



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS (ICUAP)

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)

Efecto de la presencia de *Bacillus thuringiensis* MH778713 en la germinación de *Arabidopsis thaliana* bajo condiciones de estrés causado por Cromo (VI).

ALUMNO:

Q.F.B Diego Morales Soriano

DIRECTORES:

Dr. José Antonio Munive Hernández

Dr. Verónica Liliana Ramírez Falcón

ASESORES DE TESIS:

Dr. Antonino Baez Rogelio

Dr. Carlos Alberto Contreras Paredes

Dr. Victor Rivelino Juárez González

Dr. Verónica Quintero Hernández

28 de Agosto del 2025

Tabla de contenidos

Introducción	4
Objetivo general	15
Objetivos específicos	15
Metodología	16
Resultados.....	20
Discusión de resultados.....	38
Conclusiones	47
Bibliografía	49



Puebla, Pue. a 5 de agosto 2025.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
P R E S E N T E.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de tesis de Maestría del alumno **Diego Morales Soriano**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

“Estudio de *Bacillus cereus* MH778713 como agente promotor del crecimiento vegetal en el modelo de *Arabidopsis thaliana* en condiciones de estrés oxidativo causado por cromo hexavalente (VI)”

A nuestro juicio, el alumno **Diego Morales Soriano** 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. Antonino Baez Rogelio

D.C. Víctor Rivelino Juárez González

D.C. Carlos Alberto Contreras Paredes

Introducción

La biorremediación es una estrategia que depende de la capacidad de los organismos para degradar, transformar o acumular contaminantes. Estos deben ser capaces de metabolizar los contaminantes a productos inocuos, inmovilizados o separados del sustrato en comparación con los métodos fisicoquímicos, esta técnica se considera más eficiente y con menor generación de efectos secundarios. Sin embargo, su aplicación práctica puede requerir procesos de preparación, escalamiento y soporte técnico especializado, lo que en algunos casos limita su accesibilidad o incrementa los costos (Liu *et al.*, 2018; Orberá *et al.*, 2014).

Entre los contaminantes que se pueden biodegradar con esta técnica se encuentran los solventes, plaguicidas, compuestos derivados del petróleo, pigmentos y metales pesados. Los metales pesados son contaminantes importantes del medio ambiente, su presencia y acumulación en los suelos se debe al uso desmesurado de agroquímicos, así como la industrialización y actividades antropogénicas tales como la minería, peletería y la industria automotriz.

El cromo es un metal tóxico que no tiene efectos benéficos dentro de los organismos vegetales, el aumento de la concentración de este metal en suelos es principalmente por contaminación, en la naturaleza se encuentra mayoritariamente como cromatos, sales de este elemento que presentan diferentes estados de oxidación de este metal, las más comunes son: cromo trivalente (Cr (III)) y cromo hexavalente (Cr (VI)), ambas especies son tóxicas, aunque el Cr (III) es menos nocivo, debido a que es insoluble y no es permeable a membranas; el Cr (VI) es el estado más nocivo para los microorganismos, plantas y animales, causando estrés oxidativo, cambios conformacionales en proteínas, daño al ADN y favoreciendo la síntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS), estas condiciones de toxicidad han sido ampliamente asociadas a la disminución del crecimiento vegetal y a la alteración de procesos fisiológicos en organismos vegetales, tales

como la inhibición de fotosíntesis y la captación de hierro (Kotas, 2000; Pande *et al.*, 2022; Singh *et al.*, 2013; Shanker *et al.*, 2005). *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) es una planta herbácea de pequeño tamaño y ciclo anual, nativa de Europa y Asia central. Aunque carece de relevancia económica como cultivo, *A. thaliana* ecotipo Columbia 0 es empleada como modelo de estudio, debido a su ciclo de vida corto, desarrollo en espacios pequeños, alta producción de semillas y un genoma pequeño en comparación con otros organismos vegetales y es ideal para evaluar aspectos metabólicos, así como aplicaciones en fitorremediación (Koorneef, *et al.*, 2004).

En México existen sitios contaminados con cromatos; uno de ellos está ubicado en el Estado de Puebla, donde se realizó un análisis de contaminantes en cuerpos de agua. En este estudio se detectó cromo (VI) en los ríos Alseseca y Atoyac, así como en la presa de Valsequillo, con concentraciones superiores a las permisibles. Se reportaron valores de 0.0631 mg/L para el río Alseseca, 0.0641 mg/L para el río Atoyac y 0.0659 mg/L para la presa de Valsequillo (Ortiz, 2015).

Bacillus es un género de bacterias Gram positivas con tiene forma de bastón, ampliamente estudiado por capacidades adaptativas Rehman *et al.*, (2008) reportó la capacidad de *Bacillus* para modificar el estado de reducción de otros metales demostrando que el género *Bacillus* es resistente a níquel (Ni), plomo (Pb), zinc (Zn), cobre (Cu), cadmio (Cd) y mercurio (Hg). Dentro de este género, *Bacillus thuringiensis* pertenece al grupo de *Bacillus cereus*. Es un microorganismo con potencial uso en la agricultura debido a la producción de toxinas con efecto insecticida.

En el estudio de Ramírez (2019) se reportó una bacteria que demostró tolerancia a Cr (VI), esta fue posteriormente identificada como *Bacillus thuringiensis* MH778713. Esta cepa fue aislada de las raíces de *Prosopis laevigata*, que creció en un área contaminada con metales pesados del río Nexapa, en Chietla, Puebla, México. Dentro de los metales presentes en el área se reportaron hierro (Fe), aluminio (Al), plomo (Pb), cadmio (Cd), zinc (Zn) y cromo (Cr).

Bacillus thuringiensis MH778713 es una bacteria tolerante a Cr (VI), también actúa como un microorganismo promotor de crecimiento vegetal (MPCV) favoreciendo la fijación de nitrógeno en plantas de *Prosopis laevigata* y *Arabidopsis thaliana* se encuentra asociado a raíces de plantas y optimizando la remoción de Cr (VI) (Singh *et al.*, 2019; Ramírez *et al.*, 2019). Los resultados de Ramírez *et al.*, (2019) demuestran que esta cepa muestra mayor tolerancia a cromo (VI) que otras bacterias reportadas previamente.

Los efectos de *Bacillus thuringiensis* MH778713 como promotor de germinación y crecimiento en *A. thaliana* y *Prosopis laevigata* se deben a la producción de compuestos orgánicos volátiles (VOCs). Estos metabolitos se caracterizan por su alta presión de vapor y baja solubilidad en agua, lo que facilita su difusión. La producción de VOCs es específica de cada microorganismo y, aunque no todos generan efectos benéficos de manera individual, su combinación puede promover el crecimiento, desarrollo y adaptabilidad de las plantas (Huang *et al.*, 2012).

Ramírez *et al.* (2020) evaluó el efecto de los VOCs emitidos por *B. thuringiensis* MH778713 bajo condiciones de estrés por Cr (VI), observando que las semillas de *A. thaliana* y *P. laevigata* expuestas a dichos compuestos lograron germinar, mientras que las no expuestas no lo hicieron. Es posible que esta interacción haya inducido cambios en la expresión génica que permitieron la germinación pese al estresor, aunque el mecanismo exacto aún se desconoce.

En este contexto, el presente estudio se planteó dilucidar los cambios en la expresión de genes asociados a rutas metabólicas que favorecen la germinación bajo la presencia de Cr (VI). Además, se ha reportado que los VOCs pueden modificar procesos fisiológicos como la absorción de hierro, sodio y auxinas, contribuyendo a la tolerancia de las plantas a condiciones adversas (Zhang *et al.*, 2007).

La producción de metabolitos secundarios como los VOCs ha sido estudiada por sus efectos benéficos en las plantas, ya que pueden favorecer la tolerancia frente a condiciones de estrés abiótico, incluyendo la exposición a metales pesados. Estos compuestos contribuyen a la inducción de enzimas relacionadas con procesos redox y a la síntesis de metabolitos no enzimáticos, como quelantes. Además, algunos metabolitos específicos, como ciertos azúcares, cumplen un doble papel: actúan como precursores metabólicos y como componentes estructurales (Lavid *et al.*, 2001).

Importancia de la toxicidad de Cr (VI)

El cromo (VI) no tiene función biológica en las plantas, el rango de toxicidad para los organismos vegetales es entre 5 – 100 mg/kg, su presencia en estos organismos causa mutaciones y efectos carcinogénicos (Whitacre, 2015). Los efectos de este metal en la célula son la inhibición de diversas rutas metabólicas, daño al ADN, inhibición y alteración de proteínas, peroxidación de lípidos y estrés oxidativo. (Singh *et al.*, 2013).

Los efectos tóxicos de cromo (VI) se deben a la formación de ROS e intermediarios de cromo (Cr V, Cr IV y Cr III), en condiciones normales estos intermediarios son reducidos por enzimas y compuestos detoxificantes, pero la presencia de las ROS y los intermediarios pueden sobrepasar la respuesta de enzimas (Cheng *et al.*, 2009), como resultado los intermediarios de cromo afectan rutas metabólicas como cadena transportadora de electrones y fotosíntesis, así como la disponibilidad de NADH y FADH, secuestrando los electrones e inhibiendo a sus transportadores (Singh *et al.*, 2013).

La reducción extracelular de cromo es un mecanismo de resistencia independiente a los mecanismos de respuesta para detoxificación, este ocurre en la membrana celular de las bacterias, uno de los mecanismos sugeridos para esta es la reducción de Cr (VI) por medio de una reductasa soluble dependiente de NADH, este mecanismo es considerado predominante en bacterias desarrolladas bajo condiciones aerobias (Cheung, 2007); esta estrategia protege a la célula de

la interacción de cromo con su material genético, a su vez es un mecanismo energéticamente óptimo en comparación a la reducción de cromo intracelular (Whitacre, 2015; Cheung, 2007).

Otra de las estrategias para la reducción de cromo que ocurren en la membrana celular es la reducción de Cr (VI) a Cr (III) a través de la familia de enzimas cromato reductasas, las cuales están ligadas a NADH como transportador de electrones, la expresión de esta enzima está ligada a la presencia de ROS y cromo (Ramírez-Díaz *et al.*, 2008), otro de los mecanismos en membrana que permiten la reducción de cromo hexavalente es la unión a grupos funcionales en membrana, como

ácidos orgánicos, ésteres y amidas, los cuales aumenta su concentración en presencia de Cr (VI) (Mangaiyarkarasi *et al.*, 2011).

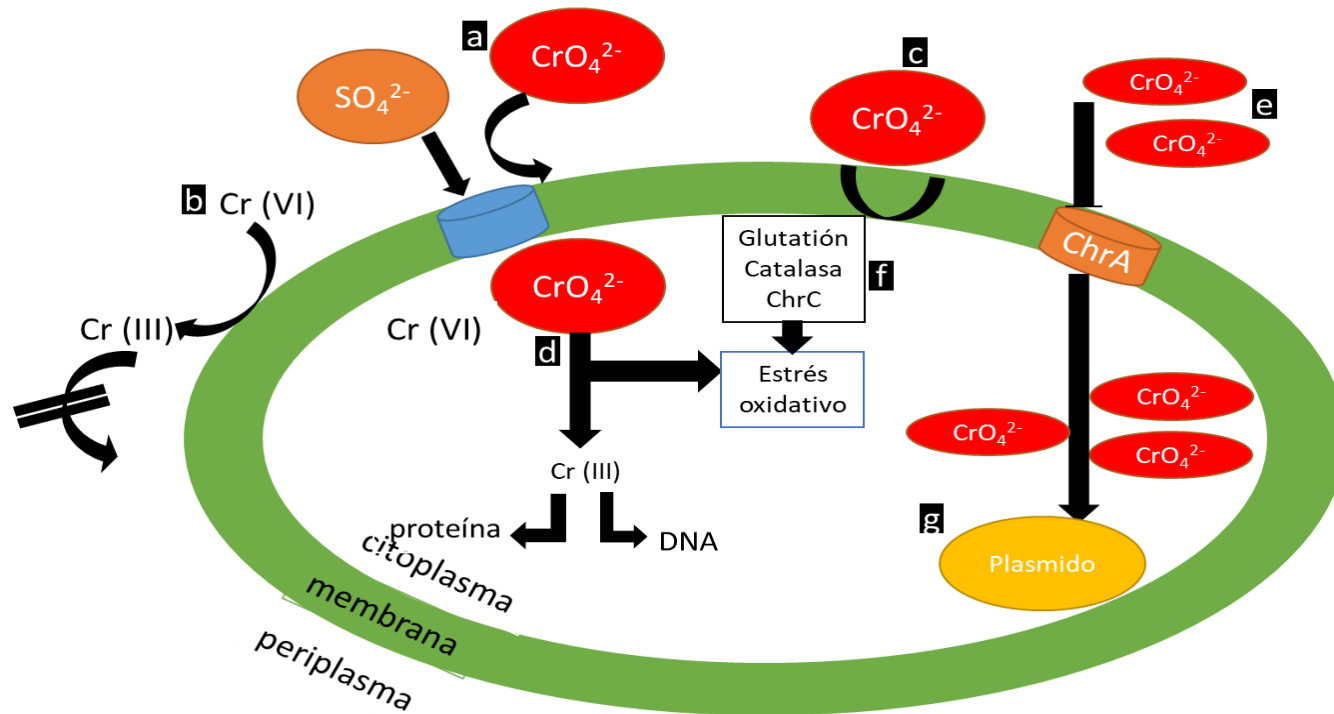


Figura 1. Mecanismos para la detoxificación de cromo (VI) en bacterias. A) La entrada de cromo (VI) a la célula ocurre por los transportadores de sulfato. B) Reducción extracelular de cromo (VI) a cromo (III). C) Acción de cromato reductasa en la membrana. D) La reducción de cromo (VI) a (III) causa la formación de ROS, generando estrés oxidativo que causa daños a ADN y proteínas. E) Flujo de cromatos a citoplasma por ChrA. F) Enzimas detoxificantes de ROS. G) Sistemas de reparación de ADN contra especies de cromo. (Whitacre, (2015).

Los mecanismos de resistencia descritos anteriormente, serán abordados en orden, el primero de ellos es la entrada de Cr (VI) a la célula, ocurre debido a la interacción con los transportadores de hierro y sulfatos, a través de transporte pasivo, como resultado existe la acumulación celular (Brown *et al.*, 2006). Además de esto, las enzimas reductoras de hierro y sulfatos tienen un papel indirecto en la reducción de Cr (VI), ya que, en el caso de las enzimas reductoras de hierro tienen una mayor velocidad de reacción respecto a las enzimas reductoras de cromatos, y en el caso de las enzimas de sulfatos su actividad permite la formación de sulfitos (S_2H), la acción de ambas enzimas permiten degradar a Cr (VI) obteniendo Cr (III), en este proceso se evita la formación de intermediarios oxidativos de cromo, disminuyendo la formación de ROS (**Figura 1**) (Whitacre, 2015).

Posterior a la entrada de Cr (VI), la reducción intracelular de Cr (VI) a Cr (III) mantiene la concentración citoplásmica de Cr (VI) baja y facilita la acumulación de cromatos desde el medio extracelular a la célula (Whitacre, 2015). A pesar de la existencia de enzimas especializadas en la reducción de Cr (VI), otros compuestos de la célula ayudan en la reducción, como NADH, flavoproteínas y compuestos quelantes, estos procesos de reducción tienen como resultado la formación de especies de cromo (V), (IV) y ROS, las cuales disminuyen la actividad de enzimas oxido reductasas acaparando el flujo de electrones para su degradación. La habilidad de contrarrestar el daño a material genético, proteínas y pared celular depende de enzimas detoxificantes de ROS, como YieF, lipoil deshidrogenasa, glutatión, superóxido dismutasa, catalasa y ChRr (**Figura 1**) (Ackerley *et al.*, 2004; Ramírez-Díaz *et al.*, 2008).

Además de la actividad de enzimas detoxificantes, la presencia de compuestos no enzimáticos antioxidantes, como carotenoides, tocoferoles, flavonoides y ascorbatos ayudan a contrarrestar el efecto de las ROS, interactuando con estos e inactivándolos, a bajas concentraciones inhiben o retrasan los procesos oxidativos deteniendo la reacción de Fenton, los

antioxidantes también son agentes quelantes que pueden interacciones con los iones responsables de generar ROS (Ramírez-Díaz *et al.*, 2008).

Finalmente, después de la reducción de Cr (VI) a Cr (III), el cromo trivalente es expulsado al medio extracelular, este proceso ocurre a través de la enzima transportadora de cromatos A (ChrA), donde a través de vesículas, es transportado al medio extracelular, para la función de esta enzima la se necesita de un gradiente de electrones (Ackerley *et al.*, 2004).

Una de las razones para el estudio de los mecanismos de tolerancia y reducción de Cr (VI) es la búsqueda y explicación de las estrategias para la tolerancia de dicho estresor en diversos microorganismos; De los cuales existen reportes de organismos aislados en sitios contaminados con este metal, como es el caso de la investigación de Francisco *et al.* (2002), donde se aislaron bacterias capaces de tolerar y reducir a Cr (VI), dentro de las cuales se identificaron bacterias pertenecientes a los géneros *Acinetobacter* y *Ochrobactrum*; Así como *Aureobacterium esteroaromaticum*, *Clavibacter michiganensis* y *Cellulomonas flavigena* dentro de las cuales se reportaron diferencias en los mecanismos y resistencias a Cr (VI), resaltando la diversidad de estrategias para la adaptación a este estresor.

Señalización y efectos de ácido abscísico (ABA) como respuesta a estresores

El ácido abscísico (ABA) es un ácido débil de 15 carbonos (PUBCHEM CID: 643732) que actúa como hormona vegetal, regulando múltiples procesos de crecimiento y desarrollo, como maduración, dormancia y germinación de semillas, división y elongación celular (Finkelstein, 2013; Kim *et al.*, 2025). En condiciones normales se conoce que inhibe el crecimiento y promueve la maduración y envejecimiento ABA se mantiene en niveles bajos, pero se acumula rápidamente cuando los organismos vegetales detectan estresores, funcionando como señal química de alerta (Zhao *et al.*, 2021).

La síntesis de ABA se lleva a cabo mediante dos rutas: la ruta directa, que produce compuestos menores a 15 carbonos, y la ruta indirecta a partir de carotenoides (Chen *et al.*, 2019). Entre los precursores de carotenoides se incluyen isoprenil pirofosfato (IPP), farnesil difosfato (C15) y geranilgeranil difosfato (C20), que también sirven como precursores para otras fitohormonas como citoquininas, brasinosteroides y giberelinas (Chen *et al.*, 2020).

ABA regula la expresión de factores de transcripción clave, como AREB2, AREB3, ABI5, bZIP15 y Bzip67, los cuales participan en procesos de latencia y adaptación al estrés (Fujita *et al.*, 2005). Para mantener niveles hormonales equilibrados, la planta regula simultáneamente el anabolismo y catabolismo de ABA. El catabolismo incluye la conjugación e hidroxilación de ABA, que puede ser glucosilado por UDP-glucosiltransferasa (UGT) codificada por UGT71C5, o convertido en ácido faseíco (PA) por citocromo P450 monooxigenasa (Liu *et al.*, 2015).

La señalización de ABA es iniciada por su reconocimiento por receptores intracelulares PYLs (componentes similares a pyrobactin resistance 1). Al unirse a ABA, los PYLs forman complejos con proteínas fosfatasa del clado A (PP2Cs), lo que libera la inhibición sobre cinasas dependientes de calcio (SnRK2/3/6/7/8/CDPK). En condiciones normales, estas cinasas están inhibidas por ABI1/PP2C, evitando la activación de genes río abajo. La acumulación de ABA y su unión a PYLs induce la activación de RCARs (Componentes reguladores de receptores de ABA) y aumenta los niveles de ROS, modulando la fosforilación de SnRK2/3/6/7/8/CDPK y desencadenando la expresión de genes de respuesta al estrés (Kumar *et al.*, 2019; **Figura 2**).

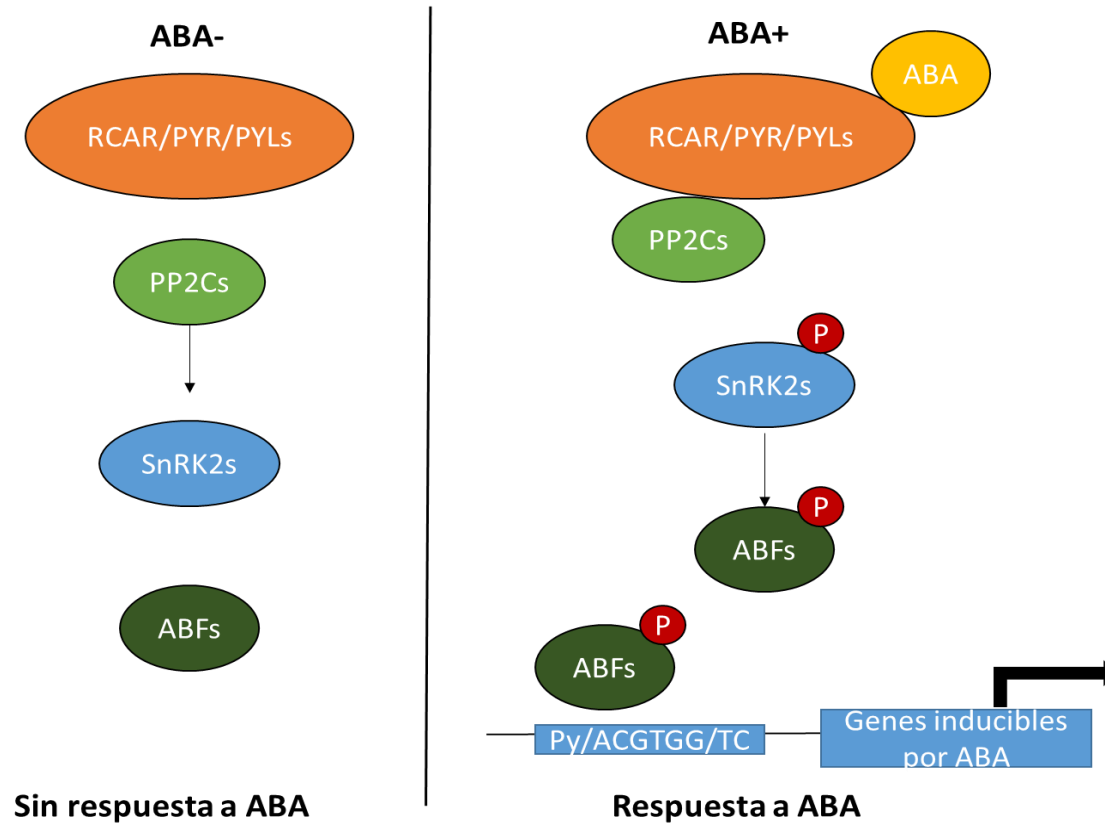


Figura 2. Mecanismo de señalización de ABA. Bajo condiciones de estrés abiótico, los niveles de ABA y ROS aumentan, lo que activa la acumulación de calcio citosólico mediado por óxido nítrico, la activación de este mecanismo es mediado por la fosforilación de cinasas, lo que desencadena la activación de genes de respuesta al estrés (Fernando, 2016).

La modulación de ABA es crítica para la regulación de procesos de defensa y crecimiento. Esta fitohormona está involucrada en diversos procesos como cierre estomático, acumulación de ceras, germinación, regulación osmótica e

inhibición de crecimiento (Xiong, 2003). Los organismos vegetales acumulan ABA rápidamente cuando son expuestos a diferentes condiciones ambientales, y el mantenimiento de los niveles de esta fitohormona es consistente en diversas partes de los tejidos vegetales de acuerdo a los estadios de crecimiento y desarrollo de las plantas (Chen *et al.*, 2020).

Durante los procesos metabólicos de las plantas, ABA se acumula y activa mecanismos de respuesta a estresores, principalmente relacionados con estrés osmótico. En el proceso de señalización durante estrés, los estresores abióticos aumentan los niveles de ABA y ROS, y estos niveles de ROS activan la concentración de calcio citosólico mediante óxido nítrico (Munemasa *et al.*, 2013).

En *Arabidopsis*, los genes codificantes para proteínas relacionadas con tolerancia a estresores incluyen enzimas detoxificantes de ROS, oxidorreductasas, factores de transcripción, proteínas cinasas y fosfatasa (Cutler *et al.*, 2010). Debido al papel de ABA como inductor de respuesta a estresores, se cree que este compuesto tiene un papel relevante como segundo mensajero y en la señalización (Zhao *et al.*, 2021).

Existen microorganismos capaces de producir VOCs que pueden actuar como precursores en la síntesis de fitohormonas o causar un efecto similar. El género *Bacillus* es conocido por la producción de compuestos como cetonas, alcoholes, terpenoides, alquenos, aldehídos, ésteres, ácidos grasos y compuestos fenólicos, con diversas actividades biológicas, incluyendo actividad antimicrobiana y antifúngica (Koilybayeva *et al.*, 2023). La variedad de compuestos con actividad de VOCs dentro de los microorganismos se debe a sus rutas metabólicas, ya que estos son sintetizados como intermediarios metabólicos, esenciales para el crecimiento bacteriano, producción de energía y síntesis de compuestos estructurales (Koilybayeva *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2021).

La actividad biológica de las fitohormonas, como el ácido abscísico (ABA) y el etileno, está relacionada con su capacidad para regular procesos fisiológicos como el crecimiento, la germinación y la respuesta al estrés. En el estudio de Galka *et al.* (2015) se demostró que el ABA puede interactuar con la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO). Esta interacción se debe a la disposición tridimensional de los grupos funcionales carboxilo, cetona e hidroxilo, y fue corroborada mediante cristalografía. Como resultado, se observó que el ABA puede modificar la actividad de RuBisCO, afectando la eficiencia de la fijación de carbono en condiciones de estrés.

Hipótesis

La presencia de *Bacillus thuringiensis* MH778713 favorecerá el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* y conferirá tolerancia al cromo hexavalente, al inducir respuestas adaptativas de la planta y mejorar la interacción planta-microorganismo.

Objetivo general

- Estudiar el efecto de la presencia de *Bacillus thuringiensis* MH 778713 en la germinación de *Arabidopsis thaliana* bajo condiciones de estrés causado por cromo (VI).

Objetivos específicos

1. Determinar la capacidad de *Bacillus thuringiensis* MH778713 para promover la germinación de *Arabidopsis thaliana* bajo condiciones de estrés causado por cromo (VI).
2. Identificar y analizar los cambios en la expresión de genes del metabolismo de carbohidratos, lípidos, aminoácidos y del metabolismo de fitohormonas en *A. thaliana* bajo condiciones de estrés causado por cromo (VI).
3. Determinar la producción de compuestos orgánicos de *Bacillus thuringiensis* MH778713, que pudieran promover la germinación de *Arabidopsis thaliana* bajo condiciones de estrés causado por cromo (VI).

Metodología

En este trabajo se analizaron los cambios en la expresión de genes de *A. thaliana* ecotipo Columbia 0 en respuesta a 100 mg/L de cromo hexavalente. El análisis de estos genes se realizó mediante herramientas bioinformáticas para la identificación de diferencias significativas en presencia del estresor.

Escarificación y germinación de las semillas de *Arabidopsis thaliana* en agar

La escarificación de las semillas se llevó a cabo en un tubo de 1.5 mL, en el cual se colocaron 150 semillas de *A. thaliana* ecotipo Columbia 0, las cuales se lavaron con 100 µL de tween 20 y 900 µL de agua destilada estéril, se agitaron en el

vortex durante 1 min y se retiró el sobrenadante con una micropipeta de 1000 μ L suavemente, después se lavó 10 veces con 900 μ L de agua destilada estéril hasta que ya no existiera ningún rastro de espuma dentro del tubo. Las semillas se colocaron en placas de Petri con agar agua 75% (v/v) a las cuales se les adicionaron diferentes concentraciones de (cromato de potasio) de 0-100 mg/Kg, usando en cada ensayo como control positivo placas sin cromo. Las placas se colocaron en una estufa de incubación de calor de convección de la Marca VELP en oscuridad para favorecer la germinación de las semillas durante 48 horas a 28°C.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de la germinación de *Arabidopsis thaliana*

La determinación de la MIC se realizó exponiendo a las semillas escarificadas de *A. thaliana* a diferentes concentraciones de Cr (VI) de 0-100 mg/Kg (de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mg/Kg), hasta identificar la MIC de la germinación de las semillas. Estos ensayos se realizaron por triplicado (3 placas con 5 semillas cada una). La germinación de las semillas de *A. thaliana* se inhibió a la concentración de 100 mg/Kg.

Limpieza de secuencias de microarreglos

El análisis de la expresión genética de *A. thaliana* en las condiciones de los arreglos (Ctrl vs. Cr), (Ctrl vs Cr + Bacillus) y (Cr vs Cr + Bacillus), se llevó a cabo a través de microarreglos mediante el servicio provisto por el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Se utilizó el chip Affymetrix Arabidopsis ATH1 Genome Array (versión 3), para la identificación de los genes con sobreexpresión se utilizó el fluoroforo Alexa 555, para los reprimidos se utilizó Alexa 647, la lista de genes se manejó con el criterio de corte de $\text{Log} \pm 2$, utilizando un Z-score ≥ 2 . Se obtuvieron 810 genes sobre expresados (UP) y 423 genes reprimidos (DOWN) con un total de 1233 genes diferencialmente expresados, cada una de estas secuencias se buscó en la base de datos de NCBI y se obtuvo la secuencia en formato FASTA.

Clasificación y análisis de secuencias de microarreglos

A partir de las secuencias de los genes diferencialmente expresados se obtuvieron las secuencias de aminoácidos mediante la plataforma KEGG. Con la herramienta BRITe se clasificaron los genes codificantes en categorías de metabolismo. Con base en esta clasificación se elaboraron gráficas que muestran la distribución de genes en cada categoría metabólica y su variación bajo las distintas condiciones evaluadas. Para facilitar el manejo de las secuencias, se organizaron tablas en Excel donde se identificaron los genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos, lípidos, aminoácidos y fitohormonas. Las gráficas se generaron en **Excel** a partir de estas tablas, lo que permitió identificar alteraciones en la expresión génica asociadas a la exposición a cromo (VI) y a la interacción con *Bacillus thuringiensis* (Kanehisa *et al.*, 2015).

Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (DAVID)

Se realizó la búsqueda de genes relacionados a las condiciones de los arreglos (Ctrl vs. Cr), (Ctrl vs Cr + Bacillus) y (Cr vs Cr + Bacillus), mediante la herramienta DAVID, donde se reportó un agrupamiento de genes relacionados al metabolismo de fitohormonas (Huang *et al.*, 2009).

Obtención de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) producidos por *Bacillus thuringiensis* MH778713 en presencia de semillas de *Arabidopsis thaliana* expuestas a Cr (VI)

El montaje experimental se realizó de acuerdo con la metodología de Ramírez *et al.* (2020), con modificaciones para la obtención de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) producidos por *Bacillus thuringiensis* MH778713 en condiciones de estrés por Cr (VI). Previamente a la inoculación se realizaron perforaciones en los costados de las placas bipartidas, las cuales fueron selladas con cinta parafilm y micropore para evitar contaminación. Las placas se incubaron a 25 °C durante un periodo de 72 a 120 horas, correspondiente al tiempo que requieren las semillas de *Arabidopsis thaliana* para germinar.

El lavado de semillas de *A. thaliana* se realizó colocando semillas en un tubo estéril, al cual se adicionaron 900 μL , posteriormente se añadió 100 μL de Tween 20 al 2% por 1 minuto, se mezcló y retiró el sobrenadante, se realizaron 10 lavados con agua destilada estéril.

Posterior al lavado de las semillas estas se colocaron en placas Petri bipartidas con agar agua – Cr, agar agua y agar extracto de levadura manitol (YMA), en el lado de las placas con agar agua y agua – Cr se colocaron 5 semillas de *A. thaliana*, se refrigeraron por 24 horas, posteriormente se inoculó una placa de agar agua – Cr con *Bacillus thuringiensis* MH778713 en el medio YMA.

Extracción de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) y análisis por GC-MS

La extracción de los VOCs producidos durante la germinación de las semillas de *A. thaliana* se realizó después de 120 horas posterior a la germinación de las semillas, para la extracción se utilizaron jeringas estériles de 5 mL, se retiró la cubierta de cinta micropore e inyectó benceno utilizando jeringas para cada lado de las placas bipartidas, sin retirar la jeringa de la placa de Petri se mezcló durante 1 minuto y aspiró el benceno, posteriormente se recolectó en microtubos, los microtubos fueron mezclados en vortex por 10 minutos y posteriormente se centrifugaron a 13000 rpm por 5 minutos, dos veces, el sobrenadante fue recolectado para su análisis en cromatografía de masas acoplada a espectro de masas (GC-MS). Se utilizaron columnas Agilent HP-5ms (30 m de largo, 0.25 mm i.d., 0.25 μm de grosor). La temperatura inicial fue 40°C y se mantuvo por 5 minutos, después subió a un ritmo de 15°C/min a 240°C y se mantuvo por 6.667 minutos, por un tiempo de corrida total de 25 minutos. El gas de arrastre fue helio a un ritmo de 1.2 mL/minuto. El cromatógrafo de gas/detector selectivo de masas Agilent 5975C se operó en el modo de ionización de electrones a 70eV, con una temperatura base de 220°C con un escaneo continuo de m/z de 50 a 500. Las muestras fueron analizadas mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en el laboratorio de Catálisis de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP.

Resultados

En respuesta a la exposición de 100mg/L de Cr (VI), se identificaron cambios significativos en la expresión génica de *A. thaliana* ecotipo Columbia 0, el uso de herramientas bioinformáticas permitió reconocer genes diferencialmente expresados.

Expresión diferencial de genes de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a estrés causado por cromo hexavalente

En respuesta a la exposición a 100 mg/L de Cr (VI), se identificaron cambios significativos en la expresión génica de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia 0.

Expresión diferencial de genes de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a estrés por cromo hexavalente

El análisis de expresión mostró que, al comparar las diferentes condiciones experimentales, se detectaron genes diferencialmente expresados tanto con incremento (sobreexpresados) como con disminución (subexpresados) en su nivel de transcripción. En la comparación Control vs. Cr (VI) se identificaron 43 genes sobreexpresados y 31 subexpresados; en Control vs. Cr + *Bacillus* se encontraron 67 sobreexpresados y 38 subexpresados; mientras que en Cr (VI) vs. Cr + *Bacillus* se observaron 46 sobreexpresados y 46 subexpresados.

La clasificación funcional de estos genes mostró su agrupamiento en categorías relacionadas con procesos generales del metabolismo, incluyendo el metabolismo de carbohidratos, aminoácidos, lípidos y fitohormonas (Figura 3). Esta representación gráfica permitió visualizar la distribución de genes asociados a distintas funciones celulares en cada una de las comparaciones realizadas. De manera complementaria, se elaboraron tablas de datos (Figura 4) que incluyen el

agrupamiento funcional de los genes diferencialmente expresados junto con el nombre de la enzima codificada, su función y el valor de Z-score asociado.

Tabla 1. Tabla de condiciones de comparación de microarreglos.

Chip	Alexa 555	Alexa 647
AthV3_06_27	Control (semilla sin cromo)	Semilla con cromo
AthV3_06_28	Control (semilla sin cromo)	Semilla con cromo y <i>Bacillus</i>
AthV3_06_29	Semilla con cromo	Semilla con cromo y <i>Bacillus</i>

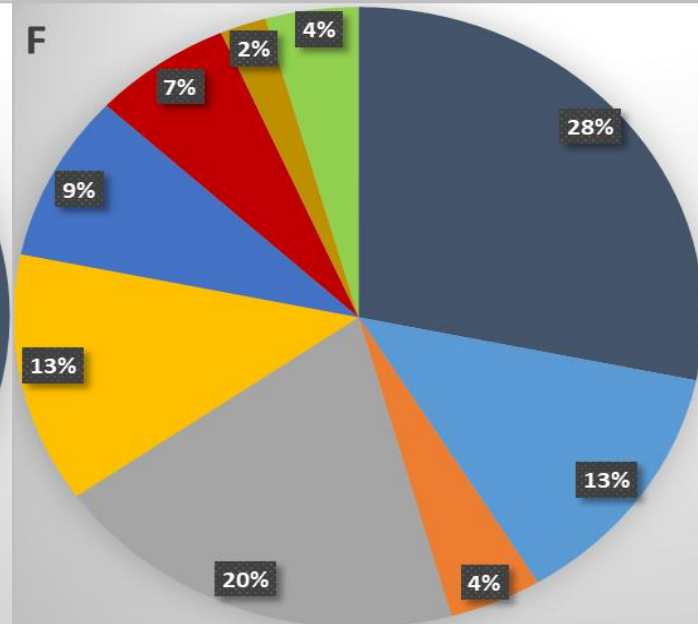
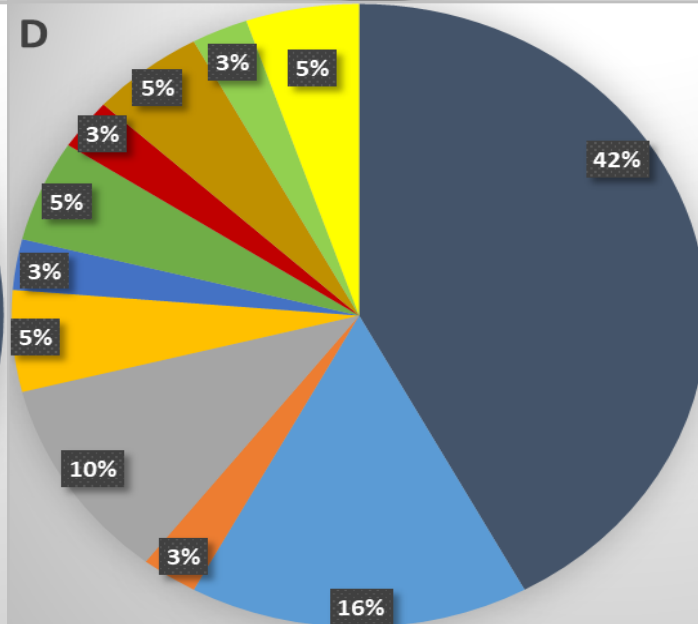
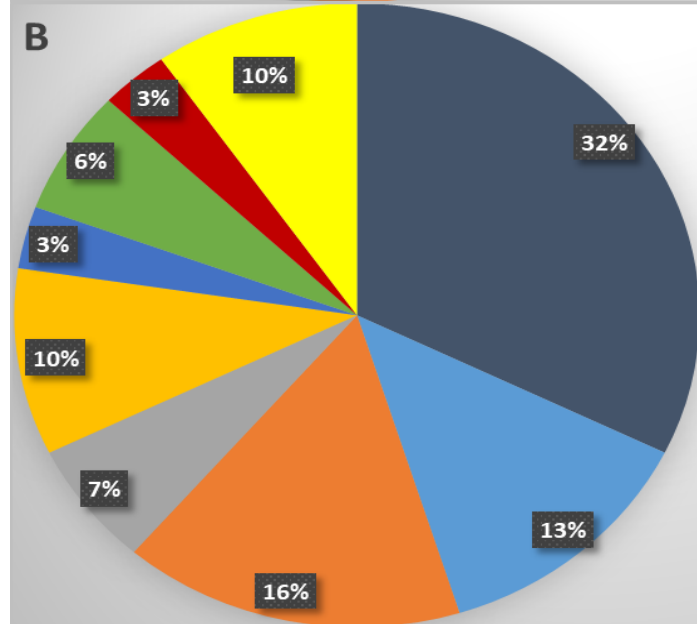
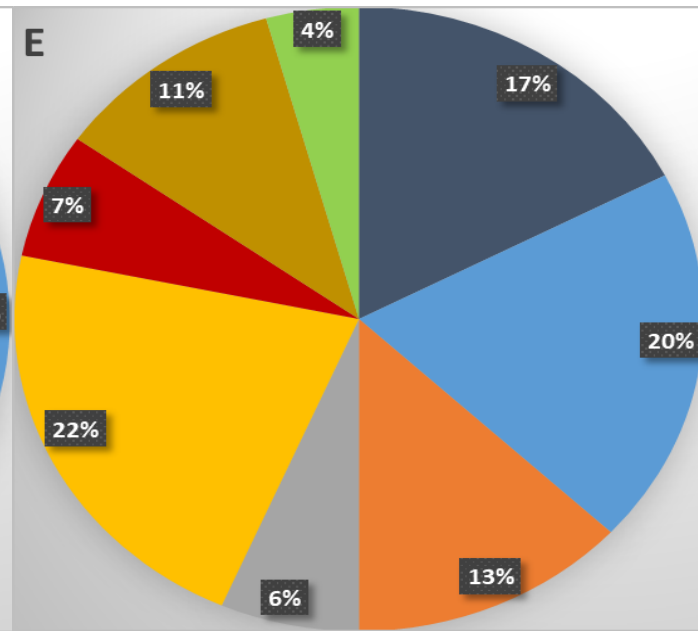
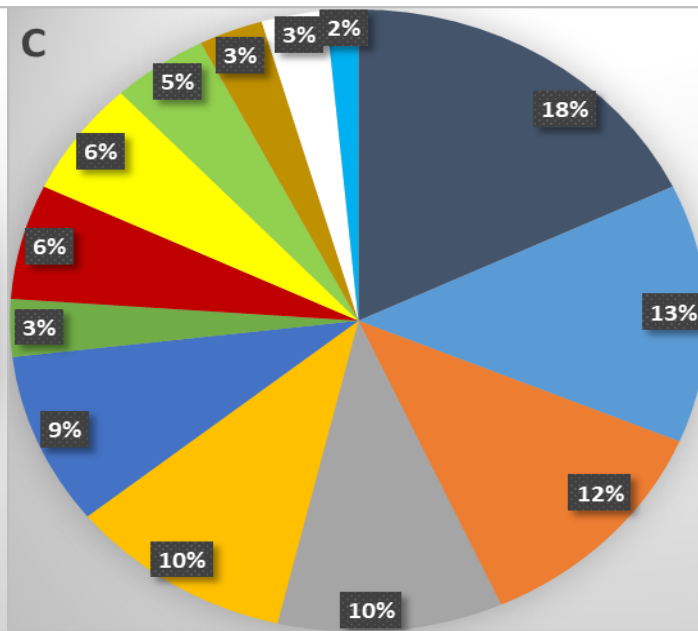
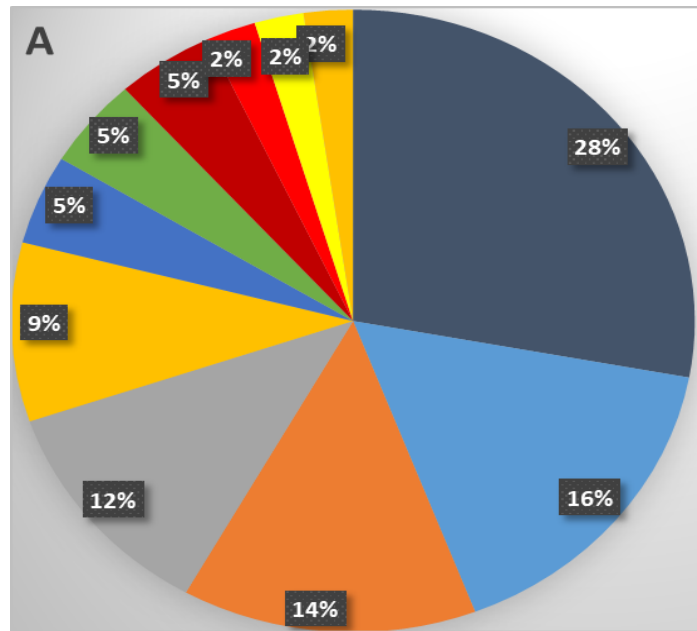


Figura 3. Agrupación funcional de los genes sobreexpresados y subexpresados relacionados a las secuencias con alteración de expresión. La distribución de los genes está marcada por el porcentaje presente en cada fracción del gráfico, los cuales se clasifican por la ruta metabólica a la que está relacionada por código de color a la leyenda del lado inferior izquierdo, en estas gráficas tenemos la distribución de las condiciones (Ctrl vs. Cr), (Ctrl vs Cr + Bacillus) y (Cr vs Cr + Bacillus) con la identificación de sobreexpresados (**A, C, E**) y subexpresados (**B, D, F**) para los genes con aumento y disminución de expresión (Kanehisa, 2015).

CONDICION_CTRL VS. CR_SOBREEXPRESION					
NUMBER	METABOLIC_ROUTE	GENE	ENZYME NAME	BRITE	Z_SCORE
12	Genetic Information Processing	AT2G43810	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm6	Messenger RNA biogenesis	2.2122
		AT1G06070	Basic-leucine zipper (bZIP) transcription facto	Transfer RNA biogenesis	2.7862
		AT3G05760	U4/U6.U5 tri-snRNP component SNU23	Folding, sorting and degradation	2.3742
		AT5G44200	nuclear cap-binding protein subunit 2	Messenger RNA biogenesis	2.2291
		AT1G29965	large subunit ribosomal protein L18Ae	Ribosome	2.0662
		AT2G07734	small subunit ribosomal protein S4	Ribosome	2.0773
		AT3G02660	tyrosyl-tRNA synthetase [EC:6.1.1.1]	Transfer RNA biogenesis	2.035
		AT1G10390	nuclear pore complex protein Nup98-Nup96	Messenger RNA biogenesis	2.3791
		AT3G23860	nucleolar G TP-binding protein	Ribosome biogenesis	2.9116
		AT2G20160	S-phase kinase-associated protein 1	Membrane trafficking	3.2132
		AT5G50440	golgi SNAP receptor complex member 2	Membrane trafficking	2.0643
		AT3G28030	DNA excision repair protein ERCC-5	DNA repair and recombination proteins	3.0117
7	Enviromental Information Processing	AT2G20160	S-phase kinase-associated protein 1	Membrane trafficking	3.2132
		AT5G10450	14-3-3 protein epsilon	Exosome	3.4681
		AT1G29590	translation initiation factor 4E	Messenger RNA biogenesis	2.899
		AT3G10920	superoxide dismutase, Fe-Mn family [EC:1.15.1.1]	Transport and catabolism	2.0089
		AT5G58690	phosphatidylinositol phospholipase C, delta	Membrane trafficking	2.1644
		AT5G07920	diacylglycerol kinase (ATP) [EC:2.7.1.107]	Phosphatidylinositol signaling system	2.2626
		AT2G38010	neutral ceramidase [EC:3.5.1.23]	Sphingolipid metabolism	2.1916
6	Organismal Systems	AT5G10450	14-3-3 protein epsilon	Exosome	3.4681
		AT1G09030	nuclear transcription Y subunit beta	Transcription factors	2.1578
		AT1G29590	translation initiation factor 4E	Messenger RNA biogenesis	2.899
		AT3G10920	superoxide dismutase, Fe-Mn family [EC:1.15.1.1]	Transport and catabolism	2.0089
		AT2G20160	S-phase kinase-associated protein 1	Centromeric chromatin formation proteins	3.2132
		AT2G17290	calcium-dependent protein kinase [EC:2.7.11.1]	Plant-pathogen interaction	2.443
5	Carbohidrates metabolism	AT5G14470	glucuronokinase [EC:2.7.1.43]	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	2.5679
		AT5G11540	L-gulonolactone oxidase [EC:1.1.3.8]	Ascorbate and aldarate metabolism	2.4584
		AT2G40840	4-alpha-glucanotransferase [EC:2.4.1.25]	Starch and sucrose metabolism	2.003
		AT4G12430	trehalose 6-phosphate phosphatase [EC:3.1.3.3]	Starch and sucrose metabolism	2.6309
		AT5G58690	phosphatidylinositol phospholipase C, delta	Inositol phosphate metabolism	2.1644
4	Cellular Processes	AT3G16100	Ras-related protein Rab-7A	Transport and catabolism	2.1944
		AT4G35410	AP-1 complex subunit sigma 1/2	Transport and catabolism	3.5548
		AT4G24550	Clathrin adaptor complexes medium subunit fa	Transport and catabolism	2.0924
		AT3G10920	superoxide dismutase, Fe-Mn family [EC:1.15.1.1]	Transport and catabolism	2.0089
2	Lipid metabolism	AT5G07920	diacylglycerol kinase (ATP) [EC:2.7.1.107]	Glycerolipid metabolism	2.2626
		AT2G38010	neutral ceramidase [EC:3.5.1.23]	Sphingolipid metabolism	2.1916
2	synthesis of other secondary metabol	AT5G14130	peroxidase [EC:1.11.1.7]	Phenylpropanoid biosynthesis	2.3671
		AT3G55120	chalcone isomerase [EC:5.5.1.6]	Flavonoid biosynthesis	3.2877
2	Metabolism of cofactors and vitamins	AT5G11380	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	Thiamine metabolism	2.1175
		AT1G19670	chlorophyllase [EC:3.1.1.14]	Porphyrin metabolism	2.0226
1	Metabolism of other aminoacids	AT1G17180	glutathione S-transferase [EC:2.5.1.18]	Glutathione metabolism	3.0288
1	Aminoacid metabolism	AT3G16150	L-asparaginase / beta-aspartyl-peptidase	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	3.3755
1	Nucleotide metabolism	AT5G26667	UMP-CMP kinase [EC:2.7.4.14]	Pyrimidine metabolism	3.0877

CONDICION_CTRL VS. CR_SUBEXPRESION					
NUMBER	METABOLIC_ROUTE	GENE	ENZYME NAME	BRITE	Z_SCORE
10	Genetic Information Processing	AT1G01100	large subunit ribosomal protein LP1	Translation	-2.4714
		AT1G03280	transcription initiation factor TFIIE subunit alp	Transcription	-2.1651
		AT1G54450	serine/threonine-protein phosphatase 2A regu	mRNA surveillance pathway	-2.3099
		AT1G67680	signal recognition particle subunit SRP72	Protein export	-2.2818
		AT2G20580	26S proteasome regulatory subunit N1	Folding, sorting and degradation	-2.6777
		AT2G23080	casein kinase II subunit alpha	Ribosome biogenesis in eukaryotes	-2.7827
		AT2G40590	small subunit ribosomal protein S26e	Translation	-2.4746
		AT3G19670	pre-mRNA-processing factor 40	Spliceosome	-2.5058
		AT5G09510	small subunit ribosomal protein S15e	Translation	-2.2375
		AT5G42040	26S proteasome regulatory subunit N12	Folding, sorting and degradation	-2.132
5	Organismal Systems	AT1G54450	serine/threonine-protein phosphatase 2A regu	mRNA surveillance pathway	-2.3099
		AT2G23080	casein kinase II subunit alpha	Circadian rhythm - plant	-2.7827
		AT2G35160	[histone H3]-lysine9 N-trimethyltransferase EHMT		-2.1259
		AT2G47620	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily C	ATP-dependent chromatin remodeling	-2.2393
		AT5G38820	solute carrier family 38 (sodium-coupled neutr	Transporters	-2.4013
4	Enviromental Information Processing	AT2G23080	casein kinase II subunit alpha	Circadian rhythm - plant	-2.7827
		AT1G03445	serine/threonine-protein phosphatase BSU1	Plant hormone signal transduction	-2.6549
		AT1G54450	serine/threonine-protein phosphatase 2A regu	mRNA surveillance pathway	-2.3099
		AT5G02470	transcription factor Dp-1	Polycomb repressive complex	-2.5264
3	Amino acid metabolism	AT2G35160	[histone H3]-lysine9 N-trimethyltransferase EH	Lysine degradation	-2.1259
		AT3G55870	anthranilate synthase component I	Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosyn	-2.1644
		AT5G11880	diaminopimelate decarboxylase	Lysine biosynthesis	-2.0083
3	Cellular Processes	AT1G50010	tubulin alpha	Transport and catabolism	-2.3398
		AT2G23080	casein kinase II subunit alpha	Circadian rhythm - plant	-2.7827
		AT5G02470	transcription factor Dp-1	Polycomb repressive complex	-2.5264
2	Carbohidrate metabolism	AT1G63180	UDP-glucose 4-epimerase	Galactose metabolism	-2.1835
		AT2G46740	L-gulonolactone oxidase	Ascorbate and aldarate metabolism	-2.1723
2	Biosynthesis of other secondary metabolit	AT5G40150	peroxidase	Phenylpropanoid biosynthesis	-2.6689
		AT3G55870	anthranilate synthase component I	Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosyn	-2.1644
1	Metabolism of cofactors and vitmins	AT5G60540	pyridoxal 5'-phosphate synthase pdxT subunit	Vitamin B6 metabolism	-2.5335
1	Lipid metabolism	AT1G02190	aldehyde decarbonylase	Cutin, suberine and wax biosynthesis	-2.1944

CONDICION_CTRL VS. CR+ BACILLUS_SOBREEXPRESION					
NUMBER	METABOLIC ROUTE	GENE	ENZYME NAME	BRITE	Z SCORE
12	Genetic Information Processing	AT3G57080	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit alpha	Transcription	3.0345
		AT1G55150	ATP-dependent RNA helicase DDX5/DBP2	Transcription	3.5241
		AT3G42370	Ribosomal protein L10 family protein	Translation	2.0761
		AT1G57660	Translation protein SH3-like family protein	Translation	2.026
		AT2G05220	Ribosomal S17 family protein	Translation	2.2828
		AT1G15200	protein-protein interaction regulator family protein	mRNA surveillance pathway	2.2648
		AT4G26650	RNA-binding protein Musashi	mRNA surveillance pathway	2.5729
		AT3G23860	nucleolar GTP-binding protein	Ribosome biogenesis in eukaryotes	2.9757
		AT2G20160	S-phase kinase-associated protein 1	Folding, sorting and degradation	2.3495
		AT4G21810	Derlin-2/3	Folding, sorting and degradation	2.0204
		AT3G28030	DNA excision repair protein ERCC-5	Replication and repair	2.2909
		AT4G30870	crossover junction endonuclease MU S81	Replication and repair	3.1308
9	Environmental Information	AT3G29090	pectinesterase [EC:3.1.1.11]	Pentose and glucuronate interconversions	2.1107
		AT3G05630	phospholipase D1/2 [EC:3.1.4.4]	Transport and catabolism	2.2085
		AT2G20160	S-phase kinase-associated protein 1	Folding, sorting and degradation	2.3495
		AT1G29590	translation initiation factor 4E	Messenger RNA biogenesis	2.0905
		AT3G55940	phosphatidylinositol phospholipase C, delta	Phosphatidylinositol signaling system	2.575
		AT5G07920	diacylglycerol kinase (ATP) [EC:2.7.1.107]	Phosphatidylinositol signaling system	2.8792
		AT2G38010	neutral ceramidase [EC:3.5.1.23]	Sphingolipid metabolism	2.0762
		AT1G03970	ABA responsive element binding factor	Plant hormone signal transduction	2.0651
		AT2G21200	SAUR family protein	Plant hormone signal transduction	2.5887
		8	Organismal systems	AT3G57080	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit alpha
AT3G05630	phospholipase D1/2 [EC:3.1.4.4]			Transport and catabolism	2.2085
AT5G59030	solute carrier family 31 (copper transporter), member 1			Transporters	2.0816
AT5G07920	diacylglycerol kinase (ATP) [EC:2.7.1.107]			Phosphatidylinositol signaling system	2.8792
AT1G31290	eukaryotic translation initiation factor 2C			Messenger RNA biogenesis	2.9585
AT1G29590	translation initiation factor 4E			Messenger RNA biogenesis	2.0905
AT2G47290	calcium-dependent protein kinase [EC:2.7.11.1]			Plant-pathogen interaction	2.587
AT3G03400	calcium-binding protein CML			Plant-pathogen interaction	2.5412
AT3G29090	pectinesterase [EC:3.1.1.11]			Pentose and glucuronate interconversions	2.1107
AT3G01270	pectate lyase [EC:4.2.2.2]			Pentose and glucuronate interconversions	2.0013
7	Carbohydrate metabolism	AT5G14470	glucuronokinase [EC:2.7.1.43]	Ascorbate and alkanate metabolism	2.6367
		AT5G11540	L-gulonolactone oxidase [EC:1.1.3.8]	Ascorbate and alkanate metabolism	2.1574
		AT3G03640	beta-glucosidase [EC:3.2.1.21]	Starch and sucrose metabolism	2.3708
		AT3G13450	2-oxoisovalerate dehydrogenase E1 component	Propanoate metabolism	2.1459
		AT3G55940	phosphatidylinositol phospholipase C, delta	Inositol phosphate metabolism	2.575
		7	Cellular Processes	AT3G05630	phospholipase D1/2 [EC:3.1.4.4]
AT3G16100	Ras-related protein Rab-7A			Transport and catabolism	2.1923
AT4G35410	AP-1 complex subunit sigma 1/2			Transport and catabolism	2.7971
AT3G25980	mitotic spindle assembly checkpoint protein Mps1			Chromosome and associated proteins	2.6828
AT2G20160	S-phase kinase-associated protein 1			Protein processing in endoplasmic reticulum	2.3495
AT2G04350	long-chain acyl-CoA synthetase [EC:6.2.1.3]			Transport and catabolism	2.028
AT3G23580	ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2			DNA repair and recombination protein	2.1154
AT2G04350	long-chain acyl-CoA synthetase [EC:6.2.1.3]			Fatty acid biosynthesis	2.028
AT5G04660	cytochrome P450 family 77 subfamily A [EC:1.10.1.10]			Cutin, suberine and wax biosynthesis	2.1141
AT5G07920	diacylglycerol kinase (ATP) [EC:2.7.1.107]			Glycerolipid metabolism	2.8792
6	Lipid metabolism	AT4G00550	digalactosyl-diacylglycerol synthase [EC:2.4.1.241]	Glycerolipid metabolism	2.7723
		AT3G05630	phospholipase D1/2 [EC:3.1.4.4]	Glycerophospholipid metabolism	2.2085
		AT2G38010	neutral ceramidase [EC:3.5.1.23]	Sphingolipid metabolism	2.0762
		AT5G11380	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase [EC:2.3.1.24]	Thiamine metabolism	2.1806
4	Metabolism Cofactors and vitamins	AT1G60440	type II pantothenate kinase [EC:2.7.1.33]	Pantothenate and CoA biosynthesis	2.358
		AT5G62980	7,8-dihydroneopterin aldolase/epimerase/oxygenase	Folate biosynthesis	2.2712
		AT4G27270	NAD(P)H dehydrogenase (quinone) [EC:1.6.5.1]	Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	2.3924
		AT3G16150	L-asparaginase / beta-aspartyl-peptidase	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	3.6282
4	Aminoacid metabolism	AT4G27070	tryptophan synthase beta chain [EC:4.2.1.20]	Glycine, serine and threonine metabolism	2.1771
		AT3G13450	2-oxoisovalerate dehydrogenase E1 component	Valine, leucine and isoleucine degradation	2.1459
		AT3G06300	prolyl 4-hydroxylase [EC:1.14.11.2]	Arginine and proline metabolism	2.0734
		AT2G07689	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2 [EC:1.1.1.10]	Oxidative phosphorylation	2.0897
3	Energy metabolism	AT3G54890	light-harvesting complex I chlorophyll a/b binding protein	Photosynthesis - antenna proteins	2.1796
		AT2G45620	ferredoxin-nitrite reductase [EC:1.7.7.1]	Nitrogen metabolism	2.1885
2	Nucleotid metabolism	AT3G23580	ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2	Purine metabolism	2.1154
		AT5G26667	UMP-CMP kinase [EC:2.7.4.14]	Pyrimidine metabolism	2.3266
2	Glican biosynthesis and metabolism	AT5G13980	alpha-mannosidase [EC:3.2.1.24]	Glycan biosynthesis and metabolism	2.0093
		AT3G20480	tetraacyldisaccharide 4'-kinase [EC:2.7.1.130]	Lipopolysaccharide biosynthesis proteins	3.0098
2	Biosynthesis of other secondary metabolites	AT5G14130	peroxidase [EC:1.11.1.7]	Phenylpropanoid biosynthesis	2.637
		AT3G55120	chalcone isomerase [EC:5.5.1.6]	Flavonoid biosynthesis	3.3062
1	Other aminoacid metabolism	AT3G03640	beta-glucosidase [EC:3.2.1.21]	Cyanoamino acid metabolism	2.3708

CONDICION_CTRL VS. CR+ BACILLUS_SUBEXPRESION					
NUMBER	METABOLIC_ROUTE	GENE	ENZYME NAME	BRITE	Z_SCORE
16	Genetic Information Processes	AT1G26370	ATP-dependent RNA helicase DHX8/PRP22	Transcription	-2.1972
		AT5G30510	small subunit ribosomal protein S1	Translation	-2.1774
		AT2G40590	small subunit ribosomal protein S26e	Translation	-3.0143
		AT1G23410	ubiquitin-small subunit ribosomal protein S27	Translation	-2.4571
		AT2G29210	splicing factor PWI domain-containing protein	Translation	-2.3859
		AT1G11400	partner of Y14 and mago	mRNA surveillance pathway	-2.5544
		AT3G07050	nuclear GTP-binding protein	Ribosome biogenesis in eukaryotes	-2.0671
		AT1G67680	SRP72 RNA-binding domain-containing protein	Protein export	-2.2921
		AT3G25650	S-phase kinase-associated protein 1	Protein processing in endoplasmic reticulum	-2.0477
		AT1G18260	HCP-like superfamily protein	Protein processing in endoplasmic reticulum	-2.1728
		AT1G63800	ubiquitin-conjugating enzyme E2 H	Folding, sorting and degradation	-2.0626
		AT2G44270	cytoplasmic tRNA 2-thiolation protein 1	Folding, sorting and degradation	-2.213
		AT2G20580	26S proteasome regulatory subunit N1	Folding, sorting and degradation	-2.426
		AT1G04810	26S proteasome regulatory subunit N2	Folding, sorting and degradation	-2.0392
		AT5G22010	replication factor C subunit 1	DNA replication	-2.0127
AT1G20720	RAD3-like DNA-binding helicase protein	Replication and repair	-2.2743		
6	Enviromental Information Processing	AT5G04970	pectinesterase	Pentose and glucuronate interconversions	-2.7601
		AT4G26080	protein phosphatase 2C	Plant hormone signal transduction	-2.8089
		AT3G25650	S-phase kinase-associated protein 1	Protein processing in endoplasmic reticulum	-2.0477
		AT5G02470	transcription factor Dp-1	Polycomb repressive complex	-2.1329
		AT1G60490	phosphatidylinositol 3-kinase	Phosphatidylinositol signaling system	-2.3998
		AT2G45150	phosphatidate cytidylyltransferase	Phosphatidylinositol signaling system	-2.36
4	Carbohidrate metabolism	AT5G04970	pectinesterase	Pentose and glucuronate interconversions	-2.7601
		AT1G26560	beta-glucosidase	Starch and sucrose metabolism	-2.3915
		AT4G13430	3-isopropylmalate/(R)-2-methylmalate dehydra	C5-Branched dibasic acid metabolism	-2.0313
		AT1G60490	phosphatidylinositol 3-kinase	Inositol phosphate metabolism	-2.3998
2	Biosynthesis of other secondary metabolites	AT5G40150	peroxidase	Phenylpropanoid biosynthesis	-2.9325
		AT3G51240	naringenin 3-dioxygenase	Flavonoid biosynthesis	-2.1317
2	Cellular Processes	AT4G11260	suppressor of G2 allele of SKP1	Plant-pathogen interaction	-2.0139
		AT1G50010	tubulin alpha	Phagosome	-2.6563
2	Amino acid metabolism	AT4G13430	3-isopropylmalate/(R)-2-methylmalate dehydra	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	-2.0313
		AT2G35160	[histone H3]-lysine9 N-trimethyltransferase E1	Lysine degradation	-2.0355
1	Metabolism of cofactors and vitamins	AT5G60540	pyridoxal 5'-phosphate synthase pdxT subunit	Vitamin B6 metabolism	-3.8182
1	Organismal Systems	AT4G11260	suppressor of G2 allele of SKP1	Plant-pathogen interaction	-2.0139
1	Lipid metabolism	AT2G45150	phosphatidate cytidylyltransferase	Glycerophospholipid metabolism	-2.36
1	Energy metabolism	AT4G33580	carbonic anhydrase	Nitrogen metabolism	-2.7382
1	Metabolism of terpenoids and polyketides	AT2G36780	UDP-glucosyltransferase 73C	Zeatin biosynthesis	-2.027

CONDICION_CR VS. CR + BACILLUS_SOBREEXPRESION					
NUMBER	METABOLIC_ROUTE	GENE	ENZYME NAME	BRITE	Z_SCORE
10	Cellular processes	AT3G12160	Ras-related protein Rab-11A	Transport and catabolism	2.1099
		AT1G73030	charged multivesicular body protein 1	Transport and catabolism	2.01257
		AT3G60860	brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange	Transport and catabolism	2.1714
		AT1G20010	tubulin beta	Transport and catabolism	2.1356
		AT3G54940	cathepsin F	Transport and catabolism	2.2249
		AT5G56290	peroxin-5	Transport and catabolism	2.1461
		AT2G03190	S-phase kinase-associated protein 1	Folding, sorting and degradation	2.3861
		AT5G03415	transcription factor Dp-1	Transcription factors	2.5793
		AT4G26560	serine/threonine-protein phosphatase 2B regulator	Protein phosphatases and associated proteins	2.41
AT5G25560	RING finger and CHY zinc finger domain-containing	Folding, sorting and degradation	2.0015		
9	Environmental Information Processing	AT1G27940	ATP-binding cassette, subfamily B (MDR/TAP), member	Membrane transport	2.3423
		AT4G26560	serine/threonine-protein phosphatase 2B regulator	Protein phosphatases and associated proteins	2.41
		AT1G07430	protein phosphatase 2C	MAPK signaling pathway - plant	2.0304
		AT2G27050	ethylene-insensitive protein 3	MAPK signaling pathway - plant	2.0293
		AT2G03190	S-phase kinase-associated protein 1	Folding, sorting and degradation	2.3861
		AT5G03415	transcription factor Dp-1	Polycomb repressive complex	2.5793
		AT2G19860	hexokinase	Membrane trafficking	2.0467
		AT4G29510	type I protein arginine methyltransferase	Chromosome and associated proteins	3.1192
AT4G17170	Ras-related protein Rab-2A	Exosome	2.2878		
8	Genetic Information Processing	AT2G09990	Ribosomal protein S5 domain 2-like superfamily protein	Ribosome	2.4695
		AT5G52490	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillar	Ribosome biogenesis in eukaryotes	4.2242
		AT2G03190	S-phase kinase-associated protein 1	Folding, sorting and degradation	2.3861
		AT2G45200	golgi SNAP receptor complex member 1	Folding, sorting and degradation	2.0524
		AT3G61450	syntaxin of plants SYP7	Folding, sorting and degradation	2.0407
		AT5G25560	RING finger and CHY zinc finger domain-containing	Folding, sorting and degradation	2.0015
		AT5G50680	ubiquitin-like 1-activating enzyme E1 A	Folding, sorting and degradation	2.6564
AT1G35530	ANCM; DEAD/DEAH box RNA helicase family protein	Replication and repair	2.1449		
6	Organismal Systems	AT3G09480	histone H2B	Chromosome and associated proteins	2.0982
		AT4G26560	serine/threonine-protein phosphatase 2B regulator	Protein phosphatases and associated proteins	2.41
		AT2G19860	hexokinase	Membrane trafficking	2.0467
		AT4G29510	type I protein arginine methyltransferase	Chromosome and associated proteins	3.1192
		AT4G29510	type I protein arginine methyltransferase [EC:2.1.1	Chromosome and associated proteins	3.1192
AT3G12160	Ras-related protein Rab-11A	Membrane trafficking	2.1099		
5	Metabolism of terpenoids and polyketides	AT5G23320	protein-S-isoprenylcysteine O-methyltransferase	Terpenoid backbone biosynthesis	2.0023
		AT5G11380	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	Terpenoid backbone biosynthesis	2.0602
		AT3G14510	geranylgeranyl diphosphate synthase, type II	Terpenoid backbone biosynthesis	2.6749
		AT4G33360	NAD+-dependent farnesol dehydrogenase	Terpenoid backbone biosynthesis	2.4463
		AT3G10230	lycopene beta-cyclase	Carotenoid biosynthesis	2.3146
3	Metabolism of cofactors and vitamins	AT5G11380	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	Thiamine metabolism	2.0602
		AT2G28880	para-aminobenzoate synthetase	Folate biosynthesis	2.0054
		AT2G40490	uroporphyrinogen decarboxylase	Porphyrin metabolism	2.6336
3	Carbohydrate metabolism	AT2G19860	hexokinase	Glycolysis / Gluconeogenesis	2.0467
		AT3G01260	aldose 1-epimerase	Glycolysis / Gluconeogenesis	2.564
		AT1G16980	trehalose 6-phosphate synthase/phosphatase	Starch and sucrose metabolism	2.1083
2	Energy metabolism	AT5G10000	ferredoxin	Photosynthesis	2.0468
		AT1G33320	cystathionine gamma-synthase	Cysteine and methionine metabolism	3.564

CONDICION_CR VS. CR + BACILLUS_SUBEXPRESION					
NUMBER	METABOLIC_ROUTE	GENE	ENZIME NAME	BRITE	Z_SCORE
13	Genetic Information Processes	AT1G32750	transcription initiation factor TFIIID subunit 1	Basal transcription factors	-4.7838
		AT1G17640	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1/	Spliceosome	-2.1068
		AT1G54590	pre-mRNA-splicing factor 18	Spliceosome	-2.1419
		AT3G01540	ATP-dependent RNA helicase DDX5/DBP2	Spliceosome	-2.1264
		AT4G15900	pleiotropic regulator 1	Spliceosome	-2.5466
		AT5G18380	small subunit ribosomal protein S16e	Translation	-2.1176
		AT3G02420	transmembrane protein 33	Nucleocytoplasmic transport	-3.4718
		AT1G24490	YidC/Oxa1 family membrane protein insertase	Protein export	-2.5836
		AT3G63460	protein transport protein SEC31	Protein processing in endoplasmic reticulum	-2.1062
		AT2G46030	ubiquitin-conjugating enzyme E2 H	Ubiquitin mediated proteolysis	-3.9218
		AT4G19130	replication factor A1	DNA replication	-2.0899
		AT1G21690	ATPase family associated with various cellular	DNA replication	-2.0136
		AT3G18630	uracil-DNA glycosylase	Base excision repair	-2.4046
9	Carbohidrates metabolism	AT1G01090	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	Glycolysis / Gluconeogenesis	-2.4333
		AT3G16950	dihydrolipoyl dehydrogenase	Glycolysis / Gluconeogenesis	-4.6523
		AT1G32480	isocitrate dehydrogenase (NAD+)	Citrate cycle	-2.7697
		AT3G02360	6-phosphogluconate dehydrogenase	Pentose phosphate pathway	-5.1372
		AT2G02720	pectate lyase	Pentose and glucuronate interconversions	-2.15
		AT5G64860	4-alpha-glucanotransferase	Starch and sucrose metabolism	-2.1073
		AT5G54570	beta-glucosidase	Starch and sucrose metabolism	-3.422
		AT1G08110	lactoylglutathione lyase	Pyruvate metabolism	-2.2959
		AT5G58690	phosphatidylinositol phospholipase C, delta	Inositol phosphate metabolism	-3.4605
6	Cellular processes	AT5G59150	Ras-related protein Rab-11A	Endocytosis	-5.0452
		AT5G22770	AP-2 complex subunit alpha	Endocytosis	-2.079
		AT4G24550	Clathrin adaptor complexes medium subunit fa	Lysosome	-2.2826
		AT5G10450	14-3-3 protein epsilon	Exosome	-3.4795
		AT2G02720	pectate lyase	Pentose and glucuronate interconversions	-2.15
		AT1G24490	YidC/Oxa1 family membrane protein insertase	Protein export	-2.5836
6	Enviromental Information Processing	AT1G24490	YidC/Oxa1 family membrane protein insertase	Protein export	-2.5836
		AT5G10450	14-3-3 protein epsilon	Exosome	-3.4795
		AT1G04970	lipopolysaccharide-binding protein	Toll-like receptor signaling pathway	-3.237
		AT1G01090	pyruvate dehydrogenase E1 component subu	Citrate cycle	-2.4333
		AT1G29590	translation initiation factor 4E	Messenger RNA biogenesis	-2.0748
		AT5G58690	phosphatidylinositol phospholipase C, delta	Phosphatidylinositol signaling system	-3.4605
4	Lipid metabolism	AT1G71160	3-ketoacyl-CoA synthase	Fatty acid elongation	-3.2609
		AT1G02190	aldehyde decarboxylase	Cutin, suberine and wax biosynthesis	-2.4039
		AT3G45130	cycloartenol synthase	Steroid biosynthesis	-2.1282
		AT5G41080	glycerophosphodiester phosphodiesterase	Glycerophospholipid metabolism	-3.0714
		AT2G29630	phosphomethylpyrimidine synthase	Thiamine metabolism	-2.7468
3	Metabolism of cofactors and vitamins	AT1G19670	chlorophyllase	Porphyrin metabolism	-2.4062
		AT4G32770	tocopherol cyclase		-2.279
2	Energy Metabolism	AT4G11730	H ⁺ -transporting ATPase	Oxidative phosphorylation	-2.2383
		AT5G67590	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 4	Oxidative phosphorylation	-2.1744
2	Organismal Systems	AT5G12180	calcium-dependent protein kinase	Plant-pathogen interaction	-3.0898
		AT1G71160	3-ketoacyl-CoA synthase	Plant-pathogen interaction	-3.2609
			adenylate dimethylallyltransferase (cytokinin		

Figura 4. Clasificación de las secuencias con alteración en la expresión relacionada a las rutas metabólicas (Kanehisa, 2015).

Comparación de la expresión génica en *Arabidopsis thaliana* bajo condiciones de estrés por cromo hexavalente

El mapa de calor representa las diferencias de expresión entre las condiciones analizadas, condición (Ctrl vs. Cr), condición (Ctrl vs Cr + Bacillus) y condición (Cr vs Cr + Bacillus). La ruta metabólica a la cual se encuentran relacionados los genes con alteración en la expresión fue predicha mediante la base de datos de KEGG (**Figura 5**). Posterior a la revisión de genes presentes en las condiciones, se seleccionaron los genes que estuvieran presentes en dos o más condiciones, la diferencia de expresión se observa de acuerdo a la variación de color, siendo rojo el aumento de la expresión de los genes, azul, una baja de expresión, el color beige indica que no ocurrió una alteración de la expresión de los genes, utilizando 162 secuencias. El conjunto de genes que presentan alteración en la expresión se encuentran agrupados en rutas metabólicas relacionadas con procesamiento de la información genética, información ambiental y sistemas del organismo. Se puede observar que en la condición (Cr vs Cr + Bacillus) existe una marcada diferencia en la expresión de genes respecto con las condiciones (Ctrl vs. Cr) y (Ctrl vs Cr + Bacillus), además de mostrar una tendencia, respecto a los genes compartidos en las tres condiciones, de los genes con una alteración en la expresión presenten una disminución. Dentro de los genes que comparten las condiciones y presentan alteración en la expresión destacaron siete genes (**Tabla 2**).

GENE	27_Ctrl_vs_C	28_Ctrl_vs_C	29_Cr_vs_C	ENZIME_NAME
AT1G02420	2.11	2.01	-3.88	Pentatricopeptide repeat superfamily protein
AT1G29590	2.9	2.09	-2.07	translation initiation factor 4E
AT1G36990	-2.28	-2.01	-2.91	C-jun-amino-terminal kinase-interacting protein
AT4G11370	-3.24	-3.65	-5.53	RING-H2 zinc finger protein RHA1
AT4G24750	2.99	3.02	-2.23	Rhodanese/Cell cycle control phosphatase superfamily protein
AT4G36150	2.24	2.17	-4.03	Disease resistance protein family
AT5G11380	2.12	2.18	2.06	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase

Tabla 2. Genes con alteración en la expresión presentes en las condiciones Ctrl vs. Cr, Ctrl vs Cr + Bacillus y Cr vs Cr + Bacillus.

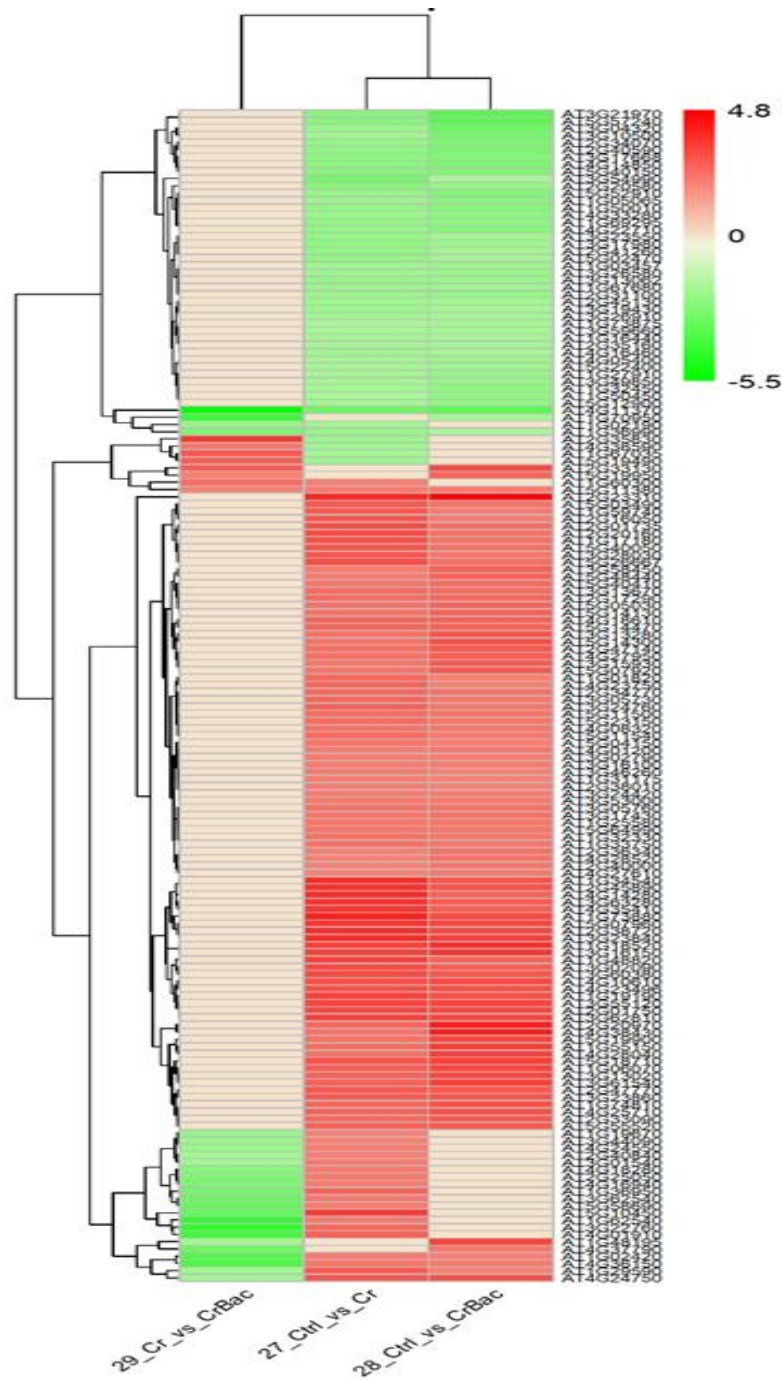


Figura 5. Mapa de calor con el agrupamiento jerárquicamente de los genes con expresión diferencial entre las condiciones Ctrl vs. Cr, Ctrl vs Cr + Bacillus yCr vs Cr + Bacillus. Los valores de alteración de la expresión están indicados por la intensidad y diferencia de color marcado en la leyenda de la esquina superior derecha de esta figura.

Análisis de enriquecimiento de conjunto de genes (DAVID)

Dentro de los genes con alteración en la expresión, se realizó el análisis de enriquecimiento de genes DAVID, en este análisis, se identificaron genes relacionados a la síntesis de terpenoides en la condición Cr vs Cr + Bacillus, estos genes fueron analizados en la plataforma DAVID, esta permite la relación de datos biológicos mediante modelos estadísticos, como resultado nos permite identificar y confirmar relaciones e hipótesis. Mediante esta herramienta se identificaron secuencias relacionadas al metabolismo de terpenoides, compuestos importantes para la síntesis de ácido abscísico (Tabla 3).

GENES REPORTADOS POR DAVID: CONDICIÓN CR VS. CR + BACILLUS			
ENTRY	GEN	NOMBRE DE LA ENZIMA	FUNCION
20	ath:AT4G33360	NAD+-dependent farnesol dehydrogenase	Biosíntesis de terpenoides
125	ath:AT5G23320	protein-S-isoprenylcysteine O-methyltransferase	Biosíntesis de terpenoides
136	ath:AT5G11380	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	Biosíntesis de terpenoides
165	ath:AT3G14510	geranylgeranyl diphosphate synthase, type II	Biosíntesis de terpenoides

ENTREZ_GENE_ID	NOMBRE DEL GEN	GENES RELACIONADOS	ESPECIE
831009	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (EC: 2.2.1.7)	RG	<i>Arabidopsis thaliana</i>
829473	NAD+-dependents farnesol dehydrogenase (EC:1.1.1.354)	RG	<i>Arabidopsis thaliana</i>
820674	geranylgeranyl diphosphate synthase, type II (E.C:2.5.1.1 2.5.1.10 2.5.1.29)	RG	<i>Arabidopsis thaliana</i>
832396	protein-S-isoprenylcysteine O-methyltransferase (E.C:2.1.1.100)	RG	<i>Arabidopsis thaliana</i>

Tabla 3. Identificación de genes con alteración de expresión relacionados al metabolismo de terpenoides (Huang, 2009).

Ensayo de promoción de la germinación en *Arabidopsis thaliana* en presencia de cromo hexavalente para la obtención de compuestos orgánicos.

Para realizar este ensayo se parte de la metodología determinada por Ramírez *et al.* (2020), respecto al lavado de semillas, ensayo de germinación y de la determinación de la concentración mínima inhibitoria para las semillas de *A. thaliana* ecotipo Columbia 0, que es 100 mg/L.

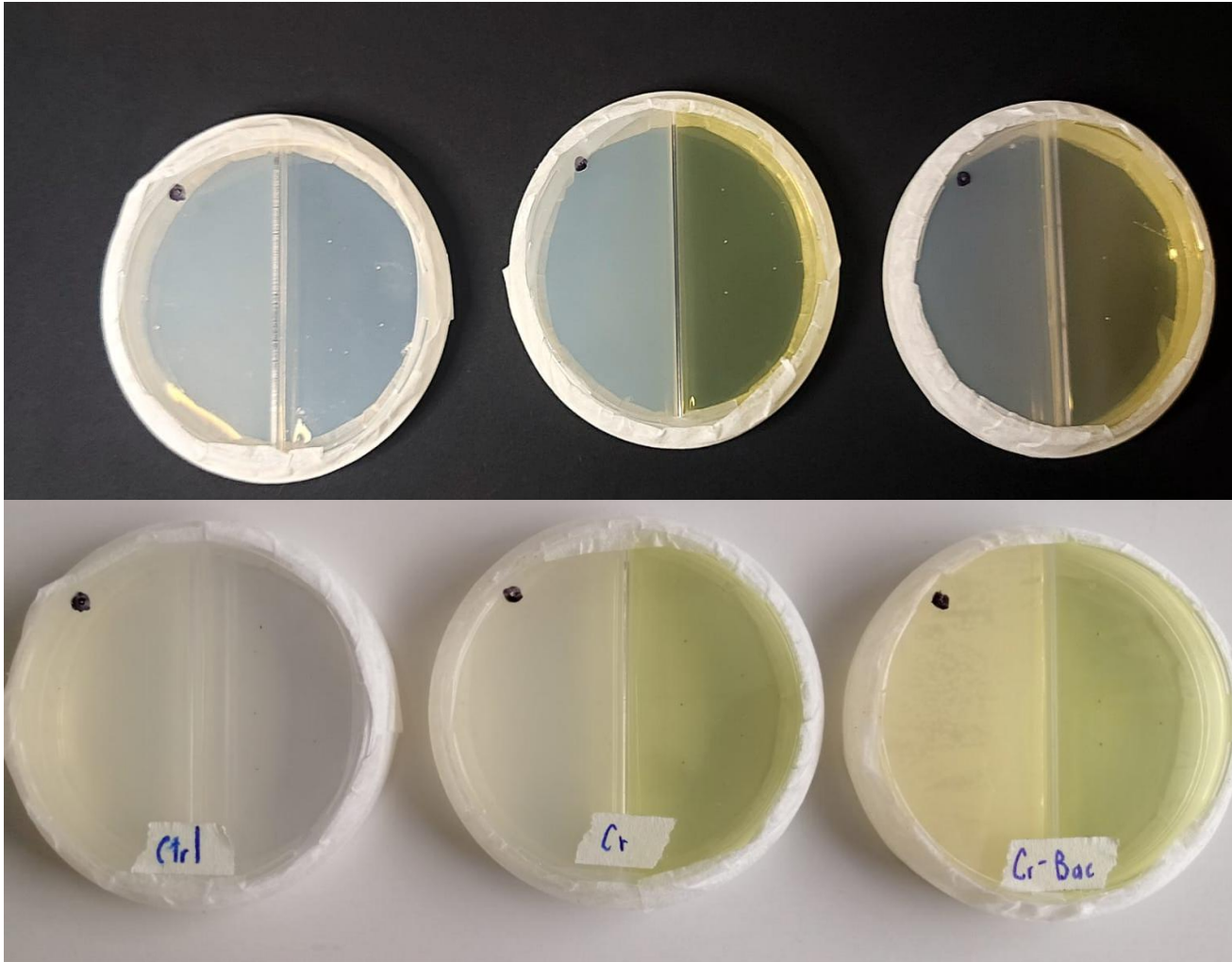


Figura 6. Germinación de *Bacillus thuringiensis* MH778713 y *Arabidopsis thaliana* en placa Petri bipartida. La imagen A muestra las placas previamente a colocarse en incubación, la imagen B muestra posterior a 120 horas, todas las placas presentan 5 semillas de *A. thaliana*, la disposición de las placas de izquierda a derecha: placa control (agar agua/YMA), placa Cr: control negativo (agar agua – Cr/YMA) y placa Cr-Bac: placa inoculada con *Bacillus thuringiensis* MH778713 (agar agua – Cr/YMA).

Análisis de compuestos orgánicos

El análisis cromatográfico permitió identificar picos sobresalientes en el rango de tiempo de retención de 44 a 46 minutos, estos picos corresponden a compuestos desconocidos, los cuales se pueden

eje de tiempo, en el rango de 44 a 46, estos compuestos se encuentran en la tabla donde se identifica el nombre, el número CAS referente a cada compuesto, la calidad de la muestra y el tiempo de retención, los cuales coinciden con la identificación de compuestos en la espectrometría de masas. La identificación de compuestos se realiza mediante la comparación de los tiempos de retención estandarizados contra las muestras desconocidas, lo que confirma que estos compuestos son emitidos por *Bacillus thuringiensis* MH778713.

En la figura B podemos observar el suavizado de los picos correspondientes a los compuestos detectados en el rango de tiempo de 44 a 46, en el que se identificaron los compuestos nombrados dentro de la **tabla 4**, debido a la composición química de los compuestos y a la presencia de grupos funcionales como aminas, ésteres y anillos aromáticos (Koilavayeva *et al.*, 2023) se sugiere que estos compuestos pueden tener actividad biológica en organismos vegetales

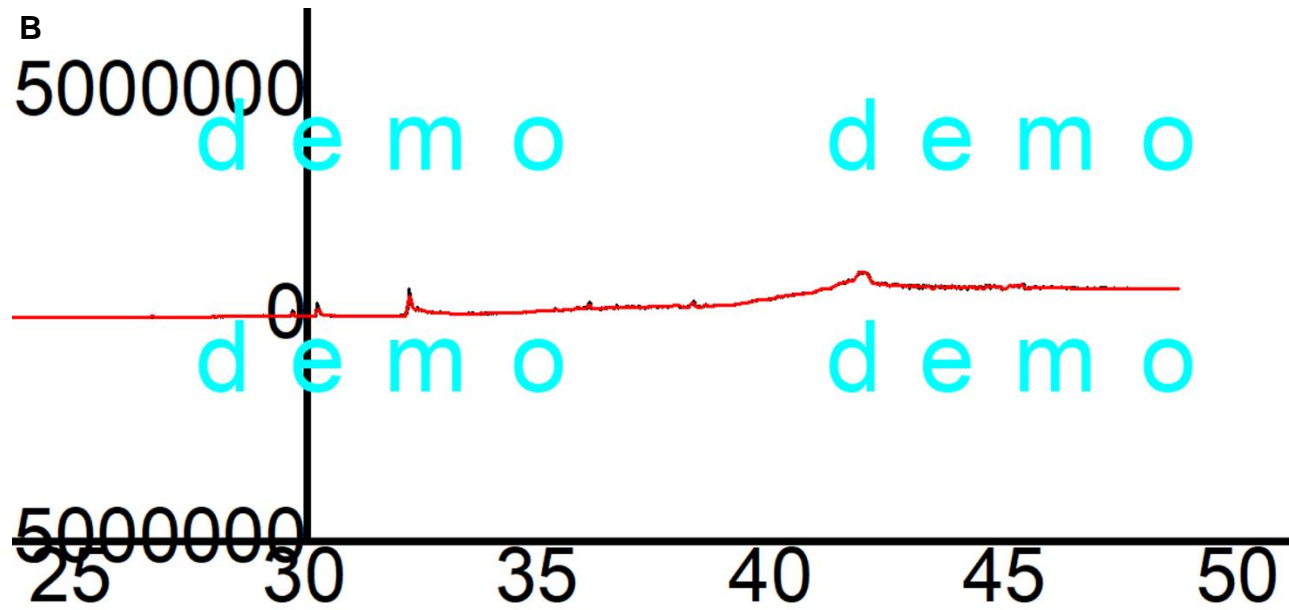
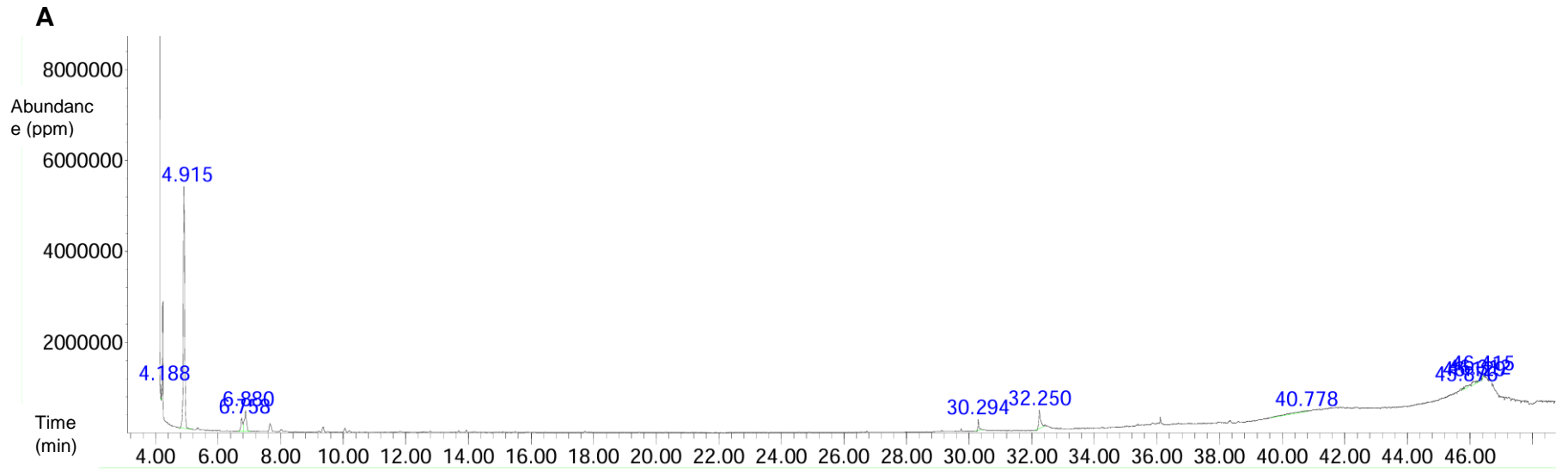


Figura 7. Gráfico de cromatografía de gases. En la figura A, la posición de los compuestos dentro de la gráfica, hacer énfasis en la meseta del minuto 44 – 46, en la figura B notamos el suavizado de la gráfica, la cual comparte los tiempos de retención, las graficas fueron obtenidas con OriginPro 8.5 SR0 (OriginLab).

COMPUESTOS IDENTIFICADOS EN LA CONDICIÓN CR VS. CR + BACILLUS				
NÚMERO	COMPUESTO	NÚM. CAS	CALIDAD	R.T
9	1-(3,4-Dimetoxibenzilideno)-6-metil-1H,5H-furo(3,4-c)piridina-3,4-diona	1000295-87-8	46	45.876
10	Acridina, 9-(pdimetilaminoanilina)	013365-38	42	46.129
11	Dibenz(b,d)cicloheptano, 3,4,7-trimetoxi-11 oximido	1000126-66-2	35	46.312
12	Acridina, 9-(pdimetilaminoanilina)	013365-38-3	46	46.415

Tabla 4. Compuestos Identificados por cromatografía de gases acoplada a espectro de masas. Tenemos presente la lista de compuestos detectados durante la cromatografía, el nombramiento de los compuestos.

Discusión de resultados

Análisis de los genes codificantes relacionados a los metabolismos de carbohidratos, lípidos y aminoácidos

A partir de las, gráficas y tablas de anotación funcional de los genes sobreexpresados y subexpresados relacionados a las secuencias con alteración de la expresión, se realizó una comparación y revisión de estos, cabe destacar que la condición

Ctrl vs. Cr sirve como control negativo, indicando el aumento de expresión de genes en presencia de Cr (VI), respecto a la condición Ctrl vs. Cr + Bacillus, en la cual se encuentra *Bacillus thuringiensis* MH778713, que promueve la germinación a pesar de la presencia de Cr (VI). Un aspecto importante a analizar son los mapas metabólicos de carbohidratos, lípidos y aminoácidos, debido al mecanismo de daño de cromo hexavalente, que causa un aumento en la producción de ROS, inhibición de enzimas oxidoreductasas y peroxidación de lípidos relacionadas a las rutas metabólicas antes mencionadas, estas alteraciones son notadas por las variaciones en los valores de Z score en los genes compartidos.

Existen diferencias en la expresión de genes, respecto a las condiciones Ctrl vs. Cr y Ctrl vs. Cr + Bacillus que presentan aumentos y disminuciones en la expresión de genes de los metabolismos de carbohidratos, lípidos y aminoácidos. Respecto al metabolismo de carbohidratos en la condición Ctrl vs. Cr en comparación con la condición Ctrl vs. Cr + Bacillus. Entre estos genes con aumento de expresión se destacan AT5G14470 glucuronocinasa, de (Z=2.5679 a 2.6367), AT5G11540 L-gulonolactona oxidasa, de (Z=2.4584 a 2.1574), así como en el metabolismo de lípidos, donde hay un aumento en el gen AT5G07920 diacilglicerol cinasa, de (Z=2.2626 a 2.8792). Entre estos genes se destaca AT5G14470, gen codificante para la glucuronocinasa, esta enzima participa en las rutas metabólicas de la pentosa y glucuronato, ascorbato y alderato, y aminoazúcares, las cuales están relacionadas con la obtención de glucosa. La glucosa producida puede ser utilizada para generar energía o para la síntesis de ribosa y desoxirribosa. Además, se observa la presencia de la enzima beta-glucosidasa.

En las gráficas de distribución de genes de las condiciones Ctrl vs. Cr y Ctrl vs. Cr + Bacillus, existe una similitud en la expresión de genes y enzimas. Destaca nuevamente la presencia de la glucuronocinasa, cuyo gen aumenta su expresión en la condición Ctrl vs. Cr + Bacillus, esta enzima está implicada en tres rutas metabólicas y se presenta en las condiciones Ctrl vs. Cr y Ctrl vs. Cr + Bacillus. Otra enzima presente en ambos arreglos que se observa un aumento de expresión, pese

a estar relacionada en cada condición a diferentes genes AT5G58690 con $Z=2.1644$ en la condición Cr vs. Ctrl y AT3G55940 con $Z=2.575$ en la condición Ctrl vs. Cr + Bacillus es la fosfatidilinositol-fosfolipasa C (PI-PLC), encargada de la producción de 1,2-diacilglicerol (DAG). Este compuesto actúa como un segundo mensajero, permanece en la membrana plasmática y facilita la unión de múltiples isoformas de proteínas quinasas en presencia de calcio, respondiendo así a estímulos externos (Kadamur y Ross, 2013).

Respecto a la condición 28 (Ctrl vs. Cr + Bacillus) en la cual se encuentra *Bacillus thuringiensis* MH778713, que promueve la germinación a pesar de la presencia de Cr (VI). Un aspecto importante a analizar son los mapas metabólicos de carbohidratos, lípidos y aminoácidos, debido al mecanismo de daño de cromo hexavalente, que causa un aumento en la producción de ROS, inhibición de enzimas oxidoreductasas y peroxidación de lípidos relacionadas a las rutas metabólicas antes mencionadas.

Dentro de los metabolismos de carbohidratos, lípidos y aminoácidos se observaron genes con una baja expresión, los cuales se han reportado como relevantes para la supervivencia y adaptabilidad en condiciones de estrés oxidativo (Yao *et al.*, 2018). Respecto al metabolismo de carbohidratos existen diferencias entre la cantidad de genes con aumento de expresión en las rutas metabólicas, entre los cuales destacan en la condición Ctrl vs. Cr + Bacillus los genes AT3G01270 codificante para pectato liasa, AT3G29090 codificante para glucoronocinasa y AT5G14470 codificante para pectinesterasa, estos genes están relacionados a las funciones de degradación de pectina, pese a que existe evidencia de que la pectina es uno de los componentes de la pared celular de las plantas, su función principal es actuar como barrera contra patógenos, esta barrera está compuesta por polímeros de pectina que pueden ser hidrolizados (An *et al.*, 2008), como producto de la degradación de la pectina se obtiene 2-dehidro-3-deoxi-D-gluconato, este compuesto se incorpora a la vía de pentosas

fosfato, de la que existe evidencia del aumento de actividad de su fase oxidativa en condiciones de estrés oxidativo para la producción de poder reductor generado por la vía de Entner Doudoroff (de Freitas-Silva *et al.*, 2017).

Dentro de las otras vías que destacan en los cambios metabólicos está el metabolismo de ascorbato y alderato, donde, a pesar de ver que se encuentran presentes en ambas condiciones, se considera un factor determinante el aumento de expresión de los genes relacionados con la vía de pentosas fosfato. Los genes que se observan con un aumento de expresión en esta ruta son AT5G11540 y ATG514470, estos se encuentran relacionados con el metabolismo de ascorbato y alderato, los genes están involucrados en la producción de ascorbato, compuesto que sirve como transportador de electrones y está directamente involucrado en el ciclo ascorbato – glutatión, cuyo papel principal es la detoxificación de ROS mediante la acción de enzimas oxido reductasas dependientes de NADPH (Corpas *et al.*, 2016), el aumento de expresión de los genes de la vía de pentosas fosfato está relacionado con el metabolismo de ascorbato y alderato, ya que en la vía de pentosas fosfato ocurre la producción de NADPH, compuesto fundamental para la detoxificación de ROS, que es transportado mediante el ascorbato para la reducción de estos compuestos tóxicos mediante la actividad de glutatión.

Dentro de los procesos metabólicos que tienen un aumento de expresión está la biosíntesis y degradación de ácidos grasos, relacionada al gen AT2G04350, codificante para acil CoA sintetasa, cuya función es la síntesis de ácidos grasos para ser incorporados a las membranas como glicerolípidos, esfingolípidos y en almacenamiento como triacilgliceroles (Zhao *et al.*, 2019), que sirven como precursores en la síntesis de ceras, cutina y suberina, también son utilizados para la obtención de energía, este proceso depende de ácidos grasos que son catabolizados durante la beta oxidación, los ácidos grasos son esterificados a coenzima A, proceso en el que forma parte 2-oxoisovalerato deshidrogenasa (E1) (Zhao *et al.*, 2019). El estudio de estas enzimas revela que existen genes con actividades redundantes que están involucrados en el metabolismo

de los lípidos; Esta redundancia funcional se debe a la importancia en el mantenimiento de las barreras lipídicas, así como en la síntesis de lípidos de membrana (Shmid *et al.*, 2005). La expresión de este gen está relacionada al metabolismo de los lípidos que forman parte de la cutícula, influyendo en la permeabilidad, por lo que el aumento de la expresión de este gen se considera que afectará la permeabilidad de la membrana para evitar el paso de Cr (VI).

Mapa de calor

Los resultados del mapa de calor muestran una diferencia de expresión significativa en genes relacionados con la replicación y regulación celular de las condiciones Ctrl vs. Cr y Ctrl vs. Cr + Bacillus respecto a la condición Cr vs Cr + Bacillus. Podemos notar que los genes en los arreglos 27 y 28 son genes relacionados con las diversas actividades, como factores de regulación, transportadores de proteínas, proteínas relacionadas a canales iónicos y síntesis de terpenoides. Dentro de los genes presentes en los arreglos 27, 28 y 29 que presentan una diferencia de expresión, podemos encontrar a los genes: AT1G02420 (PENTRATRIPEPTIDE REPEAT SUPERFAMILY PROTEIN), AT1G29590 (TRANSLATION INITIATION FACTOR 4E), AT1G36990 (C-JUN-AMINO-TERMINAL KINASE-INTERACTING PROTEIN), AT4G11370 (RING-H2 ZINC FINGER PROTEIN RHA1), AT4G24750 (RHODANESE/CELL CYCLE CONTROL PHOSPHATASE SUPERFAMILY PROTEIN), AT4G36150 (DISEASE RESISTANCE PROTEIN FAMILY), AT5G11380 (1-DEOXY-D-XYLULOSE-5-PHOSPHATE SYNTHASE). Este grupo incluye genes relacionados con factores de transcripción para la replicación de RNA, así como segundos mensajeros importantes para la síntesis de terpenoides.

Dentro de los genes relacionados a factores de transcripción destacan dos genes AT4G11370 y AT4G36150 los cuales tienen una baja de expresión considerable, de forma general la lista de genes que comparten están relacionados a la transcripción de información genética, en los cuales observamos el gen AT1G02420, codificante para proteínas repetidoras

de pentatricopeptidos, las cuales están relacionados como reguladores de RNA, ya que controlan su afinidad y especificidad. La actividad de estas proteínas es como reguladora de expresión de genes en organelos, en los organismos vegetales están asociados a cloroplastos, regulando el procesamiento y estabilización de RNA, así como la regulación postranscripcional. Así como AT1G29590, que actúa como un factor de expresión, el cual, puede suplir a otros factores (eIF4B) en el ensamblaje de la unidad 80S ribosomal, en ensayos previos se demostró su baja afinidad. Estos genes son altamente conservados, por lo que tienen un papel importante en la traducción y la capacidad suficiente para suplir a ELf4e1E en caso de necesitarlo, AT5G11380 que está relacionado al metabolismo de carbohidratos o fitohormonas la variante DXS3 está relacionada a la formación de una red filamentosa en los cloroplastos, que ayuda a la regulación en la división y al mantenimiento de su estructura (de Luna-Valdez *et al.*, 2021, Kropiwnicka *et al.*, 2015).

Dentro de los genes relacionados a la actividad de las fitohormonas destacan AT4G11370, codificante para la proteína RING-H2, la cual está asociada con la interacción de diversos componentes que regulan la actividad celular como NAC, factores de transcripción llamados ANAC que son respuestas a ácido abscísico NAC. Su actividad como regulador de ANAC se puede observar con la presencia de ABA, que induce a ANAC. Estos tienen interacciones proteína-proteína a partir de regiones de zinc, como parte de complejos reguladores de proteínas. Estas proteínas RING están asociadas también a ubiquitinación, así como AT1G36990, importante en la transcripción, ya que está relacionado con actividades celulares en la germinación o crecimiento de tubos de polen (Lechner *et al.*, 2002). Otro de los genes que están relacionados con la síntesis de segundos mensajeros es AT4G36150, relacionado a la respuesta celular contra patógenos, actúa principalmente como un activador de genes para la respuesta a través de PRR, por lo que participa en la defensa y puede formar parte de los mecanismos de señalización para muerte celular, ya que está involucrado en la señalización de PAMP (Jacob *et al.*, 2023).

Los genes presentes en el mapa de calor (**Figura 5**) destacan por estar presentes en las tres condiciones, la diferencia de expresión, así como la ruta metabólica a la que están relacionados. Este patrón sugiere un posible ajuste adaptativo en el que la célula prioriza rutas críticas que permiten la adaptación para sobreponerse al estrés oxidativo, tales como la síntesis de terpenoides para la producción de ácido abscísico, así como la activación de respuesta inmune a través de PRR. Al igual que permite observar las diferencias de expresión de genes y rutas metabólicas implicadas entre las condiciones, a través de estas diferencias y semejanzas, permite el estudio de las rutas metabólicas, Este patrón podría estar asociado a un ajuste adaptativo, ya y que existen reporte de la participación de ABA en la tolerancia a estrés oxidativo (Li *et al.*, 2022), a su vez, la activación de PRR y la señalización relacionada a PAMP como mecanismos de defensa (González-Bosch, 2018).

Análisis de enriquecimiento de genes (DAVID)

A partir de los cambios en la expresión de genes, se realizó el análisis de enriquecimiento funcional con DAVID. Esta herramienta, a partir de la prueba exacta de Fisher, permite la comparación de listas de genes, y mediante un valor de enriquecimiento (E-value) indica la probabilidad de que la asociación observada ocurra al azar (Sherman *et al.*, 2022), esto permitió identificar cuatro genes con aumento de expresión en la condición Cr vs Cr + Bacillus que están relacionados a la ruta de biosíntesis de terpenoides, los cuales fueron: AT4G33360, AT5G23320, AT5G11380 y AT3G14510. (**Tabla 3**).

Ensayo de promoción de la germinación en *Arabidopsis thaliana* en presencia de cromo hexavalente para la obtención de compuestos orgánicos.

El ensayo sugiere que, los volátiles emitidos por *Bacillus thuringiensis* MH778713 propician la germinación de *A. thaliana* bajo condiciones de estrés por Cr (VI). Existen reportes de la presencia de microorganismos capaces de tolerar y reducir el Cr (VI) presente en su medio, como los reportados por Francisco *et al.* (2002). Además del trabajo de Ramírez *et al.*

(2020), donde se estudió la ruptura de la latencia en semillas de *A. thaliana*, así como de *Prosopis laevigata*, y la promoción del crecimiento vegetal en condiciones de estrés por Cr (VI), donde se reporta la producción de compuestos como: heneicosano, tetracosano y hentriacontano.

La producción de compuestos de origen bacteriano que ayudan a un mejor desarrollo y adaptabilidad de organismos vegetales es documentada en la investigación de Koilybayeva *et al.* (2023) donde se reportó la producción de compuestos fenólicos, cetonas, alcoholes, terpenoides y ácidos grasos por parte de cepas del género *Bacillus* con diversas actividades biológicas. Dichos compuestos pueden tener efectos benéficos en los organismos vegetales, ayudando a su desarrollo, activando mecanismos de defensa e inhibiendo el crecimiento de patógenos, la actividad biológica de dichos compuestos se debe a la capacidad de ser incorporados como intermediarios en rutas metabólicas, así como servir de sustratos de reserva.

Por otro lado se ha reportado que la exposición de organismos vegetales a metales pesados puede inducir la producción de compuestos antioxidantes en las plantas, en la investigación de Del Bubba *et al.* (2013) se observó que la exposición a Cr (VI) en *Nicotiana langsdorffi* induce la producción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante, tales como: ácido p-cumarico, ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido criptoclorogénico, ácido ferúlico, fueron los compuestos fenólicos reportados, los cuales ayudaron a modular la respuesta metabólica a dicho estresor.

Estos reportes sugieren que debido a la naturaleza química de los VOCs emitidos por *Bacillus thuringiensis* MH778713, estos compuestos pueden tener efectos positivos en la regulación de la respuesta de semillas de *A. thaliana* en presencia de Cr (VI).

Análisis de compuestos orgánicos

El análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) permitió identificar compuestos orgánicos producidos por *Bacillus thuringiensis* MH778713 durante la germinación de *A. thaliana* en condiciones de estrés por Cr (VI). Entre los compuestos identificados están: 1-(3,4-Dimetoxibenzilideno)-6-metil-1H,5H-furo[3,4-c]piridina-3,4-diona, Acridina, 9-(p-dimetilaminoanilina), Dibenz[b,d]cicloheptano, 3,4,7-trimetoxi-11-oximido.

Estas moléculas comparten características estructurales con compuestos heterocíclicos nitrogenados, como piridinas y acrídinas, compuestos estudiados por sus diversos efectos en la actividad biológica en organismos vegetales, como propiedades antifúngicas, antimicrobianas y efectos similares y/o promoción de fitohormonas como auxinas y citoquininas, ayudando al desarrollo del organismo y tolerancia a estresores (Tsygankova *et al.*, 2022). La producción de esta clase de compuestos por parte de *Bacillus* ha sido estudiada en la investigación de Koilybayeva *et al.*, (2023) donde se afirma la producción de compuestos orgánicos volátiles con radicales cetona, aldehído, alquenos, así como compuestos hidrocarbonados con efectos benéficos hacia los organismos vegetales.

Dentro de los compuestos detectados, destacan estructuras relacionadas con derivados de piridina, los cuales han sido descritos como potenciales efectos de promoción en producción de fitohormonas, fungicidas y reguladores del crecimiento vegetal, de acuerdo a Tsygankova *et al.* (2022) existe una relación entre las piridinas y pirimidinas, presentan efectos similares a auxinas y citoquininas, activando procesos como la elongación celular, síntesis proteica y enzimas antioxidantes.

Adicionalmente, se ha reportado que compuestos como 2-metilpiridina y 2-propanona, emitidos por especies del género *Bacillus*, tienen actividad antifúngica significativa, actuando como defensa química en el nicho ecológico del microorganismo (Asari *et al.*, 2016). La capacidad de estos compuestos de actuar como señales inter-especie e intra-especie ha sido ampliamente documentada. Los VOCs bacterianos funcionan como señales de atracción, alerta o comunicación en la

rizosfera, participando en relaciones planta-microbio y microbio-microbio (Koilybayeva *et al.*, 2023; Asari *et al.*, 2016). Esto implica que su papel no se limita al efecto directo sobre las semillas, sino que también puede modular las poblaciones microbianas del entorno y generar condiciones favorables para la germinación.

Finalmente, compuestos derivados de fenilalanina, como 1H-indol y estireno, han mostrado un aumento en ciertos medios de cultivo (Lee *et al.*, 2023), lo que abre la posibilidad de que su presencia también esté influenciada por las condiciones de estrés y el tipo de medio utilizado en este estudio.

En conjunto, la detección de estos compuestos sugiere que *B. thuringiensis* MH778713 no solo actúa como organismo promotor del crecimiento vegetal mediante producción de VOCs, sino que podría estar contribuyendo a la protección de las plántulas a través de mecanismos antifúngicos, antioxidantes y miméticos hormonales (Ramirez *et al.*, 2020).

Conclusiones

1.- El análisis de expresión de genes mediante herramientas bioinformáticas de NCBI, KEGG y DAVID proporciona una gran cantidad de datos, el manejo y presentación de estos datos es clave para su correcta interpretación. Conforme a los datos obtenidos se puede observar que existe una alteración en la expresión de genes relacionados a factores de transcripción, regulación de RNA mensajeros y genes relacionados a la replicación, en los que se observa diferencias de estos factores, que están relacionados a la síntesis de fitohormonas y segundos mensajeros relacionados a la respuesta a estresores, los cuales están relacionados a la síntesis de terpenoides, que son importantes para la síntesis de la fitohormona ácido abscísico.

2.- Dentro de las alteraciones en los metabolismos de carbohidratos lípidos y aminoácidos, podemos observar que los genes con baja de expresión están relacionados a los mecanismos de daño de cromo hexavalente, que son el aumento de

ROS, inhibición de enzimas y peroxidación de lípidos lo cual corrobora los mecanismos de daño; Por otra parte es importante destacar que existe una variación en los genes con aumento de expresión en las condiciones de Ctrl. vs. Cr, Ctrl. Vs. Cr + Bacillus y Cr vs. Cr + Bacillus) donde podemos observar que en la condición Ctrl vs. Cr + Bacillus, diacilglicerol cumple un papel fundamental, ya que actúa en la membrana celular cerrando canales de potasio, mimetizando la actividad de ácido abscísico como osmorregulador, pese a esto, no logra tolerar el estrés debido que ácido abscísico está relacionado a la vez en la producción de enzimas detoxificantes para minimizar el efecto de las ROS, respecto al arreglo 29 (Cr vs. Cr + Bacillus) en el cual podemos notar el cambio metabólico para la adaptación al estrés oxidativo, así como el aumento de enzimas oxidorreductasas para disminuir el daño causado por cromo hexavalente, a su vez, se observa un aumento de la actividad de enzimas como pectin esterasa y pectato liasa, las cuales degradan pectinas, las cuales pueden secretar sus productos para tener una actividad como osmoprotectores, evitando el contacto con cromo hexavalente.

3.- El para la obtención de VOCs producidos por *Bacillus thuringiensis* MH778713, rompe la latencia en condiciones de estrés, corroborando el efecto sinérgico entre *Bacillus* y *A.thaliana*, teniendo como resultado, un aumento en la actividad metabólica para la señalización de producción de compuestos terpenoides. A partir del análisis de enriquecimiento de genes (DAVID), se identificaron genes relacionados a la síntesis de terpenoides, compuestos precursores en la síntesis de la fitohormona ácido abscísico.

4.- Finalmente, el análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), en el que se confirmó la producción de compuestos orgánicos generados por *Bacillus thuringiensis* MH778713 los cuales presentan dentro de sus estructuras radicales nitrogenados como piridinas y acridinas, dichos radicales han sido estudiados ampliamente por su relación con compuestos que presentan actividad biológica, por ende, se infiere que los compuestos detectados están relacionados con la promoción de germinación y tolerancia al estrés oxidativo causado por Cr (VI) en *A. thaliana* mediante

actividad antioxidante de estos compuestos, así como mimetismo químico para la promoción en la producción de ácido abscísico.

Bibliografía

1. Ackerley, D. F., Gonzalez, C. F., Keyhan, M., Blake, R., & Matin, A. (2004). *Mechanism of chromate reduction by the Escherichia coli protein, NfsA, and the role of different chromate reductases in minimizing oxidative stress during chromate reduction. Environmental Microbiology, 6(8), 851–860.* doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00639.x.
2. Asari, S., Matzén, S., Petersen, M. A., Bejai, S., & Meijer, J. (2016). Multiple effects of *Bacillus amyloliquefaciens* volatile compounds: plant growth promotion and growth inhibition of phytopathogens. *FEMS Microbiology Ecology, 92(6)*, fiw070.
3. Bitas, V., Kim, H. S., Bennett, J. W., & Kang, S. (2013). Sniffing on microbes: diverse roles of microbial volatile organic compounds in plant health. *Molecular Plant-Microbe Interactions, 26(8)*, 835-843.
4. Brown, S.D., Thompson, M.R., Verberkmoes, N.C., Chourey, K., Shah, M., Zhou, J.Z., Hettich, R.L., Thompson, D.K. (2006) Molecular dynamics of the *Shewanella oneidensis* response to chromate stress. *Mol Cell Proteomics 5*:1054–1071.
5. Chen, K., Li, G. J., Bressan, R. A., Song, C. P., Zhu, J. K., & Zhao, Y. (2020). Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants. *Journal of integrative plant biology, 62(1)*, 25-54.
6. Cheng, Y., Xie, Y., Zheng, J., Wu, Z., Chen, Z., Ma, X., Li, B., Lin, Z. (2009) Identification and characterization of the chromium (VI) responding protein from a newly isolated *Ochrobactrum anthropi* CTS-325. *J Environ Sci 21*:1673–1678.
7. Cheung, K.H., Gu, J.D., (2007). Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: a review. *Int Biodeter Biodegrad 59*:8–15.
8. Cutler, S. R., Rodriguez, P. L., Finkelstein, R. R., & Abrams, S. R. (2010). Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annual review of plant biology, 61*, 651–679. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112122>
de Freitas-Silva L, Rodríguez-Ruiz M, Houmani H, da Silva LC, Palma JM, Corpas FJ. Glyphosate-induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* affecting peroxisomal metabolism and triggers activity in the oxidative phase of the pentose phosphate pathway (OxPPP) involved in NADPH generation. *J Plant Physiol.* 2017 Nov;218:196-205. doi: 10.1016/j.jplph.2017.08.007. Epub 2017 Aug 31. PMID: 28888161.
9. Del Bubba, Massimo; Ancillotti, Claudia; Checchini, Leonardo; Ciofi, Lorenzo; Fibbi, Donatella; Gonnelli, Cristina; Mosti, Stefano . (2013). *Chromium accumulation and changes in plant growth, selected phenolics and sugars of wild type and genetically modified Nicotiana langsdorffii.* *Journal of Hazardous Materials, 262()*, 394–403. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.08.073
10. Fernando, V. D., & Schroeder, D. F. (2016). Role of ABA in *Arabidopsis* salt, drought, and desiccation tolerance. In *Abiotic and biotic stress in plants-recent advances and future perspectives.* IntechOpen.
11. Finkelstein R. (2013). Abscisic Acid synthesis and response. *The arabidopsis book, 11*, e0166. <https://doi.org/10.1199/tab.0166>
12. Francisco, R., Alpoim, M. C., & Morais, P. V. (2002). *Diversity of chromium-resistant and -reducing bacteria in a chromium-contaminated activated sludge.* *Journal of Applied Microbiology, 92(5)*, 837–843.
- González-Bosch, C. (2018). Priming plant resistance by activation of redox-sensitive genes. *Free Radical Biology and Medicine, 122*, 171-180.

13. Huang, D.W., Sherman, B.T., & Lempicki, R.A. (2009). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Research*, 37(1), 1-13.
14. Huang, M. *et al.*, (2012). The major volatile organic compound emitted from *A. thaliana* flowers, the sesquiterpene (E)-beta-caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen. *New Phytologist* 193: 997–1008.
15. Kanehisa, Minoru & Sato, Yoko & Morishima, Kanae. (2015). BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. *Journal of Molecular Biology*. 428. 10.1016/j.jmb.2015.11.006.
16. Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., & Bolton, E. E. (2025). PubChem 2025 update. *Nucleic Acids Res.*, 53(D1), D1516–D1525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1059>
17. Koilybayeva, M., Shynkul, Z., Ustenova, G., Waleron, K., Jońca, J., Mustafina, K., Amirkhanova, A., Koloskova, Y., Bayaliyeva, R., Akhayeva, T., Alimzhanova, M., Turgumbayeva, A., Kurmangaliyeva, G., Kantureyeva, A., Batyrbayeva, D., & Alibayeva, Z. (2023). Gas Chromatography–Mass Spectrometry Profiling of Volatile Metabolites Produced by Some *Bacillus* spp. and Evaluation of Their Antibacterial and Antibiotic Activities. *Molecules*, 28(22), 7556. <https://doi.org/10.3390/molecules28227556>
18. Koornneef, M., Alonso-Blanco, C., & Vreugdenhil, D. (2004). NATURALLY OCCURRING GENETIC VARIATION IN *A. THALIANA*. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), 141–172. doi:10.1146/annurev.arplant.55.031903.141605.
19. Kotas, J., Stasicka, Z. (2000). Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environ Pollut* 107:263–283. doi: 10.1016/S0269-7491(99)00168-2.
20. Kumar, M., Kesawat, M. S., Ali, A., Lee, S. C., Gill, S. S., & Kim, H. U. (2019). Integration of abscisic acid signaling with other signaling pathways in plant stress responses and development. *Plants*, 8(12), 592.
21. Lee, K., Kwon, S. H., Song, S., Lee, D. Y., Park, M. K., & Kim, Y. S. (2023). Comparative Analysis of Volatile and Non-Volatile Metabolites Derived from *Bacillus subtilis* Strains Producing Different Levels of Biogenic Amines. *Metabolites*, 13(2), 219.
Li S, Liu S, Zhang Q, Cui M, Zhao M, Li N, Wang S, Wu R, Zhang L, Cao Y, Wang L. The interaction of ABA and ROS in plant growth and stress resistances. *Front Plant Sci*. 2022 Nov 24;13:1050132. doi: 10.3389/fpls.2022.1050132. PMID: 36507454; PMCID: PMC9729957.
22. Liu, L., *et al.*, (2018). Remediation techniques for heavy metal-contaminated soils: Principles and applicability, *Sci. Total. Environ.* 633 206–219.
23. Liu, Z., Yan, J. P., Li, D. K., Luo, Q., Yan, Q., Liu, Z. B., ... & Yang, Y. (2015). UDP-glucosyltransferase71c5, a major glucosyltransferase, mediates abscisic acid homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 167(4), 1659-1670.
24. Mangaiyarkarasi, M.M.S., Vincent, S., Janarthanan, S., Subba, Rao T., Tata, B.V.R., (2011). Bioreduction of Cr(VI) by alkaliphilic *Bacillus subtilis* and interaction of the membrane groups. *Saudi J Biol Sci* 18:157–167.
25. Munemasa, S., Muroyama, D., Nagahashi, H., Nakamura, Y., Mori, I. C., & Murata, Y. (2013). Regulation of reactive oxygen species-mediated abscisic acid signaling in guard cells and drought tolerance by glutathione. *Frontiers in Plant Science*, 4, 472.
26. Noa Lavid; Amnon Schwartz; Oded Yarden; Elisha Tel-Or. (2001). *The involvement of polyphenols and peroxidase activities in heavy-metal accumulation by epidermal glands of the waterlily (Nymphaeaceae)*. , 212(3), 323–331. doi:10.1007/s004250000400
27. Orberá, T., Serrat, M., & Ortega, E. (2014). Potencialidades de la cepa SR/B-16 de *Bacillus subtilis* para el control de enfermedades causadas por hongos en cultivos de interés agrícola. *Biotecnología Aplicada*. 31: 7-12.
28. Origin(Pro), 8.5 (SR1, "Version 2010"). OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA.
29. Ortiz, A., Suarez, N., (2015). Presencia de contaminantes en tres cuerpos de agua del estado de Puebla. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias*. 6. 1590.

30. Pande, V., Pandey, S. C., Sati, D., Bhatt, P., & Samant, M. (2022). Microbial interventions in bioremediation of heavy metal contaminants in agroecosystem. *Frontiers in microbiology*, 13, 824084.
31. Ramirez, V., Baes, A., Llopez, P., Bustillos, R., Villalobos, A., Carreño, R., Contreras, L., Muñoz-Rojas, J., Fuentes, E., Martinez, J., Munive A., (2019) Chromium hyper-tolerant *Bacillus* sp. MH778713 assist phytoremediation of heavy metals by mesquite trees (*Prosopis laevigata*). *Frontiers in Microbiology*
32. Ramirez, V., Baez, A., Lopez, P., Bustillos, R., Villalobos, M. A., Carreño, R., Contreras, J. L., Muñoz – Rojas, J., Fuentes, L. E., Martinez, J., Munive, J. A., (2020). Long-Chain Hydrocarbons (C21, C24 and C31) Released by *Bacillus* sp. MH778713 Break Dormancy of Mesquite Seeds Subjected to Chromium Stress. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 11. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00741.
33. Ramirez-Diaz, M.I., Díaz-Pérez, C., Vargas, E., Riveros-Rosas, H., Campos-García, J., Cervantes, C., (2008). Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals* 21:321–332.
34. Rehman, A., Zahoor, A., Muneer, B., Hasnain, S. (2008). *Chromium Tolerance and Reduction Potential of a Bacillus sp.ev3 Isolated from Metal Contaminated Wastewater*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 81(1), 25–29. doi:10.1007/s00128-008-9442-5. responses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(12), 3566-3584.
35. RStudio Team (2020). *RStudio: Integrated Development for R*. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
36. Shanker, A. K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., & Avudainayagam, S. (2005). Chromium toxicity in plants. *Environment international*, 31(5), 739-753.
37. Sherman, B. T., Hao, M., Qiu, J., Jiao, X., Baseler, M. W., Lane, H. C., ... & Chang, W. (2022). DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic acids research*, 50(W1), W216-W221.
38. Singh, et al., (2019). *Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms (Discovery and Applications) || Bacillus spp.: As Plant Growth-Promoting Bacteria.* , 10.1007/978-981-13-5862-3(Chapter 11), 225–237. doi:10.1007/978-981-13-5862-3_11.
39. Singh, H. P., Mahajan, P., Kaur, S., Batish, D. R., Kohli, R. K., (2013). Chromium toxicity and tolerance in plants. *Environmental Chemistry Letters*. Vol. 11:229-254.
40. Tsygankova, V. A., Voloshchuk, I. V., Klyuchko, S. V., Pilyo, S. G., Brovarets, V. S., & Kovalenko, O. (2022). The effect of pyrimidine and pyridine derivatives on the growth and productivity of sorghum.
41. Whitacre, D. M. (Ed.). (2015). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 233. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. doi:10.1007/978-3-319-10479-9
42. Xiong, L., & Zhu, J. K. (2003). Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant physiology*, 133(1), 29-36.
Yao HY, Xue HW. Phosphatidic acid plays key roles regulating plant development and stress responses. *J Integr Plant Biol*. 2018 Sep;60(9):851-863. doi: 10.1111/jipb.12655. Epub 2018 Jul 9. PMID: 29660254.
43. 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. doi: 10.1007/s00425-007- 0530-2.
44. Zhang, S.B.; Qin, Y.L.; Li, S.F.; Lv, Y.Y.; Zhai, H.C.; Hu, Y.S.; Cai, J.P. Antifungal mechanism of 1-nonanol against *Aspergillus flavus* growth revealed by metabolomic analyses. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2021, 105, 7871–7888.
45. Zhao, B., Liu, Q., Wang, B., & Yuan, F. (2021). Roles of phytohormones and their signaling pathways in leaf development and stress