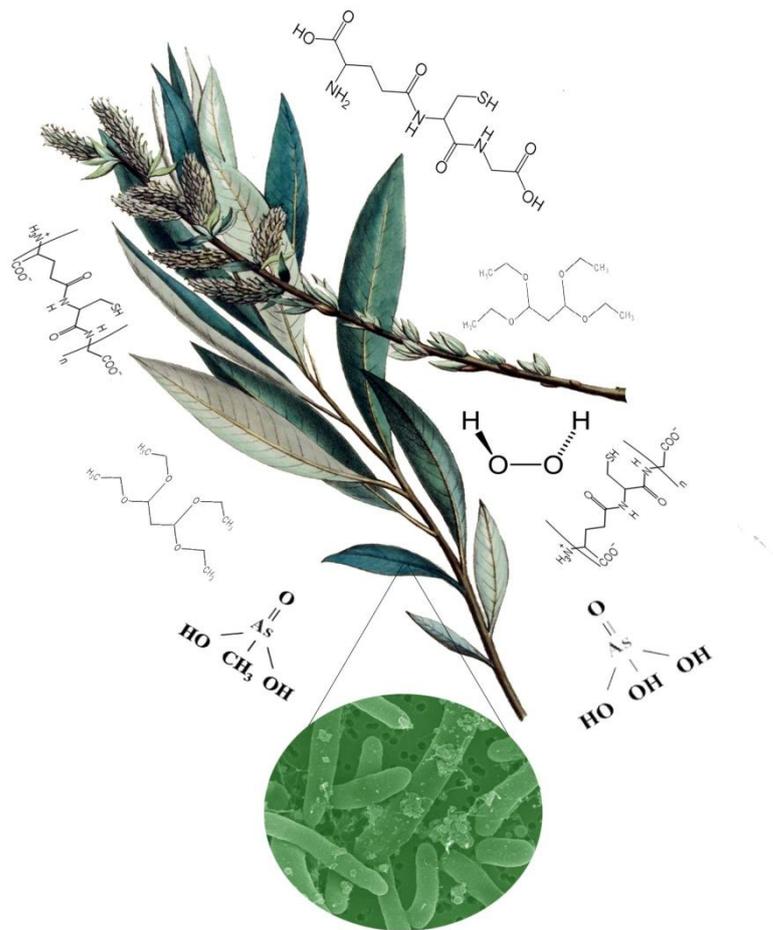


Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y
Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Bacterias asociadas a *Salix atrocinerea* y
respuestas *in vitro* frente al estrés por As:
potencial aplicación en fitorremediación



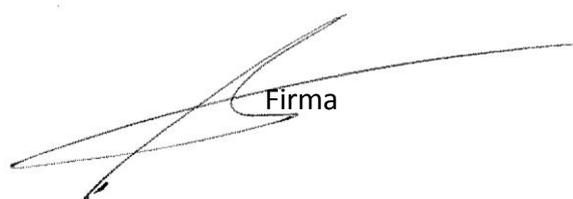
Alejandro Navazas Álvarez
6 de junio de 2014

Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y
Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Bacterias asociadas a *Salix atrocinerea* y
respuestas *in vitro* frente al estrés por As:
potencial aplicación en fitorremediación

Alejandro Navazas Álvarez



Firma

Tutora:

Ana Isabel Peláez Andrés



Firma

Cotutora:

María Aida González Díaz



Firma

RESUMEN. La contaminación de suelos por arsénico es un grave problema ambiental que puede pasar a la cadena trófica y derivar en problemas de salud humana. Existe un reducido número de especies vegetales capaces de sobrevivir en estas zonas contaminadas y acumular concentraciones de metales pesados en sus tejidos muy superiores a las presentes en el suelo. Si además, también se tienen en cuenta las bacterias del suelo que movilicen metales, así como la caracterización e interacción planta-bacteria se podrían optimizar los procesos de fitorremediación. Con el fin de estudiar el comportamiento de *Salix atrocinerea* y sus bacterias asociadas para ser utilizadas en futuros programas de biorremediación, en este trabajo se han caracterizado 3 bacterias endófitas y 3 de la rizosfera, todas ellas resistentes a As, y se ha estudiado el comportamiento *in vitro* de esta especie, caracterizando la acumulación, su especiación, el estrés oxidativo y el contenido en compuestos quelantes en plantas inoculadas con estas bacterias.

Para ello, se aislaron bacterias de la rizosfera de *S. atrocinerea* que crecía en un terreno contaminado y se inocularon a plantas de un clon de *S. atrocinerea* seleccionado en el laboratorio por ser el más acumulador de As. Los resultados muestran que la acumulación de As es mayor en raíces que en hojas y que se incrementó cuando las plantas se inocularon con las bacterias 3E o 96R. Esta mayor acumulación de As estaba relacionada con una mayor producción de compuestos tiólicos debido principalmente a la síntesis de nuevas fitoquelatinas. El análisis de especiación de As mostró que éste se acumula y metaboliza principalmente en la forma de As (III). Finalmente también se observó un mayor contenido de H₂O₂ y de malondialdehído con respecto a las plantas control, así como una disminución de la actividad glutatión reductasa en los tratamientos inoculados con bacterias.

ABSTRACT. Soil contamination by arsenic is a serious environmental problem that can access the food chain and lead to human health problems. A small number of plant species are able to survive in these polluted areas and to accumulate heavy metals concentrations in their tissues much higher than in soil. In addition, if also taken into account the soil bacteria that mobilize metals as well as the characterization and the plant-bacteria interaction, phytoremediation processes could be optimized. In order to study the behavior of *Salix atrocinerea* and its associated bacteria for use in future bioremediation programs, in this work we have characterized 3 endophytic bacteria and 3 from the rhizosphere, all of them resistant to As, and we have studied the behavior *in vitro* of this species by characterizing the accumulation, speciation, oxidative stress and chelating compounds content in plants inoculated with the bacteria.

For this, bacteria from the rhizosphere of a growing *S. atrocinerea* on a contaminated site were isolated and inoculated to plants of a clone of *S. atrocinerea* selected in the laboratory for being the greatest As accumulator. The results show that As accumulation was greater in roots than in leaves and it increased when the plants were inoculated with bacteria 3E or 96R. The greater accumulation of As was related to an increased production of thiol compounds mainly due to the synthesis of new phytochelatin. Speciation analysis showed As is accumulated and metabolized primarily in the form of As (III). Finally, in treatments inoculated with bacteria a higher content of H₂O₂ and malondialdehyde over control plants was also observed, as well as a decrease of glutathione reductase activity.

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo no habría sido posible sin la participación de muchas personas a las que me gustaría expresar mi más sincera gratitud:

Ante todo a la Dra. Aida González y al equipo de Biotecnología Ambiental y Geoquímica de la Universidad de Oviedo. A Aida por seguir confiando en mí y darme la oportunidad de continuar aprendiendo en su grupo de investigación mediante la realización de este trabajo todo ello bajo una elegante forma de gestión. A Victoria, Luis, Alejandra e Iván, porque sin el esfuerzo de Victoria y la ayuda del resto de miembros del grupo este trabajo no hubiese sido posible. A la Dra. Ana Isabel Peláez y el Dr. Jesús Sánchez Martín por acogerme durante estos meses e incitación para realizar este trabajo.

A José Luis Rodríguez Gallego por sus consejos. A Azucena y Cristina, porque sin su trabajo el mío no sería posible.

A todo el resto de mis compañeros de laboratorio de fisiología vegetal: Daniel, Ester, Javier, Fran, Laura, Sara...; y demás personal del área de Fisiología Vegetal, con mención especial a Ana Bertrand, por conseguir que el ambiente de trabajo fuese siempre agradable y estar siempre dispuestos a echarme una mano.

A mi abuela, padres y hermanas y tíos, por seguir haciendo, en conjunto con el Ministerio de Educación; la posibilidad de estudiar no más fácil, sino posible.

A todos,

Gracias.

ABREVIATURAS

As + 3E: Plantas cultivadas con As e inoculadas con la bacteria endófito 3E

As + 6E: Plantas cultivadas con As e inoculadas con la bacteria endófito 6E

As + 15E: Plantas cultivadas con As e inoculadas con la bacteria endófito 15E

As + 34R: Plantas cultivadas con As e inoculadas con la bacteria de la rizosfera 34R

As + 38R: Plantas cultivadas con As e inoculadas con la bacteria de la rizosfera 38R

As + 96R: Plantas cultivadas con As e inoculadas con la bacteria de la rizosfera 96R

CTNPs	Compuestos tiólicos no proteicos
DGGE	Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
GR	Glutation reductasa
GSH	Glutación
GSSH	Glutación oxidado
H/R	Factor de translocación
HPLC	Cromatógrafo líquido de alta resolución
MDA	Malondialdehído
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCs	Fitoquelatinas
PF	Peso fresco
PS	Peso seco
PVPP	Polivinil polipirrolidona
RFLP	Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción
ROS	Especies reactivas del oxígeno
Ti	Índice de tolerancia
UFC	Unidades formadoras de colonias
WPM	Medio Woody Plant

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Potencial de las especies leñosas en fitorremediación.....	1
1.2. Especiación del As.....	2
1.3. Mecanismos de tolerancia a los metales pesados en plantas.....	2
1.4. Efecto de las bacterias endófitas y de la rizosfera en fitorremediación....	3
1.5. Planteamiento y objetivos.....	3
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	5
2.1. Aislamiento de las poblaciones bacterianas.....	5
2.1.1. Aislamiento de bacterias endófitas.....	5
2.1.2. Aislamiento de bacterias de rizosfera.....	5
2.2. Amplificación del gen codificante del ARN ribosomal 16S.....	5
2.3. Análisis de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).....	6
2.4. Secuenciación e identificación de bacterias cultivables.....	6
2.5. Análisis de bacterias totales y poblaciones bacterianas mediante técnicas de DGGE.....	6
2.6. Caracterización y selección de las bacterias endófitas y de la rizosfera.....	6
2.6.1. Resistencia a arsénico.....	6
2.6.2. Producción biosurfactante.....	6
2.6.3. Producción de IAA.....	7
2.6.4. Producción ACC desaminasa.....	7
2.6.7. Ensayo de movilización/inmovilización de metales.....	7
2.7. Cultivo in vitro de <i>Salix atrocinerea</i>	7
2.8. Inoculación de <i>Salix atrocinerea</i> con las bacterias seleccionadas.....	7
2.9. Análisis de As en plantas.....	8
2.10. Especiación de As en suelo y planta.....	8
2.11. Medida del contenido en H ₂ O ₂ y peroxidación lipídica.....	8
2.12. Cuantificación de la actividad glutatión reductasa.....	9

2.13. Análisis de compuestos tiólicos.....	9
2.14. Tratamiento estadístico.....	9
3. RESULTADOS.....	10
3.1. Aislamiento de bacterias endófitas y de la rizosfera.....	10
3.2. Diversidad, aislamiento, caracterización, identificación y selección de las poblaciones microbianas.....	10
3.2.1. Diversidad.....	10
3.2.2. Caracterización e identificación de las bacterias endófitas y de la rizosfera.....	11
3.3. Inoculación de <i>Salix atrocinerea</i> con bacterias.....	12
3.4. Efecto de las bacterias seleccionadas sobre el crecimiento y acumulación de As por <i>Salix atrocinerea</i>	14
3.4.1. Análisis de especiación de Arsénico.....	16
3.5. Relación de la acumulación de arsénico con otros parámetros de la planta.....	18
3.5.1. Síntesis de compuestos tiólicos no proteicos.....	19
3.5.2. Análisis del contenido en H ₂ O ₂ y peroxidación lipídica.....	21
3.5.3. Actividad glutatión reductasa.....	22
4. DISCUSIÓN.....	23
5. CONCLUSIONES.....	27
6. BIBLIOGRAFÍA.....	28

1. INTRODUCCIÓN

La revolución industrial supuso un gran conjunto de transformaciones socioeconómicas, tecnológicas y culturales. En el caso concreto de Asturias, nuestra región ha estado íntimamente ligada a los procesos industriales más relevantes que han acaecido en España en estos dos últimos siglos, durante los cuales, a la par que mejoraba la calidad de vida empeoraba la calidad ambiental. Sin embargo, es evidente que una buena calidad de vida es indisoluble de una buena calidad ambiental y por ello, en los últimos años, una gran parte de los esfuerzos en investigación están orientados a mitigar el deterioro ambiental derivado de la actividad industrial como es la contaminación del suelo con metales pesados.

La contaminación de suelos por metales debido a la actividad industrial supone un gran problema medioambiental. Dado que los suelos contaminados no son útiles para el cultivo, ni la construcción, éstos quedan abandonados de forma indefinida. La exposición de estas áreas contaminadas al viento y agua, permite la dispersión de elementos tóxicos, tales como arsénico (As), pudiendo afectar a suministros de agua potable y zonas adyacentes, con un considerable efecto en la cadena trófica (Kaur et al., 2011).

Para la eliminación de estos elementos del suelo se han desarrollado técnicas en las que se aplican procesos biológicos como alternativa a los métodos convencionales de ingeniería civil. Una de estas técnicas es la fitorremediación, que se define como el empleo de plantas que eliminen los contaminantes del suelo o reduzcan los daños que éstos producen (Salt et al., 1995). Dentro de la fitorremediación, la fitoextracción se basa en el uso de plantas que absorben los metales pesados del suelo y los transportan a su parte aérea, donde se acumulan (Lombi et al., 2001). Después, se recoge este material vegetal rico en metales para su posterior tratamiento, siendo este procedimiento menos costoso y menos perjudicial para el medio ambiente que los sistemas tradicionales de descontaminación basados en la excavación del suelo e incineración (Van Nevel et al., 2007). Otro tipo de fitorremediación es la fitoestabilización, en la que se utilizan plantas que acumulan mayoritariamente los metales pesados en sus raíces evitando así que la contaminación se disperse debido a fenómenos de erosión y lixiviación (Vangronsveld et al., 2009). Además, estas plantas pueden producir exudados radicales que favorecen la inmovilización de los metales en el suelo reduciendo así su disponibilidad y por tanto el riesgo de que estos elementos tóxicos entren en la cadena trófica.

1.1. Potencial de las especies leñosas en fitorremediación

En la mayor parte de los estudios relacionados con la respuesta de las plantas a la presencia de metales pesados en el medio se han utilizado especies como *Thlaspi* o *Arabidopsis*. Sin embargo, éstas tienen pocas posibilidades de ser utilizadas en la descontaminación de suelos debido a su escaso tamaño, pues la efectividad de un proceso de fitoextracción está fuertemente condicionada por características intrínsecas de la planta tales como su capacidad para acumular y trasladar los metales a su parte aérea, presentar gran biomasa, tener un crecimiento rápido y un profundo y extenso sistema radical (Maestri et al., 2010). En consecuencia, el uso de plantas leñosas en fitorremediación, como sería el sauce, presenta varias ventajas respecto al empleo de plantas herbáceas, puesto que su amplio sistema radical puede explorar un mayor volumen de suelo y, por tanto, el impacto de la entrada de contaminante en las cadenas tróficas se reduciría notablemente (Mench et al., 2010). Además, el empleo de especies forestales conlleva una mayor

producción de biomasa que puede ser aprovechada como biocombustible o en la industria maderera con el consiguiente beneficio económico (Rockwood et al., 2004).

Estas especies leñosas, presentan una tasa de fitoextracción menor que algunas especies herbáceas hiperacumuladoras, pero dado que el volumen de biomasa que generan es mayor la cantidad total de metales absorbida del suelo sería mayor (Greger and Landberg, 1999), proporcionando así una alternativa viable a especies hiperacumuladoras pero poco productoras.

1.2. Especiación del arsénico

La forma predominante del arsénico (As) en suelos, bajo condiciones aerobias, es el arseniato (As-V), mientras que el arsenito (As-III), que es más tóxico y móvil, domina en suelos anaerobios (Hughes, 2002). El As-V actúa como un análogo del fosfato y es captado por la planta a través de los sistemas de transporte del fosfato, pudiendo alterar el metabolismo del mismo, mientras que el As-III entra a través de las acuagliceoporinas y se une a los grupos sulfhidrilo de los aminoácidos tales como la cisteína de las proteínas inactivando un amplio rango de enzimas del metabolismo intermediario (Tamaki and Frankenberger, 1992). Por lo tanto, As-III es más tóxico que el As-V; sin embargo, la exposición a ambos, As-III y As-V, provoca efectos toxicológicos similares ya que se ha visto que el As-V absorbido puede reducirse a As-III por reductasas de As-V (Oden et al., 1994).

1.3. Mecanismos de tolerancia a los metales en plantas

La presencia de metales pesados supone un estrés para las plantas, puesto que altera la homeostasis celular y aumenta la cantidad de especies reactivas del oxígeno (ROS), que deben ser eliminadas mediante sistemas de defensa antioxidante (Bartels and Souer, 2004). Esta respuesta varía en función del metal y de la planta pero normalmente participan enzimas como la catalasa (CAT), peroxidasas (POD), la superóxido dismutasa (SOD), el ciclo del glutatión-ascorbato y otros mecanismos no enzimáticos como son la síntesis de ascorbato, glutatión, compuestos fenólicos y carotenoides (Mourato et al., 2012).

Además, con el fin de minimizar los efectos tóxicos de los metales acumulados dentro de la planta, éstos pueden quedar retenidos en la pared celular o ser quelados formando compuestos menos tóxicos que los iones metálicos libres, que serán almacenados en las vacuolas. Las fitoquelatinas (PCs) son una familia de péptidos tiólicos no proteicos con capacidad quelante, constituidos por repeticiones crecientes del dipéptido γ -glutamil-cisteína con glicina como aminoácido terminal $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ donde $n = 2-11$, uniendo el metal a través del grupo tiol de la cisteína (Cobbett and Goldsbrough, 2002; Hirata et al., 2005). Las PCs han sido identificadas en una amplia variedad de plantas, hongos y microorganismos y se sintetizan a partir del glutatión (GSH) por acción del enzima PC sintasa, constitutivo en plantas superiores y cuya activación requiere la presencia de metales pesados, siendo el Cd su activador más efectivo (Clemens, 2006).

1.4. Efecto de las bacterias endófitas y de la rizosfera en fitorremediación

Se entiende por bacterias endófitas, aquellas bacterias que puedan ser aisladas de tejidos internos de la planta cuya superficie externa ha sido esterilizada y que no dañan a la planta hospedadora (Henning and Villforth, 1940). Las hay facultativas, obligadas y oportunistas, e incluso patógenas avirulentas. Si bien las más notables, serían las endófitas competentes, que

son bacterias que están equipadas con los genes importantes para el mantenimiento de la asociación planta-endófito. En otras palabras, aquellas que presentan una maquinaria genética clave para colonizar proporcionando un éxito ecológico (Hardoim et al., 2008).

Las endófitas representan a miembros especializados dentro de grupos bacterianos que también pueden estar presentes en la rizosfera (Hallmann and Berg, 2006), lo que indica que el estatus de endófito representa un *modus vivendi* bacteriano evolucionado y un estado temporal del desarrollo. Se piensa que varios factores ambientales y genéticos pueden permitir a ciertas bacterias ser endófitas (Reinhold-Hurek and Hurek, 1998)

Aunque la presencia de bacterias endófitas en plantas es variable y, en ocasiones, transitoria (Van Overbeek, 2008), son capaces de provocar cambios fisiológicos drásticos modulando el crecimiento y desarrollo de la planta (Conrath et al., 2006). La magnitud de los efectos beneficiosos de las endófitas suelen ser mayores que los de muchas bacterias colonizadoras de la rizosfera (Pillay and Nowak, 1997).

Tanto las bacterias endófitas como de la rizosfera tendrían la capacidad de sintetizar hormonas vegetales, tales como ácido indol-3-acético (IAA), y también serían capaces de bloquear la síntesis del etileno en plantas gracias a la actividad ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa (ACCD), mostrando, por tanto, un efecto directo sobre la regulación del crecimiento y el estrés (Hardoim et al., 2008).

Los procesos o metabolitos microbianos de la rizosfera afectan a la incorporación de los metales por la planta alterando su movilidad y biodisponibilidad (Kuffner et al., 2010). Además, las bacterias, gracias a sus enzimas, producen metabolitos tales como sideróforos, auxinas, moduladores de etileno, etc., que potencian el crecimiento de las plantas en los suelos contaminados y, por tanto, favorecen la degradación de los contaminantes orgánicos y la fitoextracción de los metales por las mismas (Luo et al., 2011). Las bacterias de la rizosfera, ajustando el balance hormonal de la planta, pueden aumentar la superficie radical y la producción de pelos radicales, incrementar la disponibilidad y/o aumentar la solubilidad del metal mediante la producción de biosurfactantes con la consiguiente transferencia del mismo de la rizosfera al interior de los tejidos de la planta. Además, un incremento en ésta biomasa podría promover una mayor eficiencia en la fitoextracción de contaminantes (Weyens et al., 2009).

1.5. Planteamiento y objetivos

Hasta la fecha, la mayor parte de los trabajos publicados se centran en estudiar de forma independiente el efecto que tienen las comunidades microbianas y las plantas sobre la captación, degradación y acumulación de contaminantes. Sin embargo, en la naturaleza rara vez nos encontramos con las plantas en un hábitat independiente al de los microorganismos. Esto hace que la respuesta de las plantas en condiciones reales difiera de las observadas en el laboratorio, lo que conlleva programas de fitorremediación poco exitosos. Por tanto, es interesante y necesario conocer el comportamiento de las plantas, en concreto de una especie forestal, junto a su entorno microbiológico y determinar el efecto que este ejerce. Estudiando aspectos relativos a la identificación y función de las bacterias, así como a la tolerancia, acumulación, y la quelación e inmovilización de los metales por la planta, conseguiremos un mejor conocimiento del papel que juegan las bacterias en los mecanismos implicados en la adaptación y acumulación de As por las plantas, que redundará en una optimización de los programas de fitorremediación.

Por tanto, el objetivo de este trabajo ha sido estudiar el comportamiento de *Salix atrocinerea* cultivado *in vitro* en presencia de As y de bacterias asociadas, caracterizando su respuesta mediante parámetros fisiológicos y bioquímicos.

Para desarrollar este objetivo hemos abordado los siguientes objetivos parciales:

1. **Aislamiento, caracterización, identificación y selección de las bacterias cultivables y análisis molecular de las poblaciones microbianas:** En este apartado se estimará la diversidad bacteriana total (cultivable y no cultivable) y se obtendrá una colección de bacterias cultivables tanto de la rizosfera como endófitas de las raíces de un ejemplar de *S. atrocinerea* procedente de un terreno contaminado. Se caracterizarán mediante pruebas bioquímicas para tratar de concluir su posible papel en fitorremediación. Se identificarán y posteriormente, se hará una selección en base a sus propiedades para llevar a cabo el experimento de inoculación *in vitro*

2. **Inoculación de *Salix atrocinerea* con bacterias seleccionadas por su potencial en fitorremediación:** A partir de las bacterias seleccionadas en el apartado anterior, se procederá a llevar a cabo ensayos de bioaumentación mediante inoculación de las mismas en plantas de *S. atrocinerea* cultivadas *in vitro*.

3. **Caracterización de las respuestas fisiológicas de *Salix atrocinerea*:** Con este objetivo se analizará como la acumulación del As en las plantas junto con la presencia o ausencia de bacterias, afecta al crecimiento, al estrés oxidativo y a la actividad glutatión reductasa. A fin de obtener más información sobre estas respuestas, a parte de la acumulación de As, también se realizará un análisis de especiación del metal tanto en el medio de cultivo, como en los tejidos vegetales.

4. **Análisis de compuestos tiólicos quelantes:** Los estudios de este apartado van dirigidos a conocer si las fitoquelatinas y otros compuestos relacionados participan en la acumulación y tolerancia de As por *Salix atrocinerea*.

Estudiando estos aspectos relativos a la acumulación y detoxificación del As, en combinación con la presencia/ausencia de bacteria, conseguiremos un mejor conocimiento de los mecanismos de adaptación de las plantas a un suelo contaminado, lo que redundará en una optimización de los procesos de fitorremediación.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Aislamiento de las poblaciones bacterianas

Tanto las bacterias de la rizosfera como las endófitas, procedían de la raíz de un ejemplar de *S. atrocinerea* presente en un suelo contaminado con metales pesados de una antigua industria de fertilizantes (Langreo-Asturias).

2.1.1. Aislamiento de bacterias endófitas

Se lavaron las raíces con agua, se sumergieron 2 g de muestra en 70 % de etanol durante 5 minutos, posteriormente en 6 % de hipoclorito de sodio durante 5 minutos. Se aclararon cuatro veces con agua destilada estéril y del último lavado se tomaron 100 µL de agua que fueron sembrados en placas con medio de cultivo, garantizándose así la esterilidad del proceso. Otra prueba de esterilidad fueron las siembras de trozos de raíces estériles sobre placas con medio de cultivo. Se cortaron las raíces aprox. 1 cm y se trituraron con la ayuda de un mortero y de arena de cuarzo estéril. Se añadió 5 mL de agua estéril y se continuó macerando las raíces, a partir del agua colectada se hicieron siembras en diluciones 10^{-1} – 10^{-8} con el objetivo de tener colonias aisladas, puras y representativas de la diversidad de la muestra. Se sembraron 0,1 mL de cada dilución en placas de medio de cultivo sólido GAE (10 g/L glucosa; 0,5 g/L extracto de levadura; 1g/L L-asparagina; 0,5 g/L MgSO₄ x 7 H₂O; 0,01 g/L FeSO₄ y 15 g/L agar) y TSA (15 g/L de digerido de caseína, 5g/L digerido de soja, 5 g/L cloruro sódico y 15 g/L agar). Las placas se incubaron a 30 °C durante 7 días hasta la aparición de colonias bacterianas, momento en que se hizo un recuento de todas las colonias bacterianas (UFC/g suelo). Del líquido obtenido del macerado de las raíces se tomaron 800 µL para la extracción del ADN genómico de todas las bacterias endófitas, cultivables y no cultivables (PowerSoil® DNA Isolation Kit, MO BIO Laboratories).

2.1.2. Aislamiento de bacterias de rizosfera

Se tomó suelo adherido a las raíces de *Salix atrocinerea*, se pasó por un tamiz de 2 mm para eliminar la materia orgánica. Se añadieron 5 g de suelo en 10 mL de una solución 0,1 % Na₄P₂O₇. Cada una de las suspensiones se agitó durante 10 minutos para facilitar que los microorganismos se desprendiesen de las partículas de suelo. Posteriormente, se dejó reposar durante 3 minutos y se tomó una alícuota de 0,5 mL de la fracción no sedimentada para hacer diluciones seriadas hasta 10^{-7} . Se sembraron 0,1 mL de cada dilución en placas de medio de cultivo sólido GAE y TSA. Las placas se incubaron a 30 °C durante 7 días hasta la aparición de colonias bacterianas.

2.2. Amplificación del gen codificante del ARN ribosomal 16S

A partir de las bacterias cultivables se amplificó el gen que codifica para el ARNr 16S mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando oligonucleótidos conservados para Eubacterias (pA: 5´AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3´; 1492R: 5´ ACCTTGTTACGACTT 3´) según el protocolo descrito por Bruce et al. (1992).

2.3. Análisis de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

Con el fin de identificar cepas diferentes y ribotipos únicos en las muestras, se hizo un análisis de polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción del gen que codifica para el ARNr 16S. Los productos de PCR del gen ARNr 16S fueron digeridos con enzimas de restricción HaeIII y AluI. La mezcla de restricción (20 µl) contenía: 1 U de enzima, 10X buffer del enzima de

restricción y 0.5-1 µg de ADN. La mezcla se incubó a 37 °C durante 2 horas. Los productos resultantes fueron analizados en gel de agarosa al 1,5 % en Tris-Borato-EDTA (TBE). Los geles fueron teñidos con SYBR Gold y observados en un transiluminador de luz UV.

2.4. Secuenciación e identificación de bacterias cultivables

La determinación de las secuencias de nucleótidos obtenidas tras la amplificación del gen codificante del ARN ribosomal 16S se llevó a cabo con el kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems). Los productos fueron purificados y sometidos a electroforesis capilar mediante el equipo de análisis genético ABI PRISM® 3130xl Genetic Analyzer (Servicios Científico- Técnicos, Unidad de Secuenciación, Universidad de Oviedo). El software de análisis de secuencias utilizado fue Sequence Scanner Software v1.0 (Applied Biosystems). Las secuencias de nucleótidos se compararon con las secuencias presentes en la base de datos BLAST del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), así como en la base de datos del Ribosomal Database Project (RDP) (<http://rdp.cme.msu.edu>) con el fin de identificar y caracterizar taxonómicamente las bacterias aisladas.

2.5. Análisis de bacterias totales y poblaciones bacterianas mediante técnicas de DGGE

Para el análisis de las bacterias totales es necesario realizar previamente una extracción directa del ADN cromosómico para ello, se realizó una extracción con PowerSoil® DNA Isolation Kit partiendo, en el caso de las endófitas, de 1 mL del macerado de raíces estériles y, en el caso de las bacterias de la rizosfera de 5 g de suelo.

La Electroforesis en Geles con Gradiente Desnaturalizante, DGGE, es una técnica basada en PCR que permite analizar comunidades bacterianas a lo largo del tiempo (Peláez et al., 2013). Se utiliza en estudios de análisis de estabilidad poblacional y permite la identificación de bacterias y su cuantificación relativa en la muestra (Andreote et al., 2010). Esta técnica se realizó siguiendo el protocolo descrito por Muyzer y Small (1993).

2.6. Caracterización y selección de las bacterias endófitas y de la rizosfera

Las bacterias se seleccionaron atendiendo a las siguientes características:

2.6.1. Resistencia a arsénico

Para determinar la resistencia a As de las cepas aisladas, éstas se sembraron en medios de cultivo sólidos (GAE y TSA) que contenían 1mM, 20mM, 50mM y 100mM de As (V) como Na₂HAsO₄. Todas las placas se incubaron a 30 °C.

2.6.2. Producción biosurfactante

La producción de biosurfactante, tras el cultivo de las bacterias en distintos medios de cultivo pero siempre en presencia de hexadecano fue determinada por el método del 'drop collapse' siguiendo el protocolo descrito por Bodour et al. (1998).

2.6.3. Producción de IAA

Se siguió el método colorimétrico descrito por Sheng et al. (2008). Este método estima las cantidades de compuestos indólicos producidos por bacterias en un medio con L-triptófano como precursor.

2.6.4. Producción ACC desaminasa

Se siguió el método descrito por Penrose and Glick (2003). La actividad de la 1-amino-ciclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa (ACCD) se evaluó por la medida de la cantidad de α -cetobutirato (producto de la ruptura del ACC por la ACCD) producido.

2.6.7. Ensayo de movilización/inmovilización de metales

Se siguió el método descrito por Kuffner et al., (2010), basado en la movilización de metales pesados tras la puesta en contacto de 1 g de suelo de la zona contaminada con los metabolitos bacterianos producidos en fase estacionaria.

2.7. Cultivo *in vitro* de *Salix atrocinerea*

Para la realización de este trabajo se utilizaron plantas de *S. atrocinerea* procedentes de un clon seleccionado previamente en el laboratorio mediante cultivo *in vitro* por ser el más acumulador de As.

Segmentos apicales de 2-3 cm de longitud se transfirieron a medio WPM (medio woody plant) con macronutrientes, micronutrientes y vitaminas descrito por Lloyd and McCown (1981), y además contenía 30 g L⁻¹ de sacarosa y 6,5 g L⁻¹ de agar. A continuación se cultivaron en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 25 °C y al cabo de 8 semanas se recogieron las plantas, se lavaron con agua desionizada (Milli-Q 185 plus system, 18 m Ω cm⁻¹ resistividad) para eliminar los posibles restos de agar; quedando de esta manera listas para pasarlas a un cultivo vitropónico en cajas Magenta de policarbonato de 600 mL de capacidad, con 10 tapones de celulosa en la base y 80 ml de solución WPM líquida. El arsénico se utilizó en forma de arseniato sódico heptahidratado (Na₂HAsO₄ · 7H₂O) en una concentración de 150 μ M. Previamente al paso de cultivo vitropónico, las plantas fueron inoculadas con la bacteria de interés.

2.8. Inoculación de *Salix atrocinerea* con las bacterias seleccionadas

A partir de las bacterias seleccionadas (apartado 2.6.), se llevó a cabo un ensayo de bioaumentación mediante inoculación de las mismas en plantas de *Salix atrocinerea*. Para llevar a cabo la inoculación, se embebieron las raíces en una solución con una concentración bacteriana de 10⁸ UFC/ml (Kuffner et al., 2010) durante 15 min y se añadió 1 mL al medio de cultivo de la caja magenta.

Al cabo de 30 días de cultivo se midió el peso fresco y seco, la longitud del tallo y de la raíz más larga y el número de hojas. Para obtener el peso seco (PS), como medida de la biomasa total de las plantas, se recogió el material vegetal y secó a 40 °C hasta obtener un peso constante.

Con el fin de reducir al mínimo la variabilidad que existe en el desarrollo de los clones, los resultados se expresan según los siguientes índices:

- Índice peso fresco (PF): $(PF_{final} - PF_{inicial}) / (PF_{inicial})$
- Índice caulinar: $(Longitud_{tallo\ final} - Longitud_{tallo\ inicial}) / (Longitud_{tallo\ inicial})$
- Índice radical: $(Longitud_{raíz\ final} - Longitud_{raíz\ inicial}) / (Longitud_{raíz\ inicial})$
- Índice foliar: $(N^{\circ}\ Hojas_{final} - N^{\circ}\ Hojas_{inicial}) / (N^{\circ}\ Hojas_{inicial})$

El peso seco (%) se calculó de la siguiente forma:

$$\text{Peso seco (\%)} = (\text{Peso seco} / \text{Peso fresco}) \times 100$$

2.9. Análisis de As en plantas

Se tomaron 100 mg de las muestras vegetales (hojas y raíces) y tras secarlas a 70 °C durante 48 horas se sometieron a una digestión ácida con una mezcla de HNO₃ concentrado: H₂O₂: HF en la proporción 3: 1: 1. Posteriormente, las muestras se atacaron en horno microondas hasta conseguir el licuado total de la muestra (Montaser, 1998) y el análisis de metales se realizó por espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) tipo cuadrupolo (HP-7500 cc). La determinación se realiza por calibrado con patrones internos.

Una vez cuantificado el contenido de As en la planta, se estimó el factor de translocación (H/R) dividiendo la concentración de As en hoja entre la concentración de As en raíz (Shi et al., 2010). También se calculó el índice de tolerancia (Ti), dividiendo el peso seco de las plantas crecidas en As entre el peso seco de las plantas control (Wilkins, 1978) y que mide la capacidad de las plantas de crecer ante una determinada concentración de As.

2.10. Especiación de As en suelo y planta

Se llevó a cabo un estudio de la especiación del As tanto en el medio líquido de cultivo como en las muestras de tejidos vegetales. La especiación de arsénico fue analizada, en ambos casos según el protocolo descrito por Huang and Fecher (2012) determinando las especies presentes As (III), As(V), monometilarsénico (MMA) y dietilarsénico (DMA) por HPLC-ICPMS (1260 Infinity Technologies-7700 Series/Agilent technologies) mediante una columna de especiación para arsénico.

2.11. Medida del contenido en H₂O₂ y peroxidación lipídica

El contenido de H₂O₂ en las hojas se midió según el método de Fernández et al. (2013), con pequeñas modificaciones. En primer lugar, 500 mg de tejido fresco de hojas se homogeneizaron con 2,5 mL de ácido tricloroacético al 0,1 % y el homogeneizado se centrifugó a 10000 g durante

15 minutos. A una alícuota de 0,5 mL del sobrenadante, se le añadieron 0,5 mL de tampón fosfato (pH 7,6) 100 mM y 1 mL de KI. La absorbancia se midió a 390 nm.

La peroxidación lipídica se evaluó midiendo la formación de malondialdehído (MDA) según el método descrito por Demiral and Turkan (2005).

2.12. Cuantificación de la actividad glutatión reductasa

Para el análisis de la actividad glutatión reductasa (GR), todos los pasos se realizaron a 4 °C. Los extractos crudos se obtuvieron mediante la extracción de 500 mg de hojas frescas con tampón Tris-HCL 100 mM (pH 7,8) que contenía ditioneitol 3 mM, EDTA 1 mM y PVPP 2 % (p/p) insoluble y se centrifugaron a 10000 g durante 30 minutos (Martins et al., 2011)

La actividad de la glutatión GR (EC 1.6.4.2) se cuantificó siguiendo el método descrito por Shanker et al. (2004).

2.13. Análisis de compuestos tiólicos

Tanto las plantas control como las plantas cultivadas con o sin bacteria en presencia o ausencia de As se separaron en hojas y raíces, se trituraron en nitrógeno líquido y se almacenaron a - 80 °C hasta su posterior utilización. Para la extracción de los compuestos tiólicos se siguió el protocolo de Rauser (1987) ligeramente modificado por Fernández et al. (2012). Todo el proceso se realizó en cámara fría (4 °C) para evitar la desnaturalización de los péptidos de la muestra.

Para el análisis por HPLC se utilizó un cromatógrafo Waters 600 y se siguió el protocolo de Fernández et al. (2012). Se midió la absorbancia del compuesto derivatizado (5-mercapto-2-nitrobenzoato) a 412nm. Los patrones utilizados fueron estándares externos de GSH y una mezcla de PCs (PC₂, PC₃ y PC₄) sintetizadas *in vitro* por el Prof. M.H. Zenk con el enzima PC sintasa extraído de *Silene vulgaris* (Friederich et al. 1998).

Los compuestos tiólicos resultantes fueron numerados según el tiempo de retención y los cambios cuantitativos de los mismos se compararon cuantificando las áreas de integración obtenidas a 412 nm de absorbancia como equivalentes de nmoles de GSH.

2.14. Tratamiento estadístico

Para el ensayo de inoculación *in vitro* se realizó un ANOVA bifactorial de efectos fijos completo equilibrado, con la presencia/ausencia de As o bacteria como variables independientes y como variable dependiente los diferentes parámetros analizados, siendo el nivel de significación 0,05 en todos los casos y n = 6 por tratamiento. Los resultados obtenidos se analizaron usando el SPSS18® (IBM®).

3. RESULTADOS

3.1. Aislamiento de bacterias endófitas y de la rizosfera

Se aislaron un total de 44 bacterias, 21 endófitas y 23 rizosfera, de un ejemplar de *S. atrocineria* de la zona de estudio, para ello se emplearon diferentes medios GAE y TSA. Siendo mayor el número de bacterias aisladas en medio GAE que TSA. Las condiciones de cultivo fueron en aerobiosis y a 30 °C.

3.2. Diversidad, aislamiento, caracterización, identificación y selección de las poblaciones microbianas

3.2.1. Diversidad

A fin de conocer el verdadero perfil genético de la población microbiana presente en

S. atrocineria, es necesario realizar una electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) que nos permita tener una idea de la diversidad más allá de las bacterias cultivables, y que por otro lado, son con las únicas que podemos trabajar en el laboratorio.

El ADN genómico total de cada muestra se extrajo según se indica en la sección de Material y Métodos, amplificándose posteriormente fragmentos de 194 pb que incluían la región hipervariable V3 del gen codificante del ARNr 16S. La banda de amplificación obtenida para cada muestra, endófitas y rizosfera, se analizó mediante (DGGE).

En el caso de la muestra endófitas, se aprecian claramente tres bandas mayoritarias que representarían los grupos bacterianos dominantes en la población (Fig.1). Estas tres bandas no aparecen en la muestras de rizosfera, donde sí aparece una banda mayoritaria con diferente posición de gradiente. Además, también se puede apreciar en la imagen varias bandas con menor intensidad y con diferente movilidad entre las muestras (Fig.1).

Para analizar el conjunto de las bandas del gel de DGGE se llevó a cabo un análisis bioinformático con el programa *Phoretix*. Este programa es capaz de detectar, además de las bandas mayoritarias de los geles de DGGE, aquellas menos intensas que se corresponden con grupos minoritarios. Así, pudo observarse, como la diversidad microbiana es mayor que la obtenida tras cultivo en placa, con un total de aproximadamente 22 géneros de endófitas frente a las 21 bacterias endófitas aisladas en placa, y un total de aproximadamente 23 géneros de la rizosfera frente a las 23 bacterias de la rizosfera obtenidas mediante cultivo.

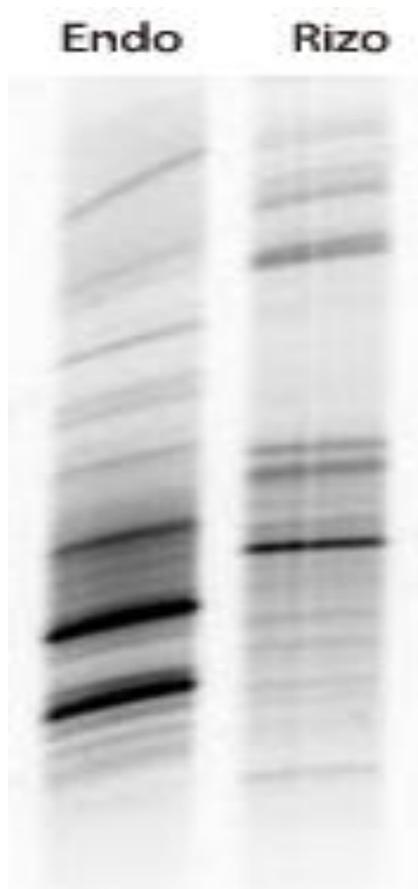


Figura 1. Análisis mediante DGGE de las muestras de un ejemplar de *S. atrocinera* presente en un terreno contaminado. El nombre de cada carril se corresponde con el nombre de cada muestra. Endo: endófitas. Rizo: rizosfera.

3.2.2. Caracterización e identificación de las bacterias endófitas y de la rizosfera

Debido al gran número de cepas aisladas (44), en primer lugar se realizó una prueba de resistencia a As, seleccionándose un total de 24 bacterias resistentes a 100 mM de As. A continuación, en la búsqueda de bacterias con potencial aplicación en fitorremediación, se realizó una prueba de producción de biosurfactante, reduciéndose el número a un total de 14 bacterias, 5 endófitas y 9 de la rizosfera. Cabe destacar que mientras el 50 % de ambas poblaciones era resistente a 100 mM de As, sólo el 38 % de las endófitas eran capaces de producir biosurfactante frente al 65 % de las bacterias de la rizosfera. Sobre estas 14 bacterias se realizó otra selección en base a aquellas que presentaron un mejor crecimiento en medio líquido GAE durante 2 días a 30°C y 150 rpm.; ya que para la inoculación de plantas se necesitan inóculos bacterianos del orden de 10^7 - 10^9 UFC/ml (Kuffner et al., 2010). Por lo que finalmente se seleccionaron un total de 6 bacterias, 3 endófitas y 3 de la rizosfera y se analizaron bioquímicamente para la producción de IAA (ácido indol-3-acético) y ACCD (1-amino-ciclopropano-1-carboxilato desaminasa) (Tabla 1).

Los resultados muestran diferencias entre bacterias en cuanto a la producción de IAA, siendo las que más producen la 3E, seguida de la 34R (Tabla 1). En cuanto a la producción de ACCD, la bacteria que más ACCD produjo fue la 34R (Tabla 1).

Tabla 1. Caracterización bioquímica de una selección de bacterias procedentes de una planta de *S. atrocinnerea* crecida en un terreno contaminado: resistencia As, producción biosurfactantes, IAA y ACCD. (E: endófitas, R: rizosfera) Valores marcados con diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre bacterias ($p < 0,05$).

Código interno	(% identidad)	As (mM)	Biosurf.	IAA ($\mu\text{g/mL}$)	ACCD (nM)
3E	En identificación	> 100	+	14,22 \pm 0,13 a	0,07 \pm 0,01 bc
6E	<i>Variovorax</i> sp. Zs50 (99 %)	> 100	+	10,55 \pm 0,05 c	0,01 \pm 0,00 d
15E	En identificación	> 100	+	10,40 \pm 0,15 c	0,06 \pm 0,00 c
34R	En identificación	> 100	+	12,69 \pm 0,09 b	0,14 \pm 0,00 a
38R	<i>Variovorax paradoxus</i> (98 %)	> 100	+	8,46 \pm 0,01 e	0,06 \pm 0,01 c
96R	En identificación	> 100	+	9,79 \pm 0,04 d	0,09 \pm 0,01 b

Se piensa que la forma más directa para las bacterias de promover la acumulación de metales pesados en plantas es la movilización de metales del suelo. Por ello, tras esta selección y dado que la finalidad de estos estudios es fitorremediar una zona contaminada consideramos interesante conocer el efecto de la exposición de las diferentes bacterias con el suelo de la zona contaminada.

Los resultados de movilización de metales de los metabolitos de las bacterias seleccionadas en contacto con el suelo de la zona contaminada, muestran que la movilización de metales es diferente en función del tipo de bacteria (Tabla 2). Destaca que únicamente con las bacterias de la rizosfera se produce una movilización de Pb y, que sólo las bacteria 34R es capaz de movilizar Hg y en gran cantidad. Las bacterias 6E y 96R movilizan Zn; aumentando en estos casos la disponibilidad del metal a la planta.

En cuanto al As, no se observa movilización del mismo con ninguna de las bacterias pero sí inmovilización, especialmente con la 34R.

Tabla 2. Movilización de metales tras poner 1 g de suelo de la zona contaminada en contacto con 5 ml de los metabolitos bacterianos de cada bacteria analizada, por separado, durante 16 h a 35 rpm. Como control se tomó el lavado de medio GAE con el suelo, para cada réplica, se pusieron dos alícuotas con el suelo y se tomaron 3 medidas (n = 6). Valores marcados con diferente letra en la misma columna indican diferencias significativas entre bacterias ($p < 0,05$).

Bacteria	Metal (ppm)			
	Zn	As	Hg	Pb
Control	0,09 ± 0,01 a	2,22 ± 0,19 bc	0,01 ± 0,00 a	0,01 ± 0,00 a
3E	0,04 ± 0,00 a	1,74 ± 0,14 b	0,01 ± 0,00 a	0,02 ± 0,00 ab
6E	0,39 ± 0,03 b	2,59 ± 0,29 b	-	0,02 ± 0,00 a
15E	0,07 ± 0,00 a	1,54 ± 0,13 ab	0,00 ± 0,00 a	0,02 ± 0,00 a
34R	0,10 ± 0,01 a	1,27 ± 0,10 a	0,39 ± 0,02 b	0,03 ± 0,00 b
38R	0,41 ± 0,03 b	2,67 ± 0,29 c	0,03 ± 0,00 a	0,06 ± 0,00 d
96R	0,09 ± 0,00 a	1,85 ± 0,15 b	0,02 ± 0,00 a	0,10 ± 0,0 1e

3. 3. Inoculación de *Salix atrocinerea* con bacterias

En experimentos previos realizados en el grupo de investigación sobre acumulación en *Betula celtiberica*, debido al mal estado que presentaban los cultivos al cabo de 30 días y ante la duda de si era atribuible al As o a la bacteria inoculada (10^8 UFC/ml), se realizó un experimento en el que sólo se pusieron plantas cultivadas sin As e inoculadas con bacterias a diferentes densidades (10^2 UFC/ml y 10^5 UFC/ml). Para ello se tomaron, aleatoriamente, dos bacterias endófitas y dos de la rizosfera.

Tras 30 días se observó, que tanto las plantas inoculadas como los controles presentaban un mal aspecto, con raíces necrosadas y hojas marchitas (datos no mostrados) por lo que en este caso, el único factor común entre ambas había sido el tiempo en el que las raíces habían estado embebidas en el tampón fosfato salino (PBS) (las raíces del control en PBS sin bacterias y las raíces de los tratamientos en PBS con bacterias). Debido a esto, se decidió cambiar el medio del inóculo bacteriano por el medio WPM de la planta, asegurándonos, mediante microscopía que las células bacterianas no perdían viabilidad y se retomó el tamaño inicial de la densidad del inóculo (10^8 UFC/ml).

Para asegurarnos de que la bacteria inoculada sí estaría presente en la planta, para ello se realizó una comprobación mediante microscopía FISH (Fig. 2) y aislamiento en placa tras esterilización y extracción de ADN bacteriano de las plantas inoculadas y controles (Fig. 3). Los resultados de microscopía, aislamiento y extracción muestran que la bacteria de la rizosfera también es capaz de penetrar en el interior de los tejidos de la planta y que los controles *in vitro* no inoculados son axénicos (Fig. 2 y Fig. 3).

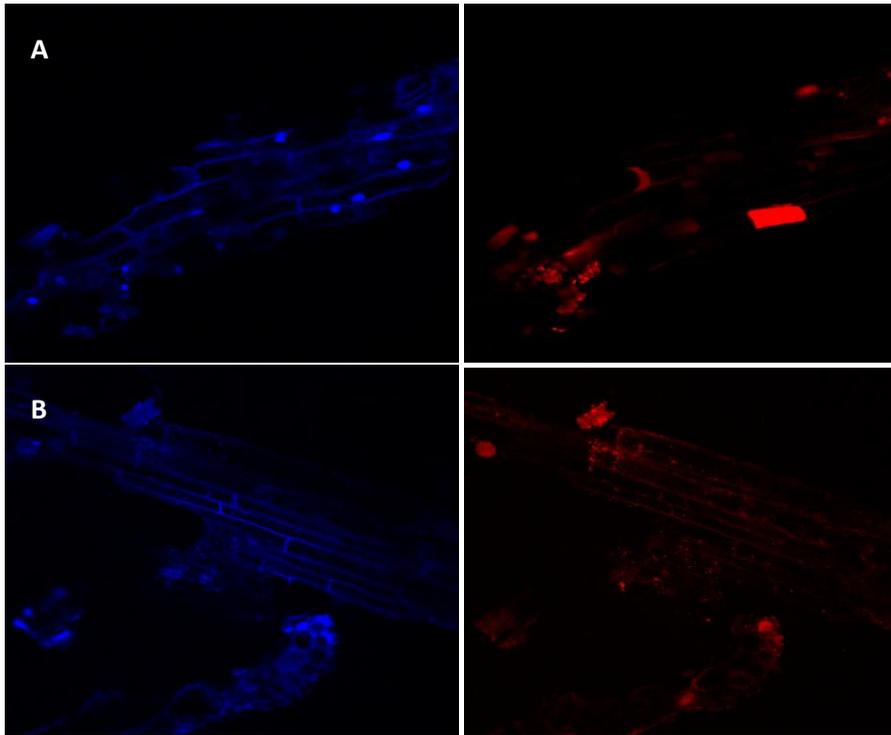


Figura 2. Hibridación fluorescente *in situ* (FISH) en cortes (10 μ m) de raíces de *S. atrocinerea*. Células teñidas con DAPI (izq.) y sonda bacteriana-Cy3 (dcha.) **(A)** *S. atrocinerea* control **(B)** *S. atrocinerea* inoculado con una bacteria de la rizosfera.

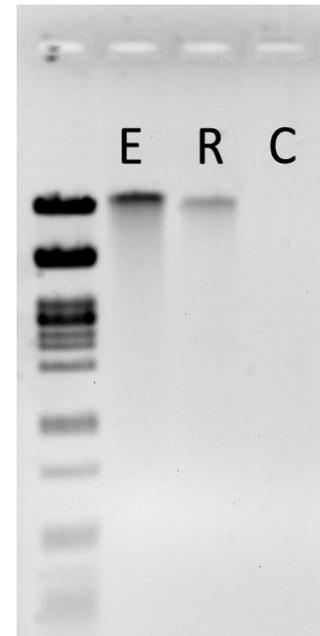


Figura 3. Extracción ADN bacteriano de las raíces de plantas inoculadas tras esterilización superficial. E: endófitas, R: rizosfera, C: control *in vitro* sin inocular.

3.4. Efecto de las bacterias seleccionadas sobre el crecimiento y acumulación de As por *Salix atrocinerea*

Se inocularon las plantas con 3 bacterias endófitas (3E, 6E y 15E) y 3 bacterias de la rizosfera (34R, 38R y 96R) tanto en presencia como en ausencia de As y los resultaron muestran después de 30 días de cultivo un descenso del peso fresco de las plantas en casi todos los tratamientos ensayados, excepto para el As+3E donde los valores fueron similares al control (Tabla 3).

Tabla 3. Índice de incremento en peso fresco, porcentaje de peso seco e índice de incremento del tallo en plantas de *S. atrocinerea* cultivadas durante 30 días en presencia o ausencia de As e inoculadas con bacterias endófitas (3E, 6E, 15E) y de la rizosfera (34R, 38R, 96R). Los valores marcados con diferente letra en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Tratamiento	Δ Peso Fresco	% Peso seco		Δ Longitud del tallo
		Hojas	Raíces	
Control	2,10 \pm 0,24 ab	45,70 \pm 5,61 bc	16,51 \pm 3,95 f	0,90 \pm 0,17 b
3E	1,14 \pm 0,26 de	29,91 \pm 3,19 d	17,22 \pm 1,28 f	0,52 \pm 0,08 cd
6E	1,55 \pm 0,45 cd	29,84 \pm 8,13 d	14,41 \pm 2,10 f	0,61 \pm 0,07 c
15E	1,66 \pm 0,14 c	32,48 \pm 7,98 d	16,23 \pm 1,29 f	0,55 \pm 0,08 c
34R	1,38 \pm 0,03 d	34,53 \pm 5,14 d	16,74 \pm 2,08 f	0,34 \pm 0,08 d
38R	1,84 \pm 0,25 bc	31,1 \pm 5,8 d	14,80 \pm 0,77 f	0,54 \pm 0,11 c
96R	1,56 \pm 0,01 cd	29,17 \pm 1,95 d	15,24 \pm 0,47 f	0,62 \pm 0,03 c
As	1,50 \pm 0,15 cd	40,10 \pm 6,53 cd	37,06 \pm 0,95 c	1,03 \pm 0,13 b
As + 3E	2,41 \pm 0,49 a	55,40 \pm 9,97 ab	40,80 \pm 1,57 b	1,21 \pm 0,11 a
As + 6E	0,84 \pm 0,20 e	63,60 \pm 5,13 a	33,70 \pm 0,44 d	0,57 \pm 0,17 c
As + 15E	1,18 \pm 0,13 de	63,70 \pm 11,96 a	31,00 \pm 0,72 e	1,25 \pm 0,07 a
As + 34R	0,93 \pm 0,29 e	66,70 \pm 4,28 a	42,80 \pm 0,00 b	0,45 \pm 0,06 cd
As + 38R	1,60 \pm 0,18 cd	55,80 \pm 10,00 ab	37,01 \pm 1,24 c	0,97 \pm 0,11 b
As + 96R	1,19 \pm 0,11 de	64,40 \pm 3,42 a	46,30 \pm 0,30 a	0,60 \pm 0,15 c

En cuanto al peso seco, hay que destacar que curiosamente, tanto en hojas como en raíces, cuando las plantas se cultivaron en As y se inocularon con las bacterias endófitas y de la rizosfera, los resultados obtenidos fueron mejores que en el control (Tabla 3). Así, en presencia de As, mientras que en raíces los máximos valores de crecimiento correspondieron al tratamiento As+96R, en hojas fueron bastante similares entre sí (Tabla 3).

Los resultados de otros parámetros de crecimiento, como la longitud de la raíz y el número de hojas, no mostraron diferencias significativas y no se recogen en la tabla, la longitud del tallo fue el único factor que mostró diferencias significativas entre los distintos tratamientos. Los tratamientos As+3E y As+15E muestran un mayor incremento en longitud, mientras que los tratamientos As y As+34R no presentan reducción de crecimiento ya que la longitud del tallo fue similar a las de las plantas control mientras el tratamiento 34R es el que presenta el valor más bajo (Tabla 3).

Tras 30 días de cultivo observamos que la acumulación de As es menor en hojas que en raíces, alcanzando en este último órgano concentraciones superiores a 2000 mg As Kg⁻¹ PS, sobre todo en las plantas que habían sido inoculadas con 3E y 96R (Fig. 4).

En hojas, el As acumulado no superó en ningún caso los 63 mg As Kg⁻¹ PS obtenidos en las plantas inoculadas con 3E (Fig. 4).

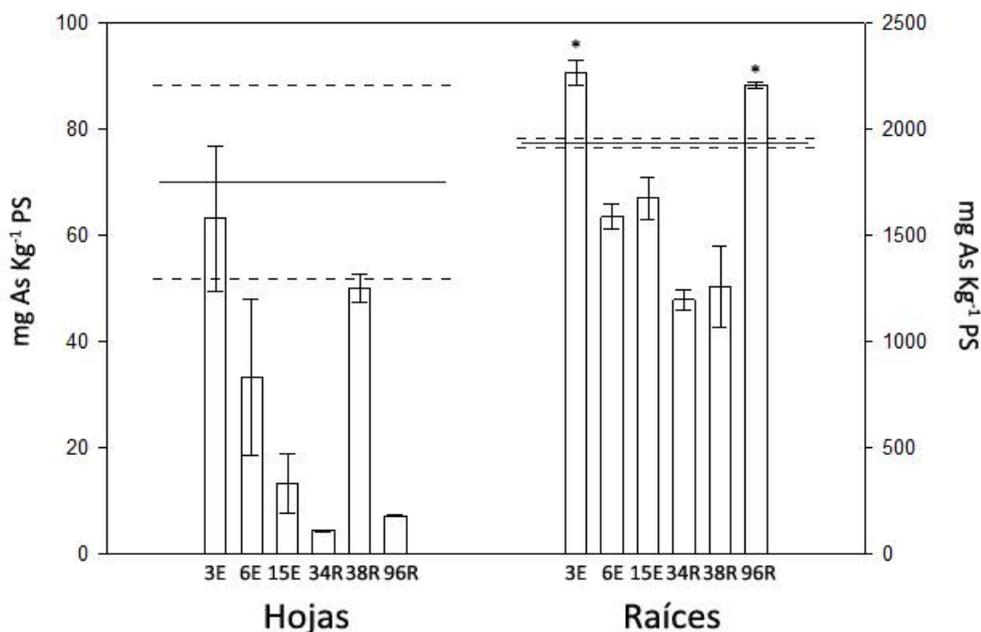


Figura 4. Acumulación de As (mg kg⁻¹ PS) en hojas y raíces de *S. atrocinerea* cultivadas durante 30 días en presencia de As e inoculadas con las bacterias endófitas (3E, 6E y 15E) y de la rizosfera (34R, 38R y 96R). Las barras marcadas con (*) indican diferencias significativas superiores al tratamiento con As (no inoculado), representando su media por línea continua (—) y su desviación por línea discontinua (- - -) ($p < 0,05$).

El índice de tolerancia, en hojas, fue mayor en las plantas de *S. atrocinerea* inoculadas con bacterias, tanto endófitas como de la rizosfera, que en las plantas cultivadas sólo con As (Tabla 4). Sin embargo, en raíces, las plantas que presentaron un mayor índice de tolerancia fueron aquellas procedentes de los tratamientos As+3E, As+34R y As+96R. En cuanto al índice de translocación, fue muy bajo en todos los tratamientos ensayados (Tabla 4).

Tabla 4. Índice de tolerancia (Ti), en hojas y raíces, y factor de translocación (H/R) de plantas de *S. atrocinerea* cultivadas durante 30 días en presencia de As y bacterias.

Tratamiento	Índice de tolerancia (Ti)		H/R
	Hojas	Raíz	
As	0,88	2,24	0,04
As + 3E	1,21	2,47	0,03
As + 6E	1,39	2,04	0,02
As + 15E	1,39	1,88	0,01
As + 34R	1,46	2,59	0,00
As + 38R	1,22	2,24	0,04
As + 96R	1,41	2,80	0,00

3.4.1. Análisis de especiación de Arsénico

Los resultados de especiación muestran como, en las hojas, el arsénico se acumula en forma reducida (As (III), arsenito) a excepción de aquellas plantas inoculadas con la bacteria 15E dónde aproximadamente el 50% de arsénico se acumula en forma de arsenito y el otro 50% en forma oxidada (As (V), arseniato) (Fig. 5).

En las raíces, nos encontramos, sin embargo, que aunque la mayor parte del arsénico se encuentra en la forma reducida de arsenito, otra pequeña parte se encuentra en forma de arseniato a excepción de las raíces de plantas inoculadas con la bacteria 6E en las que la mayor parte del arsénico está en forma de arseniato (Fig. 5).

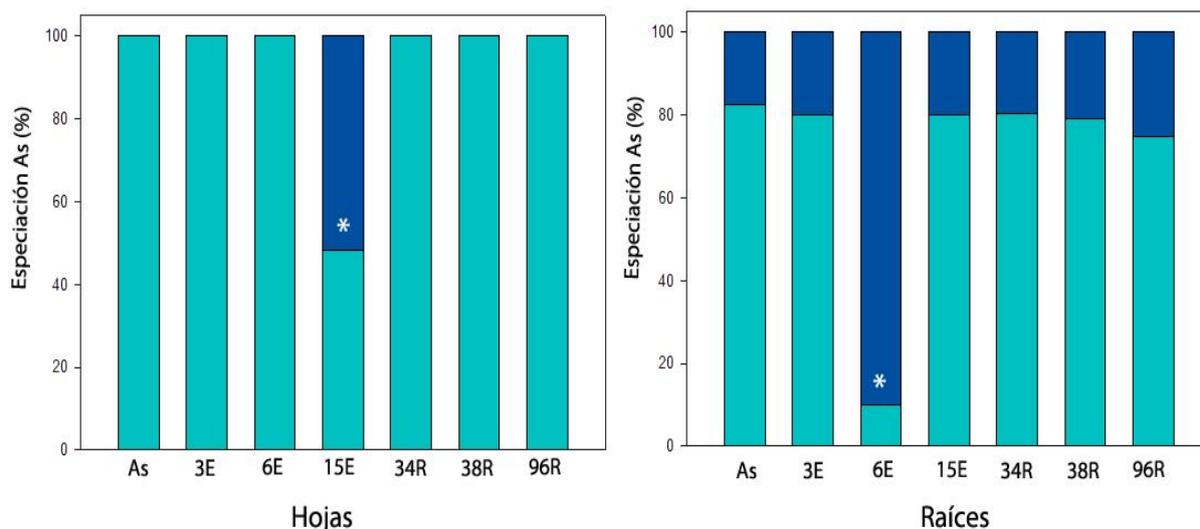


Figura 5. Especiación del As (%) en hojas y raíces de *S. atrocinerea* cultivadas durante 30 días en presencia de As e inoculadas con las bacterias endófitas (3E, 6E y 15E) y de la rizosfera (34R, 38R y 96R), As III (■) As V (■). Las barras marcadas con (*) indican diferencias significativas respecto al tratamiento con As ($p < 0,05$).

Quando se analizó la especiación del arsénico en el medio de cultivo después de 30 días, observamos que más del 90% del arsénico se encuentra en la forma de arseniato (que es la que habíamos puesto inicialmente) excepto en el caso del medio de cultivo en el que las plantas habían sido inoculadas con la bacteria 34R (Fig. 6)

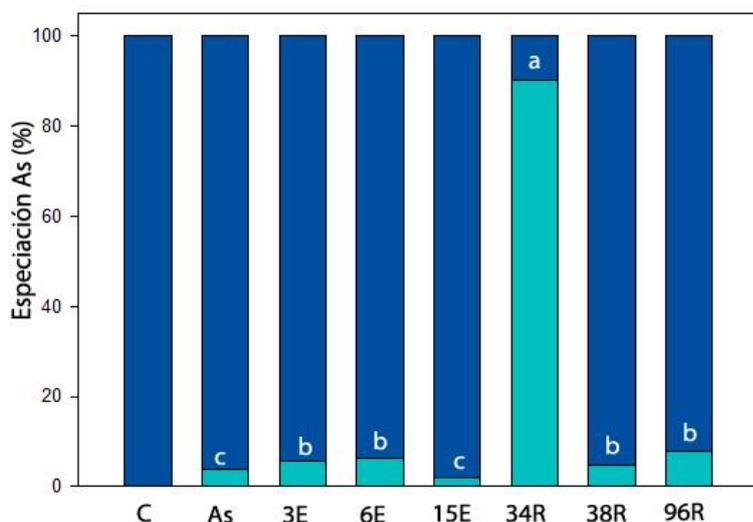


Figura 6. Especiación de As (%) del medio de cultivo tras 30 de cultivo con *S. atrocinerea* en presencia de As e inoculadas con las bacterias endófitas (3E, 6E y 15E) y de la rizosfera (34R, 38R y 96R), As III (■) As V (■). C: medio de cultivo con As sin planta ni bacteria. Las barras marcadas con diferente letra indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Para corroborar que el medio de cultivo carece de compuestos con potencial reductor para convertir el As (V) en As (III), se analizó este medio después de 30 días sin plantas ni bacterias (C) observándose que el 100% de arsénico se encuentra en la forma en la que inicialmente se había añadido, es decir en forma de As (V) (Fig. 7,c). Mientras que cuando se analiza el medio en el que han crecido plantas sin bacterias (As) observamos que una pequeña parte del arsénico se ha reducido a As (III) (Fig. 7,d)

En ningún caso, se detectaron compuestos orgánicos volátiles de arsénico en forma metilada, ni en el medio de cultivo (Fig. 7), ni en los tejidos de la planta.

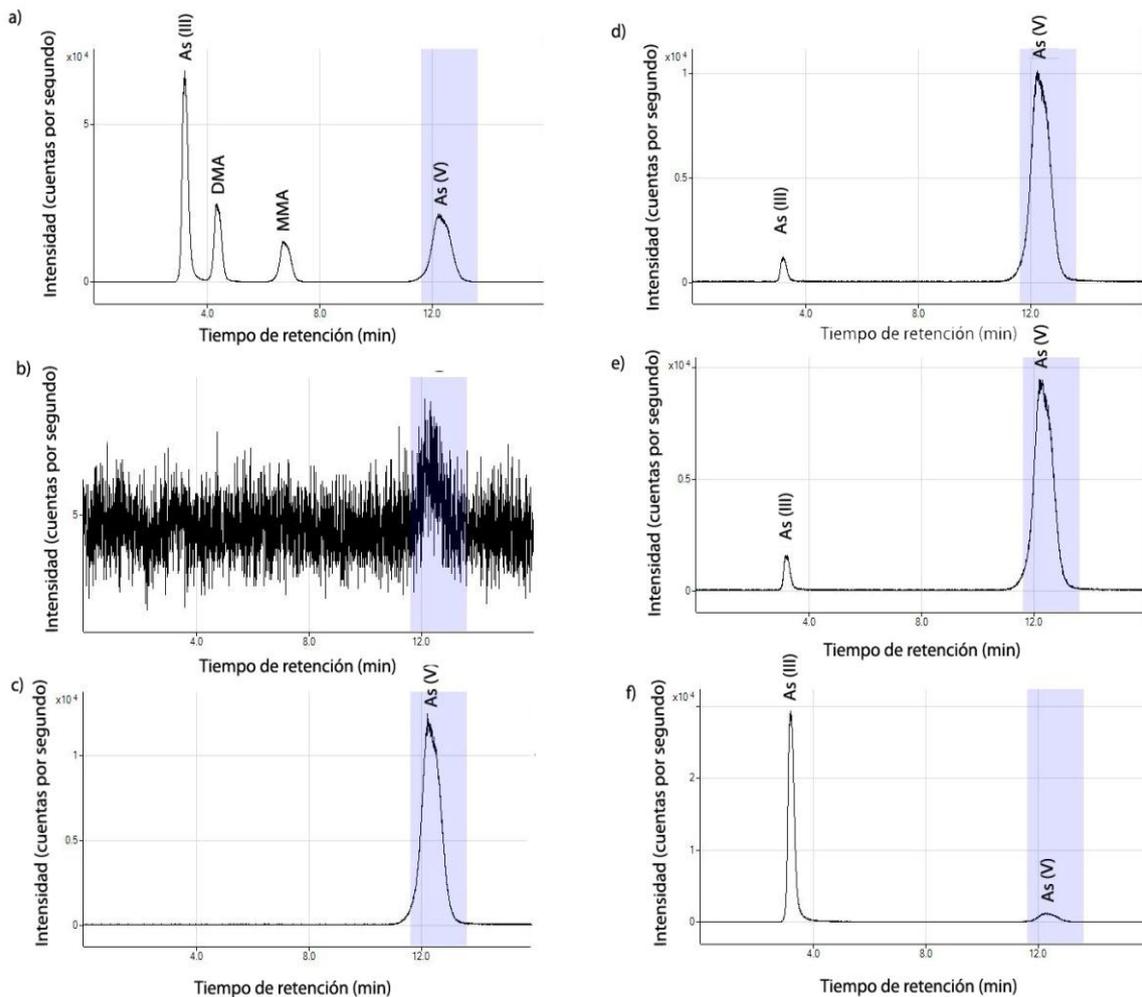


Figura 7. Cromatogramas de especiación de As del medio de cultivo: a) patrón, b) medio sin As, c) medio sin planta ni bacteria, d) medio con As y planta, e) As+3E y f) As+34R.

Para realizar los ensayos de análisis de fitoquelatinas y estrés oxidativo y, puesto que sería muy laborioso realizarlos con todas las bacterias ensayadas, a la vista de los resultados obtenidos, hemos seleccionado 2 bacterias, una endófito y otra de la rizosfera. Entre las endófitas, hemos seleccionado la bacteria 3E, por ser la que mejores resultados presentaba en cuanto a la producción de IAA, estimulación del crecimiento de los tallos y acumulación de As sobre todo en raíces. En cuanto a las de la rizosfera, se seleccionó la bacteria 34R por presentar también alta producción de IAA y ACC desaminasa y aunque la acumulación de As en la planta fue baja, fue la única que redujo el As (V) a As (III) en el medio de cultivo.

Una vez seleccionadas estas dos bacterias, se realizó un experimento de una semana de duración con la finalidad de relacionar la acumulación de As durante las primeras fases de la interacción planta-bacteria con la producción de compuestos tiólicos no proteicos (CTNPS), los parámetros de estrés oxidativo y la actividad glutatión reductasa (GR).

3.5. Relación de la acumulación de arsénico con otros parámetros de la planta

En las plantas de *S. atrocinerea* crecidas durante 7 días en medio de cultivo con As, observamos que este metaloide se acumuló mayoritariamente en las raíces alcanzándose concentraciones superiores a 300 mg As Kg⁻¹ PS (Fig. 8).

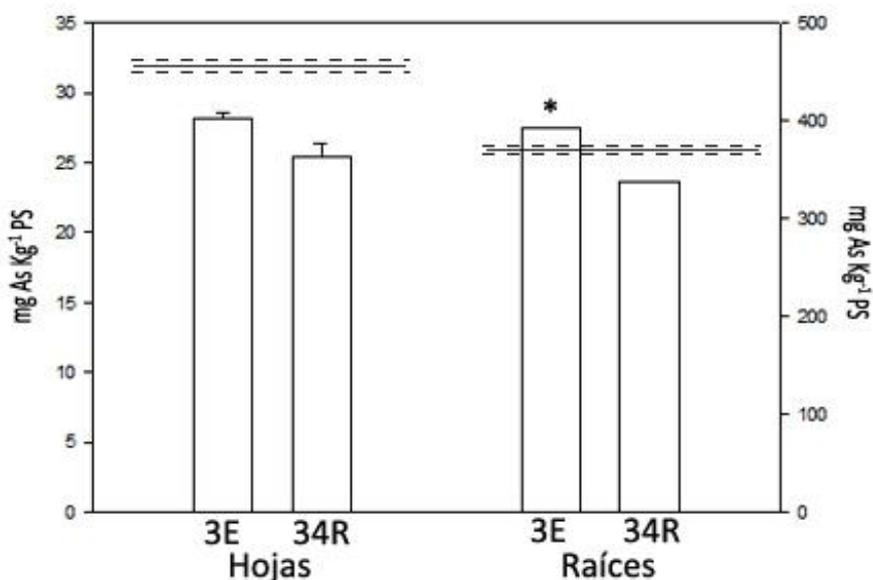


Figura 8. Acumulación de As (mg kg⁻¹ PS) en hojas y raíces de *S. atrocinerea* cultivada durante 7 días en presencia de As e inoculadas con las bacterias 3E y 34R. Las barras marcadas con (*) indican diferencias significativas superiores al tratamiento con As (no inoculado), representando su media por línea continua (—) y su desviación por línea discontinua (- - -) ($p < 0,05$).

3.5.1. Síntesis de compuestos tiólicos no proteicos

El contenido total de compuestos tiólicos no proteicos (CTNPs), varió en *S. atrocinerea* en función de la presencia o ausencia de As y de la presencia o ausencia de las bacterias 3E o 34R, e independientemente del tratamiento, el contenido en hojas siempre fue menor que en raíces (Fig. 9) Tanto en hojas como en raíces, el contenido de CTNPs fue siempre mayor en las plantas crecidas en presencia de As que en las plantas control y los niveles más altos se obtuvieron en plantas cultivadas con As e inoculadas con las bacterias 3E y 34R.

Cabe destacar que en raíces se observa un aumento de tioles en las plantas inoculadas con las bacterias 3E y 34R y que este aumento es todavía mayor en las plantas cultivadas con As y bacterias (Fig. 9).

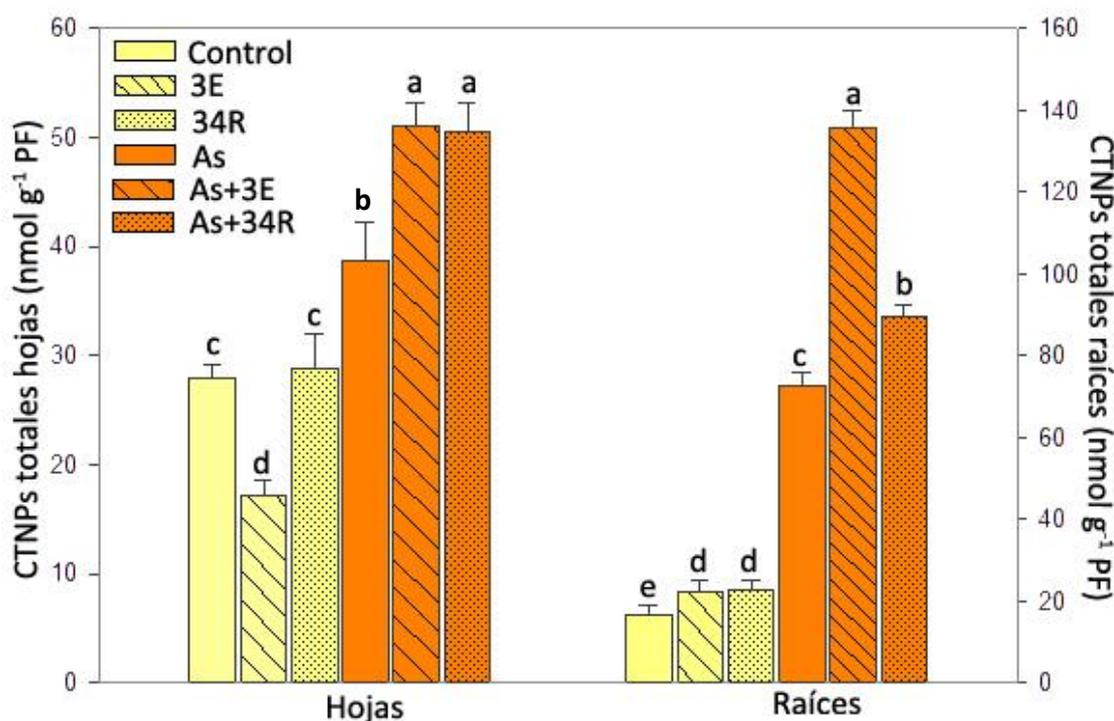


Figura 9. Contenido total en compuestos tiólicos no proteicos en hojas y raíces de plantas de *S. atrocinerea* cultivadas durante 7 días en presencia o ausencia de As y de las bacterias 3E y 34R. Barras marcadas con diferente letra en el mismo grupo indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Cuando analizamos los diferentes compuestos tiólicos en hojas observamos cambios en las concentraciones de los diferentes tioles entre los distintos tratamientos, obteniéndose los niveles más altos de GSH en las hojas de plantas cultivadas con As e inoculadas tanto con la bacteria 3E como con la 34R (Tabla 5). En las plantas control se obtuvieron las concentraciones más altas de desGlyPC₂ mientras que las más bajas se detectaron en las plantas inoculadas con la bacteria 3E, en ausencia de As (Tabla 5).

Tabla 5. Compuestos tiólicos no proteicos en hojas de plantas de *S. atrocinerea* cultivadas durante 7 días en presencia o ausencia de As y de las bacterias 3E y 34R. Los valores marcados con diferente letra en la misma fila indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). n.d.: no detectado.

Compuestos tiólicos en hojas (nmol g ⁻¹ PF)						
CTNP	Tratamiento					
	Control	3E	34R	As	As + 3E	As + 34R
GSH	12,03 ± 0,02 c	10,19 ± 0,96 c	20,44 ± 0,43 b	22,8 ± 2,64 b	29,09 ± 2,64 a	29,4 ± 2,19 a
PC ₂	n.d.	n.d.	n.d.	3,67 ± 0,19 a	3,22 ± 0,09 a	3,76 ± 0,07 a
desGlyPC ₂	5,08 ± 0,60 a	0,94 ± 0,04 c	1,33 ± 0,47 bc	3,54 ± 1,01 ab	3,01 ± 0,68 abc	2,02 ± 0,64 bc
PC ₃	n.d.	n.d.	n.d.	2,22 ± 0,59 a	n.d.	3,22 ± 0,09 a
CT ₁	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,67 ± 0,19	n.d.
CT ₂	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,68 ± 0,15	n.d.
CT ₃	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,98 ± 0,51	n.d.
CT ₄	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,35 ± 0,27
CT ₅	6,28 ± 0,66 a	3,13 ± 0,27 b	4,44 ± 0,46 ab	3,81 ± 0,26 b	2,90 ± 0,22 b	5,84 ± 0,36 a
CT ₆	4,64 ± 0,47 a	2,91 ± 0,30 b	2,64 ± 0,24 b	3,13 ± 0,06 b	2,90 ± 0,22 b	4,96 ± 0,56 a

En cuanto a las PC₂ y PC₃, destacar que ambas se sintetizan *de novo* en presencia de As y bacterias aunque no pudimos detectar PC₃ en hojas de plantas As+3E (Tabla 5). También hay que resaltar que solo en las hojas del tratamiento As+3E aparecen tres compuestos tiólicos (que denominamos CT₁, CT₂, CT₃) y que no hemos podido identificar. El compuesto CT₄ solamente aparece en las plantas cultivadas con As+34R. Por su parte, los compuestos CT₅ y CT₆ son más abundantes en el tratamiento control y en el de As.

En raíces hay que destacar la presencia de cisteína (Cys) solamente en las plantas que fueron inoculadas con las bacterias 3E y 34R tanto en presencia como en ausencia de As (Tabla 6). Los tioles desGlyPC₂ y CysPC₂ solamente se detectaron cuando las raíces fueron cultivadas en As y con las bacterias 3E y 34R mientras que PC₂, PC₃ y desGlyPC₃ se sintetizaron siempre en presencia de As, independientemente de la presencia o ausencia de bacterias aunque hay que resaltar que los niveles más altos de desGlyPC₃ corresponden al tratamiento As+3E (Tabla 6).

Tabla 6. Compuestos tiólicos no proteicos en raíces de plantas de *S. atrocinerea* cultivadas durante 7 días en presencia o ausencia de As y de las bacterias 3E y 34R. Los valores marcados con diferente letra en la misma fila indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). n.d.: no detectado.

Compuestos tiólicos en raíces (nmol g ⁻¹ PF)						
CTNP	Tratamiento					
	Control	3E	34R	As	As + 3E	As + 34R
Cys	n.d.	6,23 ± 0,54 a	7,29 ± 1,06 a	n.d.	7,81 ± 2,36 a	6,36 ± 2,58 a
GSH	12,85 ± 2,78 a	15,81 ± 2,10 a	14,63 ± 0,52 a	7,86 ± 0,03 b	14,18 ± 4,71 a	7,72 ± 1,28 b
PC₂	n.d.	n.d.	n.d.	5,47 ± 0,05 a	7,23 ± 0,97 a	5,21 ± 0,17 a
desGlyPC₂	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,01 ± 0,68 a	4,41 ± 0,28 a
CysPC₂	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	27,32 ± 1,31 a	16,61 ± 1,82 b
PC₃	n.d.	n.d.	n.d.	15,63 ± 2,57 a	16,96 ± 0,70 a	12,84 ± 0,25 a
desGlyPC₃	n.d.	n.d.	n.d.	31,80 ± 1,52 b	51,17 ± 2,44 a	36,37 ± 3,94 b
CT₅	3,72 ± 0,70	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CT₆	3,28 ± 0,10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

3.5.2. Análisis del contenido en H₂O₂ y peroxidación lipídica

Los resultados muestran que el contenido de H₂O₂ (µg g⁻¹ PF) aumenta cuando las plantas se cultivan en presencia de bacterias o As (Tabla 7) y los valores más altos se obtienen cuando se inoculan las plantas con la bacteria 3E o cuando crecen solo con As (Tabla 7).

Tabla 7. Contenido de H₂O₂ y peroxidación lipídica en hojas de *S. atrocinerea* cultivadas durante 7 días en presencia o ausencia de As e inoculadas con bacterias. Los valores marcados con diferente letra en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Tratamiento	Contenido de H ₂ O ₂ ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF)	Concentración de MDA ($\mu\text{mol g}^{-1}$ PF)
Control	0,31 ± 0,01 c	5,91 ± 0,70 c
3E	0,50 ± 0,01 a	9,96 ± 0,64 b
34R	0,45 ± 0,01 b	11,78 ± 0,64 a
As	0,48 ± 0,02 a	8,87 ± 0,94 b
As + 3E	0,45 ± 0,02 b	9,00 ± 0,77 b
As + 34R	0,45 ± 0,02 b	8,61 ± 0,32 b

En cuanto al malondialdehído (MDA), se observa que la inoculación con las bacterias 3E y 34R así como el cultivo con As incrementan los niveles de este compuesto, obteniéndose los niveles más altos en plantas cultivadas con 34R duplicando casi el valor de las plantas control (Tabla 7).

3.5.3. Actividad glutatión reductasa

La inoculación con las bacterias 3E y 34R redujo la actividad glutatión reductasa (GR) respecto al control (Fig. 9), mientras que el cultivo en presencia de As solamente presentó valores similares al control. La inoculación de la bacteria a las plantas que crecen en As, de nuevo mostró reducción de la GR, reducción mucho más marcada en el tratamiento As+34R que en el As+3E (Fig. 10)

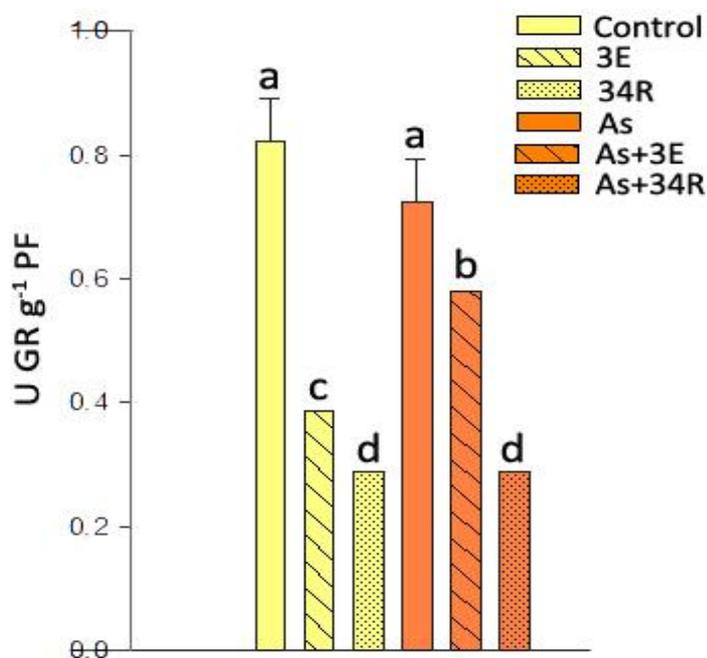


Figura 10. Actividad GR (U g⁻¹ PF) en hojas de *S. atrocinerea* cultivadas durante 7 días en presencia o ausencia de As e inoculadas con las bacterias 3E y 34R. Las barras marcadas con diferente letra indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

4. DISCUSIÓN

Las bacterias que se han ensayado en este trabajo fueron aisladas de las raíces de un árbol de *S. atrocinerea* que estaba creciendo en un terreno contaminado rico en As y otros metales pesados. Las bacterias cultivables, tanto endófitas como de la rizosfera pueden servir como organismos modelo para el estudio de las interacciones planta-microorganismo. Además, y como es objetivo final del presente trabajo, las bacterias cultivables se pueden enriquecer y utilizar para diversas aplicaciones como la bioaumentación en la descontaminación de suelos (Pilon-Smits, 2005).

Si bien la mayoría de las bacterias del medio ambiente no son capaces de crecer en los medios convencionales de laboratorio, como se muestra en el DGGE, los cultivos selectivos nos han permitido identificar distintos grupos bacterianos con diferentes requisitos nutricionales que complementan las pruebas bioquímicas y moleculares realizadas (Nichols 2007). Así, se encontró una gran diversidad de bacterias resistentes a metales en medio GAE, lo que podría sugerir que muchos de los grupos bacterianos asociados a plantas requieren altas concentraciones de nutrientes para su crecimiento *in vitro*. Esta afirmación está de acuerdo con los resultados de Kuffner et al. (2010), quienes observaron una mayor diversidad bacteriana cuanto más concentrado estaba el medio.

Analizando los diferentes patrones de bandas, por DGGE, de las muestras endófitas y de la rizosfera, podemos establecer diferencias en la composición de las comunidades microbianas de *S. atrocinerea* lo cual está de acuerdo con las observaciones realizadas en otras plantas (Berg et al. 2005). Si en estos análisis se analizase también la secuencia de las bandas, se podrían identificar los grupos bacterianos mayoritarios presentes en estas comunidades. De todas formas, estos análisis no están exentos de problemas ya que la amplificación de los fragmentos puede estar sesgada por los oligonucleótidos y por las condiciones de amplificación utilizadas, favoreciendo la amplificación de ciertos grupos bacterianos en detrimento de otros. Pese a estos inconvenientes, esta técnica permite visualizar los componentes dominantes de las poblaciones bacterianas de diversas muestras y a distintos tiempos, permitiéndonos afirmar que existen diferencias entre las poblaciones endófitas y de la rizosfera.

Todas las bacterias seleccionadas por resistencia a As y producción de biosurfactantes producen ACCD y IAA, lo que concuerda con los resultados de otros autores en los que se ha encontrado este tipo de bacterias asociadas con plantas hiperacumuladoras de metales (Idris et al., 2004; Zaidi et al., 2006, Zhuo et al., 2014). También se ha demostrado (Rajkumar and Freitas, 2008) que estos parámetros (producción de IAA, ACCD) y la resistencia a metales en bacterias promueve tanto la solubilidad como la absorción de metales pesados en plantas.

Aunque en la bibliografía (Kuffner et al., 2010) está descrito que la capacidad de producir IAA es más acusada en bacterias endófitas mientras que la producción de ACC sería más común en bacterias de la rizosfera, con nuestras bacterias no existe una marcada diferencia en los valores de producción de IAA o ACCD entre las 3 bacterias endófitas y las 3 bacterias de la rizosfera seleccionadas. Esto estaría en consonancia con la hipótesis de que la mayoría de las endófitas proceden del suelo y, por tanto, todas estas bacterias aisladas por su resistencia a arsénico, tendrían funciones similares a las de la rizosfera (Huang et al., 2010).

Si los niveles de auxina en los tejidos vegetales pueden ser modulados por bacterias productoras de IAA como propone Davies (1995), la producción de este IAA bacteriano

puede ser importante para el crecimiento de las plantas en terrenos contaminados. Un resultado que apoya esta idea sería el tratamiento As+3E en el que se observa un aumento en longitud de los tallos que coincide con altos niveles de producción de esta hormona. En general, los niveles de producción de IAA medidos en las 6 bacterias seleccionadas superan los $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ descritos en la bibliografía como necesarios para este tipo de bacterias que, aparte de resistir a As, presentan un efecto promotor sobre el crecimiento de la planta (Zhu et al., 2014).

En cuanto a la ACCD, este enzima no tiene ninguna función conocida en bacterias, sin embargo la presencia de bacterias productoras de ACCD actúa sobre el metabolismo de la planta degradando el ACC a compuestos que van a ser utilizados por las bacterias como suministro de nitrógeno y energía sin alterar el equilibrio nutricional de las plantas (Glick, 2007). Por tanto, eliminando el ACC, las bacterias reducen el efecto nocivo del etileno, atenuando el estrés de la planta y promoviendo el crecimiento. Este hecho concuerda con nuestros resultados de peso seco, ya que éste en presencia de As, tanto en hojas como en raíces, es mayor en los tratamientos en los que se inocula con bacterias que en aquellos en los que las bacterias no están presentes. El hecho de que el peso seco sea mayor en el tratamiento con As que en el control, podría explicarse por un incremento en la síntesis de lignina provocado por la toxicidad de ciertos metales al interferir con el metabolismo de las auxinas, que activaría una serie de proteínas que se conjugarían con la auxina. La inactivación de esta hormona provocaría un incremento de la lignina reflejado en un aumento del peso seco (Elobeid et al., 2012). Este parámetro es un indicador de la biomasa de la planta y cuanto mayor sea ésta, mayor potencial de fitorremediación, ya que una mayor biomasa está relacionada con una mayor captación de metales (Becerra-Castro et al., 2012).

En cuanto a la movilización de metales realizada según las pruebas bioquímicas, se observó mayor movilización con las bacterias de la rizosfera aunque lo cierto es que tanto las bacterias endófitas como las de la rizosfera, son capaces de movilizar metales y promover su acumulación en la planta (Kuffner et al., 2008). No obstante, y aunque algunos autores proponen un descenso del pH atribuible a la movilización (Wenzel et al., 2004), en nuestro caso, no se observan grandes oscilaciones del mismo (datos no mostrados). Para el caso concreto del As destaca su inmovilización por la bacteria 34R, lo que puede ser debido a que la mayor parte del arsénico en el suelo esté en forma de As (V) que reacciona especialmente con el Fe (III) (muy abundante en nuestro suelo contaminado) con lo que su movilización estará limitada (Oremland and Stolz, 2005). Además las bacterias también pueden provocar la reducción de Fe (III) a Fe (II) liberando el As (V), el cual puede reaccionar con otros elementos minerales o ser absorbido por la bacteria para su metabolismo, al igual que ocurre con el As (III) (Zargar et al., 2010). Podemos concluir, por tanto, que la movilización de metales en el suelo es atribuible a diversos procesos. Además de las ya citadas transformaciones redox, también tendría un papel importante la liberación de protones y ácidos orgánicos (Gadd, 2004).

Uno de los factores más importantes que determinan la especiación de As en tejidos es la capacidad de la planta de transformarlo, por lo que conocer la especiación de As nos dará información sobre los mecanismos de detoxificación de As (Zhang et al., 2002). En hojas, la presencia de, únicamente, As (III) en todos los tratamientos ensayados excepto en As+15E, estaría de acuerdo con los resultados obtenidos por Yan et al. (2012), en los cuales plantas de *Panax notoginseng* cultivadas con concentraciones moderadas de As carecían de niveles detectables de As (V) en hojas. Similares resultados fueron también obtenidos por Kertulis et al. (2005) con *Pteris vittata* que contenía As (III) en hojas y As (V) en las raíces. La presencia en hojas de As (V) en el tratamiento As+15E podría atribuirse a la presencia de la bacteria ya que en

el resto de los tratamientos todo el As presente está en la forma As (III). Una posible explicación a la presencia de As (V) en hojas, puede ser debido a que la bacteria produciría altas cantidades de GSH que compitiesen con las PCs por la formación de complejos estables y al ser las uniones As (III)-(GSH) menos estables que las As (III)-PCs se produciría la disociación de estos complejos con la siguiente reoxidación del As (III) a As (V) (Bluemlein et al., 2009, Zhao et al., 2009). En el caso de las raíces, observamos que la mayor parte del As está en forma As (III) excepto en la bacteria 6E, lo cual podría explicarse de una forma similar a la planteada en hojas. En cualquiera de los casos, no se puede establecer una relación directa entre la forma en la que se acumula el As en hojas o en raíces y la cantidad acumulada.

Otro de los factores que pueden influir en la especiación de As en los tejidos de la planta, es la forma en que éste está presente en el entorno, en nuestro caso en el medio de cultivo. La presencia de As (III) en plantas crecidas sólo con As (sin inóculo bacteriano) podría ser debido al hecho de que las raíces de numerosas plantas pueden tomar As (V) y liberar grandes cantidades de As (III) al medio (Zhang et al., 2009) o también a que las raíces de las plantas podrían excretar al medio diferentes compuestos que redujesen el As (V) a As (III) (Taiz and Zeiger, 2010). Las diferencias encontradas en torno a los porcentajes de especiación de As (III) y As (V) entre las diferentes bacterias podría atribuirse a que éstas han desarrollado distintos mecanismos bioquímicos que les permiten utilizar el As, bien como aceptor de electrones (As (V)) para la respiración anaerobia o como donador de electrones (As (III)) para promover la fijación quimioautótrofa de dióxido de carbono (CO₂) en carbono celular (Rhine et al., 2006). Otros autores (Macur et al., 2001), sin embargo consideran que la reducción de As (V), en aerobiosis, sería más bien un mecanismo de detoxificación y resistencia debido a la presencia de una reductasa As (V) citoplasmática (Silver and Phung, 2005). Esta enzima es una proteína de pequeño tamaño (13-16 kD) que mediaría la reducción de As (V) a As (III), el cual puede ser transportado fuera de la célula, como ocurriría con la 34R, o secuestrado en compartimentos intracelulares, como As (III) libre o conjugado con GSH o otros tioles (Silver and Phung, 2005).

Cabe la posibilidad de que las plantas por sí mismas metilen el arsénico o que alternativamente, lo puedan hacer las bacterias endófitas. En nuestro caso no se encontraron evidencias de metilación, ni en los tejidos ni en el medio de cultivo, aunque en el estudio de Koch et al. (2000) sí se encontraron un gran número de formas metiladas en hojas. No obstante, todavía no está claro si ciertas especies de plantas pueden convertir las formas inorgánicas de arsénico a formas orgánicas. Aunque en nuestro caso, los resultados apuntan a que *S. atrocinerea* no es capaz de producir formas orgánicas metiladas de As, ni tampoco las bacterias endófitas ensayadas.

Cuando estudiamos la acumulación de As en hojas observamos que ésta es baja (entre 30-80 veces menor que el tratamiento con As solamente) y que al cabo de 30 días de cultivo en la mayoría de los tratamientos se alcanzó y se superó el umbral de toxicidad establecido para el As (1-20 mg As kg⁻¹ PS) descrito por White and Brown (2010). Pero una baja acumulación de As en hojas genera una tasa de translocación muy reducida que puede explicarse porque el As (V) es rápidamente reducido a As (III) el cual se uniría a las fitoquelatinas (PCs) y se acumularía en las vacuolas quedando retenido de forma permanente en las raíces sin el consiguiente transporte a la parte aérea (Zhang et al., 2009). Además la acumulación observada a los 7 días con la bacteria 34R nos hace pensar que la mayor parte del As acumulado en las hojas se transporta durante los primeros días y a partir de este momento la mayor parte del As que se absorbe se acumula en la raíz.

En cuanto a la síntesis de compuestos tiólicos no proteicos (CTNPs) podemos destacar que aunque algunos autores han concluido que en *Salix* no se sintetizan fitoquelatinas (Landberg and Greger, 2004), en nuestro caso podemos constatar que sí se sintetizan en presencia de As y que su contenido es mucho mayor en raíces que en hojas lo cual es lógico teniendo en cuenta que en la raíz se acumula una mayor concentración de As que en las hojas. Los niveles de glutatión (GSH), en hojas, varían entre los distintos tratamientos ensayados detectándose los niveles más altos cuando el As y las bacterias estaban presentes. Esto podría ser debido a un incremento en la producción de GSH por la propia bacteria aunque en el caso de las raíces la situación se invierte y solo aumentan los niveles de GSH en el tratamiento As+3E. Cabe destacar también que en presencia de As siempre se produce la síntesis *de novo* de PC₂ y PC₃ excepto en hojas inoculadas con la bacteria 3E en las que se sintetizan *de novo* tres péptidos tiólicos (CT1, CT2 y CT3) que no se detectan ni en las raíces ni en ningún otro tratamiento con As y/o bacterias aunque no podemos descartar que los produzca la propia bacteria. Todo esto nos lleva a pensar que estos tioles tendrían un papel importante en la detoxificación de As en *Salix*. La presencia de cisteína (Cys) únicamente en los tratamientos As+3E y As+34R podría ser atribuible a un activo metabolismo bacteriano.

Si bien las bacterias endófitas, entre otras muchas propiedades, se caracterizan por no presentar efectos visibles de toxicidad en plantas (Hallmann et al., 1997), lo cierto es que, en nuestro caso los resultados muestran que al igual que el As, la presencia de bacterias incrementa los niveles de H₂O₂ lo que supondría un estrés para la planta traducido en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Altas concentraciones de H₂O₂ son el reflejo del daño provocado por el estrés oxidativo, ya que el H₂O₂ no presenta carga, y puede difundir libremente a través de las membranas biológicas originando graves daños, alterando componentes celulares como el ADN y algunos enzimas implicados en la fijación de carbono (Zhu et al., 2009). Además, si continúa la reducción del H₂O₂ se origina HO· que es el radical de oxígeno más reactivo y con mayor efecto tóxico. Por otra parte, una mayor producción de malondialdehído en los tratamientos con bacterias refleja que, al menos, las fases iniciales de la interacción planta-bacteria supone un estrés para la planta.

Existen estudios que demuestran que la exposición a especies inorgánicas de arsénico resulta en la generación de ROS (Hartley-Whitaker et al., 2001). Esto probablemente ocurra por la conversión de arsenato en arsenito, tal como muestran los resultados de especiación en tejidos de *S. atrocinerea*. Esto conduciría a la síntesis de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos como el glutatión, dado que éste, tiene también un papel precursor en la síntesis de PCs, el consumo de GSH en la respuesta quelante podría ser limitante para la respuesta antioxidante, reduciendo la cantidad disponible de GSH en esta para eliminar las ROS (Hartley-Whitaker et al., 2001). Esto concuerda con los resultados observados en los tratamientos As+3E y As+34, en donde una mayor síntesis de tioles se traduce en una menor actividad de la GR. Este descenso es grande en el caso de la bacteria 34R lo que podría ser atribuible, a que dado la capacidad de esta bacteria para provocar la reducción del As (V) a As (III), parte del As disponible del medio estaría como As (III) y formaría complejos directamente con las fitoquelatinas de la planta. Todo ello sin necesidad de que se active la GR, generando el GSH necesario para la reducción de As (V) a As (III) pues este GSH es el sustrato de la arsenato reductasa (Ali et al., 2009).

En conclusión, en este trabajo, se abordan aspectos biológicos relacionados con la interacción planta-bacteria con una posible aplicación biotecnológica para la fitorremediación de suelos contaminados con As y otros metales, siendo necesario realizar más estudios en esta dirección.

5. CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos se puede concluir que:

- Más de la mitad de las bacterias de la rizosfera y endófitas de *S. atrocinerea* toleraron altas concentraciones de As y formaron la base para seleccionar por sus propiedades bioquímicas y características de crecimiento, 6 bacterias (3 de rizosfera y 3 endófitas) potencialmente útiles para bioaumentación en experimentos de fitorremediación.
- *S. atrocinerea* acumuló altas concentraciones de As en sus raíces, acumulación que puede ser incrementada cuando las plantas se inoculan con la bacteria 3E o 96R. En hojas la acumulación de As superó los niveles tóxicos sin presentar síntomas de toxicidad, lo que unido a su acumulación en la raíz y gran biomasa la hace idónea para ser utilizada en programas de fitoestabilización.
- El análisis de especiación de As en tejidos mostró que éste se acumula y metaboliza principalmente, tanto en hojas como en raíces, en forma de As (III). El análisis de las formas químicas del As en el medio de cultivo de la planta con bacterias mostró que estas afectan a la especiación variando la relación As (III)/As (V); especialmente en el caso de la bacteria 34R que invierte totalmente esa relación. Sería necesario llevar a cabo controles de especiación con las bacterias, sin presencia de planta, en el medio de cultivo para confirmar la implicación de las mismas en ese fenómeno.
- En respuesta al As se observó en todos los tratamientos un aumento de compuestos tiólicos totales, mayor en raíces que en hojas, debido principalmente a la síntesis *de novo* de PC₂ y PC₃, así como a otro tipo de tioles presentes en las plantas inoculadas con la bacteria 3E. Todo ello nos lleva a concluir que estos compuestos tienen una función quelante en la acumulación de As.
- El aumento en el contenido de H₂O₂ y de MDA refleja el estrés oxidativo que sufre la planta debido a la presencia de As y/o bacterias y la reducción de la actividad GR podría ser debida a la implicación del glutatión en la respuesta quelante.

BIBLIOGRAFÍA

- Andreote, F.D., Rocha, U.N.D., Araújo, W.L., Azevedo, J.L. and Van Overbeek, L.S., 2010. Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 97: 389-399.
- Ali, W., Isayenkov, S.V., Zhao, F.J., and Maathuis, F.J.M., 2009. Arsenite transport in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* 66:2329–2339
- Bartels, D., Souer, E., 2004. Molecular responses of higher plants to dehydration. En: Hirt, H., and Shinozaki, K. (eds.) *Plant responses to abiotic stress*, Springer Berlin Heidelberg. 4: 9-38.
- Becerra-Castro, C., Monterroso, C., Prieto-Fernández, A., Rodríguez-Lamas, L., Loureiro-Viñas, M., Acea, M.J., Kidd, P.S., 2012. Pseudometallophytes colonizing Pb/Zn mine tailings: a description of the plant-microorganism-rhizosphere soil system and isolation of metal-tolerant bacteria. *J. Hazard. Mat.* 217: 350:359.
- Berg, G., Krechel, A., Ditz, M., Sikora, R.A., Ulrich, A. and Hallmann, J., 2005. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiol Ecol* 51: 215–229.
- Bluemlein, K., Raab, A., Feldmann, J., 2009. Stability of arsenic peptides in plant extracts: off-line versus on-line parallel elemental and molecular mass spectrometric detection for liquid chromatographic separation. *Anal Bioanal Chem* 393: 357–366.
- Bodour, A., Drees, K., Maier, R., 2003. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. *Appl Environ Microbiol.* 69:3280–3287
- Bruce, K.D., Hiorns, W.D., Hobman, J.L., Osborn, A.M., Strike, P and Ritchie, D.A., 1992. Amplification of DNA from native populations of soil bacteria by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3413–3416.
- Clemens, S., 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88: 1707-1719.
- Cobbett, C., Goldsbrough, P., 2002. Phytochelatin and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 15-182.
- Conrath, U., 2006. Priming: getting ready for battle. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19: 1062–1071.
- Davies, P.J. (ed.) 1995. The plant hormone concept: concentration, sensitivity, and transport. In *Plant hormones: Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology*. pp. 13–18. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Demiral, T., Turkan, I., 2005. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environ. Exp. Bot.* 53(3): 247-257.
- Elobeid, M., Göbel, C., Feussner, I., Polle, A., 2012. Cadmium interferes with auxin physiology and lignification in poplar. *J. Exp. Bot.* 63: 1413-1421.
- Fernández, R., Bertrand, A., García, J.I., Tamés, R.S., González, A., 2012. Lead accumulation and synthesis of non-protein thiolic peptides in selected clones of *Melilotus alba* and *Melilotus officinalis*. *Environ. Exp. Bot.* 78: 18-24.
- Fernández, R., Bertrand, A., Reis, R., Mourato, M.P., Martins, L.L., González, A., 2013. Growth and physiological responses to cadmium stress of two populations of *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter. *J. Hazard. Mat.* 244-245: 555-562.
- Friederich, M., Kneer, R., Zenk, M.H., 1998. Enzymic synthesis of phytochelatin in gram quantities. *Phytochem.* 49: 2323-2329.

- Gadd, G.M., 2004. Mycotransformation of organic and inorganic substrates. *Mycologist* 18: 60-70.
- Glick, B.R., 2007. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Crit. Rev. Plant Sci.* 26: 227–242
- Gordon S.A., Weber R.P., 1951. Colorimetric estimation of indole- acetic acid. *Plant Physio.*,l 26: 192-195.
- Greger, M., Landberg, T., 1999. Differences in uptake and tolerance to heavy metals in *Salix* from unpolluted and polluted areas. *Appl. Geochem.* 11(1-2): 175-180.
- Hallmann, J. and Berg, G. 2006. Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes. In *Microbial Root Endophytes* (Schulz, B.J.E. et al., eds), pp. 15–31, Springer.
- Hallmann, J., Quadthallmann, A., Mahaffee, W. F., and Kloepper, J. W., 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology.* 43(10): 895-914
- Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S., van Elsas, J.D.C., 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology* 16, 10:463-471.
- Hartley-Whitaker J., Woods C., Meharg A.A., 2001. Is differential phytochelatin production related to decreased arsenate influx in arsenate tolerant *Holcus lanatus* L.? *New Phytologist.* (In press.).
- Henning, K. and Villforth, F., 1940. Experimentelle untersuchungen zur frage der bacteriesymbiose in ho'heren pflanzen und ihre beeinflussung durch 'Leitemente'. *Biochem. Zeitschr.* 305: 299–309.
- Hirata, K., Tsuji, N., Miyamoto, K., 2005. Biosynthetic regulation of phytochelatin, heavy metal-binding peptides. *J. Biosci. Bioeng.* 100(6): 593-599.
- Huang, A., Teplitski, M., Rathinasabapathi, B., Ma, L.Q., 2010. Characterization of arsenic-resistant bacteria from the rhizosphere of arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata*. *Can. J. Microbiol.* 56: 236–246.
- Huang, J.-H., Fecher, P., Ilgen, G., Hu, K.-N., Yang, J., 2012. Speciation of arsenite and arsenate in rice grain - Verification of nitric acid based extraction method and mass sample survey. *Food Chemistry*, 130 (2):453-459.
- Hughes, M.F., 2002. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol. Lett.* 133: 1–16. In: B.A. Fowler (ed.). *Biological and environmental effects of arsenic.* Elsevier, New York.
- Idris, R., Trifonova, R., Puschenreiter, M., Wenzel, W.W. and Sessitsch, A., 2004. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. *Appl Environ Microbiol* 70: 2667–2677.
- Kaur, S., Kamli, M.R., Ali, A., 2011. Role of arsenic and its resistance in nature. *Can. J. Microbiol.* 57: 769–774.
- Koch, I., Wang, L., Ollson, C.A., Cullen, W.R., Reimer, K.J., 2000. The predominance of inorganic arsenic species in plants from Yellowknife, Northwest Territories, Canada. *Environmental Science and Technology* 34: 22–26.
- Kuffner, M., De Maria, S., Puschenreiter, M., Fallmann, K., Wieshammer, G., Gorfer, M., Sessitsch, A., 2010. Culturable bacteria from zn- and cd-accumulating *Salix caprea* with differential effects on plant growth and heavy metal availability. *Journal of Applied Microbiology*,-108(4):1471-1484.
- Kuffner, M., Puschenreiter, M., Wieshammer, G., Gorfer, M. and Sessitsch, A., 2008. Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows. *Plant Soil* 304: 35–44.
- Landberg, T., Greger, M., 2004.No phytochelatin (PC2 and PC3) detected in *Salix viminalis*. *Physiologia Plantarum*, 121 (3): 481-487.
- Lehmann, T., Hoffmann, M., Hentrich, M., Pollmann, S., 2010. Indole-3-acetamiddependent auxin biosynthesis: a widely distributed way of indole-3-acetic acid production? *Euro. J. Cell Biol.* 89: 895–905.

- Liu, W.-J., Wood, B.A., Raab, A., McGrath, S.P., Zhao, F.-J., Feldmann, J., 2010. Complexation of arsenite with phytochelatins reduces arsenite efflux and translocation from roots to shoots in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 152: 2211–2221.
- Lloyd, G., McCown, B., 1981. Commercially feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Combined Proceedings - International Plant Propagator's Society*, 30: 421-427.
- Lombi, E., Zhao, F., McGrath, S., Young, S., Sacchi, G., 2001. Physiological evidence for a high-affinity cadmium transporter highly expressed in a *Thlaspi caerulescens* ecotype. *New Phytol.* 149: 53-60.
- Luo, S.L., Chen, L., Chen, J.L., Xiao, X., Xu, T.Y., Wan, Y., Rao, C., Liu, C.B., Liu, Y.T., Lai, C., Zeng, G.M., 2011. Analysis and characterization of cultivable heavy metal resistant bacterial endophytes isolated from Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and their potential use for phytoremediation. *Chemosphere* 85: 1130-1138.
- Macur, R.E., Wheeler, J.T., McDermott, T.R., Inskeep, W.P., 2001. Microbial populations associated with the reduction and enhanced mobilization of arsenic in mine tailings. *Environ. Sci. Technol.* 35: 3676–3682.
- Maestri, E., Marmiroli, M., Visioli, G., Marmiroli, N., 2010. Metal tolerance and hyperaccumulation: Costs and trade-offs between traits and environment. *Environ. Exp. Bot.* 68(1): 1-13.
- Martins, L., Mourato, M., Cardoso, A.I., Pinto, A.P., Mota, A.M., Gonçalves, M.L.S., de Varennes, A., 2011. Oxidative stress induced by cadmium in *Nicotiana tabacum* L.: effects on growth parameters, oxidative damage and antioxidant responses in different plant parts. *Acta Physiol. Plant.* 33(4): 1375-1383.
- Meharg, A. A. and Hartley-Whitaker, J., 2002. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytologist*, 154: 29-43.
- Mench, M., Lepp, N., Bert, V., Schwitzguébel, J-P., Gawronski, A.W., Schröder, P., Vangronsveld, J., 2010. Successes and limitations of phytotechnologies at field scale: outcomes, assessment and outlook from COST Action 859. *J. Soils Sediments* 10(6): 1039-1070.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology*. 59: 695-700.
- Montaser, A., 1998. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*. Wiley VCH. New York.
- Mourato, M. Reis, R., Martins, L.L., 2012. Characterization of plant antioxidative system in response to abiotic stresses: a focus on heavy metals toxicity. *InTech*, p.388.
- Naruse, I., Yoshiie, R., Kameshima, T., 2010. Gaseous mercury oxidation behavior in homogeneous reaction with chlorine compounds. *J. Mater. Cycles Waste Manag.* 12(2): 154-160.
- Nichols, D., 2007. Cultivation gives context to the microbial ecologist. *FEMS-Microb. Ecology* 60: 351-367.
- Oden, K.L., Gladysheva, T.B., Rosen, B.P., 1994. Arsenate reduction mediated by the plasmid-encoded ArsC protein is coupled to glutathione. *Mol. Microbiol.* 12: 301–306.
- Oremland R.S., Stolz J. F., 2005. Arsenic, microbes and contaminated aquifers. *Trends in Microbiology*. 13(2): 45-49.
- Peláez, A.I., Lores, I., Sotres, A., Méndez-García C., Fernández-Velarde, C., Santos, J.A., Rodríguez-Gallego, J.L., Sánchez, J., 2013. Design and field-scale implementation of an on-site bioremediation treatment in PAHs polluted soil. *Environmental Pollution*. 181: 190-199
- Penrose D.M., Glick, B.R., 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase containing plant growth promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum*, 118:10–15.
- Pickering I.,J., Gumaelius L., Harris H.H., Prince R.C., Hirsch G., Banks J.A., Salt D.E., George G.N., 2006. Localizing the biochemical transformations of arsenate in a hyperaccumulating fern. *Environ Sci Technol* 40: 5010–5014.

- Pillay, V., K. and Nowak, J. 1997 Inoculum density, temperature, and genotype effects on in vitro growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. *Can. J. Microbiol.* 43: 354–361.
- Pilon-Smits, E., 2005. Phytoremediation. *Annu Rev Plant Biol* 56: 15–39.
- Rajkumar, M. and Freitas, H., 2008. Influence of metal resistant- plant growth promoting bacteria on the growth of *Ricinus communis* in soil contaminated with heavy metals. *Chemosphere* 71: 834–842.
- Rausser, W.E., 1987. Compartmental efflux analysis and removal of extracellular cadmium from roots. *Plant Physiol.* 85: 62-65.
- Reinhold-Hurek, B. and Hurek, T., 1998. Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends*
- Rhine, E.D., Phelps, C.D., Young, L.Y., 2006. Anaerobic arsenite oxidation by novel denitrifying isolates. *Environ. Microbiol.* 8: 889–908.
- Rockwood, D.L., Naidu, C.V., Carter, D.R., 2004. Short-rotation woody crops and phytoremediation: Opportunities for agroforestry? *Agroforest. Syst.* 61-2(1): 51-63.
- Salt, D.E., Prince, R.C., Pickering, I.J., Raskin I., 1995. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in indian mustard. *Plant Physiol.* 109: 1427-1433.
- Shanker, A. K., Djanaguiraman, M., Sudhagar, R., Chandrashekar, C.N., Pathmanabhan, G., 2004. Differential antioxidative response of ascorbate glutathione pathway enzymes and metabolites to chromium speciation stress in green gram (*Vigna radiata* (L.) R.Wilczek. cv CO 4) roots. *Plant Sci.* 166: 1035-1043
- Shi, G.R., Liu, C.F., Cai, Q.S., Liu, Q.Q., Hou C.P., 2010. Cadmium accumulation and tolerance of two safflower cultivars in relation to photosynthesis and antioxidative enzymes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 85: 256-263.
- Silver, S., Phung, T.L., 2005. Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 599–608.
- Singh, N., Ma, L.Q., Srivastata, M., Rathinasabapathi, B., 2006. Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stresses in *Pteris vittata* L. and *Pteris ensiformis* L. *Plant Sci.* 170: 274-282.
- Sneller, F.E.C., van Heerwaarden, L.M., Koevoets, P.L.M., Vooijs, R., Schat, H., Verkleij, J.A.C., 2000. Derivatization of phytochelatins from *Silene vulgaris*, induced upon exposure to arsenate and cadmium: Comparison of derivatization with Ellman's reagent and monobromobimane. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 4014–4019.
- Tamaki, S., Frankenberger Jr., W.T., 1992. Environmental biochemistry of arsenic. *Revs. Environ. Contam. Toxicol.* 124: 79–110.
- Taiz, L., Zeiger, E., 2010. *Plant Physiology*. Sinauer, Sunderland, MA. pp. 690.
- Van Nevel, L., Mertens, J., Oorts, K., Verheyen, K., 2007. Phytoremediation of metals from soils: how far from practice? *Environ. Pollut.* 150(1): 34-40.
- Van Overbeek, L. and van Elsas, J., D., 2008. Effects of plant genotype and growth stage on the structure of bacterial communities associated with potato (*Solanum tuberosum* L.). *FEMS Microbiol. Ecol.* 64: 283–296
- Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., Thewys, T., Vassilev, A., Meers, E., Nehnevajova, E., van der Lie, D., Mench, M., 2009. Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 7: 765-794.
- Wenzel, W.W., Lombi, E. and Adriano, D.C., 2004. Root and rhizosphere processes in metal hyperaccumulation and phytoremediation technology. In *Heavy Metals in Plants: From Biomolecules to Ecosystems* ed. Prasad, M.N.V. pp. 313–344. Berlin: Springer.
- Weyens, N., van der Lelie, D., Taghavi, S., Vangronsveld, J., 2009a. Phytoremediation: plant-endophyte partnerships take the challenge. *Current Opinion in Biotechnology.* 20: 248-254.

- White, P. and Brown P., 2010. Plant nutrition for sustainable development and global health. *Annals of Botany* 105: 1073–1080.
- Wilkins, D.A. 1978. The measurement of tolerance to edaphic factors by means of root growth. *New Phytol.* 80:623–633.
- Yan, X.L., Lin, L.Y., Liao, X.Y., Zhang, W.B., 2012. Arsenic accumulation and resistance mechanism in *Panax notoginseng*, a traditional rare medicinal herb. *Chemosphere.* 87: 31-36.
- Zaidi, S., Usmani, S., Singh, B.R. and Musarrat, J., 2006. Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ-101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*. *Chemosphere* 64: 991–997.
- Zargar, K., Hoefl, S., Oremland, R., Saltikov, C.W., 2010. Identification of a novel arsenite oxidase gene, *arxA*, in the haloalkaliphilic, arseniteoxidizing bacterium *Alkalilimnicola ehrlichii* strain MLHE-1. *J. Bacteriol.* 192: 3755–3762.
- Zhang, X., Zhao F.J., Huang, Q., Williams, P.N., Sun, G.X., Zhu, Y.G., 2009. Arsenic uptake and speciation in the rootless duckweed *Wolffia globosa*. *New Phytol* 182: 421–428.
- Zhao, F.J., Wang J.R., Barker J.H.A., Schat H., Bleeker P.M., McGrath S.P., 2003. The role of phytochelatin in arsenic tolerance in the hyperaccumulator *Pteris vittata*. *New Phytol* 159: 403–410.
- Zhu, L.J., Guan, D.X., Luo, J., Rathinasabapathi, B., Ma, L.Q., 2014. Characterization of arsenic-resistant endophytic bacteria from hyperaccumulators *Pteris vittata* and *Pteris multifida*. *Chemosphere.* 113:9-16.
- Zhu, W., Zhao, D., Miao, Q., Xue, T., Li, X., Zheng, C., 2009. *Arabidopsis thaliana* metallothionein, AtMT2a, mediates ROS balance during oxidative stress. *J. Plant Biol.* 52(6): 585-592.