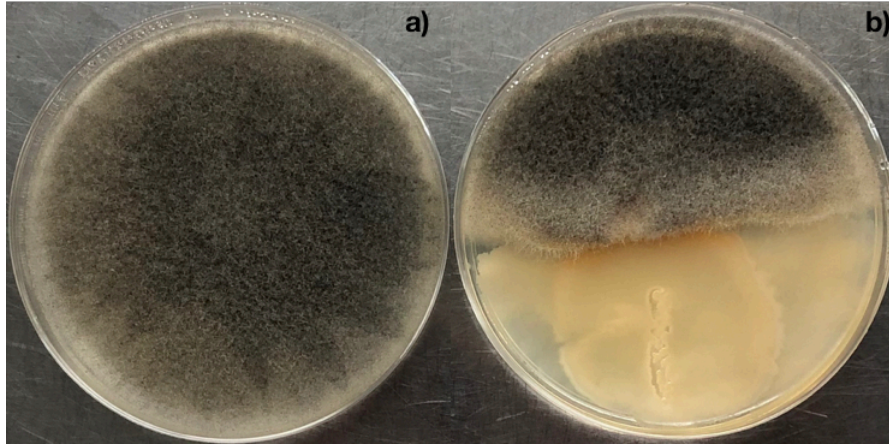


Fig 1. Muestra la actividad antifúngica de *Bacillus cereus* MH778713, a) muestra el crecimiento miceliar de *Fusarium* sp.; b) Muestra la inhibición del crecimiento de *Bacillus cereus* MH778713 contra *Fusarium* sp.

Varias especies del género *Bacillus* son capaces de producir Compuestos orgánicos volátiles como *Bacillus amyloquefaciens*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus*; *Bacillus amyloquefaciens* produce COVs los cuales son capaces de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos como *Fusarium* sp. (Yuan et al., 2012); *Bacillus cereus* MH778713 fue evaluado en cuanto a su habilidad para producir COVs en cajas bipartidas las cuales previenen el contacto físico entre esta bacteria y *Fusarium* sp., se observo el efecto de inhibición del crecimiento radial del hongo, además de cambios en la morfología colonial de este en las placas las que fueron inoculadas con *Bacillus cereus* MH778713 **Fig. 2 (C)**, se usaron como controles negativos placas no inoculadas **Fig. 2 (A)** y placas inoculadas con *E. coli* BL21 DE3 **Fig. 2 (B)**.

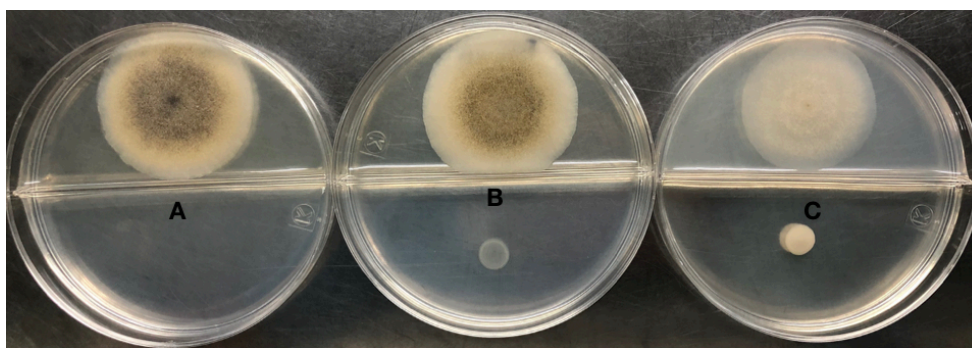


Fig 2. Muestra la actividad antifúngica de *Bacillus cereus* MH778713 (C) y los controles negativos (A) placas de Petri bipartidas sin inocular y placas de Petri bipartidas inoculadas con *E. coli* BL21 DE3 (B).

El perfil de producción de compuestos orgánicos volátiles de *Bacillus cereus* MH778713 obtenido mediante el uso de la extracción con éter etílico después de 24 horas de co-cultivación en cajas de Petri bipartidas para evitar el contacto físico entre el hongo y la bacteria, se muestra en la **Tabla 1**. El perfil de COVs consta de 23 compuestos entre ellos se encuentra Alcoholes, Alcanos, Alquenos, Éteres, Ésteres, Cetonas, Amidas y compuestos que contiene azufre.

Tabla 1. Perfil de compuestos orgánicos volátiles de *Bacillus cereus* MH778713 contra *Fusarium* sp. después de 24 horas de co-cultivación en cajas de Petri bipartidas.

No.	Rt (min)	Compuestos	Formula molecular	Peso molecular	Área %
1	11.185	4-ethyl-Decane	C ₁₂ H ₂₆	170.34	1.53
2	11.795	3,7-dimethyldecane	C ₁₂ H ₂₆	170.34	0.71
3	13.502	4,6-dimethyldodecane	C ₁₄ H ₃₀	138.394	2.61
4	13.589	Pentadecane	C ₁₅ H ₃₂	184.367	0.64
5	13.761	Oxalic acid, 6-ethyloct-3-yl propyl ester	C ₁₅ H ₂₈ O ₄	272.385	0.98
6	133.922	2,6,11-trimethyl Dodecaneso	C ₁₅ H ₃₂	212.421	1.91
7	15.107	Hexadecane	C ₁₆ H ₃₄	226.448	1.01
8	15.393	Heneicosane	C ₁₂ H ₄₄	296.574	4.67
9	16.810	2,6,10-trimethyl pentadecane	C ₁₈ H ₃₈	254.502	1.82
10	16.939	Heptadecane	C ₁₇ H ₃₆	240.435	3.73
11	17.357	Heptacosane	C ₁₇ H ₅₆	380.745	4.23
12	17.615	1-Octadecene	C ₁₈ H ₃₆	252.486	4.48
13	18.302	Hentriacontane	C ₃₁ H ₆₄	436.853	2.20
14	18.345	Pentacosane	C ₂₅ H ₅₂	352.691	1.61
15	18.442	1H-Indole, 5-methyl-2-phenyl	C ₁₅ H ₁₃ N	207.276	6.20
16	18.538	Eicosane	C ₂₀ H ₄₂	282.556	3.80
17	18.785	1-Propene, 3-(2-cyclopentenyl)-2-methyl-1,1-diphenyl-	C ₂₁ H ₂₂	274.407	5.71
18	18.828	11-decyl- Tetracosane	C ₃₄ H ₇₀	478.934	6.35
19	19.0	Oxalic acid, allyl hexadecyl ester	C ₂₁ H ₃₈ O ₄	254.531	2.22

20	19.268	Methadone N-oxide	C ₂₁ H ₂₇ NO	309.453	1.87
21	20.285	Octadecane	C ₁₈ H ₃₈	254.502	1.82
22	20.750	9-Nonadecene	C ₁₉ H ₃₈	266.513	2.35
23	24.883	1,2-Propanediol, 3-benzyloxy-1,2-diacetyl	C ₁₄ H ₁₈ O ₅	266.293	1.78

Se ha probado la eficacia de COVs alcanos producidos por *Bacillus amyloquefaciens* NJN-6 los cuales son presentan una actividad antifúngica contra *Fusarium oxysporum* (Yuan et al., 2012), En el perfil de producción de VOCs *Bacillus cereus* MH778713 expresa en su mayoría compuestos alcanos, en este ensayo se usaron 4 compuestos alcanos presentes en la muestra y de los cuales anteriormente se había probado su efecto como promotores del crecimiento vegetal (Hentriacontane, Heneicosane y Tetracosane) a una concentración de 50 µg. Se usaron como controles negativos cajas de Petri no inoculadas **Fig. 3 (a)** y cajas de Petri inoculadas con *E. coli* BL21 DE3 **Fig. 3 (b)**, como control positivo se usaron cajas de Petri inoculadas con *Bacillus cereus* MH778713 **Fig. 3 (c)**, el análisis de la inhibición del crecimiento con los compuestos hentriacontane, heneicosane y tetracosane se muestra en la **Fig. 3 (d, e y f)** respectivamente.

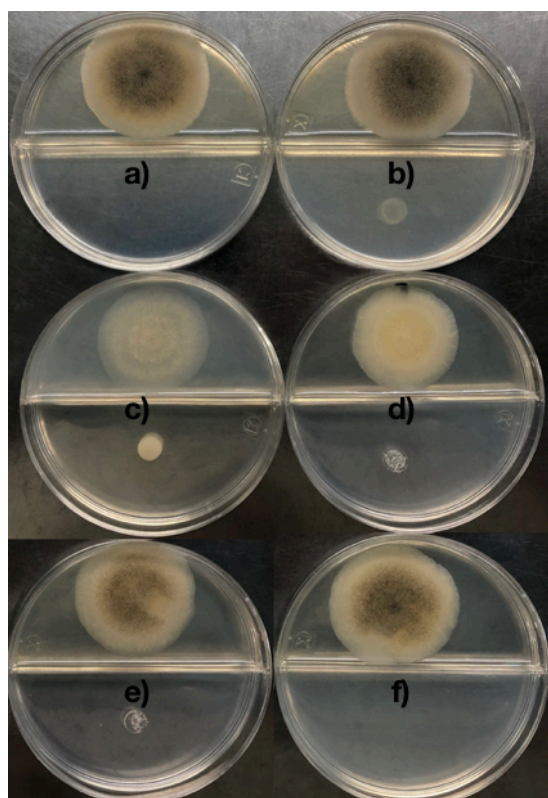


Fig 3. Muestra la actividad antifúngica de Bacterial COVs, (d) Hentriacontane, (e) Heneicosane , (f) Tetracosane y los controles negativos (a) placas de Petri bipartidas sin inocular y placas de Petri bipartidas inoculadas con *E. coli* BL21 DE3 (b) y el control positivo placas de Petri bipartidas inoculadas con *Bacillus cereus* MH778713 (c).

Siendo el compuesto tetracosane el que tuvo un efecto casi nulo en la inhibición del crecimiento radial del hongo. La inhibición del crecimiento radial de *Fusarium* sp. después de 24 horas de co-cultivación fue evaluado y la menor inhibición del crecimiento radial se fue para el compuesto tetracosane, como se muestra en la **Fig. 4**.

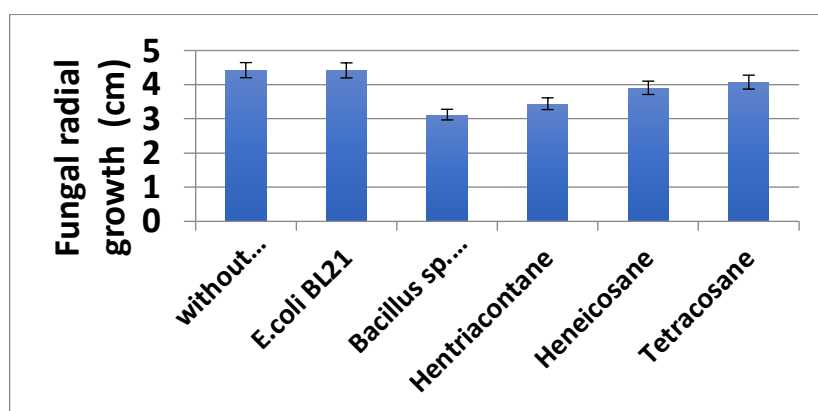


Fig 4. Diferencia en la medición del crecimiento radial de la colonia de *Fusarium* sp. al ser co-cultivado durante tres días en cajas bipartidas con *Bacillus cereus* MH778713; n=15.

DISCUSIÓN

Muchas bacterias del suelo pueden producir COVs los cuales se han documentado que podrían tener una capacidad antifúngica, evitando la propagación en el suelo de fitopatógenos y permitiendo que la semilla de las plantas pueda germinar (Garbeva et al., 2011). Diferentes bacterias del género *Bacillus* son capaces de producir compuestos volátiles orgánicos los cuales son capaces de inhibir el crecimiento micelial de diferentes hongos, por ejemplo *Bacillus subtilis* CF3 produce 2, 4 -ditertbutilfenol el cual inhibe el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium expansum*, *Monilinia fructicola* y *Alternaria alternata* produce una inhibición micelial de hasta 59.97% (Gao et al., 2018). *Bacillus subtilis* FA26 sintetiza compuestos como Hexadecano, Pentadecano y Eicosano los cuales muestran una alta actividad antimicrobiana frente *Clavibacter michiganensis* (Rajer et al., 2017). *Bacillus*

amyloliquefaciens NJN-6 compuestos alquílicos de C14-C15 (tetradecano y pentadecano) exhiben la capacidad de inhibir de un 22.5-18.4 % respectivamente el crecimiento micelial de *Fusarium* sp. (Yuan et al., 2012). *Bacillus cereus* MH778713 produce más de 20 compuestos volátiles orgánicos (COVs) de los cuales la mayoría son compuestos alquílicos, de estos compuestos se eligieron los tres más abundantes para realizar ensayos de inhibición de *Fusarium* sp., dos de ellos son alcanos de cadena larga de C21 y C31 (Heneicosane y Hentriacontane) fueron capaces de inhibir el crecimiento de micelial de *Fusarium* sp. en ensayos *in vitro*. La expresión de Bacterial COVs es capaz estimular la expresión de genes envueltos en funciones importantes para bacterias del suelo como la fijación de nitrógeno (*nifH*), desnitrificación (*nirS*), nitrificación (*amoA*) y la producción de antibióticos como (NRPS) (Yuan et al., 2017). Los COVs son una forma de comunicación directa entre los organismos que forman parte de la rizosfera (Raíces de las plantas, hongos, bacterias y protistas) (Yamada et al., 2012). En 2015 se empezaron a describir una familia de terpeno sintetas bacterianas las cuales se encuentran directamente relacionadas con la expresión de COVs que se encuentran mediando la interacción química entre todos los organismos que se encuentran formando parte de la comunidad rizosferica, proporcionando evidencia sobre la presencia de proteínas las cuales son encargadas de expresar los compuestos para que se lleve a cabo la comunicación (Yamada et al. 2015). Sin embargo todavía falta dilucidar como estos compuestos logran que se lleve a cabo la comunicación entre organismos, si estos organismos son capaces de internalizados y llevar la señal para ser traducida mediante receptores y mediadores de la cascada de señalización desencadenada por estos compuestos, o si los receptores se encuentran presentes en la membrana celular y de ahí es desencadenada la respuesta de los individuos presentes en el nicho ecológico para ser esta traducida y disparar una serie de reacciones como respuesta al estímulo de estos compuestos o simplemente estos compuestos son metabolizados por los organismos de la comunidad y transformados para convertirlos en moléculas con una actividad biológica importante (Widhalm et al., 2015; Adebessin et al., 2017; Tissier et al., 2017). Los mecanismos de acción todavía no se han dilucidado sin embargo se ha demostrado el efecto de COVs alquílicos de cadena larga C21 y C31 aislados de *Bacillus cereus* MH778713 en su eficacia para inhibir el crecimiento radial de un hongo fitopatógeno de interés económico como *Fusarium* sp.

CONCLUSIÓN

Los compuestos hentriacontane y Heneicosane determinados mediante el análisis de CG-EM muestran una eficaz actividad antifúngica, por lo cual podrían ser una alternativa atractiva como agentes de biocontrol para los cultivos de interés agrícola que son afectadas por este agente patógeno.

REFERENCIAS

1. Abdelmoteleb, A., Troncoso, R., Gonzalez, T., González, D. (2017). Antifungal Activity of Autochthonous *Bacillus subtilis* Isolated from *Prosopis juliflora* against Phytopathogenic Fungi. *Mycobiology*. 10.5941/MYCO.2017.45.4.385.
2. Adebessin, F., Widhalm, J. R., Boachon, B., Lefèvre, F., Pierman, B., Lynch, J. H., et al. (2017). Emission of volatile organic compounds from petunia flowers is facilitated by an ABC transporter. *Science* 356, 1386–1388. doi: 10.1126/science. aao0826
3. Akinci I, Akinci S. (2010). Effect of chromium toxicity on germination and early seedling growth in melon (*Cucumis melo* L.). *Afr. J. Biotechnol.* 929:4589-4594.
3. Aldrich, M.V., Gardea-Torresdey, J.L., Peralta-Videa, J.R., Parsons, J.G. (2003). Uptake and reduction of Cr (VI) to Cr (III) by mesquite (*Prosopis* spp.): chromate–plant interaction in hydroponics and solid media studied using XAS. *Environ. Sci. Technol.* 37, 859–1864.
4. Aldrich, M.V., Peralta-Videa, J.R., Parsons, J.G., Gardea-Torresdey, J.L. (2007). Examination of arsenic (III) and (V) uptake by the desert plant species mesquite (*Prosopis* spp.) using X-ray absorption spectroscopy. *Sci. Total Environ.* 379, 249–255.
5. Álvarez, E., Marcos, M.L., Vaamonde, C., Fernández-Sanjurjo, M.J. (2003). Heavy metals in the dump of an abandoned mine in Galicia (NW Spain) and in the spontaneously occurring vegetation. *Sci. Total. Environ.* 313, 85-197.
6. Amin H, Ahmed AB., Abbasi, MS., Amin, F., Jahangir, TM., Soomro, NU. (2019). Evaluation of chromium phyto-toxicity, phyto-tolerance, and phyto-accumulation using biofuel plants for effective phytoremediation. *Int J Phytoremediation.* 21(4):352-363.
7. Arc, E., Sechet, J., Corbineau, F., Rajjou, L., Marion-Poll, A. (2013). ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. *Front Plant Sci.* 4:63.
8. Arias, A., Peralta-Videa, J.R., Ellzey, J.T., Viveros, M.N., Gardea-Torresdey, J.L. (2010). Effects of *Glomus deserticola* inoculation on *Prosopis*: Enhancing chromium and lead uptake and translocation as confirmed by x-ray mapping, ICP-OES and TEM techniques. *Environ. Exp. Bot.* 68, 139–148.
9. Arias, A., Peralta-Videa, J.R., Ellzey, J.T., Viveros, M.N., Ren, M., Mokgalaka, N.S., Castillo, H., Gardea-Torresdey, J.L. (2011). Plant growth and metal distribution in tissues of *Prosopis juliflora-velutina* grown on chromium-contaminated soil in the presence of *Glomus deserticola*. *Environ. Sci. Technol.* 44 ,7272–7279.

10. Arrebola, E., Sivakumar, D., and Korsten, L. (2010). Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus. *Biol. Control* 53,22–128. doi: 10.1016/j.biocontrol.2009.11.010
11. Ashraf, M.A., Hussain, I., Rasheed, R., Iqbal, M., Riaz, M., Arif, M.S. (2017). Advances in microbe-assisted reclamation of heavy metal contaminated soils over the last decade: a review. *J. Environ. Manag.* 198, 132–143.
12. Audrain, B., Farag, M.A., Ryu, C.M., Ghigo, J.M. (2015). Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology. *FEMS Microbiol Rev.* 39(2):222-233.
13. Backer, R., Rokem, J.S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., et al., (2018). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Front Plant Sci.* 9:1473.
14. Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H., Corbineau, F. (2008). From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *C R Biol.* 331:806-814.
15. Bailly, A., Groenhagen, U., Schulz, S., Geisler, M., Eberl, L., and Weisskopf, L. (2014). The inter-kingdom volatile signal indole promotes root development by interfering with auxin signalling. *Plant J.* 80, 758–771. doi: 10.1111/tpj.12666
16. Bain, D.C. (1976). A titanium-rich soil clay. *Eur. J. Soil. Sci.* 10.1111/j.1365-2389.1976.tb01976.x.
17. Bankar, A., Ameeta, R., Kumar, R., Smita, S., Zinjarde, S. (2009). Removal of chromium (VI) ions from aqueous solution by adsorption onto two marine isolates of *Yarrowia lipolytica*. *J. Hazard. Mater.* 170, 487-494.
18. Bergersen, E.O. (1961). A comparative study of cephalometric superimposition. *The angle orthodontist.* 31, 216-229.
19. Bitas V, Kim H, Bennett JW, Kang S. (2013). Sniffing on microbes: diverse roles of microbial volatile organic compounds in plant health. *Mol Plant Microbe Interac.* 26:835-843.
20. Bitas, V., McCartney, N., Li, N., Demers, J., Kim, J.-E., Kim, H.-S., et al. (2015). *Fusarium oxysporum* volatiles enhance plant growth via affecting auxin transport and signaling. *Front. Microbiol.* 6:1248. doi: 10.3389/fmicb.2015.01248

21. Blom, D., Fabbri, C., Eberl, L., and Weisskopf, L. (2011). Volatile-mediated killing of *Arabidopsis thaliana* by bacteria is mainly due to hydrogen cyanide. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1000–1008. doi: 10.1128/aem.01968-10
22. Boardman, N.K. (1975). Trace elements in photosynthesis, in *Trace Elements in Soil-Plant-Animal Systems*, Nicholas, P. J. D. and Egan, A. R., Eds. Academic Press, New York.
23. Bücken-Neto L, Paiva ALS, Machado RD, Arenhart RA, Margis-Pinheiro M. (2017). Interactions between plant hormones and heavy metals responses. *Genet Mol Biol.* 40(1):373-386.
24. Campos, V., Moraga, R., Yáñez, J., Zaror, C., Mondaca, M. (2005). Chromate reduction by *Serratia marcescens* isolated from tannery effluent. *Bull. Environ. Cont. Toxic.* 75, 400–406.
25. Cánovas, D., Cases, I., De Lorenzo, V. (2003). Heavy metal tolerance and metal homeostasis in *Pseudomonas putida* as revealed by complete genome analysis. *Environ. Microbiol.* 5, 1242-1256.
26. Cappa, J.J., Pilon-Smits, E.A.H. (2014). Evolutionary aspects of hyperaccumulation. *Plant.* 239, 267–275.
27. Chaney, R.L., Malik, M., Brown, L., Brewer, S.L., Angle, J.S., Baker, A.J.M. (1997). Phytoremediation of soil metals. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 279–284.
28. Chen, H., Xiao, X., Wang, J., Wu, L., Zheng, Z., and Yu, Z. (2008). Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen *Botrytis cinerea*. *Biotechnol. Lett.* 30: 919–923.
29. Cherchi, C., Gu, Z. (2010). Impact of Titanium Dioxide Nanomaterials on Nitrogen Fixation Rate and Intracellular Nitrogen Storage in *Anabaena variabilis*. *Environ. Sci. Technol.* 44, 8302–8307.
30. Chinnaswamy, A., Coba de la Peña, T., Stoll, A., de la Peña Rojo, D., Bravo, J., Rincón, A., Lucas, M., Pueyo, J. (2018). A nodule endophytic *Bacillus megaterium* strain isolated from *Medicago polymorpha* enhances growth, promotes nodulation by *Ensifer medicae* and alleviates salt stress in alfalfa plants. *Ann. Appl. Biol.* 172, 295-308.

31. Claret, F., Tournassat, C., Crouzet, C., Gaucher, E., Schäfer, T., Braibant, G., Guyonnet, D. (2011). Metal speciation in landfill leachates with a focus on the influence of organic matter. *Waste Manag.* 31, 2036-2045.
32. Clark, R.B. (1977). Effect of aluminum on the growth and mineral elements of Al-tolerant and Al-intolerant corn. *Plant. Soil.* 47, 653-659.
33. Corral, A., Morales, Y.E., Pazos, L.A., Ramírez, A., Martínez, R.D., Muñoz, J. (2012). Quantification of cultivable bacteria by the “Massive Stamping Drop Plate” method. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 14, 147-156.
34. Davies, F.T., Puryear, J.D., Newton, R.J., Egilla, J.N., Grossi, J.A.S. (2002). Mycorrhizal fungi increase chromium uptake by sunflower plants: influence on tissue mineral concentration, growth, and gas exchange. *J Plant Nutr.* 25, 2389-2407.
35. Dimkpa, C., Merten, D., Svatoš, A., Büchel, G., Kothe, E. (2009). Siderophores mediate reduced and increased uptake of cadmium by *Streptomyces tendae* F4 and sunflower (*Helianthus annuus*), respectively. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1687-1696.
36. Ditengou, F.A., Muller, A., Rosenkranz, M., Felten, J., Lasok, H., van Doorn, M. M., et al. (2015). Volatile signalling by sesquiterpenes from ectomycorrhizal fungi reprogrammes root architecture. *Nat. Commun.* 6:6279. doi: 10.1038/ncomms7279
37. Dube, B.K., Tewari, K., Chatterjee, J., Chatterjee, C. (2003). Excess chromium alters uptake and translocation of certain nutrients in citrullus. *Chemosphere* 53(9):1147-1153.
38. Elangovan, R., Abhipsa, S., Rohit, B., Ligy, P., Chandraraj, K. (2006). Reduction of Cr (VI) by a *Bacillus* sp. *Biotechnol. Lett.* 28, 247–252.
39. Everts, J. (1997). Ecotoxicology for Risk Assessment in Arid Zones: Some Key Issues. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 32, 1-10. <https://doi.org/10.1007/s002449900149>
40. FAO Conservation Guide, 20 (Book 20). 1989. Arid zone forestry: A guide for field technicians. ISBN 92-5-102809-5. Food and Agriculture Organization.
41. Felker, P., Kanell, G.H., Clark, P.R. (1983). Biomass production of *Prosopis* species (Mesquite), leucaena, and other leguminous trees grown under heat/drought stress. *Forest. Sci.* 29, 592-606.
42. Fernando, W.G.D., Nakkeeran, S., Zhang, Y., Savchuk, S. (2007) Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus* species on canola petals,. *Crop Protection.* 26(2): 100-107.

43. Fincheira, P., Parada, M., Quiroz, A. (2017). Volatile organic compounds stimulate plant growing and seed germination of *Lactuca sativa*. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 17(4):853-867.
44. Foy, C.D., Chaney, R.L., White, M.C. (1978). The physiology of metal toxicity in plants. *Annu. Rev. Physiol.* 29, 511-519.
45. Francisco, R., Alpoim, M.C., Morais, P.V. (2002). Diversity of chromium-resistant reducing bacteria in a chromium-contaminated activated sludge. *J. Appl. Microbiol.* 92, 837–843.
46. Fterich, A., Mahdhi, M., Pajuelo, E., Rivas, R., Mars, M. (2011). Characterization of root-nodulating bacteria associated to *Prosopis farcta* growing in the arid regions of Tunisia. *Arch. Microbiol.* 193, 385-397.
47. Gardea-Torresdey, J.L., de la Rosa, G., Peralta-Videa, P. (2004). Use of phytofiltration technologies in the removal of heavy metals: A review. *Pure. Appl. Chem.* 76, 801-813.
48. Giorgio, A., De Stradis, A., Lo Cantore, P., Iacobellis, N.S. (2015). Biocide effects of volatile organic compounds produced by potential biocontrol rhizobacteria on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Front Microbiol.* 6:1056.
49. Glass, D.J. (1999). United States and international markets for phytoremediation. Needham, Mass.: D. Glass Associates Inc.
50. Goulhen, F., Gloter, A., Guyot, F., Bruschi, M. (2006). Cr (VI) detoxification by *Desulfovibrio vulgaris* strain Hildenborough: microbe–metal interaction studies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 892–897.
51. Gowd, S., Govil, P.K. (2018). Distribution of heavy metals in surface water of Ranipet industrial area in Tamil Nadu. *Ind. Environ. Monit. Assess.* [10.1007/s10661-007-9675-5](https://doi.org/10.1007/s10661-007-9675-5).
52. Graeber, K., Nakabayashi, K., Miatton, E., Leubner-metzger, G., Soppe, W.J. (2012). Molecular mechanisms of seed dormancy. *Plan cell environ.* 35:769-1786.
53. Gutierrez-Luna, F.M., López-Bucio, J., Altamirano-Hernández, J., Valencia-Cantero, E., Reyes de la Cruz, H., Macías-Rodríguez, L. (2010). Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. *Symbiosis.* 51:75-83.
54. Haiyan, G., Peizhong, L., Xinxing, X., Qing, Z., Wenqiang, G. (2018). Research on Volatile Organic Compounds From *Bacillus subtilis* CF-3: Biocontrol Effects on Fruit

- Fungal Pathogens and Dynamic Changes During Fermentation. *Frontiers in Microbiology* 9:456. DOI.10.3389/fmicb.2018.00456
55. Hong, H.P., Zhang, H., Olhoft, P. et al. (2007). *Organogenic callus* as the target for plant regeneration and transformation via *Agrobacterium* in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 43, 558-568.
56. Hou, J., Liu, W., Wang, B., Wang, Q., Luo, Y., Franks, A.E. (2015). PGPR enhanced phytoremediation of petroleum contaminated soil and rhizosphere microbial community response. *Chemosphere.* 10.1016/j.chemosphere.2015.07.025.
57. Jain, R., Singh, S.P., Singh, A., Singh, S., Tripathi, P., Chandra, A. et al. (2016). Study on physio-biochemical attributes and metallothionein gene expression affected by chromium (VI) in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid). *J. Environ. Biol.* 37(3):375-382.
58. Jayaram, K., Prasad, M.N.V. (2009). Removal of Pb (II) from aqueous solution by seed powder of *Prosopis juliflora* D.C. *J. Hazard. Mater.* 169, 991-997.
59. Kabata-Pendias, A. (2010). Trace elements in soils and plants. 4th Ed. CRC Press.
60. Kalbitz, K., Wennrich, R. (1998). Mobilization of heavy metals and arsenic in polluted wetland soils and its dependence on dissolved organic matter. *Sci. Total. Environ.* 209, 27-39.
61. Kaszycki, P., Dubicka-Lisowska, A., Augustynowicz, J., Piwowarczyk, B., Wesołowski, W. (2018). *Callitriche cophocarpa* (water starwort) proteome under chromate stress: evidence for induction of a quinone reductase. *Environ Sci Pollut Res Int.* 25(9):8928-8942.
62. Khan, M.U., Sessitsch, A., Harris, M., Fatima, K., Imran, A., Arslan, M., Shabir, G., Khan, Q.M., Afzal, M. (2014). Cr-resistant rhizo- and endophytic bacteria associated with *Prosopis juliflora* and their potential as phytoremediation enhancing agents in metal-degraded soils. *Front. Plant. Sci.* 10.3389/fpls.2014.00755.
63. Khan, N., Martínez-Hidalgo, P., Ice, T. A., Maymon, M., Humm, E. A., Nejat, N., Hirsch, A. M. (2018). Antifungal Activity of *Bacillus* Species Against *Fusarium* and Analysis of the Potential Mechanisms Used in Biocontrol. *Frontiers in microbiology*, 9, 2363. doi:10.3389/fmicb.2018.02363

64. Kiser, M.A., Wesrehoff, P., Benn, T., Wang, Y., Perez-Rivera, J., Hristovski, K. (2009). Titanium Nanomaterial Removal and Release from Wastewater Treatment Plants. *Environ. Sci. Technol.* 43, 6757–6763.
65. Kotas, J., and Stasicka, Z. (2000). Chromium occurrence in the environment and methods of this speciation. *Environ. Pollut.* 107, 263-283.
66. Kottb, M., Gigolashvili, T., Grosskinsky, D. K., and Piechulla, B. (2015). Trichoderma volatiles effecting Arabidopsis: from inhibition to protection against phytopathogenic fungi. *Front. Microbiol.* 6:995. doi: 10.3389/fmicb.2015.00995
67. Kranner, I., Colville, L. (2011). Metals and seeds: Biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. *Environ Exp Bot.* 72:93-105.
68. Krebs, B., Höding, B., Kübart, S., Workie, M., Junge, H., Schmiedeknecht, G., Hevesi, M. (1998). Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. I. Activities and characterization of *Bacillus subtilis* strains / Anwendung von *Bacillus subtilis* als Mittel für den biologischen Pflanzenschutz. I. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 105(2): 181-197.
69. Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870-1874.
70. Lee, B., Farag, M.A., Park, H.B., Kloepper, J.W., Lee, S.H., Ryu, C.M. (2012). Induced resistance by a long-chain bacterial volatile: elicitation of plant systemic defense by a C13 volatile produced by *Paenibacillus polymyxa*. *PLoS One.* 7(11):e48744.
71. Li, Z., Gao, Y., Zhang, Y., Lin, C., Gong, D., Guan, Y., et al, (2018). Reactive oxygen species and gibberellin acid mutual induction to regulate tobacco seed germination. *Front Plant Sci.* 9:1279.
72. Liu, X.M., Zhang, H. (2015). The effects of bacterial volatile emissions on plant abiotic stress tolerance. *Front Plant Sci.* 6:774.
73. Liu, Y., Chen, L., Zhang, N., Li, Z., Zhang, G., Xu, Y., et al. (2016). Plant-microbe communication enhances auxin biosynthesis by a root-associated bacterium, *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. *Mol. Plant Microbe Interact.* 29, 324–330. doi: 10.1094/MPMI-10-15-0239-R
74. Lu, H., Wang, X., Zhang, K. et al. (2014). Identification and nematicidal activity of bacteria isolated from cow dung. *Ann Microbiol.* 64: 407.

75. Lu, J., Yang, F., Wang, S., Ma, H., Liang, J., Chen, Y. (2017). Co-existence of Rhizobia and Diverse Non-rhizobial Bacteria in the Rhizosphere and Nodules of *Dalbergia odorifera* Seedlings Inoculated with *Bradyrhizobium elkanii*, *Rhizobium multihospitium*-Like and *Burkholderia pyrrocinia*-Like Strains. *Front. Microbiol.* 8, 2255.
76. Ma, X., Wang, X. B., Cheng, J., Nie, X., Yu, X. X., Zhao, Y. T., et al. (2015). Microencapsulation of *Bacillus subtilis* B99-2 and its biocontrol efficiency against *Rhizoctonia solani* in tomato. *Biol. Control.* 90, 34–41. doi: 10.1016/j.biocontrol.2015.05.013
77. Mahar, M., Wang, P., Ali, A., Kumar, M., Hussain, A., Wang, Q., Li, R., Zhang, Z. (2016). Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: A review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 126, 111-121.
78. Marguá, E., Hidalgo, M., Queralt, I. (2007). XRF spectrometry for trace elements analysis of vegetation samples. *Spectrosc. Eur.* 19, 3-10.
79. Markert, B. (1987). Multielementanalytik: Mögliche Darstellungsweisen von Messdaten, *Fresenius Z. Anal. Chem.* 315, 327-329.
80. Marques, A.F., Queralt, I., Carvalho, M.L., Bordalo, M. (2003). Total reflection X-ray fluorescence and energy-dispersive X-ray fluorescence analysis of runoff water and vegetation from abandoned mining of Pb–Zn ores. *Spectrochimica Acta Part B: At. Spectrosc.* 58, 2191-2198.
81. Marques, A.P.G.C., Oliveira, R.S., Rangel, A.O.S.S., Castro, P.M.L. (2006). Zinc accumulation in *Solanum nigrum* are enhanced by different arbuscular mycorrhizal fungi. *Chemosphere.* 10.1016/j.chemosphere.2006.03.022.
82. Martínez-Pérez, A., López, P.A., Gil-Muñoz, A., Cuevas-Sánchez, J.A. (2012). Plantas silvestres útiles y prioritarias identificadas en la mixteca poblana, México. *Acta Bot. Mex.* 98, 73-98.
83. McLean, J.A., Acon, B.W., Montaser, A., Singh, J., Pritchard, D.E., Patierno, S.R. (2000). Determination of Chromium in Human Lung Fibroblast Cells Using a Large Bore—Direct Injection High-Efficiency Nebulizer with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Appl. Spectrosc.* 55, 659-663.

84. Megharaj, M., Avudainayagam, S., Naidu, R. (2003). Toxicity of hexavalent chromium and its reduction by bacteria isolated from soil contaminated with tannery waste. *Curr. Microbiol.* 47, 51–54.
85. Meldau, D. G., Meldau, S., Hoang, L. H., Underberg, S., Wunsche, H., Baldwin, I. T. (2013). Dimethyl disulfide produced by the naturally associated bacterium *Bacillus* sp B55 promotes *Nicotiana attenuata* growth by enhancing sulfur nutrition. *Plant Cell* 25, 2731–2747. doi: 10.1105/tpc.113.114744
86. Mench, M., Martin, E. (1991). Mobilization of cadmium and other metals from two soils by root exudates of *Zea mays* L., *Nicotiana tabacum* L. and *Nicotiana rustica* L. *Plant. Soil.* 10.1007/BF00010399.
87. Mokgalaka, N.S., Flores, E., Castillo, H., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey, J.L. (2008). Toxicity of Arsenic (III) and (V) on Plant Growth, Element Uptake, and Total Amylolytic Activity of Mesquite (*Prosopis juliflora* and *P. velutina*). *Inter. J. Phytorem.* 10, 47-60.
88. Morales, Y., Juárez, D., Aragón, C., Mascarua, M., Bustillos, R., Fuentes, L., Contreras, R., Muñoz, J. (2011). Growth response of maize plantlets inoculated with *Enterobacter* spp., as a model for alternative agriculture. *Rev. Argent. Microbiol.* 43, 287-93.
89. Mulligan, C.N., Yong, R.N., Gibbs, B.F. (2001). Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. *J. Hazard. Mater.* 85, 1–2.
90. Munzuroğlu, O., Zengin, F.K., Yahyagil, Z. (2008). The abscisic acid levels of wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Çakmak 79) seeds that were germinated under heavy metal (Hg⁺⁺, Cd⁺⁺, Cu⁺⁺) Stress. *G.U. J Sci.* 21(1):1-7.
91. Nicholas, K.B., Nicholas, J.H. (1997). “GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments,” Distributed by the authors.
92. Nilsson, S.I., Bergkvist, B. (1983). Aluminium chemistry and acidification processes in a shallow podzol on the Swedish westcoast. *Water. Air. Soil. Pollut.* 20, 311-329.
93. Nishimura, N., Tsuchiya, W., Morescom J.J., Hayashi, Y., Satoh, K., Kaiwa, N., et al. (2018). Control of seed dormancy and germination by DOG1-AHG1 PP2C phosphatase complex via binding to heme. *Nat Commun.* 9(1):2132.

94. Nivethitha, P., Thangavel, P., Prince, W.S.P.M., Subburam, V. (2002). Identification of heavy metal accumulating plants and their use in reclamation of soil contaminated with heavy metals. *Eco. Env. Cons.* 8, 249–251.
95. Panda, S.K., Choudhury, S. (2005). Chromium stress in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 17(1):95-102.
96. Park, H.B., Lee, B., Kloepper, J.W., Ryu, C.M. (2013). One shot-two pathogens blocked: Exposure of *Arabidopsis* to hexadecane, a long chain volatile organic compound, confers induced resistance against both *Pectobacterium carotovorum* and *Pseudomonas syringae*. *Plant Signal Behav.* 8:e24619.
97. Park, J.H., Choppala, G.K., Bolan, N.S. *et al.* (2011). Biochar reduces the bioavailability and phytotoxicity of heavy metals. *Plant. Soil.* 10.1007/s11104-011-0948-y.
98. Pérez, G., Tamariz, V., López, L., Hernández, F., Castelán, R., García, W.A., Díaz, A., Handal, A. (2018) Atoyac River Pollution in the Metropolitan Area of Puebla, México. *Water.* 10, 267-284.
99. Piechulla, B., Lemfack, M. C., and Kai, M. (2017). Effects of discrete bioactive microbial volatiles on plants and fungi. *Plant Cell Environ.* 40, 2042–2067.doi: 10.1111/pce.13011
100. Price, C.A., Clark, H.E., Funkhouser, E.A. (1972). Functions of micronutrients in plants. In *Micronutrients in Agriculture*, Soil Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin USA. 231 p.
101. Quintelas, C., Fernandes, B., Castro, J., Figueiredo, H., Tavares, T. (2008). Biosorption of Cr (VI) by a *Bacillus coagulans* biofilm supported on granular activated carbón (GAC). *Chem. Eng. J.* 136, 195–203.
102. Rajendran, G., Mistry, S., Desai, A.J. (2007). Functional expression of *Escherichia coli fhuA* gene in *Rhizobium* spp. of *Cajanus cajan* provides growth advantage in presence of Fe³⁺: Ferrichrome as iron source. *Arch. Microbiol.* 187, 257-264.
103. Rajkumar, M., Nagendran, R. (2005). Characterization of a novel Cr⁶⁺ reducing *Pseudomonas* sp. with plant growth-promoting potential. *Curr. Microbiol.* 50, 266–271.
104. Ramírez, V., Baez, A., López, P., Bustillos, R., Villalobos, M. Á., Carreño, R., ... Munive, J. A. (2019). Chromium Hyper-Tolerant *Bacillus* sp. MH778713 Assists Phytoremediation of Heavy Metals by Mesquite Trees (*Prosopis laevigata*). *Frontiers in microbiology*, 10, 1833. doi:10.3389/fmicb.2019.01833.

105. Rehman, A., Zahoor, A., Muneer, B., Hasnain, B. (2008). Chromium tolerance and reduction potential of a *Bacillus* sp. ev3 isolated from metal contaminated wastewater. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 81, 25–29.
106. Ryu, CM., Farag, M.A., Hu, CH., Reddy, MS., Kloepper, J.W., Paré, P.W. (2004). Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 134:1017-1026.
107. Ryu CM, Hu CH, Locy RD, Kloepper JW. (2005). Study of mechanisms for plant growth pro-motion elicited by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Soil.* 92:268-285.
108. Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Wei, H.X., Paré, P.W., et al., (2003). Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci.* 100, 4927-32.
109. Sajjad, A., Saeed, S., Bashir, M.A. (2012). Spatial variation in pollinator communities and productive performance of *Prosopis juliflora* (Fabaceae). *J. Poll. Ecol.* 8, 59–66.
110. Sbabou, L., Idir, Y., Bruneel, O., Le Queré, A., Aurag, J. (2016). Characterization of *Root-Nodule Bacteria Isolated from Hedysarum spinosissimum L, Growing in Mining Sites of Northeastern Region of Morocco*. *SOJ. Microbiol Infect. Dis.* [10.15226/sojmid/4/3/00156](https://doi.org/10.15226/sojmid/4/3/00156).
111. Schaeffer, A.B., Fulton, M. (1933). A simplified method of staining endospores. *Science* 77, 194.
112. Schell, D., Beermann, C. (2014). Fluidized bed microencapsulation of *Lactobacillus reuteri* with sweet whey and shellac for improved acid resistance and in-vitro gastrointestinal survival. *Food. Res. Int.* [10.1016/j.foodres.2014.03.016](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.016).
113. Schulz-Bohm, K., Martín-Sánchez, L., & Garbeva, P. (2017). Microbial Volatiles: Small Molecules with an Important Role in Intra- and Inter-Kingdom Interactions. *Frontiers in microbiology*, 8, 2484. doi:10.3389/fmicb.2017.02484
114. Senthilkumar, P., Prince, W.S., Sivakumar, S., Subbhuraam, C.V. (2005). *Prosopis juliflora*- a green solution to decontaminate heavy metal (Cu and Cd) contaminated soils. *Chemosphere.* 60, 1493–1496.
115. Sethuraman, P., Balasubramanian, N. (2010). Removal of Cr (VI) from aqueous solution using *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter cloacae*. *Int. J. Eng. Sci.* 2, 1811-1825.
116. Shanker, A.K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., Avudainayagam, S. (2005). Chromium toxicity in plants. *Environment International.* 31(5), 739-753. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.02.003>

117. Sharifi R, Ryu CM. (2018). Revisiting bacterial volatile-mediated plant growth promotion: lessons from the past and objectives for the future. *Ann Bot.* 122(3):349-358.
118. Shen, RF., and Ma, JF. 2001. Distribution and mobility of aluminium in an Al-accumulating plant, *Fagopyrum esculentum*. *Moench J Exp Bot.* 52, 1683-1687.
119. Simon, L., Balazsy, S., Balogh, A., Pais, I. (1990). Effect of titanium on the growth of *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium lupini* strains. *Acta. Microbiol. Pol.* 39, 51-57.
120. Slaski, J.J. (1994). Differences in the metabolic response of root tips of wheat and rye to aluminium stress. *Plant. Soil.* 167, 165-171.
121. Somasegaran, P., Hoben, H.J. (1994). *Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-Rhizobium technology.* Berlin: Springer-Verlag.
122. Song, C., Schmidt, R., de Jager, V., Krzyzanowska, D., Jongedijk, E., Cankar, K., et al. (2015b). Exploring the genomic traits of fungus-feeding bacterial genus *Collimonas*. *BMC Genomics* 16:1103. doi: 10.1186/s12864-015-2289-3
123. Srinath, T., Verma, T., Ramteke, P.W., Garg, S.K. (2002). Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. *Science for Environmental Technology. Chemosphere* 48, 427-435.
124. Tahir, H. A. S., Gu, Q., Wu, H., Raza, W., Hanif, A., Wu, L., et al. (2017). Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* SYST2. *Front. Microbiol.* 8:171. doi: 10.3389/fmicb.2017.00171
125. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol Evol.* 28, 2731-2739.
126. Tarangini, K., Kumar, A., Satpathy, G.R., Sangal, V.K. (2009). Statistical Optimization of Process Parameters for Cr (VI) Biosorption onto Mixed Cultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*. *Clean-Soil. Air. Water.* 10.1002/clen.20090033.
127. Taylor, G.J., Blarney, F.P., Edwards, D.G. (1998). Antagonistic and synergistic interactions between aluminum and manganese on growth of *Vigna unguiculata* at low ionic strength. *Physiol. Plant.* <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1998.1040206.x>.

128. Thacker, U., Madamwar, D. (2005). Reduction of toxic chromium and partial localization of chromium reductase activity in bacterial isolate DM1. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 891–899.
129. Thompson, J.D. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic. Acids. Res.* 25, 4876–4882.
130. Tissier, A., Morgan, J. A., and Dudareva, N. (2017). Plant volatiles: going ‘in’ but not ‘out’ of trichome cavities. *Trends Plant Sci.* 22, 930–938. doi: 10.1016/j.tplants. 2017.09.001
131. Ullah, A., Heng, S., Farooq, M., Fahad, S., Yang, X. (2015). Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: A review. *Environ. Exp. Bot.* 117, 28–40.
132. Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud ML, Touraine B, Moënne-Loccoz Y, Muller D, *et al.* (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front Plant Sci.* 4:356.
133. Van Dam, N. M., Weinhold, A., and Garbeva, P. (2016). “Calling in the dark: the role of volatiles for communication in the rhizosphere,” in *Deciphering Chemical Language of Plant Communication*, eds J. D. Blande and R. Glinwood (Cham:Springer International Publishing), 175–210.
134. Viamajala, S., Smith, W., Sani, R.K., Apel, W.A., Petersen, J.N., Neal, A.L. (2007). Isolation and characterization of Cr (VI) reducing *Cellulomonas* spp. from subsurface soils: Implications for long-term chromate reduction. *Bioresour. Technol.* 98, 612–622.
135. Vincent, J.M. (1970). *A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria.* Blackwell. Oxford.
136. Vishal B, Kumar PP. (2018). Regulation of Seed Germination and Abiotic Stresses by Gibberellins and Abscisic Acid. *Front Plant Sci.* 9:838.
137. Viti, C., Marchi, E., Decorosi, F., Giovannetti, L. (2014). Molecular mechanisms of Cr (VI) resistance in bacteria and fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 633-659.
138. Wallace, A., Alexander, G.V., Chaudhry, F.M. (1977). Phytotoxicity of cobalt, vanadium, titanium, silver and chromium. *Commun. Soil. Sci. Plant. Anal.* 8, 751-756.

139. Wang Y, Wang Y, Kai W, Zhao B, Chen P, Sun L, *et al.*, (2014). Transcriptional regulation of abscisic acid signal core components during cucumber seed germination and under Cu²⁺, Zn²⁺, NaCl and simulated acid rain stresses. *Plant Physiol Biochem.* 76:67-76.
140. Wang, C., Wang, Z., Qiao, X., Li, Z., Li, F., et al. (2013). Antifungal activity of volatile organic compounds from *Streptomyces alboflavus* TD-1. *FEMS Microbiol Lett.* 341:45–51.
141. Wang, L., Ji, B., Hu, Y., Liu, R., Sun, W. (2017). A review on in situ phytoremediation of mine tailings. *Chemosphere.* 184, 594-600.
142. Wang, S., Wu, H., Qiao, J., Ma, L., Liu, J., et al. (2009). Molecular mechanism of plant growth promotion and induced systemic resistance to tobacco mosaic virus by *Bacillus* spp. *J Microbiol Biotechnol.* 19:1250–1258.
143. Wedepohl, K.H. Ed., (1974). *Handbook of Geochemistry*, Springer-Verlag, Berlin.
144. Wen-Teish, C., Yu-Chung, C., Chia-Ling, J. (2007). Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish chitin wastes. *Bioresource Technology.* 98 (6): 1224-1230.
145. Wenke, K., Wanke, D., Kilian, J., Berendzen, K., Harter, K., and Piechulla, B. (2012). Volatiles of two growth-inhibiting rhizobacteria commonly engage AtWRKY18 function. *Plant J.* 70, 445–459. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04891.x
146. Widhalm, J. R., Jaini, R., Morgan, J. A., and Dudareva, N. (2015). Rethinking how volatiles are released from plant cells. *Trends Plant Sci.* 20, 545–550. doi: 10.1016/j.tplants.2015.06.009
147. Wintermans, P. C. A., Bakker, P. A. H. M., and Pieterse, C. M. J. (2016). Natural genetic variation in *Arabidopsis* for responsiveness to plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Mol. Biol.* 90, 623–634. doi: 10.1007/s11103-016-0442-2
148. Wu R.F.U, Xie, H., Xie, Y., Raza, S., Samad, T.W.A., Xuewen, G. (2017). Volatile organic compounds produced by a soil-isolate, *Bacillus subtilis* FA26 induce adverse ultra-structural changes to the cells of *Clavibacter michiganensis* ssp. *Sepedonicus*, the causal agent of bacterial ring rot of potato. *Microbiology.* 163. 10.1099/mic.0.000451.
149. Wuana, R.A., Okieimen, F.E. (2011). Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. *Commun. Soil. Sci. Plant. Anal.* 42, 111-122.
150. Xun, F., Xie, B., Lui, S. et al. (2015). Effect of plant growth-promoting bacteria (PGPR)

- and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculation on oats in saline-alkali soil contaminated by petroleum to enhance phytoremediation. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3396-4>.
151. Yamada, Y., Cane, D. E., and Ikeda, H. (2012). Diversity and analysis of bacterial terpene synthases. *Methods Enzymol.* 515, 123–162. doi: 10.1016/B978-0-12-394290-6.00007-0
152. Yamada, Y., Kuzuyama, T., Komatsu, M., Shin-Ya, K., Omura, S., Cane, D. E., et al. (2015). Terpene synthases are widely distributed in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 857–862. doi: 10.1073/pnas.1422108112.
153. Yıldız M, Terzi H. (2016). Proteomic analysis of chromium stress and sulfur deficiency responses in leaves of two canola (*Brassica napus* L.) cultivars differing in Cr (VI) tolerance. *Ecotoxicol Environ Saf.* 124:255-266.
154. Yogeswari, S., Ramalakshmi, S.N., and Muthu, J.M. (2012) identification and comparative studies of different volatile fractions from *Monochaetia kansensis* by GC-MS. *Global Journal of Pharmacology.* 6(2): 65-71.
155. Young, H.K., Dong, S.L., Kim, H.B. (2003). *Vibrio harveyi* is also a chromate reductase. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4390–4395.
156. Yuan, J., Raza, W., Shen, Q., Huang, Q., (2012). Antifungal Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 Volatile Compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *Applied and Environmental Microbiology.* 78(16); 5942–5944.
157. Yuan, J., Raza, W., Shen, Q., Huang, Q., (2012). Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *Appl Environ Microbiol.* 78:5942–5944.
158. Yuan, J., Zhao, M., Li, R., Huang, Q., Raza, W., Rensing, C., et al. (2017). Microbial volatile compounds alter the soil microbial community. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 22485–22493.
159. Zappala, M.N., Ellzey, J.T., Bader, J., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L. (2014). Effects of Copper Sulfate on Seedlings of *Prosopis pubescens* (Screwbean Mesquite). *Inter. J. Phytorem.* 16, 1031-1041.
160. Zhang, H., Kim, M.S., Krishnamachari, V., Payton, P., Sun, Y., Crimson, M., et al., (2007). Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta.* 226:839-851.

161. Zhang, H., Kim, M.S., Sun, Y., Dowd, S.E., Shi, H., Paré, P.W., (2008). Soil bacteria confer plant salt tolerance by tissue-specific regulation of the sodium transporter HKT1. *Mol Plant Microbe Interact.* 21(6):737-44.
162. Zhang, H., Murzello, C., Sun, Y., Kim, MS., Xie, X., Jeter, R.M., Zak, J.C., Dowd, S.E., Paré, P.W. (2010). Choline and osmotic-stress tolerance induced in *Arabidopsis* by the soil microbe *Bacillus subtilis* (GB03). *Mol Plant Microbe Interact.* 23(8):1097-1104.

FIGURAS SUPLEMENTARIAS
FIGURAS SUPLEMENTARIAS CAPÍTULO 1

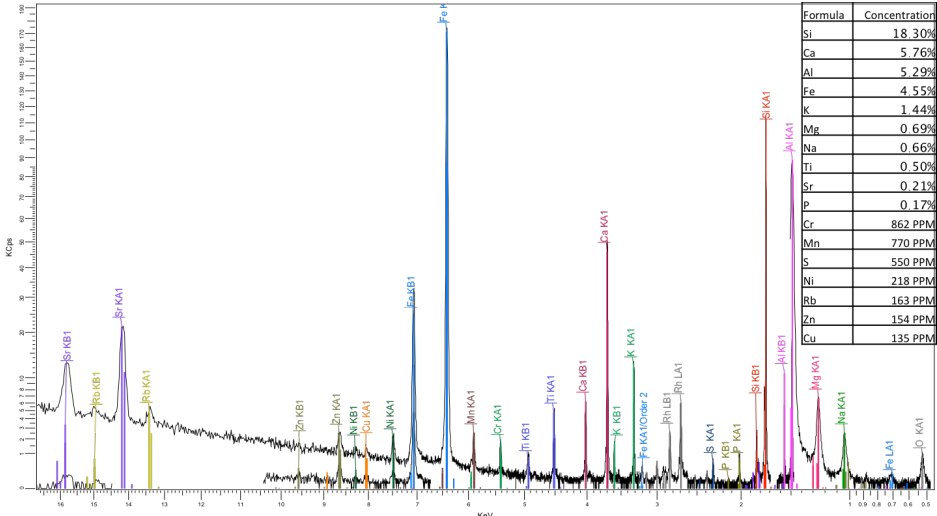


Fig S1. WDXRF (Wavelength Dispersive X-Ray Fluorescence) diffractograma que muestra el contenido de metales pesados en el sedimento de la región del río Nexapa.

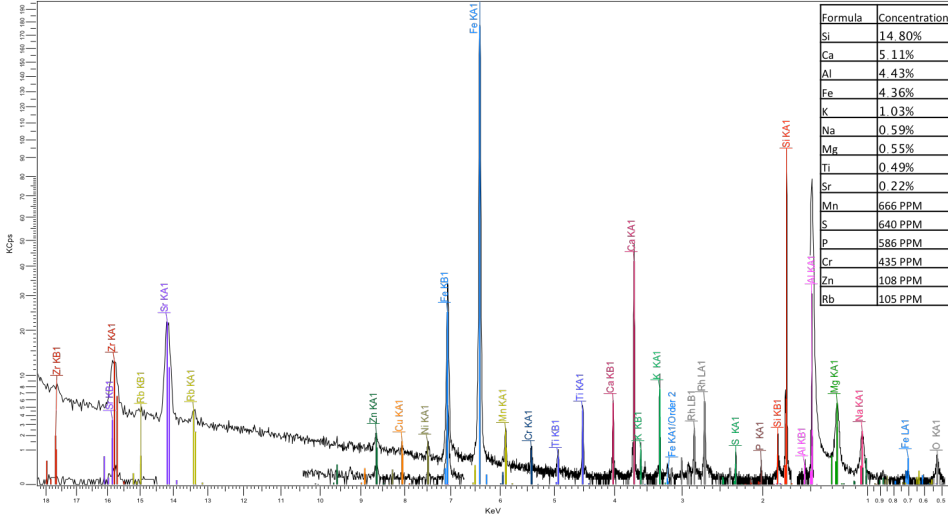


Fig S2. WDXRF (Wavelength Dispersive X-Ray Fluorescence) diffractograma que muestra el contenido de metales pesados del suelo no Rizosférico de la región del río Nexapa.

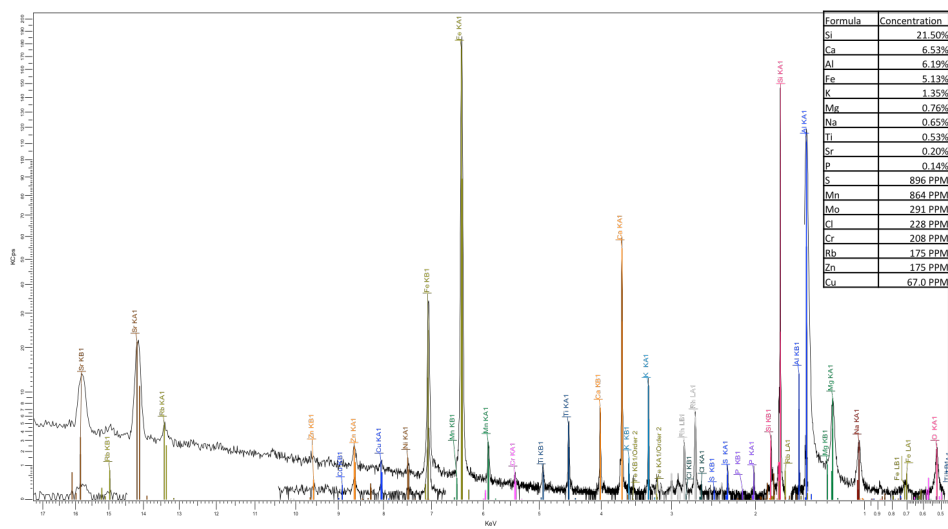


Fig S3. WDXRF (Wavelength Dispersive X-Ray Fluorescence) diffractograma que muestra el contenido de metales pesados del suelo Rizosférico de la región del río Nexapa.

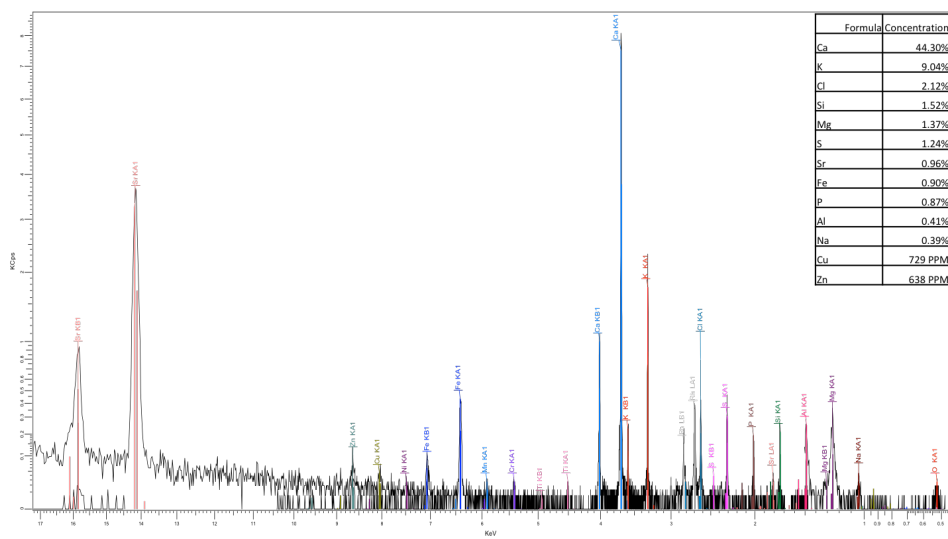


Fig S4. WDXRF (Wavelength Dispersive X-Ray Fluorescence) diffractograma que muestra el contenido de metales pesados de la raíz de *Prosopis laevigata*.

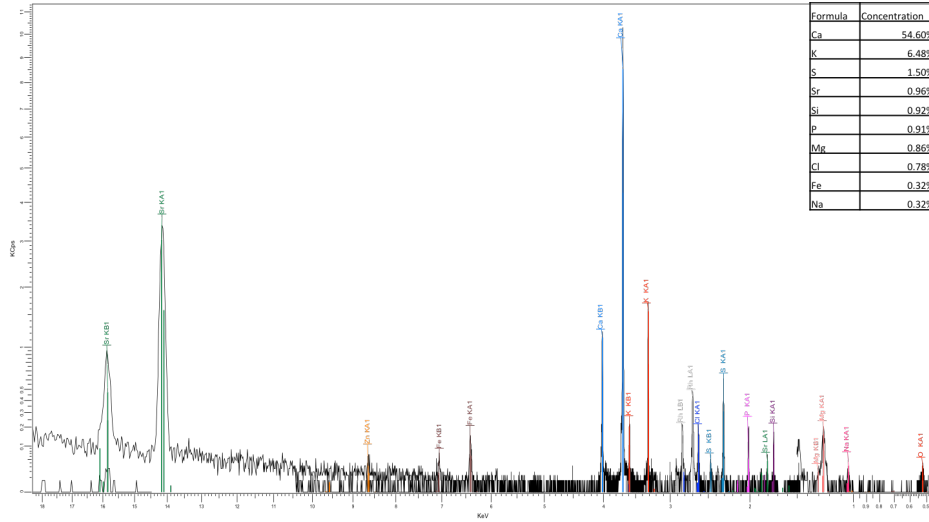


Fig S5. WDXRF (Wavelength Dispersive X-Ray Fluorescence) diffractograma que muestra el contenido de metales pesados del tallo de *Prosopis laevigata*.

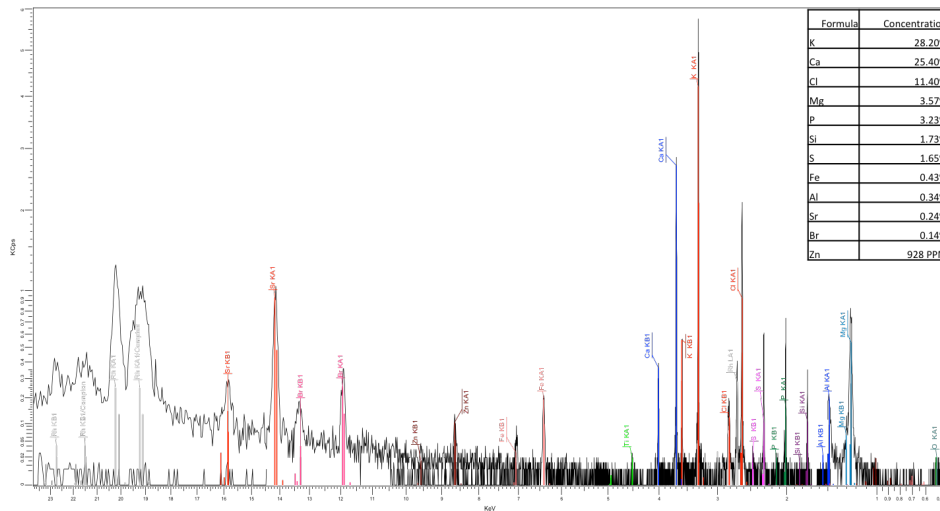


Fig S6. WDXRF (Wavelength Dispersive X-Ray Fluorescence) diffractograma que muestra el contenido de metales pesados de las hojas de *Prosopis laevigata*.

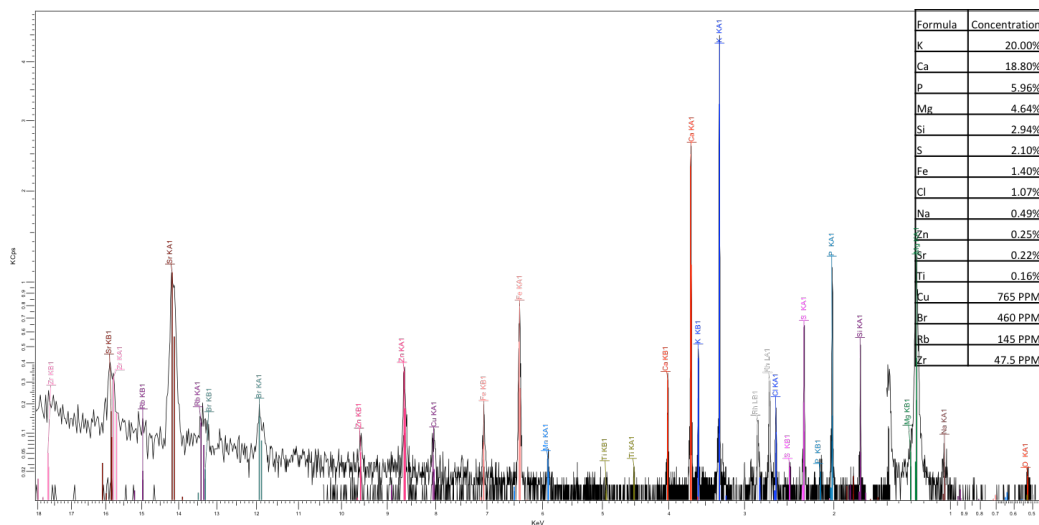


Fig S7. WDXRF (Wavelength Dispersive X-Ray Fluorescence) diffractograma que muestra el contenido de metales pesados de la vaina de *Prosopis laevigata*.

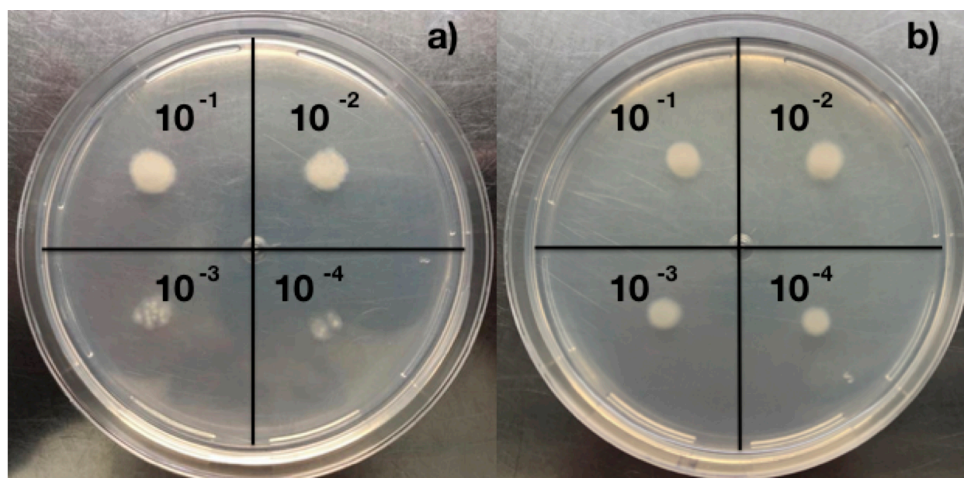


Fig S8. Tolerancia del aislado *Bacillus cereus* MH778713 a altas concentraciones de aluminio. a. muestra diferentes diluciones de la cepa de 10^{-1} a 10^{-4} sin aluminio, b. muestra diferentes diluciones de la cepa de 10^{-1} a 10^{-4} con aluminio a la concentración de 10000 mg/kg.

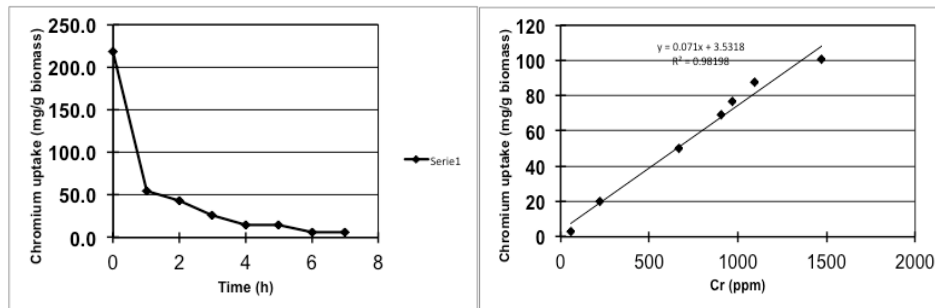


Fig S9. A. Captación de cromo VI a 218 mg/kg, B. Relación entre la concentración de cromo inicial y el máximo de captación de metal absorbido por el aislado *Bacillus cereus* MH778713.

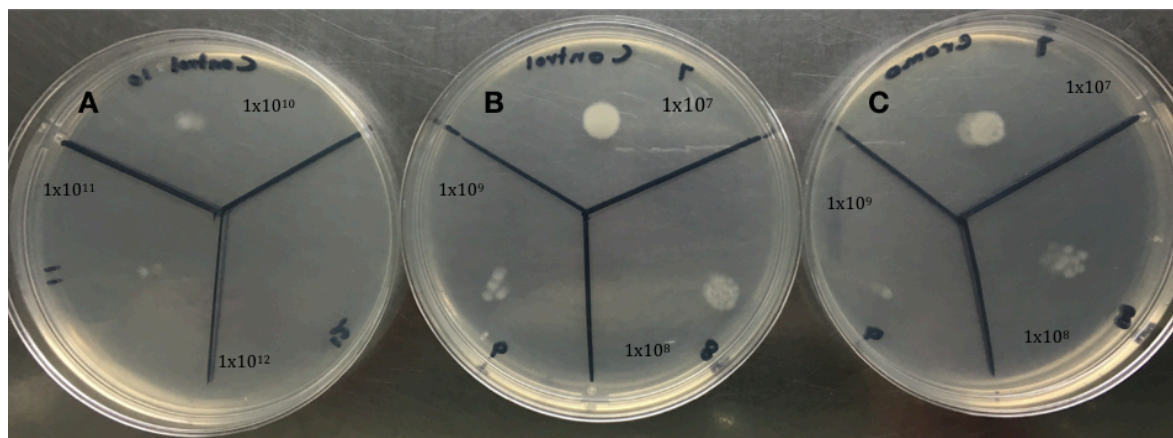


Fig S10. Supervivencia de las células de *Bacillus cereus* MH778713 en solución acuosa a 1474 mg/kg. de cromo VI A y B células al tiempo 0, C células después de un tratamiento con cromo VI durante 7 horas.

FIGURA SUPLEMENTARIA CAPÍTULO 2

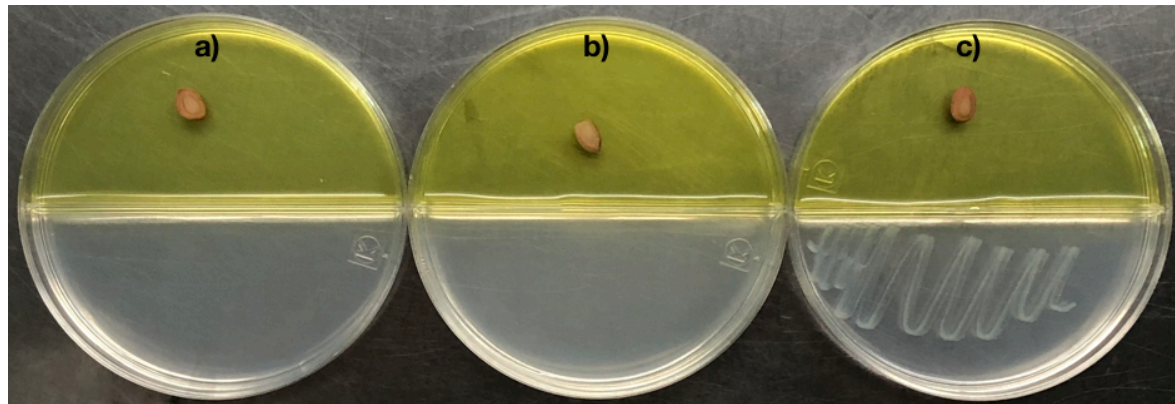


Fig. suplementaria 1. Se muestran los tres diferentes controles negativos usados en este trabajo. Semillas de *Prosopis laevigata* las cuales germinaron en placas bipartidas por 72h h a 28 °C en agar agua con 2500 mg L⁻¹ of cromo (VI) expuestas a 5 µl de benceno (b), *Escherichia coli* BL21 (DE3) (c), sin nada (a). Este análisis fue hecho por quintuplicado en tres experimentos diferentes.

TABLAS SUPLEMENTARIAS
TABLAS SUPLEMENTARIA CAPÍTULO 1

Tabla Sup1. Contenido de metales pesados en sedimento, suelo y tejidos de la árboles jóvenes de Mesquite. La concentración de metales pesados esta dada en mg/kg. El sedimento corresponde a las muestras del río Nexapa, el contenido del suelo rizosférico tomado a 300 metros de el río Nexapa, suelo no rizosférico las muestras fueron tomadas a 200 metros del río Nexapa y el suelo rizosférico tomado de el lugar de toma de muestra. Los valores de referencia de los metales pesados se muestran en las columnas R plant y R soil en la tabla (Kabata y Pendias. 2010).

Elemento	Sedimento (mg/Kg)	Suelo no rizosférico (mg/Kg)	Suelo Rizosférico (mg/Kg)	Raíz (mg/Kg)	Tallo (mg/Kg)	Hoja (mg/Kg)	Valores de referencia para plantas (mg/Kg)	Valores de referencia para suelos (mg/Kg)
Al	5.29 x10 ⁴	4.43 x10 ⁴	6.18 x10 ⁴	5700	2.06 x10 ⁴	4000	1x10 ³	1x10 ⁵
Fe	4.55x10 ⁴	4.36 x10 ⁴	5.13 x10 ⁴	5800	3.2 x10 ³	4200	1200	500
Ti	5 x10 ³	4.9 x10 ³	5.3 x10 ³	----	2900	-----	80	9x10 ³
Cr	862	435	208	----	-----	-----	0.2	50
Zn	154	108	174	939	427	<20	20	120
Cu	135	<20	66.9	<20	644	<20	1500	100
Ni	218	<20	-----	----	----	-----	100	90



Puebla, Pue. a 7 de noviembre 2019.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
PRESENTE.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Doctorado de la alumna **Verónica Liliana Ramírez Falcón**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:


"*Bacillus cereus* MH778713 asiste en la fitorremediación a *Prosopis laevigata* mediante la expresión de compuestos orgánicos volátiles"

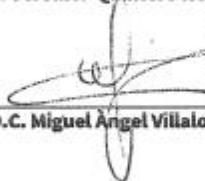
A nuestro juicio, la alumna **Verónica Liliana Ramírez Falcón** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.


Atentamente.
"Pensar Bien Para Vivir Mejor"


D.C. Verónica Quintero Hernández


D.C. Ricardo Carreño López


D.C. Miguel Ángel Villalobos López


D.C. Luis Ernesto Fuentes Ramirez


D.C. María del Rocío Bustillos Cristales

Posgrado en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522
posgrado_microbiologia@comen.buap.mx