

Arthrocnemum macrostachyum y su microbioma como herramienta para la recuperación de suelos degradados

TESIS DOCTORAL

Salvadora Navarro de la Torre

Sevilla, 2017



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA



***ARTHROCNEMUM MACROSTACHYUM* Y SU MICROBIOMA**

COMO HERRAMIENTA PARA LA RECUPERACIÓN DE

SUELOS DEGRADADOS

SALVADORA NAVARRO DE LA TORRE

SEVILLA, 2017



La Tesis Doctoral titulada ***“Arthrocnemum macrostachyum y su microbioma como herramienta para la recuperación de suelos degradados”***, realizada por la Licenciada en Biología Dña. Salvadora Navarro de la Torre para optar al grado de Doctor en Biología Molecular y Biomedicina con Mención Internacional por la Universidad de Sevilla, se presenta con la aprobación de los Directores y el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Sevilla.

Los directores,

Fdo. Dr. Ignacio D. Rodríguez Llorente

Fdo. Dra. Eloísa Pajuelo Domínguez

El Director del Departamento,

La doctoranda,

Fdo. Dr. Miguel Ángel Caviedes Formento

Fdo. Salvadora Navarro de la Torre

A todas las personas que han formado parte
de esta etapa de aprendizaje

“Sin prisa, pero sin descanso”

Johann W. Goethe

“Una sucesión de pequeñas voluntades consigue un gran resultado”

Charles Baudelaire

AGRADECIMIENTOS

Todos los que me conocéis sabréis como soy, y por ello sabréis que esta parte de la Tesis puede que haya sido la más difícil de escribir, por lo que intentaré que no quede muy sosa.

Siempre me gustó el Conocimiento del Medio en el colegio, y conforme esta asignatura fue avanzando durante el instituto, me fue gustando cada vez más, sobre todo “esa parte” de las bacterias y las células (desde pequeña iba para bióloga de bata). Cuando estaba en el instituto quería ser profesora de biología, y ya mostraba mis dotes “enseñando” a los peluches de mi cuarto cada vez que estudiaba o repasaba un tema. Como era de esperar, entré en la carrera de Biología y aquí llega mi primer y más importante agradecimiento. Gracias a mis padres, por haberme dejado estudiar lo que yo quise, aunque no fuera la carrera con más salidas del mundo.

Lo que más me gustaba de la carrera de Biología eran las prácticas de laboratorio y conocí la existencia de algo llamado Tesis Doctoral que se hacía después de la carrera, que duraba 4 años y que consistía en estar haciendo experimentos en el laboratorio. Desde ese momento ese fue mi objetivo. Sabía que existían alumnos que ayudaban a los profesores en los laboratorios, pero mi constante vergüenza, me impidió preguntar. Ya en quinto y último año, un compañero me habló de la beca de colaboración y, decidí quitarme la vergüenza e ir a preguntar a mi departamento favorito: Micro. He de señalar que gran parte

de esta decisión fue gracias a mi madre, que me acompañó hasta la puerta del departamento para que fuera preguntando uno por uno a todos los profesores. Después de preguntarle a todos los profesores, entré de alumna interna con Eduardo. Aunque no me dieron la beca de colaboración ese año, yo iba todos los días al departamento y si Eduardo no tenía trabajo para mí, yo iba a buscarlo a la "cocina" con Nuria y con Rocío (las técnicas) que gustosas me daban tareas. En este paso por el departamento de Micro de la facultad de Biología tengo que agradecer tanto a Eduardo como a Nuria y Rocío, la posibilidad de poder saber lo que es un laboratorio y como se trabaja en él. A Eduardo, como ya lo hice en el trabajo Fin de Master, también le agradezco que me animara a realizar un Máster. Así que, al acabar biología, ya estaba echando los papeles para realizar uno. Ese año también pedí la beca de colaboración, y para ello tuve que buscar un grupo con el que realizar el trabajo Fin de Máster, y después de escribir a cientos de profesores que participaban en él, recibí un correo con una aceptación. Tengo que decir que ese correo que recibí fue de lo mejor que me ha pasado y que nunca pensé que me iban a ir tan "rodadas" las cosas. Gracias a ese correo, empecé a realizar mi trabajo de Fin de Máster, y luego pasé a realizar mi Tesis Doctoral. En esta parte de los agradecimientos es donde doy gracias a todas las personas que han estado conmigo durante estos 5 años (se dice pronto...): un año de máster, un año en el limbo esperando la beca de la Junta y los tres años de mi Tesis. Gracias a Nacho, que fue el que respondió mi correo para el trabajo de Fin de Máster. Gracias por haberme aceptado aquel día en el

grupo, sin tener en cuenta mis notas, y por haber estado ahí durante toda mi Tesis, corrigiendo mis artículos y póster en mi inglés “guay”. Gracias también a Eloísa, mi otra directora de Tesis, por su vitalidad y su continua insistencia sobre la Junta para que me diera dinero para irme de estancia. Gracias a ambos por ser mis directores y preocuparse por mí en todo momento. También tengo que agradecer a Miguel Ángel, el que era “jefe” del grupo y ahora “jefe” de todo el departamento. Gracias por ser siempre tan atento y por tener siempre tu puerta abierta ante cualquier duda que tuviera. Sobre todo, gracias por “criar y mantener” a este grupo que tenemos (me incluyo en él por el momento :)), un grupo lleno de buena gente, que sabe divertirse tanto en las horas de trabajo como en las horas de recreo. Y hablando de las horas de recreo, no me puedo olvidar de las Ladies del BIO-181: Ana, Bouchra, Jenny, Karina, Patricia y Asun. Gracias por hacérmelo pasar tan bien en nuestras excursiones y salidas. Ana, gracias por estar ahí siempre que necesitaba algún papeleo o ayuda con el “Word” a la hora de escribir esta Tesis, sobre todo por siempre poner buena cara cada vez que desde investigación nos devolvían liquidaciones de dietas. A Bouchra tengo que agradecerle mucho. Gracias por estar conmigo desde el minuto uno, ayudándome y enseñándome, siendo el motor de este laboratorio. Jenny y Karina, creo que con las siguientes frases os resumo lo bien que hemos estado juntas en este tiempo predoctoral: “¿Dónde está mi plátano?”, “Halófitas despacitas” y “Ella es la abeja Reina”. Gracias por esos ratos y por las ayudas prestadas en algunos experimentos. Dentro del grupo de las “Halófitas

despacitas” también quiero darle las gracias a Jose y Jesús Alberto (Nicolas Cage), porque, aunque sean de Ecología, me han ayudado y han formado parte de esta Tesis. Dentro del grupo de los “ecólogos”, también le doy las gracias a Enrique, ya que, sin su ayuda, gran parte de esta Tesis no habría sido posible, y por mostrarme que también me gusta ser bióloga de bota. En general, gracias al grupo de la doctora Susana, ya que han posibilitado la ampliación de esta Tesis con más conocimientos, además de los microbiológicos.

Gracias a todas las personas que han pasado por este laboratorio durante este tiempo, en concreto a Khouloud, por ser tan simpática y risueña y hacer que practicara mi inglés. También agradecerle a la Secretaria del Departamento, M^a del Mar y Pedro, por ayudarme con los trámites y papeles durante esta Tesis.

Durante este tiempo he aprendido un montón de cosas, como a enseñar a los alumnos de las prácticas. Esta experiencia me ha gustado mucho, y aunque sea un trabajo el tener que preparar la práctica, tener claro todos los conceptos y, sobre todo saber transmitirlos, creo que es de las cosas que más me han gustado de la Tesis.

Otra de las cosas que he aprendido es a defenderme sola en un país extranjero durante tres meses. Al principio de mi estancia tenía mucho miedo, sobre todo por no saber comunicarme con la gente, y pensaba que iban a ser tres meses eternos, pero al final se pasó todo bastante rápido. Desde el primer

momento se creó en la residencia un grupo genial formado por personas de diferentes países, y ese grupo hizo que se me pasara la estancia super rápida y me quedara con muy buenos recuerdos. En el ámbito del trabajo, todo fue extraño. Me hubiera gustado aprender todo de una manera más pausada, pero la situación se dio así y el grupo se portó muy bien conmigo. Gracias a la doctora María del Carmen por acogerme en el grupo y dirigir mi estancia allí. Gracias a Lorena por pasar conmigo las dos últimas semanas a tope y enseñarme todas las técnicas quimiotaconómicas.

La realización tanto de la Tesis como de la estancia tengo que agradecerse a la Junta de Andalucía, por darme financiación para poder realizarlas a través del proyecto P11-RNM-7274MO.

Por último, quiero dar las gracias a mi familia, porque, aunque no entiendan muy bien que hago, para ellos es lo mejor. A mis padres y mi hermana, por escucharme hablar sobre mi día a día en el laboratorio, tragarse todas mis presentaciones cada vez que ensayo e intentar ayudarme, aún sin saber cómo. A Óscar, mi fei, por escuchar todos mis problemas y agobios y saber lo que hago en el laboratorio a la "perfección": Hacer PCR de "Halomonitas" y "Halomasofitos" y ayudar a crecer a "Artronemus macroestaquea". Gracias por quererme y apoyarme en todo momento.

En definitiva, gracias a todas las personas que han estado conmigo en este periodo y me han ayudado a que sea más fácil algo que ya me era fácil por el

simple hecho de que me encanta. Creo que he tenido la suerte de entrar en el mejor grupo.

Gracias a todos.

ÍNDICE GENERAL

	<u>Página</u>
Índice de Tablas	IX
Índice de Figuras	XI
Aportaciones a congresos y revistas	XV
Abreviaturas	XVII
ABSTRACT	1
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	13
1. La contaminación por metales pesados	15
2. La salinidad, un problema agrícola	20
3. Técnicas para la eliminación de contaminantes en suelos afectados	22
3.1. Fitorremediación de metales pesados	24
3.2. Fitorremediación de suelos salinos	28
4. Las plantas halófitas: <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> y su utilidad en fitorremediación	29
5. El papel de las bacterias rizosféricas y endofíticas en la adaptación de las plantas a los ecosistemas contaminados	33
5.1. Propiedades PGP, una ayuda para la planta	35



5.2. Modificación de la rizosfera	38
6. Fitorremediación en las marismas del río Odiel y en las de Lebrija	39
MATERIALES Y MÉTODOS	43
1. Recolección de muestras y análisis químicos	45
2. Aislamiento de las bacterias cultivables	46
3. Extracción de ADN y amplificación del gen del ARNr 16S	48
4. Creación de árboles filogenéticos para las especies nuevas	49
5. Determinación de las condiciones del crecimiento óptimo de las posibles especies nuevas	50
5.1. Rango de temperatura	50
5.2. Rango de pH	51
5.3. Rango de sal	51
5.4. Crecimiento en anaerobiosis	52
6. Análisis de diversidad por Box-PCR	52
7. Amplificación de genes relacionados con la síntesis de osmoprotectores	53
8. Actividades enzimáticas	55
8.1. Actividad ADNasa	55
8.2. Actividad amilasa	55
8.3. Actividades catalasa y oxidasa	56



8.4. Actividad celulasa	56
8.5. Actividad lipasa	57
8.6. Actividad pectinasa	57
8.7. Actividad proteasa	58
8.8. Actividad quitinasa	58
9. Caracterización enzimática, bioquímica y nutricional de las bacterias aisladas	60
10. Estudios quimiotaxonómicos de las bacterias seleccionadas como nuevas especies	61
10.1. Estudios del ácido diaminopimérico	61
10.2. Análisis de los azúcares de membrana	63
10.3. Estudio de los lípidos polares	64
10.4. Análisis de las quinonas	66
10.5. Análisis de los ácidos grasos	68
11. Resistencia a sal y a metales pesados	69
12. Propiedades PGP	70
12.1. Producción de IAA	70
12.2. Producción de sideróforos	72
12.3. Solubilización de fosfato	73
12.4. Fijación de nitrógeno	73
12.5. Presencia de actividad ACC desaminasa	74
12.6. Formación de biopelículas	75
13. Selección de consorcios bacterianos	76

14. Inoculación de semillas de <i>A. macrostachyum</i>	77
14.1. Preparación de los inóculos bacterianos	77
14.2. Germinación de las semillas en presencia de metales	77
14.3. Germinación de las semillas en presencia de sal	78
15. Ensayo de las plantas en suelos contaminados	80
16. Ensayo de las plantas en presencia de sal	81
17. Análisis del crecimiento	82
18. Concentración de iones en los tejidos de las plantas	83
19. Intercambio de gases y análisis de fluorescencia de la clorofila	83
20. Análisis de enzimas antioxidantes	85
20.1. Ensayo de la actividad catalasa	86
20.2. Ensayo de la actividad ascorbato peroxidasa	88
20.3. Ensayo de la actividad superóxido dismutasa	88
20.4. Ensayo de la actividad guaiacol peroxidasa	89
21. Análisis estadísticos	90
CAPÍTULO 1: <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> como herramienta de fitorremediación de metales pesados	91
Objetivos	93
Resultados	95
1. Aislamiento e identificación de las bacterias cultivables de la rizosfera y los tejidos de <i>A. macrostachyum</i>	95

2. Caracterización de las cepas aisladas de <i>A. macrostachyum</i>	98
2.1. Cribado de las actividades enzimáticas y la movilidad	98
2.2. Resistencia a sal y a metales pesados	100
3. Cribado para las propiedades PGP <i>in vitro</i>	105
4. Efecto de los metales pesados en las propiedades PGP <i>in vitro</i>	107
5. Selección de bacterias para la formación de consorcios bacterianos	111
6. Efecto de los consorcios seleccionados en la germinación de semillas	112
7. Impacto de la bioaumentación de los sedimentos en la captación de iones y la capacidad de transporte de los mismos por la planta	113
8. Impacto de la bioaumentación de los sedimentos en la tolerancia de la planta al estrés por metales	116
8.1. Efectos sobre el crecimiento de las plantas crecidas en sedimentos contaminados	116
8.2. Efectos sobre el aparato fotosintético de <i>A.</i> <i>macrostachyum</i>	117
8.3. Efectos sobre las actividades de las enzimas antioxidantes de la planta	117

CAPÍTULO 2: <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> como herramienta de fitodesalinización	121
Objetivos	123
Resultados	125
1. Aislamiento e identificación de bacterias endofitas de <i>A. macrostachyum</i>	125
2. Resistencia bacteriana a la sal y presencia de genes relacionados con la tolerancia a sal	125
3. Actividades enzimáticas y propiedades PGP mostradas por las cepas en presencia de NaCl	127
4. Formación del consorcio bacteriano	128
5. Respuesta de la germinación de las semillas a la inoculación bacteriana	129
6. Respuesta de la planta al combinar el efecto de la salinidad y la inoculación bacteriana	131
CAPÍTULO 3: Descripción de posibles nuevas especies pertenecientes al microbioma de <i>Arthrocnemum macrostachyum</i>	135
Objetivos	137
Resultados	139
1. Morfología y caracterización fenotípica	139

1.1. Género <i>Kushneria</i>	139
1.2. Género <i>Vibrio</i>	141
1.3. Género <i>Pseudoalteromonas</i>	141
1.4. Género <i>Halomonas</i>	142
1.5. Género <i>Bacillus</i>	143
1.6. Género <i>Staphylococcus</i>	143
2. Análisis filogenéticos, composición base del ADN e hibridación ADN-ADN.....	144
2.1. Género <i>Kushneria</i>	144
2.2. Género <i>Vibrio</i>	145
2.3. Género <i>Pseudoalteromonas</i>	146
2.4. Género <i>Halomonas</i>	146
2.5. Género <i>Bacillus</i>	149
2.6. Género <i>Staphylococcus</i>	149
3. Análisis bioquímicos y nutricionales	150
3.1. Género <i>Kushneria</i>	150
3.2. Género <i>Vibrio</i>	158
3.3. Género <i>Pseudoalteromonas</i>	158
3.4. Género <i>Halomonas</i>	159
3.5. Género <i>Bacillus</i>	160
3.6. Género <i>Staphylococcus</i>	161
4. Análisis quimiotaxonómicos	161
4.1. Género <i>Kushneria</i>	163

	<u>Página</u>
4.2. Género <i>Vibrio</i>	163
4.3. Género <i>Pseudoalteromonas</i>	163
4.4. Género <i>Halomonas</i>	164
4.5. Género <i>Bacillus</i>	164
4.6. Género <i>Staphylococcus</i>	167
DISCUSIÓN	169
1. <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> como herramienta de fitorremediación de metales pesados	171
2. <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> como herramienta de fitodesalinización	180
3. La microbiota de <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> como fuente de nuevas especies bacterianas	186
CONCLUSIONES	191
CONCLUSIONS	195
BIBLIOGRAFÍA	199

ÍNDICE DE TABLAS

	<u>Página</u>
Tabla 1. Datos para realizar la curva patrón de la producción de IAA	71
Tabla 2. Datos para crear las diferentes concentraciones de BSA usadas para construir una curva patrón de proteínas	86
Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas del suelo y concentraciones finales de metales en el suelo y en las plantas de <i>A. macrostachyum</i> de las marismas del Odiel	95
Tabla 4. Especies cercanas a las cepas aisladas de <i>A. macrostachyum</i> en base a la secuencia parcial del gen del ARNr 16S	97
Tabla 5. Actividades enzimáticas mostradas por las cepas aisladas	99
Tabla 6. Concentraciones máximas tolerables (MTC) para los metales pesados y el NaCl para cada aislado	102
Tabla 7. Propiedades PGP presentes en las cepas aisladas	106
Tabla 8. Propiedades PGP de las bacterias aisladas en presencia de metales pesados	109
Tabla 9. Producción de IAA por las bacterias aisladas en presencia de metales pesados	110

Tabla 10. Especies cercanas a las endofitos aisladas de <i>A. macrostachyum</i> en base a las secuencias parciales del gen del ARNr 16S	125
Tabla 11. Actividades enzimáticas, movilidad y tolerancia a la sal de las cepas endofíticas	126
Tabla 12. Propiedades PGP de los endofitos aislados	128
Tabla 13. Parámetros fotosintéticos en ramas de <i>A. macrostachyum</i> en respuesta al tratamiento con un rango de concentraciones de NaCl	133
Tabla 14. Características bioquímicas de las cepas estudiadas como posibles especies nuevas	157
Tabla 15. Perfil de ácidos grasos más abundantes presentes en las cepas problema	162

ÍNDICE DE FIGURAS

	<u>Página</u>
Figura 1. Nivel de contaminación por encima de los valores umbrales en Europa	18
Figura 2. Marismas del Odiel	19
Figura 3. Ambientes hipersalinos	20
Figura 4. Mecanismos de eliminación de los contaminantes por las plantas.....	27
Figura 5. Posible patrón de crecimiento de halófitas bajo condiciones salinas.....	30
Figura 6. Planta de <i>Arthrocnemum macrostachyum</i>	32
Figura 7. Posible mecanismo de acción por bacterias que promueven el crecimiento de la planta	36
Figura 8. Plantas de <i>Spartina maritima</i> y <i>Spartina densiflora</i> en el estuario conjunto de los ríos Tinto y Odiel	40
Figura 9. Sistema para estudiar el crecimiento en condiciones de anaerobiosis	52
Figura 10. Alineamiento de las secuencias del gen de la betaína aldehído deshidrogenasa (<i>betB</i>) de diferentes géneros	54
Figura 11. Resultados positivos y negativos de las diferentes actividades enzimáticas estudiadas	59

Figura 12. Galerías API utilizadas en la identificación de las posibles especies nuevas	60
Figura 13. Diseño de las placas usadas en la cromatografía	67
Figura 14. Resultados positivos y negativos de algunas de las propiedades PGP estudiadas	74
Figura 15. Semillas germinadas de <i>A. macrostachyum</i>	79
Figura 16. Bandeja del tratamiento sin inocular con macetas de <i>A. macrostachyum</i> con suelo de las marismas del Odiel	80
Figura 17. Patrones de la Box-PCR	96
Figura 18. Actividades enzimáticas presentes en las cepas aisladas	100
Figura 19. Resistencias de las cepas aisladas a metales pesados y NaCl	101
Figura 20. Número de aislados agrupados de acuerdo al rango de resistencia a metales	104
Figura 21. Presencia de propiedades PGP en los endofitos y en las cepas rizosféricas	105
Figura 22. Efectos de los metales pesados en las propiedades PGP	108
Figura 23. Cinética de germinación de las semillas de <i>A. macrostachyum</i> en ausencia y presencia de metales pesados	113

Figura 24. Efecto de los tratamientos de bioaumentación en el total de metales acumulados por las plantas de *A. macrostachyum*115

Figura 25. Efecto de los tratamientos de bioaumentación sobre la RGR y sobre la masa seca total en las plantas de *A. macrostachyum*116

Figura 26. Efecto de los tratamientos de bioaumentación sobre los parámetros fotosintéticos de plantas de *A. macrostachyum*118

Figura 27. Efecto de los tratamientos de bioaumentación sobre las enzimas antioxidantes de las plantas de *A. macrostachyum*119

Figura 28. Presencia de genes para la síntesis de osmoprotectores127

Figura 29. Diagrama de Venn de las propiedades PGP presentes en las bacterias aisladas129

Figura 30. Cinética de germinación de las semillas130

Figura 31. Análisis del crecimiento de *A. macrostachyum* en respuesta a un rango de concentraciones de NaCl y ausencia o presencia de bacterias después de tres meses131

Figura 32. Concentración total de sodio para las plantas de *A. macrostachyum* en respuesta al rango de concentraciones de NaCl y ausencia o presencia de bacterias durante tres meses133

Figura 33. Árbol filogenético para las cepas EAod3 ^T , EAod4 ^T y EAod7 ^T	147
Figura 34. Árbol filogenético para la cepa EAod9 ^T	148
Figura 35. Árbol filogenético para la cepa RA15 ^T	151
Figura 36. Árbol filogenético para la cepa EAR18 ^T	152
Figura 37. Árbol filogenético para la cepa EAR8 ^T	153
Figura 38. Árbol filogenético para la cepa RA18 ^T	154
Figura 39. Perfiles de los lípidos polares totales	165
Figura 40. Placa del ácido diaminopimérico revelada	166

PUBLICACIONES EN REVISTAS

Los resultados del Capítulo 1 están publicados en la revista *Marine Pollution Bulletin*:

Navarro-Torre, S., Barcia-Piedras, J.M., Caviedes, M.A., Pajuelo, E., Redondo-Gómez, S., Rodríguez-Llorente, I.D., Mateos-Naranjo, E. (2017). Bioaugmentation with bacteria selected from the microbiome enhances *Arthrocnemum macrostachyum* metal accumulation and tolerance. *Marine Pollution Bulletin*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.02.008>.

Navarro-Torre S., Mateos-Naranjo E., Caviedes M.A., Pajuelo E., Rodríguez-Llorente I.D. (2016). Isolation of plant-growth promoting and metal resistant cultivable bacteria from *Arthrocnemum macrostachyum* in the Odiel marshes with potential use in phytoremediation. *Marine Pollution Bulletin* 110: 133-142. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.06.070.

Los resultados del Capítulo 2 están publicados en la revista *Plant Biology*:

Navarro-Torre, S., Barcia-Piedras, J.M., Mateos-Naranjo, E., Redondo-Gómez, S., Camacho, M., Caviedes, M.A., Pajuelo E., Rodríguez-Llorente, I.D. (2017). Assessing the role of endophytic bacteria in the halophyte *Arthrocnemum macrostachyum* salt tolerance. *Plant Biology* 19(2):249-256. doi:10.1111/plb.12521.

Parte de los resultados del Capítulo 3 están publicados en la revista *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*:

Lucena, T., Arahal, D.R., Ruvira, M.A., Navarro-Torre, S., Mesa, J., Pajuelo, E., Rodríguez-Llorente, I.D., Rodrigo-Torres, L., Piñar, M.J., Pujalte, M.J. (en prensa). *Vibrio palustris* sp. nov. and *Vibrio spartinae* sp. nov., two new members of the Gazogenes clade, isolated from salt-marsh plants (*Arthrocnemum macrostachyum* and *Spartina maritima*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

APORTACIONES A CONGRESOS

Navarro-Torre, S., Barcia-Piedras, J.M., Mateos-Naranjo, E., Redondo-Gómez, S., Camacho, M., Caviedes, M.A., Pajuelo, E., Rodríguez-Llorente, I.D. Evaluación del papel de los endofitos en la tolerancia a la sal de *Arthrocnemum macrostachyum*. VII Reunión del Grupo Especializado de Microbiología de Plantas (MIP-17). Mayo 2017, Salamanca (España).

Navarro-Torre, S., Barcia-Piedras, J.M., Caviedes, M.A., Pajuelo, E., Redondo-Gómez, S., Rodríguez-Llorente, I.D., Mateos-Naranjo, E. Bioaugmentation with bacteria selected from the microbiome

enhances *Arthrocnemum macrostachyum* germination, metal accumulation and tolerance. *BioRemid* 2017. Marzo 2017, Granada (España).

Redondo-Gómez, S., Navarro-Torre, S., Barcia-Piedras, J.M., Mateos-Naranjo, E., Perez-Romero, J.A., Parra, R., Camacho, M., Caviedes, M.A., Pajuelo, E., Rodríguez-Llorente, I.D. Endophyte bacteria from phyllosphere of *Arthrocnemum macrostachyum* seem to play an important role in the tolerance to stressing concentrations of NaCl. *XIV MEDECOS & XII AEET meeting*. Enero/Febrero 2017, Sevilla (España).

Navarro-Torre S., Mateos-Naranjo E., Caviedes M.A., Pajuelo E., Rodríguez-Llorente I.D. Isolation and characterization of endophytic and rhizospheric bacteria of *Arthrocnemum macrostachyum* in the Odiel marshes and the heavy metals effects in their PGP properties. *7th World Congress on Microbiology*. Noviembre 2016, Valencia (España).

Navarro-Torre, S., Barcia-Piedras, J.M., Pajuelo, E., Caviedes, M.A., Redondo-Gómez, S., Camacho, M., Rodríguez-Llorente, I.D. Diversity and abundance of genes for the synthesis of osmoprotectants in the rhizosphere of the halophyte *Arthrocnemum macrostachyum*. *Rhizosphere* 4. Junio 2015, Maastricht (Holanda).

ABREVIATURAS

ACC: ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico	F_v/F_m: máxima eficiencia cuántica de la fotoquímica del PSII
ADN: ácido desoxirribonucleico	g: gramo
AGL: aminoglicolípido no identificado	GGDC: calculador de distancias genoma-genoma
AMA: agar mineral de amonio	GPx: guaiacol peroxidasa
A_N: tasa fotosintética neta	gs: conductancia estomática
APL: aminofosfolípido no identificado	h: hora
APx: ascorbato peroxidasa	HPLC: cromatografía líquida de alto rendimiento
ARNr: ácido ribonucleico ribosómico	<i>i.e.: id est</i> (esto es)
atm: atmósfera	IAA: ácido indol acético
BSA: albúmina de suero bovino	IARC: agencia internacional para la investigación en cáncer
C_a: concentración de CO ₂ del ambiente	ICP-OES: espectroscopía de emisión atómica acoplada a plasma inducido
CAS: sulfuro de azuro de cromo	IRGA: analizador de gas infrarrojo
CAT: catalasa	JCM: colección japonesa de cepas tipo (Japan Collection of Microorganisms)
CE: consorcio endofitos	kb: kilobase
CECT: colección española de cepas tipo	KCTC: colección coreana de cepas tipo (Korean Collection for Type Cultures)
C_i: concentración intracelular de CO ₂	Kg: kilogramo
cm: centímetro	kPa: kilopascal
CMC: carboximetil celulosa	l: litro
CR: consorcio rizosféricos	LMG: colección belga de cepas tipo (Laboratorium voor Microbiologie Universiteit Gent)
CSIC: consejo superior de investigaciones científicas	ln: logaritmo neperiano
CTAB: bromuro de cetil trimetilamonio	M: molar
DF: Dworkin y Foster	m²: metro cuadrado
DGGE: electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante	MA: agar marino
DPG: difosfatidilglicerol	mg: miligramo
DSM: denominación cepas tipo alemanas. (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen)	MIDI: sistema de identificación microbiana
DSMZ: colección alemana de cepas tipo (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)	min: minuto
E: este	ml: mililitro
EA: endofitos de hoja de <i>Arthrocnemum</i> Lebrija	mm: milímetro
EAod: endofitos de hoja de <i>Arthrocnemum</i> Odiel	mM: milimolar
EAR: endofitos <i>Arthrocnemum</i> de raíz	ms: milisegundo
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético	mS: milisiemens
et al.: <i>et alii</i> (y otros)	MTC: máxima concentración tolerable
F'_m: fluorescencia máxima inhibiendo el PSII	mV: milivoltios
F₀: fluorescencia en estado de oscuridad	N: normal (concentración) o norte (punto cardinal)
fig: figura	
F_m: máxima fluorescencia	
F_s: fluorescencia en estado estacionario	

n: número de muestras
NB: caldo nutritivo
NBRIP: medio de fosfato del Instituto Nacional de Investigaciones Botánicas
NCBI: centro nacional de información biotecnológica
NFB: caldo libre de nitrógeno
ng: nanogramo
nm: nanómetro
Nº: número
O: oeste
°C: grados Celsius
ONPG: orto-nitrofenil- β -galactosidasa
p/v: peso/volumen
P: probabilidad
pb: pares de bases
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PE: fosfatidiletanolamina
PG: fosfatidilglicerol
PGP: promotor del crecimiento de la planta
PGPB: bacterias promotoras del crecimiento de la planta
PIPES: ácido 1:4-piperazindietanosulfónico
pp: partes por millón
PPFD: densidad de flujo de fotones fotosintéticos
PSII: fotosistema II
PX: peroxidasa
RA: rizosféricos de *Arthrocnemum*
RGR: tasa de crecimiento relativo

ROS: especies reactivas de oxígeno
rpm: revoluciones por minuto
s: segundos
S.D.: desviación estándar
S.E.: error estándar
S: sur
s²: segundo cuadrado
SOD: superóxido dismutasa
sp.: especie
SW30: agua de mar al 30%
TAE: Tris, ácido acético y EDTA.
TCBS: tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa
TSA: agar triptona de soja
TSB: caldo triptona de soja
U: unidad
UV: ultravioleta
v/v: volumen/volumen
V: voltio
vs: *versus* (contra: frente a)
 Φ_{PSII} : eficiencia cuántica del PSII
<: menor que
>: mayor que
 \geq : mayor o igual que
 μg : microgramo
 μl : microlitro
 μm : micrómetro
 μM : micromolar
 μmol : micromol
 μs : microsegundo



ABSTRACT

Salt marshes soils are often affected by anthropogenic contamination of both organics and heavy metals, in addition to the frequent excess of salinity. Degradation of these ecosystems has ecological, agricultural and human health consequences. In this work, the use of *Arthrocnemum macrostachyum* and its microbiome has been explored as a tool for phytoremediation in contaminated marshes.

Arthrocnemum macrostachyum is a Cd- hyperaccumulator and hypertolerant halophyte plant, which has been proposed as phytoremediation tool. This plant grows naturally in the Odiel marshes, a polluted ecosystem with high levels of heavy metals. A total of 48 bacteria were isolated from plants (18 from the rhizosphere and 30 endophytes), all of them could grow in presence of high concentrations of heavy metals and salt. At least one of the plant growth promoting (PGP) properties tested was present in the isolated bacteria and there were several strains that showed high values of these properties. The presence of heavy metals affected the PGP production by the in a variable manner. On the other hand, the possibility of a high number of isolated bacteria could be new species was investigated.

The results suggested that the isolated bacteria could promote plant growth even in the presence of heavy metals, in the way that the synergic interaction of plant and bacteria could be an interesting tool for phytoremediation.

Two bacterial *consortia* with the best-performing endophytic (CE) or rhizospheric strains (CR) were selected on the basis of heavy metals resistance and PGP properties. Germination kinetics was recorded in the presence and absence of heavy metals using both bacterial *consortia*. On the other hand, a glasshouse experiment was designed to investigate the role of bacterial consortia on metal uptake capacity and tolerance in plants grown on metal polluted sediments. Plants were assigned to three inoculation treatments (with CR, CE and without

inoculation). Bacterial inoculation accelerated germination of *A. macrostachyum* seeds both in the absence and presence of heavy metals. Bioaugmentation with both bacterial *consortia* enhanced *A. macrostachyum* capacity to accumulate ions in its roots, without significantly increasing metal translocation to shoots. Furthermore, bioaugmentation alleviated the phytotoxicity due to metal exposure. These effects could be ascribed to a beneficial effect on the photosynthetic apparatus and on the modulation of plant oxidative stress machinery. These results suggest that inoculation of *A. macrostachyum* with the selected bacteria could ameliorate plant establishment and growth in contaminated marshes and improve the metal remediation efficiency of this halophyte.

During the isolation of bacteria, some strains had a low identity of their 16S RNA sequences as compared to the sequences available in databases. The phenotypic and chemotaxonomic characteristics were studied in these strains and the results obtained indicated that some studied bacteria could be new species. One of these strains has just been described as a new species within the genus *Vibrio*, under the name *Vibrio palustris* EAod9^T

Concerning salinity, there is an increasing interest to use halophytes for revegetation of salt affected ecosystems, as well as in understanding their mechanisms of salt tolerance. Eight endophytic bacteria belonging to *Bacillus* and closely related genera were isolated from the phyllosphere of *A. macrostachyum* growing in saline agricultural soils. The presence of PGP properties, enzymatic activities and tolerance towards NaCl were determined. Effects of inoculation on seeds germination and adult plants growth under experimental NaCl treatments (0, 510 and 1030 mM NaCl) were studied. Inoculation with a *consortium* including the best performing bacteria considerably improved considerably the kinetics of germination and the final germination percentage of *A. macrostachyum* seeds.

Moreover, inoculation of plants with selected *consortium* mitigated the effects of high salinity on plant growth and physiological performance and, in addition, this *consortium* appears to have increased the potential of *A. macrostachyum* to accumulate Na^+ in its shoots. Results suggest that bacteria isolated from *A. macrostachyum* phyllosphere seem to play an important role in plant salt tolerance under stressing salt concentrations, improving seed germination and plant development.



Los suelos de las marismas suelen estar afectados por contaminación antropogénica, tanto de compuestos orgánicos como de metales pesados. Además, es frecuente el exceso de salinidad debido a las mareas. La degradación de estos ecosistemas tiene consecuencias ecológicas, agrícolas y para la salud humana. En esta Tesis Doctoral, se ha explorado la utilización de *Arthrocnemum macrostachyum* y su microbioma como herramienta para la fitorremediación de los suelos degradados por estos contaminantes.

A. macrostachyum es una planta halófila hiperacumuladora e hipertolerante al cadmio y podría ser usada como herramienta en fitorremediación. Esta planta crece de manera natural en las marismas del Odiel, un ecosistema contaminado con altos niveles de metales pesados. Durante este trabajo se aislaron un total de 48 bacterias (18 de la rizosfera de *A. macrostachyum* y 30 endofitos de esta misma planta) y todas ellas pudieron crecer en presencia de metales pesados y sal. Al menos una de las principales propiedades promotoras del crecimiento de la planta (PGP) estuvo presente en todas las bacterias aisladas y se observaron altos valores de estas propiedades. La presencia de metales pesados en el medio afectó a la producción de las propiedades PGP por las bacterias. Este efecto puede ser negativo o positivo, dependiendo del metal, la cepa y la propiedad PGP. Por otro lado, un alto número de estas bacterias aisladas podrían ser nuevas especies no descritas, por lo que estas cepas también fueron estudiadas.

Los resultados obtenidos sugieren que estas bacterias podrían promover el crecimiento de las plantas incluso en presencia de metales pesados y que la interacción sinérgica planta-microorganismo asociado podría ser una interesante herramienta en fitorremediación. Por ello, se seleccionaron dos consorcios bacterianos formados por las mejores bacterias rizosféricas (CR) y los mejores endofitos (CE) base a su resistencia a metales pesados y a sus propiedades PGP. Se

observó la cinética de germinación de semillas de *A. macrostachyum* en presencia y ausencia de metales pesados usando estos dos consorcios. Por otro lado, a partir de semillas se diseñó un experimento en invernadero para investigar el papel de los consorcios en la capacidad de *A. macrostachyum* de captar y tolerar metales pesados cuando crece en sedimentos contaminados con metales. A las plantas se les realizaron tres tratamientos (inoculadas con el consorcio CR, inoculadas con el consorcio CE y sin inocular). Para empezar, la inoculación bacteriana aceleró la germinación de las semillas tanto en presencia como en ausencia de metales pesados. Ambos consorcios mejoraron la capacidad de *A. macrostachyum* para acumular iones en sus raíces y, además, también se amortiguaron los niveles de toxicidad. Las bacterias tuvieron un efecto beneficioso sobre el aparato fotosintético de las plantas, así como en la modulación de la maquinaria de estrés oxidativo. Estos resultados sugieren que la inoculación de *A. macrostachyum* con las bacterias seleccionadas podría favorecer el establecimiento y el crecimiento de esta planta en marismas contaminadas y mejorar la eficiencia de la remediación.

Durante el aislamiento de las bacterias, varias cepas mostraron una baja identidad en su secuencia del gen del ARNr 16S comparadas con las depositadas en las bases de datos. A estas cepas se les estudiaron las características fenotípicas y quimiotaxonómicas y los resultados que se obtuvieron indicaron que las bacterias estudiadas podrían ser nuevas especies. Una de estas cepas ya ha sido descrita como una nueva especie del género *Vibrio* bajo el nombre de *Vibrio palustris* EAod9^T.

Con respecto al problema de la salinización de suelos agrícolas, se ha despertado un creciente interés por la revegetación de estas zonas utilizando plantas halófitas. En esta Tesis Doctoral se aislaron 8 endofitos de la parte aérea de plantas de *A. macrostachyum* crecidas en suelos agrícolas de la zona de Lebrija.

Estas bacterias aisladas pertenecieron al género *Bacillus* y otros géneros relacionados. Se determinó la presencia de propiedades PGP, la presencia de actividades enzimáticas y la tolerancia a sal. Las mejores bacterias fueron seleccionadas para la formación de un consorcio, con el cual se estudió los efectos de la inoculación en la germinación de las semillas y en el desarrollo de las plantas en presencia de distintos tratamientos con sal (0, 510 y 1030 mM). La inoculación mejoró considerablemente la germinación de las semillas y el porcentaje de germinación. Además, la inoculación con el consorcio disminuyó los efectos de la salinidad, mejorando el crecimiento de las plantas e incrementando el potencial de *A. macrostachyum* de acumular Na^+ en los tallos. Estos resultados sugieren que las bacterias aisladas de la filosfera de las plantas de *A. macrostachyum* parecen jugar un papel importante en la tolerancia de la planta a la sal bajo concentraciones de sal estresantes, mejorando la germinación de las semillas y el desarrollo de la planta.



INTRODUCCIÓN

1. La contaminación por metales pesados.

Los metales pesados forman parte de la naturaleza del planeta en muy bajas concentraciones, siendo inofensivos para los organismos vivos. Algunos de estos metales son requeridos por las células (en cantidades inferiores al 0,1%) para la realización de numerosas actividades vitales, como es el caso de los oligoelementos (Fe, Zn, Cu, Co, F, Cr, Mn, I, Mo, Se, V), pero en mayores cantidades se vuelven tóxicos (Nagajyoti *et al.*, 2010). Sin embargo, desde hace décadas, ciertas actividades humanas, como la agricultura o la industria, han cambiado la distribución y han aumentado la cantidad de estos metales pesados, convirtiendo este grupo de químicos ambientales no bio-degradables en ubicuos (Wu *et al.*, 2016) y originando un problema de contaminación. Esta contaminación por metales pesados es un problema global que afecta profundamente al medio ambiente y a la salud pública (Vangronsveld *et al.*, 2009), principalmente por su baja solubilidad y biodisponibilidad y por su capacidad como agentes mutagénicos y cancerígenos (Davis *et al.*, 2000). Otras típicas respuestas a la contaminación por metales pesados son la inhibición del crecimiento, la supresión del consumo de oxígeno y los impedimentos en la reproducción y reparación de tejidos (Air Pollution Information System, 2016). Dentro de los metales o metaloides más importantes, en base a su toxicidad ambiental, se encuentran As, Cd, Cu, Pb y Zn (Hogan, 2010).

La Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) ha clasificado los metales pesados en tres categorías, basadas en estudios de carcinogenicidad en los seres humanos:

- En el grupo 1 se encuentran aquellos metales que son carcinogénicos para el ser humano. El As y sus compuestos, el Cd y sus compuestos, el Cr

hexavalente y el Ni y sus compuestos se encuentran en este grupo y están asociados con el cáncer de pulmón, hígado, nariz y riñón (IARC, 2012).

- El grupo 2 se divide a su vez en dos. El grupo 2A es para los metales que probablemente sean carcinogénicos, donde se encuentran los compuestos inorgánicos de Pb (IARC, 2006) y el Pb metálico (IARC, 1987). El grupo 2B está formado por aquellos metales que posiblemente sean carcinogénicos y en él se encuentra el metilmercurio (IARC, 1993).
- En el grupo 3 se encuentran los metales pesados que no son carcinogénicos para el ser humano.

Los metales pesados también originan daños en las plantas que viven en los suelos contaminados, ya que inhiben el crecimiento, afectan al estrés hídrico de la planta y a la fotosíntesis e inducen la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), responsables de numerosos desórdenes fisiológicos que conducen a la planta hacia la muerte (Barceló y Poschenrieder, 1990; Greger y Ögren, 1991; Hossain *et al.*, 2012; Lombi *et al.*, 2001).

Otro grupo de seres vivos que se ven afectados por los metales pesados son los microorganismos presentes en los suelos. Este tipo de contaminación provoca graves daños en las comunidades microbianas del suelo, ya que reducen la biomasa microbiana total y el tamaño de las poblaciones de grupos microbianos con funciones específicas (Zhuang *et al.*, 2007). Los metales pesados tóxicos, como Cd, Al, Hg y Pb, se unen a grupos -SH, inhibiendo la actividad de muchas enzimas que participan en procesos celulares fundamentales, como la transcripción y la traducción. Estas modificaciones originan daños en la membrana y el ADN (Nies y Silver, 2007). Para tener estos efectos tóxicos sobre los microorganismos, los metales deben atravesar la membrana plasmática y esto ocurre debido a la similitud química entre los diferentes metales, de manera que a veces se

transportan metales tóxicos al interior de la bacteria a través de los sistemas de transporte creados para incorporar microelementos (Cervantes *et al.*, 2006).

Mediante estudios biomonitorizados se ha observado que la concentración de Pb ha disminuido más del 126% en el 2012, mientras que las concentraciones de Cd, Ni y Cr son 10, 3 y 16 veces mayores, respectivamente, que en 1941 (Rodríguez Martín *et al.*, 2015). Por otro lado, las concentraciones de As también han aumentado durante el 2012 (Rodas *et al.*, 2007). En Europa, las actividades contaminantes afectan a alrededor de 3 millones de sitios (Sirguey y Ouvrad, 2013), siendo los suelos agrícolas del oeste de Europa y la región mediterránea las áreas más contaminadas (Figura 1) (Tóth *et al.*, 2016).

En muchas áreas, la enorme cantidad de metales pesados disponibles en el suelo está asociada a la alta concentración de sal soluble. La salinidad incrementa la movilidad de los metales debido a la formación de complejos de aniones derivados de la sal con los metales pesados y a la competición entre cationes derivados de la sal y los iones metálicos por los sitios de adsorción en la fase sólida (Acosta *et al.*, 2011; Hatje *et al.*, 2003). El Ca^{2+} y el Mg^{2+} inducen mayor movilidad de los metales que el Na^+ (Lutts y Lefèvre, 2015). El efecto de las sales clorhídricas (NaCl , CaCl_2 , MgCl_2) y NaSO_4 , en la movilidad de Cd, Cu, Pb y Zn indican que los principales mecanismos que regulan la movilidad del metal son la competición del Ca^{2+} y el Mg^{2+} por los sitios de absorción, la formación de complejos con el cloro y/o con los sulfatos (Acosta *et al.*, 2011). Normalmente Cd, Pb y Zn tienen competencia con el Ca^{2+} , mientras que el Cu suele formar CuSO_4 . Este efecto de la sal ocurre, principalmente, en áreas costeras o estuarios situados cerca de grandes poblaciones y/o áreas industriales.

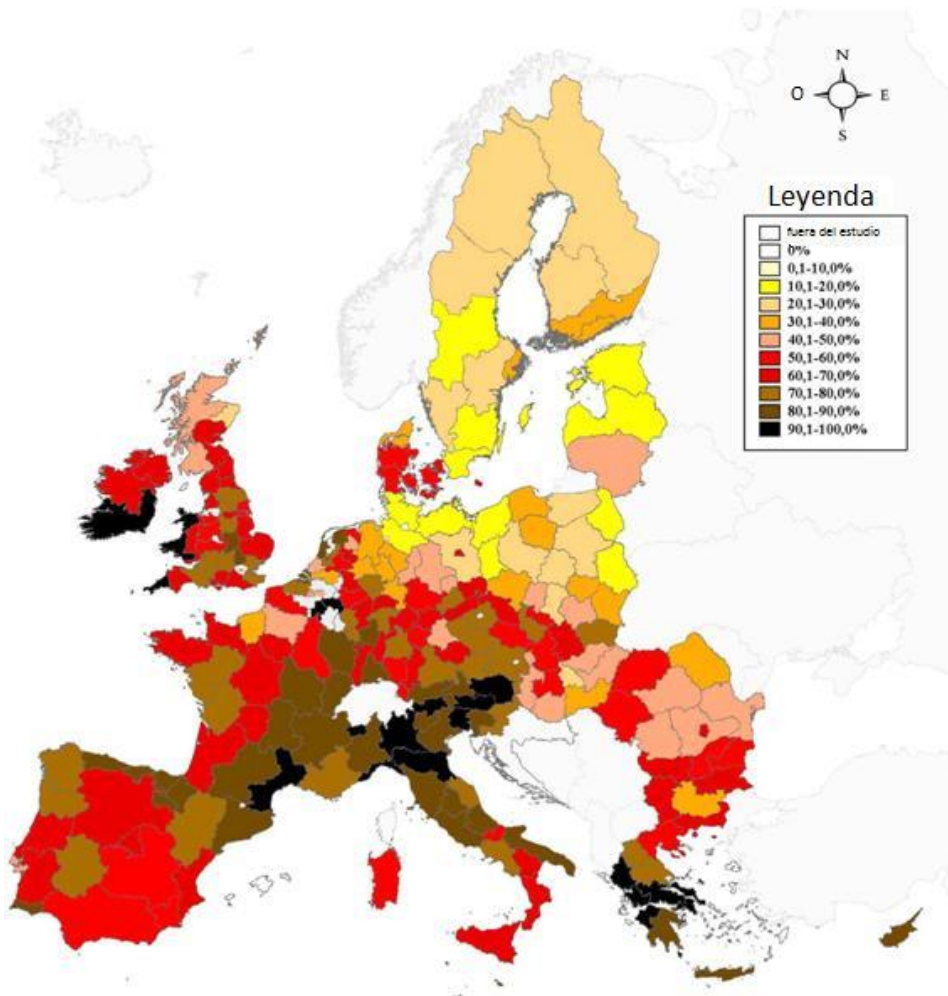


Figura 1. Nivel de contaminación por encima de los valores umbrales en Europa (modificada de Tóth *et al.*, 2016).

Un importante problema de contaminación por metales pesados que nos afecta directamente es la contaminación de las marismas del Odiel. Las marismas del Odiel son un paraje natural localizado en el sur de la provincia de Huelva y constituye una fuente alimenticia de las aves que pueblan este espacio natural, gracias a los nutrientes presentes en los sedimentos que se acumulan en la

desembocadura del río. Además, presenta una gran riqueza mineral, salina y pesquera.



Figura 2. Marismas del Odiel. En la foto superior se ven las marismas y en la inferior el área industrial presente en dichas marismas.

Durante más de cien años, se ha estado desarrollando en esta área una intensa actividad minera, debido a que en la cuenca de este río se encuentran materiales del Paleozoico y más específicamente, es donde ocurre la formación de las llamadas formaciones vulcano-sedimentarias (Grande *et al.*, 2003). El drenaje ácido minero es uno de los mayores problemas ambientales causados por los

depósitos de sulfuro de la minería (Akcil y Koldas, 2006). Estos depósitos provocan la disminución del pH y esto hace que los elementos traza aumenten. Además, en los años sesenta, comenzó la industrialización en dicha zona (Davis *et al.*, 2000; Leblanc *et al.*, 2000; Nelson y Lamothe, 1993), contribuyendo a la contaminación que hace de este lugar una de las áreas más contaminadas del mundo por la alta concentración de metales, principalmente As, Cu, Pb y Zn, presentes en sus sedimentos (Mesa *et al.*, 2015a; Nelson y Lamothe, 1993; Sáinz *et al.*, 2004).

2. La salinidad, un problema agrícola.

Los suelos afectados por la sal pueden ser definidos como aquellos con altos niveles de sal disuelta y/o altas concentraciones de iones de sodio en la matriz del suelo (Qadir *et al.*, 2000).



Figura 3. Ambientes hipersalinos. En la imagen de la derecha se encuentra el Mar Muerto, en el centro un estanque de evaporación salina (Atlit, Israel) y en la imagen de la izquierda, un estanque de cristalización salina (Eilat, Israel) (Oren, 2015).

Se ha estimado que de 1 a 10 billones de hectáreas de suelo en el mundo están afectadas por la sal (Yensen y Biel, 2006) y que existe una subida potencial del 10 al 16% al año (Aydemir y Süngerm, 2011) debido al cambio climático. Este aumento de áreas afectadas conducirá al uso de un agua de baja calidad, a un aumento de la salinización por la irrigación, a una expansión de tierras áridas, semi-

áridas y desérticas y a un aumento del nivel del mar, contribuyendo a la intrusión salina en los acuíferos (Jesus *et al.*, 2015).

Si se continúa de esta manera, el 50% de las tierras cultivables estarán agotadas a mitad del siglo XI (Mahajan y Tuteja, 2005).

Además de la pérdida de tierras cultivables, las altas concentraciones de sal en los suelos tienen efectos fisiológicos en las plantas, como el cierre de los estomas, el “shock” hiperosmótico y la inhibición de la división celular y la fotosíntesis. Sin embargo, los efectos más comunes son el desequilibrio de los nutrientes y la toxicidad de ciertos iones, como Na^+ y Cl^- . Esto conduce a una inhibición del crecimiento o a la muerte de la planta (Aslam *et al.*, 2011).

Las altas concentraciones de sal también afectan a las bacterias presentes en dichos suelos. Existen numerosas bacterias (Ventosa, 2006) que se han adaptado a vivir en ambientes con alta salinidad gracias a la acumulación de moléculas orgánicas de bajo peso molecular llamados solutos compatibles. Estas moléculas equilibran la presión osmótica externa y mantienen la turgencia intracelular (Reshetnikov *et al.*, 2011). Dentro de estos solutos compatibles se encuentran las ectoínas y las betaínas entre otras moléculas.

La salinidad, y especialmente la sodicidad, también contribuyen a la degradación del suelo desestabilizando la agregación del mismo, que conduce, en última instancia, a la reducción de la conductividad hidráulica, el deterioro en el movimiento del aire y del agua, a la escorrentía y a la exposición a la erosión (Jesus *et al.*, 2015). Estos daños en el suelo ocasionan una baja disponibilidad de agua para las plantas y reducen la penetración de las raíces, el contenido de oxígeno y la emergencia de las plántulas (Qadir y Oster, 2002).

El problema de la salinidad se debe tanto a motivos naturales (inundación de las tierras costeras, por ejemplo) como a las actividades antropogénicas (subida del nivel freático, riego con agua salada, etc.) (Hasanuzzaman *et al.*, 2013; Marchanda y Garg, 2008; Munns, 2005).

Un ejemplo de este problema ambiental se encuentra en las marismas del Guadalquivir. Estas marismas son una formación geológica que ocupa una antigua laguna costera situada cerca de la desembocadura del río. Dentro de la provincia de Sevilla, las marismas del Guadalquivir comprenden las poblaciones de Aznalcázar, Las Cabezas de San Juan, Dos Hermanas, Lebrija, Isla Mayor, Los Palacios y Villafranca, La Puebla del Río y Utrera. Los suelos de estas poblaciones presentan una naturaleza arcillosa (Moreno *et al.*, 1980) y, como se ha dicho anteriormente, debido al uso de aguas de riego con altos contenidos en sal y a la evaporación, estos suelos han ido aumentando su salinidad y sodicidad presentando dificultades para su uso agrícola.

3. Técnicas para la eliminación de contaminantes en suelos afectados.

Dado el aumento de suelos contaminados por metales y por la sal, y las consecuencias de dicha contaminación, se han ido desarrollando técnicas encaminadas a la eliminación o paliación de estos contaminantes en los suelos.

Para la eliminación de metales pesados, un método comúnmente empleado consistía en devolver los residuos a la mina de donde habían sido extraídos, verterlos al mar o a un cuerpo de agua dulce, o confinarlos en una piscina o batería de almacenamiento (Méndez *et al.*, 2007). Posteriormente, estas aguas contaminadas almacenadas eran procesadas para la eliminación de los metales que contenían, mediante la precipitación química, el intercambio iónico o la adsorción (Peng *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2008). También se han ido desarrollando

métodos físico-químicos, que pueden ser realizados *in situ* o *ex situ* (Peng *et al.*, 2009). Las técnicas *in situ* requieren, normalmente, la estabilización de los metales por la adición de productos químicos (correctores de pH o agentes quelantes) y se realizan sobre el terreno contaminado. En cambio, las técnicas *ex situ* necesitan de un traslado del suelo a contenedores especiales donde se lava, para luego continuar con la separación física o química de los contaminantes (“soil washing”). Esta separación se suele llevar a cabo con la excavación y retirada de la capa superficial contaminante seguida de un proceso llamado “landfill”, que consiste en depositar dicha capa en una balsa excavada sobre el terreno y sellarla herméticamente mediante una capa aislante. Esta balsa se cubre con suelo no contaminado y turba y se procede a la revegetación. Uno de los problemas asociados a esta técnica es el lixiviado de los metales a las aguas subterráneas. Para evitar este problema en grandes áreas contaminadas, se suele optar por la estabilización de los contaminantes mediante la adición de compuestos químicos que disminuyen su movilidad y así, disminuiría también el riesgo de que alcancen los reservorios de agua (Pajuelo *et al.*, 2011).

Para el caso de los suelos afectados por la salinidad, los métodos más frecuentes son la lixiviación y la adición de químicos y orgánicos. La lixiviación implica la aplicación de agua en exceso para promover el movimiento de las sales solubles desde la superficie del suelo hasta los estratos más profundos. Sin embargo, esta técnica está restringida a suelos salinos, ya que su efecto sobre la relación de adsorción de sodio es limitado e incluso contraproducente, ya que reduce la estabilidad del suelo. La lixiviación depende de la disponibilidad de agua y de su calidad, así como del drenaje del suelo y de la profundidad de la capa freática (Qadir *et al.*, 2000). Otra desventaja de la lixiviación es que se reduce el nitrógeno total, el carbono orgánico total, la actividad microbiana y sobre todo la fertilidad del suelo (Laudicina *et al.*, 2009). Por otro lado, se requiere la adición de químicos

para la remediación de suelos con más sodio. Este proceso funciona por la promoción del intercambio de iones a través de la disolución del CaCO_3 existente en el suelo o por la adición de cationes de calcio, seguido de una lixiviación. La corrección química es capaz de reducir la salinidad y la sodicidad de los suelos (Qadir *et al.*, 2001). Sin embargo, algunos de los químicos empleados son limitantes en suelos calcáreos y todos ellos aún dependerían de la lixiviación (Qadir *et al.*, 2003). Por último, se puede emplear la remediación orgánica, incrementando la disolución nativa de la calcita, así como la estructura y agregación del suelo y, por extensión, el drenaje y la conductividad hidráulica para mejorar la lixiviación (Wong *et al.*, 2009).

En cualquier caso, los principales problemas de estas técnicas, tanto para el trato con metales pesados como para la salinidad, son el traslado de los contaminantes de un lugar a otro, su elevado coste, y el daño que suponen en el medio ambiente.

Desde hace unos años, se han ideado métodos alternativos, asociados globalmente como biorremediación, que aprovechan la capacidad de detoxificación de los contaminantes de algunos seres vivos, sobre todo microorganismos y plantas (Abhilash *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2008). Estas estrategias biotecnológicas son de bajo coste, respetuoso con el medio ambiente y de gran aceptación pública. Además, presentan numerosas ventajas ambientales como mejorar la fertilidad del suelo, favorecer el desarrollo ecológico y mantener la estética de los paisajes (Vangronsveld *et al.*, 2009).

3.1. Fitorremediación de metales pesados.

La fitorremediación consiste en el uso de una serie de tecnologías basadas en la utilización de plantas para la eliminación de los contaminantes del suelo,

sedimentos o aguas superficiales, o su transformación en sustancias menos tóxicas o biodisponibles (Pajuelo *et al.*, 2011; Rajkumar *et al.*, 2012). Su utilización tiene grandes ventajas, como son la aplicación *in situ*, ser una tecnología verde basada en el uso de la energía solar, fácil de aplicar, adaptable frecuentemente a un amplio rango de metales, etc. Además, las plantas después de ser utilizadas en fitorremediación pueden emplearse para producir papel, madera y biocombustibles.

La fitorremediación incluye diferentes técnicas que implican diversos procesos en las plantas, de manera que cada una de ellas es más apropiada para una clase particular de contaminantes. Las plantas pueden eliminar los contaminantes mediante diferentes mecanismos, entre los que se encuentran los siguientes (Figura 4):

- **Fitoextracción**: Es un proceso donde los metales pesados son absorbidos por las raíces de las plantas y posteriormente son trasladados a la parte aérea de las mismas, donde quedan almacenados (Favas *et al.*, 2014). A la hora de su eliminación, los metales se encuentran concentrados en un volumen mucho más pequeño que en el suelo. La biomasa será retirada y tratada como un residuo contaminado.
- **Fitovolatilización**: Los compuestos son tomados del suelo y convertidos en volátiles. Después serán evaporados a la atmósfera. Esta técnica solo ocurre con algunos metales pesados como el Hg o el Se (Padmavathiamma y Li, 2007).
- **Fitoestabilización**: Los metales van a ser inmovilizados en el suelo por su captura en las raíces de las plantas, su precipitación, complejación o reducción de su estado de oxidación (Wuana y Okieimen, 2011). Con esta técnica lo que se busca es una disminución de la biodisponibilidad,

previniendo la entrada de los metales pesados en las cadenas tróficas (Méndez y Maier, 2008).

- Fitodegradación: En las plantas superiores, los compuestos xenobióticos pueden ser parcialmente transformados a través de varios procesos químicos (Gerhardt *et al.*, 2009), que pueden agruparse en tres fases principales: Fase I o conversión, donde el contaminante se convierte en una forma activa para la siguiente fase; fase II o conjugación, donde el contaminante activado se conjuga con ligandos preexistentes en la planta como el glutatión, glucosa, etc.; y fase III o compartimentación/secuestro, donde el contaminante conjugado se transporta hasta las vacuolas, si el complejo es soluble, o hasta la pared celular, si es insoluble (Gerhardt *et al.*, 2009).
- Rizofiltración: Es un proceso de eliminación de los contaminantes a través de la acumulación de los metales o compuestos orgánicos en las raíces de plantas que se encuentran sumergidas en aguas contaminadas.

En el caso de la fitoextracción se recomienda la utilización de plantas hiperacumuladoras, aquellas que crecen en suelos contaminados con metales pesados y tienen la habilidad de acumular altas cantidades de estos metales en su interior sin que se vea afectado su desarrollo y crecimiento. Estas plantas pueden acumular más de un 1% de Zn o Mn, un 0,1% de Ni, Cu, Co o Pb y un 0,01% de Cd en base a su peso seco (Baker y Brooks, 1989; Callahan *et al.*, 2006; Cobett, 2003). Entre los procesos más destacados implicados en la hiperacumulación se encuentran el aumento de la adsorción de metales por células de las raíces a través de proteínas de la membrana plasmática, quelación de los metales en el citoplasma con varios ligandos, bloqueo de la acumulación de los complejos metal-quelante en las vacuolas de la raíz,

aumento de la transferencia de los complejos metal-quelante al xilema por una alta expresión de los transportadores al xilema en la raíz y el confinamiento de los metales en las vacuolas de la epidermis de las hojas por medio de transportadores localizados en el tonoplasto (Krämer, 2010; Rascio y Navari-izzo, 2011; Sarma, 2011). Sin embargo, la hiperacumulación aparece como una rara, aunque fascinante adaptación en el reino de las plantas.

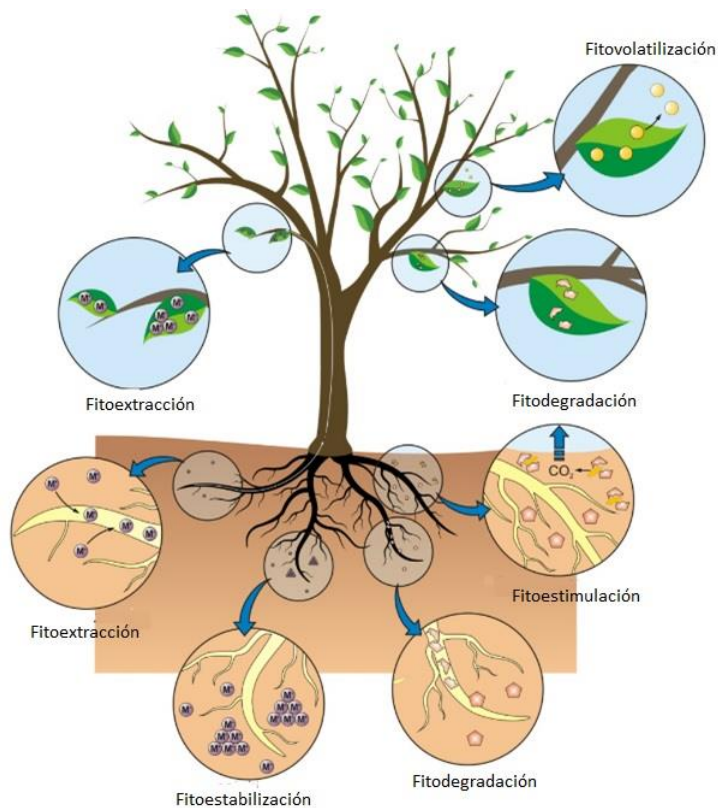


Figura 4. Mecanismos de eliminación de los contaminantes por las plantas (modificada de Favas *et al.*, 2014).

3.2 Fitorremediación de suelos salinos.

Desde el punto de vista de la recuperación de ambientes salinos, la fitorremediación también se define como el cultivo de plantas acumuladoras de sal o tolerantes a la sal para la reducción de la salinidad y/o sodicidad de los suelos (Qadir y Oster, 2002).

Los principales mecanismos que tienen las plantas para la desalinización de los suelos son:

- Reducción del pH del medio: Con la disminución del pH se consigue que se incremente la disolución de CaCO_3 . Esta disolución provoca que el Ca^{2+} esté más disponible para el intercambio de iones con el Na^+ y de esta manera, el Na^+ no puede formar compuestos y es absorbido por la planta (Qadir *et al.*, 2000; 2005; Rasouli *et al.*, 2013; Walker *et al.*, 2013).
- Absorción de sales: La planta absorbe las sales disueltas en general y/o el sodio en particular (Rabhi *et al.*, 2009; Shelef *et al.*, 2012; Walker *et al.*, 2013).

Para incrementar la eficiencia de estos mecanismos que poseen las plantas, se ha investigado el uso combinado de las plantas y diferentes tratamientos del suelo, como, por ejemplo, la adición de yeso, el cultivo de diferentes especies de plantas o la bioaumentación, esto es, la adición al suelo de microorganismos que favorezcan el crecimiento de las plantas (Jesus *et al.*, 2015).

Estudios recientes confirman que la fitorremediación y, en concreto, la fitoextracción, tienen una alta posibilidad de aumentar la eficiencia y la calidad de los suelos afectados (Jesus *et al.*, 2015). Por otro lado, la biomasa de las plantas

utilizadas en el proceso se puede usar en procesos industriales tales como la obtención de bioenergía o de celulosa (Abideen *et al.*, 2011; Glenn *et al.*, 2013).

4. Las plantas halófitas: *Arthrocnemum macrostachyum* y su utilidad en fitorremediación.

Las plantas halófitas son aquellas que pueden sobrevivir y reproducirse en ambientes cuyas concentraciones de sal exceden los 200 mM de NaCl (Flowers y Colmer, 2008) y constituyen aproximadamente el 1% de la flora del planeta. Algunas de estas plantas aumentan su productividad con el incremento de la sal y crecen mejor en presencia que en ausencia de sal. Estas plantas reciben el nombre de euhalófitas (Yensen, 2008). Las especies halófitas se encuentran diversificadas por todo el planeta en marismas, manglares, humedales, terrenos pantanosos, zonas áridas y semiáridas y campos agrícolas (Lokhande y Suprasanna, 2012).

Las plantas halófitas se clasifican, según aspectos ecológicos, en: halófitas obligadas, halófitas facultativas y halófitas de hábitats indiferentes, separándolas de las glicófitas (von Sengbusch, 2003).

Las plantas glicófitas son plantas que no se encuentran en ambientes salinos de manera natural, pero pueden tolerar cierta cantidad de sal, pero no son consideradas halófitas.

Las halófitas obligadas son aquellas que crecen solo en presencia de sal y dentro de este grupo se encuentran algunas especies de la familia *Chenopodiaceae*. Las facultativas son capaces de establecerse en suelos salinos, pero su óptimo de crecimiento es sin sal o en baja concentración de sal. Dentro de este grupo se encuentran muchas especies de las familias *Poaceae*, *Cyperaceae* y *Brassicaceae*.

Por último, se encuentran aquellas especies halófitas que son indiferentes hacia su hábitat y son capaces de hacer frente a los suelos salados en la naturaleza.

Sin embargo, por lo general crecen en suelos libres de sal. Estas plantas pueden competir con especies que son sensibles a la sal y a la vez son capaces de vivir en suelos salados. Algunas de las especies de este grupo pueden crecer en cualquier hábitat. En comparación, los tres tipos de halófitas tienen un mejor crecimiento que las glicófitas (Figura 5) (Hasanuzzaman *et al.*, 2014).

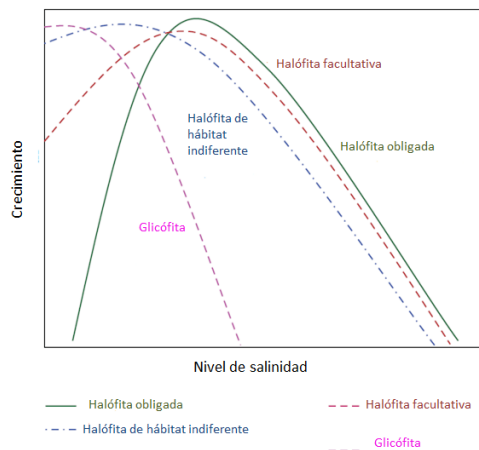


Figura 5. Posible patrón de crecimiento de halófitas bajo condiciones salinas (modificada de Hasanuzzaman *et al.*, 2014).

Estas plantas presentan una serie de características morfológicas y anatómicas para tratar con los suelos salinos como la compartimentación de iones, ajustes osmóticos, succulencia, transporte y captura de iones, sistemas antioxidantes, mantenimiento del estado redox y excreción e inclusión de sal (Lokhande y Suprasanna, 2012).

El principal mecanismo que presentan estas plantas a la hora de crecer en suelos con altas concentraciones de sal es la acumulación de las sales inorgánicas en el interior de las vacuolas y la acumulación de solutos orgánicos en el citoplasma

de las células vegetales (Hasanuzzaman *et al.*, 2014). Las vacuolas de estas plantas podrían tener una modificación lipídica para evitar que el Na^+ vuelva al citoplasma, además de ser más grandes que en el resto de plantas (Glen *et al.*, 1999). Además, estas plantas poseen un gran control estomático que permite una optimización del uso del agua bajo condiciones de estrés salino (Redondo-Gómez *et al.*, 2010b; Shabala, 2013).

También pueden tener sistemas antioxidantes que disminuyan el nivel de las especies reactivas de oxígeno (ROS), reduciendo así el estrés oxidativo. Los principales mecanismos de eliminación de ROS son las metaloproteínas, dentro de las que se encuentran las enzimas superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APx), guaiacol peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT). El balance de estas enzimas es crucial para mantener los niveles de O_2^- y H_2O_2 y la prevención en la formación del tóxico HO^\cdot (Gil y Tuteja, 2010; Hossain *et al.*, 2012).

Las plantas halófitas tienen tres mecanismos de adaptación principales: exclusión de sal, excreción de sal o acumulación de sal (Flowers y Colmer, 2015). Las plantas excluyentes de sal presentan un mecanismo de ultrafiltración en las raíces, de esta manera dejan toda la sal fuera de sus raíces. Las excretantes de sal presentan glándulas foliares y tricomas que regulan los niveles internos de sal y, por último, se encuentran las plantas acumuladoras de sal que han desarrollado succulencia para acumular altas concentraciones de sal. Estas últimas han desarrollado un buen sistema de transporte capaz de traspasar la sal a la parte aérea de la planta, especialmente a las hojas (Dajic, 2006).

Las plantas halófitas son capaces de tratar con múltiples factores de estrés. Muchas dianas fisiológicas que son afectados por la sal también lo son por metales, por lo que algunas plantas que resisten a la sal de manera natural pueden tener la

capacidad de crecer en presencia de metales e incluso de la acumulación de los mismos en sus tejidos (Anjum *et al.*, 2014; Hasanuzzaman *et al.*, 2014).

Arthrocnemum macrostachyum (Moric) C. Koch es un arbusto C3 halófito que pertenece a la familia *Amaranthaceae* con hojas muy pequeñas en forma de escama y la filosfera está compuesta por tallos articulados y suculentos.



Figura 6. Planta de *Arthrocnemum macrostachyum*.

Estos tallos son verdes, y durante las estaciones secas tienen un color rojizo. Este color se genera por la acumulación de ftopigmentos como antocianina y betacianina (Wang *et al.*, 2006) entre otros, que protegen la integridad del aparato fotosintético en presencia de ambientes salinos (Flowers *et al.*, 2014).

Está distribuida por la región Mediterránea y es abundante en las marismas del Odiel y en las marismas del Guadalquivir en la región de Lebrija. Esta planta se ha utilizado en diversos trabajos de fitorremediación, donde se observa la absorción de Cu, Pb y Zn en residuos mineros (Conesa y Schulín, 2010). También se ha estudiado la acumulación de elementos traza en tejidos de plantas de *A. macrostachyum* crecidas en estuarios contaminados, en sus tejidos (Madejón *et al.*,

2009). Además, *A. macrostachyum* es una planta hipertolerante al estrés por Cd e hiperacumuladora de Cd en sus raíces (Redondo-Gómez *et al.*, 2010a).

Por otro lado, esta planta ha demostrado una alta capacidad para la acumulación de Na⁺ ya que debido al hábitat que ocupa está sujeta a inundaciones de las mareas y a hipersalinidad estacional llegando a crecer a concentraciones salinas de hasta 1030 mM de NaCl (Redondo-Gómez *et al.*, 2010b).

Todas estas características, planta halófila, hiperacumuladora de sal y metales, hipertolerante al estrés con metales y sal y, además, autóctona de las áreas de interés, hacen de *A. macrostachyum* una planta ideal para los estudios que se plantean como objetivo de la presente Tesis Doctoral.

5. El papel de las bacterias rizosféricas y endofíticas en la adaptación de las plantas a los ecosistemas contaminados.

Como se ha comentado anteriormente, las plantas empleadas en fitorremediación deben ser capaces de eliminar grandes cantidades de metales pesados y, al mismo tiempo, incrementar su biomasa. Esto muchas veces está limitado en presencia de altas concentraciones de metales pesados, por lo que las plantas pueden perder su capacidad fitorremediadora (Ali *et al.*, 2013). Por esta razón es importante el estudio de los microorganismos asociados a las plantas, que podrían favorecer el crecimiento y la adaptación de las mismas.

Las poblaciones microbianas son fundamentales para preservar la calidad del suelo a través de procesos de rotación de la materia orgánica y por participar en el ciclo de los nutrientes (Jeffries *et al.*, 2003). Además, diversos estudios demuestran que la biodisponibilidad de los metales está influenciada por los metabolitos excretados por las bacterias (Langella *et al.*, 2014; Tak *et al.*, 2013). Los

microorganismos presentan numerosas respuestas a los iones metálicos en las que se incluyen la biosorción de metales, la precipitación de los mismos y su transformación enzimática (Valls y de Lorenzo, 2002). Se ha sugerido que la interacción entre halófitas y microorganismos podría ser útil en estrategias de fitorremediación en ecosistemas costeros (Andrades-Moreno *et al.*, 2014; Mesa *et al.*, 2015b; Rebores y Caçador, 2008).

La rizosfera de una planta es el área de suelo más cercano a la raíz y es una zona de máxima actividad microbiana, debido a la presencia de exudados por parte de la raíz que funcionan como una fuente de nutrientes para el crecimiento microbiano (Burdman *et al.*, 2000).

Los microorganismos rizosféricos, en su mayoría bacterias (Kaymak, 2010), colonizan la raíz de la planta y muchos de ellos contribuyen a ayudar a la planta a tolerar el estrés abiótico (Yang *et al.*, 2009). En los suelos contaminados estas bacterias tienen un papel crucial en ayudar a la planta contra el estrés producido por los metales pesados (Gamalero *et al.*, 2009).

Por otro lado, los endofitos son bacterias que habitan en el interior de los tejidos de las plantas sin causar daños en las mismas (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004). El conocimiento acerca de la diversidad de los endofitos ha ido aumentando conforme se ha incrementado el interés de estudio de dichas bacterias. Además, la introducción de técnicas independientes de cultivo ha permitido ampliar el conocimiento sobre las especies bacterianas que colonizan la planta. Los endofitos son muy diversos taxonómicamente y se encuentran tanto en plantas como en árboles y contribuyen a la salud de la planta y a la productividad (Berg *et al.*, 2014).

Estas bacterias tienen el ambiente preparado por la planta, ya que hay un ambiente más uniforme y protegido, sin exposición a condiciones ambientales

extremas como la temperatura, la radiación ultravioleta o la competencia microbiana, por lo que pueden ser mejores protectores de la planta contra el estrés biótico y abiótico que las rizosféricas (Glick, 2010; Newman y Reynolds, 2005).

Las vías de entrada de los endofitos al interior de la planta incluyen a los estomas, las lenticelas y las heridas, pero la principal entrada es la zona de emergencia de las raíces secundarias (Dong *et al.*, 2003; Lamb *et al.*, 1996; Reinhold-Hurek y Hurek, 1998). De hecho, la rizosfera es la fuente más importante de endofitos. Se ha descrito la presencia de enzimas celulolíticas y pectinolíticas en estas bacterias (Compant *et al.*, 2010) y, de esta forma, pueden entrar en el interior de las plantas degradando las paredes celulares vegetales.

Para establecerse, los endofitos deben hacer frente a los sistemas de defensa e inmunidad frente a patógenos presentes en el hospedador (Zeidler *et al.*, 2004) y, además, deben tener reconocimiento de señales, movilidad, capacidad de penetración y capacidad de ajustar su metabolismo y comportamiento (Mitter *et al.*, 2013). Una vez dentro, los endofitos se pueden establecer en distintos tejidos de la planta como la raíz, las hojas, el tallo o las semillas (Benhizia *et al.*, 2004; Hallman *et al.*, 1997), aunque, en la mayoría de las plantas, es en las raíces donde se encuentran más endofitos.

Los endofitos aislados de plantas hiperacumuladoras muestran una alta tolerancia a metales y son útiles en fitorremediación porque reducen la fitotoxicidad de estos metales (Mastretta *et al.*, 2009) y promueven el crecimiento de la planta (Chen *et al.*, 2010).

5.1 Propiedades PGP, una ayuda para la planta.

Tanto las bacterias rizosféricas como los endofitos pueden presentar propiedades que promueven el crecimiento de la planta (PGP) (Mesa *et al.*, 2015a;

Rajkumar *et al.*, 2009) a través de diversos mecanismos (Ahemad y Khan, 2011; Bhattacharyya y Jha, 2012).

Dentro de los beneficios de las propiedades PGP sobre las plantas se encuentran la tolerancia a estrés abiótico, mayor facilidad en la fijación de nutrientes e hierro, regulación del crecimiento y protección frente a patógenos (Choudhary *et al.*, 2011; García-Fraile *et al.*, 2015).

El nitrógeno es el factor más limitante en las plantas y es necesario para la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y metabolitos secundarios, entre otros. Los mecanismos por los que el nitrógeno atmosférico se añade a las formas orgánicas que pueden ser asimilados por las plantas es exclusivo de procariontas (Lloret y Martínez-Romero, 2005; Raymond *et al.*, 2004), y existen bacterias fijadoras de nitrógeno que pueden ayudar a las plantas.

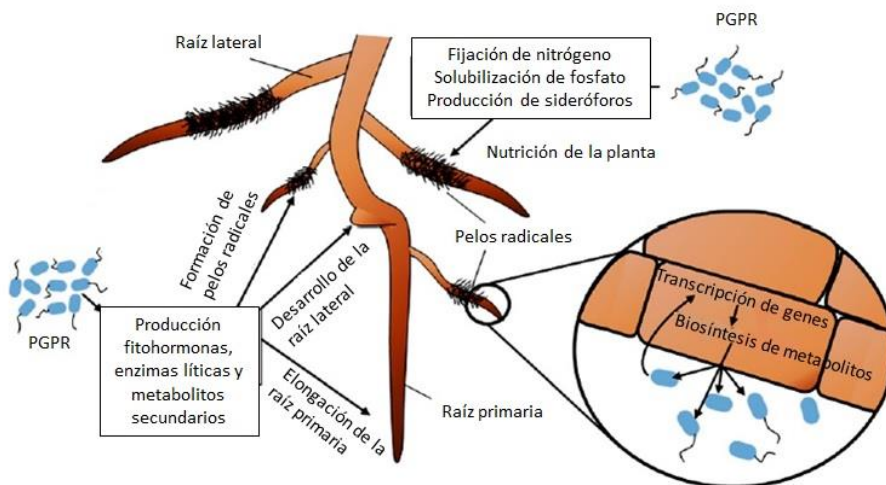


Figura 7. Mecanismos de acción por bacterias que promueven el crecimiento de la planta (modificada de Vacheron *et al.*, 2013).

Por otro lado, también existen bacterias que son capaces de solubilizar fosfato (Wani *et al.*, 2007), incrementando la disponibilidad de iones fosfato en el suelo, siendo más fáciles de captar para las plantas.

Otro elemento no disponible para las plantas en el suelo es el hierro. Normalmente, se encuentra en la naturaleza en forma de Fe^{3+} , que es altamente insoluble. Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular que quelan el Fe^{3+} del ambiente. La presencia de bacterias productoras de sideróforos facilita la captación de hierro por las plantas (Flores-Felix *et al.*, 2015).

Con respecto a la regulación del crecimiento de la planta, se encuentran bacterias fitoestimuladoras, que producen auxinas, giberelinas, etc. (Lugtenberg *et al.*, 2002; Somers *et al.*, 2004). Las auxinas regulan la mayoría de los procesos de la planta directa o indirectamente (Tanimoto, 2005). La auxina más activa y conocida en las plantas es el ácido indol acético (IAA) (Hayat *et al.*, 2010). Bajos niveles de IAA estimulan la elongación de la raíz primaria, mientras que altos niveles de IAA disminuyen la longitud de la raíz principal, incrementan la formación de pelos radicales y estimulan la formación de raíces secundarias. De esta manera, las plantas pueden tener un mayor acceso a los nutrientes del suelo (Spaepen *et al.*, 2007; Vacheron *et al.*, 2013).

Una hormona presente en la planta es el etileno que regula procesos como la maduración de frutos, la caída de las hojas, etc. (Wang *et al.*, 2013). Las plantas sintetizan 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC), un precursor del etileno que se forma en respuesta a varios tipos de estrés ambiental (Glick, 2012). Hay bacterias que presentan la enzima ACC desaminasa, utilizada en la degradación de etileno (Glick, 2014), disminuyendo así el estrés en la planta.

Por último, las bacterias también pueden presentar enzimas que ayudan a la planta contra el ataque de patógenos como, por ejemplo, las quitinasas o las glucanasas (Arora *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2010).

5.2. Modificación de la rizosfera.

En el apartado anterior ya se comentó la importancia que tienen las bacterias ayudando a las plantas en los procesos de fitorremediación. Por este motivo, se han desarrollado técnicas asociadas a la fitorremediación que tienen como finalidad aumentar la cantidad de bacterias presentes en la rizosfera, pudiendo mejorar así la capacidad fitorremediadora de las plantas. Estas técnicas son la adición de enmiendas, la bioestimulación de las poblaciones microbianas y la bioaumentación de las bacterias asociadas a la planta (Pajuelo *et al.*, 2014).

- Adición de enmiendas: Consiste en añadir algunas sustancias a los suelos para alterar la disponibilidad de los contaminantes. Para los suelos contaminados con metales, la adición de enmiendas orgánicas es una práctica común, junto con el uso de la fitoestabilización. Estas enmiendas ayudan inmediatamente a disminuir la biodisponibilidad de los metales, proporcionando un fertilizante de liberación lenta que mejora el crecimiento de la planta, y sirve como un inóculo microbiano (Park *et al.*, 2011). Además, se mejora la estructura del suelo, reduce la erosión e incrementa la infiltración (Méndez y Maier, 2008). Algunos ejemplos de enmiendas orgánicas son la paja, el estiércol, ácidos húmicos, etc.
- Bioestimulación: Consiste en la adición de aceptores/donadores de electrones o nutrientes para estimular las poblaciones microbianas existentes en los suelos, con el fin de mejorar la actividad de microorganismos indígenas degradadores o promover el co-metabolismo

(Miller, 2010). Cuando la contaminación es por metales pesados, normalmente los suelos son muy pobres, con bajo contenido en materia orgánica y nitrógeno. La adición al suelo de melaza, lodo y estiércol, entre otros, serviría al suelo como donador de electrones y fuente de carbono (Moreno-Jiménez *et al.*, 2012).

- **Bioaumentación:** Consiste en el enriquecimiento de las poblaciones microbianas nativas presentes en las rizosferas de las plantas (El Fanroussi y Agathos, 2005). Esto se consigue mediante la inoculación con microorganismos exógenos con buenas habilidades en degradación de contaminantes, aunque es preferible la inoculación con microorganismos aislados previamente de la misma rizosfera. En este último caso, se garantiza la adaptación y la competitividad de los inóculos.

6. Fitorremediación en las marismas del río Odiel y en las de Lebrija.

Como se ha comentado anteriormente, las áreas contaminadas estudiadas en esta Tesis Doctoral fueron las marismas del Odiel, contaminadas por metales pesados, y las marismas del Guadalquivir a su paso por Lebrija, con suelos degradados debido a la alta salinidad.

Las marismas del Odiel han sido bastante estudiadas durante los últimos años en el campo de la fitorremediación de metales pesados. Desde 2008 se han realizado estudios en este campo. Así, se ha comparado la acumulación de metales en los tejidos de dos gramíneas presentes en dichas marismas, la invasora *Spartina densiflora* y la autóctona *Spartina maritima*, midiendo la concentración de metales en dichas plantas crecidas en las marismas del Odiel (Cambrollé *et al.*, 2008). Estos estudios revelaron que estas plantas tenían una alta capacidad para acumular metales en su rizosfera.

Posteriormente, Mateos-Naranjo *et al.* (2011) determinaron que *S. densiflora* tenía una alta tolerancia a los metales pesados presentes en las marismas y que además acumulaba dicho metal en sus tejidos. De igual forma, estudiaron la germinación y el desarrollo de esta planta en condiciones de invernadero, usando suelo recolectado de las marismas del Odiel. Con estos experimentos se concluyó que esta planta era capaz de germinar y crecer en suelos contaminados, por lo que *S. densiflora* mostraba un alto potencial en la fitorremediación. Por otro lado, *S. maritima* también demostró tener la capacidad de acumular una mayor cantidad de metales en sus raíces y en los sedimentos cercanos a las raíces, indicando una alta capacidad para la inmovilización de los metales en la biomasa subterránea para proteger a los tejidos fotosintéticos, por lo que también podría usarse para la fitoestabilización, ya que promueve la sedimentación al mismo tiempo que concentra los metales en sus rizosediamentos (Curado *et al.*, 2013).



Figura 8. Plantas de *S. maritima* y *S. densiflora* en el estuario conjunto de los ríos Tinto y Odiel (SO España) (Cambrollé *et al.*, 2008).

Andrades-Moreno *et al.* (2014) fueron los primeros en estudiar la población microbiana presente en la rizosfera de plantas de *S. densiflora* crecidas en las marismas del Odiel. En este estudio se comparó la diversidad de bacterias presentes en la rizosfera con la presente en suelos desnudos, en base al ADN aislado de las muestras de suelo mediante la técnica de gel de electroforesis en doble gradiente (DGGE). Los resultados demostraron que la influencia de la contaminación del suelo en la población microbiana era mayor en presencia de las plantas. A partir de este trabajo, se realizaron estudios sobre la caracterización tanto de las bacterias presentes en la rizosfera como de los endofitos presentes las plantas del género *Spartina*. En paralelo al desarrollo de esta Tesis Doctoral, se aislaron endofitos de *S. maritima*, y se formó un consorcio bacteriano con las mejores bacterias aisladas, en base a sus propiedades PGP, sus actividades enzimáticas y la tolerancia tanto a sal como a metales pesados (Mesa *et al.*, 2015b). Con este consorcio formado, se inocularon plantas de *S. maritima* crecidas en suelos contaminados. El resultado de estos experimentos fue el diseño de un consorcio de endofitos que podría ser utilizado para promover la adaptación y el crecimiento de *S. maritima* en marismas contaminadas, aunque no ayudara a incrementar la acumulación de metales en la planta. Por otro lado, Paredes-Pález *et al.* (2016a) aislaron bacterias presentes en la rizosfera de las plantas de *S. maritima* crecidas en las marismas del Odiel y las caracterizaron para ver sus propiedades PGP, resistencia a metales y salinidad, además de estudiar la bioadsorción de los metales pesados por las bacterias. Las conclusiones de este trabajo mostraron que, a pesar de la gran cantidad de bacterias Gram positivas aisladas, dos cepas de *Pantoea agglomerans* (RSO6 y RSO7) eran las que mejores resultados mostraron en base a la resistencia como a la bioacumulación de metales, propiedades PGP y formación de biopelículas. Posteriormente, se realizaron estudios sobre la germinación de semillas de *S. densiflora*, utilizando esta especie como planta

modelo, que crece en las marismas del Odiel, si bien es una especie invasora. Estos ensayos se llevaron a cabo en presencia de suelo de estas marismas, inoculando las semillas con las dos cepas previamente nombradas y la cepa *Bacillus aryabhatai* RSO25 (Paredes-Páliz *et al.*, 2016b). Los resultados mostraron que la germinación de las semillas se vio mejorada por la inoculación bacteriana, probablemente debido al efecto protector que podrían ejecutar las bacterias contra el exceso de metales presentes en el suelo.

Con respecto a la zona de Lebrija, no se ha realizado ningún trabajo previo sobre la fitodesalinización del lugar. Sólo se ha llevado a cabo un estudio relacionado con la captación de elementos traza por una variedad de planta de tomate en presencia de fosfoyeso, un producto que se utiliza para la recuperación de suelos sódicos (Enamorado *et al.*, 2014), por lo que los estudios realizados en esta Tesis Doctoral serán los primeros en fitodesalinización.



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Recolección de muestras y análisis químicos.

En diciembre de 2015 se recogieron tres plantas de *A. macrostachyum* de un suelo agrícola en Lebrija (Sevilla, España) (36° 54'N-6° 12'E). En febrero de 2015 se recogieron tres plantas de *A. macrostachyum* sin senescencia aparente y con una edad y tamaño similar junto con su suelo rizosférico (entre 10 y 20 cm de profundidad, que corresponde al área de mayor biomasa de raíces) de las marismas del río Odiel (Huelva, España) (37° 13'N-6° 57'O).

Las muestras se tomaron utilizando pala o guantes de plástico y se transportaron inmediatamente al laboratorio en bolsas de plástico individuales, usando una para las muestras de rizosedimentos y otra para las plantas. Posteriormente se almacenaron a 4 °C hasta su procesamiento.

Para los análisis químicos de los rizosedimentos y los tejidos de las plantas, las muestras se secaron a 80 °C durante 48 horas, se molieron y homogeneizaron mediante tamizado a través de redes de nailon de 2 mm, con el fin de eliminar piedras grandes y material muerto (Redondo-Gómez *et al.*, 2007). Posteriormente, 0,5 g de las muestras se sometieron a una digestión ácida con 6 ml de HNO₃, 0,5 ml de HF y 1 ml de H₂O₂.

La concentración de los elementos se midió por espectroscopía de emisión atómica acoplada a plasma inducido (ICP-OES) (ARLFisons3410). La conductividad se determinó utilizando un medidor de conductividad Crison-522 y el potencial redox y el pH con un medidor portátil Crison pH/mVp-506, después de diluir los sedimentos con agua destilada (1:1). Finalmente, el análisis de la textura del suelo se realizó determinando los porcentajes de arena, limo y arcilla mediante el método del hidrómetro de Bouyoucos (Bouyoucos, 1936).

2. Aislamiento de las bacterias cultivables.

Para el aislamiento de los endofitos, la parte aérea y las raíces de las plantas se separaron para desinfectar su superficie de la siguiente manera: las muestras fueron sumergidas en etanol al 70% (v/v) y agitadas durante 1 minuto. Posteriormente, pasaron a sumergirse en hipoclorito sódico al 3% (v/v) durante 15 minutos en agitación suave. Finalmente, se lavaron cuatro veces con agua destilada estéril. Una vez desinfectada la superficie, tres muestras de las raíces y tres de la parte aérea de cada planta, de 2-3 cm de longitud, se trituraron por separado con un mortero estéril en 1 ml de solución salina estéril al 0,9% (p/v). La mezcla generada se sembró directamente (100 μ l por placa) en tres placas de Petri con medio TSA (Intron Biotechnology) suplementado con una mezcla de sales correspondientes a una fuerza iónica total de 0,3 M (TSA 0,3 M) y en otras tres placas de Petri con medio TSA suplementadas con una mezcla de sales correspondientes a una fuerza iónica total de 0,6 M (TSA 0,6 M). Las placas se incubaron a 28 °C durante 72 horas.

Con el fin de aislar las bacterias rizosféricas, las muestras de suelo (cerca de las raíces de las plantas) se agitaron en una solución salina estéril al 0,9% (p/v) durante 5 minutos y la suspensión se sembró (100 μ l por placa) en tres placas con medio TSA 0,3 M y otras tres placas con medio TSA 0,6 M, e incubadas durante 72 horas a 28 °C. El TSA 0,3 M y el TSA 0,6 M se prepararon añadiendo 54,5 ml y 129,5 ml, respectivamente, de una solución stock de sales SW30 al preparar 1 litro de los medios.

Este mismo procedimiento se llevó a cabo con las plantas y los sedimentos recolectados después de los experimentos.

Las bacterias se aislaron en base a la diferente morfología de las colonias, la tinción de Gram y la movilidad.

La morfología de las colonias se observó con mayor detalle en aquellas cepas que pudieran ser nuevas especies. Para ello, se dejaron crecer las cepas en las condiciones óptimas. Pasado el tiempo de incubación, las colonias aisladas fueron observadas utilizando un microscopio estereoscópico Olympus SZ61. Se observó la forma y el tamaño de la colonia (diámetro en mm), la elevación, la forma del margen y el color de las colonias.

El tamaño (ancho x largo en μm) y la forma de las bacterias se observaron mediante la tinción de Gram usando un microscopio Olympus CX41 con el objetivo de 100X.

Para detectar la movilidad, las colonias aisladas se transfirieron a 5 ml de medio TSB (Intron Biotechnology) 0,3 M e incubadas a 28 °C durante 30 minutos en agitación. Se depositó una gota del cultivo se depositó sobre un portaobjetos, se cubrió con un cubreobjetos y se observó en un microscopio Olympus CX41 con el objetivo de 100X.

TSA: 17 g de peptona de caseína; 3 g de peptona de soja; 5 g de NaCl; 2,5 g de KH_2PO_4 ; 2,5 g de glucosa; 15 g de agar y agua destilada hasta completar 1 litro. pH ajustado a 7,3. Se esteriliza en autoclave 20 min a 121 °C y 1 atm de sobrepresión.

TSB: 17 g de peptona de caseína; 3 g de peptona de soja; 5 g de NaCl; 2,5 g de KH_2PO_4 ; 2,5 g de glucosa y agua destilada hasta completar 1 litro. pH ajustado a 7,3. Se esteriliza en autoclave 20 min a 121 °C y 1 atm de sobrepresión.

SW30: 234 g de NaCl; 39 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 61 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g de NaHCO_3 ; 0,7 g de NaBr; 6 g de KCl; 1 g de CaCl_2 y agua destilada hasta completar 1 litro. La fuerza iónica total es de 4 M. pH ajustado a 8.

3. Extracción de ADN y amplificación del gen del ARNr 16S.

Las bacterias se cultivaron en 3 ml de medio TSB 0,3 M durante 48 horas a 28 °C en agitación continua. El ADN genómico fue extraído utilizando el kit i-genomic BYF DNA Extraction kit (Intron Biotechnology), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La amplificación del gen del ARNr 16S se llevó a cabo utilizando los cebadores 16F27 (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 16R1488 (5'-CGGTTACCTGTTAGGACTTCACC-3'), y la enzima i-Taq polimerasa (Maxime PCR PreMix Kit, Intron Biotechnology) bajo las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 20 segundos, alineamiento a 58 °C durante 10 segundos y extensión a 72 °C durante 50 segundos, seguido de una extensión final a 75 °C durante 5 minutos. Posteriormente, con 5 µl de los productos obtenidos en la PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con RedSafe™ (Intron Biotechnology), en tampón TAE 1X a 100 V durante 30 minutos. El gel se visualizó bajo luz UV y los restos de los productos de la PCR se purificaron usando la enzima ExoSAP-IT (Affymetrix USB) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los ADN purificados se enviaron a la empresa StabVida (Portugal) para su secuenciación. Las secuencias amplificadas del gen del ARNr 16S se compararon con las depositadas en las bases de datos, usando el servidor EzTaxon (Chun *et al.*, 2007). Las secuencias del gen del ARNr 16S de los aislados se depositaron en la base de datos GenBank del NCBI, bajo los números de acceso mostrados en las Tablas 4 y 10.

Aquellas bacterias que mostraron un porcentaje de identidad de menos del 99% con las secuencias presentes en las bases de datos, se consideraron como posibles nuevas especies. Las cepas estudiadas como especies nuevas en esta Tesis Doctoral han sido *Kushneria* sp. EAod3, *Kushneria* sp. EAod4, *Kushneria* sp. EAod7,

Bacillus sp. EAR8, *Halomonas* sp. EAR18, *Pseudoalteromonas* sp. RA15 y *Staphylococcus* sp. RA18. Las cepas *Vibrio* sp. RA1 y *Vibrio* sp. EAod9 se estudiaron también como especies nuevas, pero en colaboración con el grupo de la doctora María J. Pujalte de la Universidad de Valencia y el personal de la Colección Española de Cepas Tipo (CECT) (Valencia).

4. Creación de árboles filogenéticos para las especies nuevas.

Se realizaron árboles filogenéticos basados en la comparación de las secuencias del gen del ARNr 16S de las bacterias que pudieran ser especies nuevas. Para ello, se utilizó un servidor de la DSMZ llamado GGCD (Genome-to-genome Distance Calculator) (http://ggdc.dsmz.de/phylo_form.php). Para hacer los árboles de las especies de *Kushneria* y *Halomonas* se introdujeron en el servidor todas las secuencias del gen del ARNr 16S de la familia *Halomonadaceae*; para las especies de *Pseudoalteromonas* se necesitaron todas las secuencias del género, incluyendo las subespecies; para la cepa de *Bacillus* se necesitaron las secuencias de las 30 primeras especies que aparecieron en el EzTaxon; y para la cepa de *Staphylococcus*, las secuencias de todo el género incluyendo las subespecies. Una vez introducidas las secuencias, el servidor envió los resultados, dentro de los que se encuentran los árboles filogenéticos. Los análisis filogenéticos se realizaron de acuerdo a Montero-Calasanz *et al.* (2012) y las similitudes entre parejas se calcularon como recomendaron Meier-Kolthoff *et al.* (2013).

Con la ayuda de los árboles filogenéticos se determinaron las cepas tipo que se utilizaron como referencia para cada especie nueva.

5. Determinación de las condiciones del crecimiento óptimo de las posibles especies nuevas.

Para la descripción de las especies nuevas, se determinaron las condiciones de crecimiento óptimo para cada cepa. Para ello, las bacterias se cultivaron a diferentes rangos de temperatura, pH y sal. Además, se probó el crecimiento de las bacterias en diferentes medios como MA (Difco), Agar cetrimida (Scharlau) y Agar MacConkey (Sigma), estos dos últimos suplementados con SW30 hasta alcanzar una fuerza iónica de 0,3 M.

MA: 5 g de peptona; 1 g de extracto de levadura; 0,1 g de citrato férrico; 19,45 g de NaCl; 8,8 g de MgCl₂; 3,25 g de Na₂S; 1,8 g de CaCl₂; 0,55 g de KCl; 0,16 g de NaHCO₃; 0,08 g de KBr; 34 mg de SrCl₂; 22 mg de H₃BO₃; 4 mg de Na₂O₃Si; 2,4 mg de NaF; 1,6 mg de NH₄NO₃; 8 mg de Na₂HPO₄; 15 g de agar y agua destilada hasta completar 1 litro. pH ajustado a 7. Se esteriliza en autoclave 20 min a 121 °C y 1 atm de sobrepresión.

Agar cetrimida: 0,3 g de cetrimida; 20 g de peptona de gelatina; 1,4 g de MgCl₂; 10 g de K₂SO₄; 15 g de agar; 10 ml de glicerina y agua destilada hasta completar 1 litro. pH ajustado a 7,2. Se esteriliza en autoclave 15 min a 121 °C y 1 atm de sobrepresión.

Agar MacConkey: 17 g de digerido pancreático de gelatina; 1,5 g de digerido pancreático de caseína; 1,5 g de digerido péptico de tejido animal; 10 g de lactosa; 1,5 g de sales biliares; 5 g de NaCl₂; 30 mg de rojo neutro; 1 mg de cristal violeta; 13,5 g de agar y agua destilada hasta completar 1 litro. pH ajustado a 7,1. Se esteriliza en autoclave 15 min a 121 °C y 1 atm de sobrepresión.

5.1. Rango de temperatura.

Las bacterias se cultivaron en placas con medio TSA 0,3 M a 4, 15, 20, 25, 28, 30, 32, 37 y 45 °C durante 6 días. Pasado este tiempo, se observó el crecimiento de

las bacterias a cada temperatura. En base al mejor crecimiento, se determinó la temperatura óptima de cada bacteria.

5.2. Rango de pH.

Para determinar el pH óptimo, las bacterias se cultivaron en placas con medio TSA 0,3 M a distintos valores de pH durante 6 días. Los valores ensayados fueron desde pH 5 a pH 9. El valor de pH en el que hubo mejor crecimiento de cada bacteria se consideró el pH óptimo.

Los valores de pH se ajustaron a la hora de hacer el medio con los tampones citrato-fosfato para el rango de pH de 2,6 a 7 (ácido cítrico 0,1 M y fosfato de sodio dibásico 0,2 M) y Tris-HCl para el rango de pH de 7,2 a 9 (Tris (hidroximetil) aminometano 0,1 M y HCl 0,1 M).

5.3. Rango de sal.

Para determinar el rango de sal, se utilizaron placas con medio mTGE. Los valores de sal ensayados fueron: 0, 0,5, 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, 17,5, 20, 25 y 30%. Las placas se incubaron durante 6 días. Se consideró óptimo aquel porcentaje de sal donde se obtuvo un mejor crecimiento para cada bacteria. Las placas con las diferentes concentraciones de sal se obtuvieron añadiendo al medio mTGE la cantidad correspondiente de SW30 para conseguir la concentración final.

mTGE: 6 g de extracto de carne; 10 g de triptona; 2 g de dextrosa; 15 g de agar y agua destilada hasta completar 1 litro. pH ajustado a 7. Se esteriliza en autoclave 20 min a 121 °C y 1 atm de sobrepresión (Bangash *et al.*, 2015).

5.4. Crecimiento en anaerobiosis.

Para ver si había crecimiento en anaerobiosis, las posibles especies nuevas se sembraron en picadura en tubos con medio TSA 0,3 M semisólido (0,6% de agar). A continuación, se sellaron los tubos con 2 ml de agar al 2% (p/v) y, cuando solidificaron, se añadió a cada tubo 2 ml de parafina estéril (Zou y Wang, 2010) (Figura 9). Estos tubos bien cerrados se incubaron durante 10 días a 28 °C. La presencia de crecimiento en los tubos indica que las cepas son capaces de crecer en condiciones de anaerobiosis.

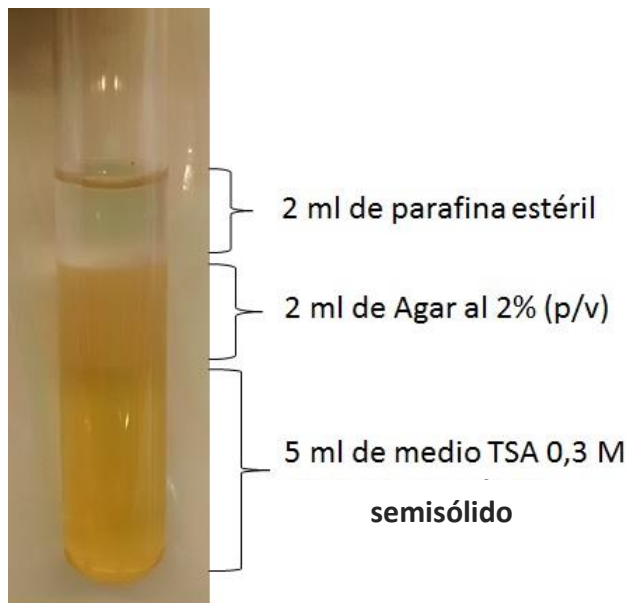


Figura 9. Sistema para estudiar el crecimiento en condiciones de anaerobiosis.

6. Análisis de diversidad por Box-PCR.

Para evaluar la diversidad genética de las bacterias aisladas, se realizaron los análisis de Box-PCR utilizando el cebador *BOX A1R* (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') y la enzima *i-Taq* polimerasa. La concentración

de las muestras de ADN para la amplificación por PCR fue de 40 ng y los pasos de amplificación programados fueron los siguientes: activación de la enzima a 94 °C durante 2 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 20 segundos, alineamiento a 52 °C durante 20 segundos y extensión a 72 °C durante 1 minuto, y una extensión final a 72 °C durante 5 minutos. Con los productos de la PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, teñido con RedSafe™, en tampón TAE 1X a 75 V durante 2 horas. El gel se visualizó bajo luz UV y se fotografió. Posteriormente, se analizó con el programa CLIQS 1D Pro (TotalLab) y se determinaron los dendrogramas y las similitudes mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson (Jobson, 1991).

7. Amplificación de genes relacionados con la síntesis de osmoprotectores.

Los genes amplificados relacionados con la síntesis de osmoprotectores fueron *ectBC* y *betB*.

Para la amplificación de los genes *ectBC* se utilizaron los cebadores *Tra3* (5' ACCGGYACITTYTTYAGITTYGA 3') y *CR* (5' GGIGGRTRAANACRCA 3') (Reshetnikov *et al.*, 2011) y la enzima i-Taq polimerasa bajo las siguientes condiciones de PCR: desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 minutos, 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 20 segundos, alineamiento a 48,5 °C durante 10 segundos y extensión a 72 °C durante 50 segundos, seguido de una extensión final a 75 °C durante 5 minutos.

Para la amplificación del gen *betB*, se usaron los cebadores degenerados *betBF* (5' ATYGGYGMTGGAECTAYCC 3') y *betBR* (5' ACCGGBCCRAARATYTCYTC 3') junto con la enzima i-Taq polimerasa. Los cebadores se diseñaron en base a las secuencias de varios genes *betB* de diferentes géneros, depositadas en la base de datos GenBank del NCBI, como *Pseudomonas putida* W619, *Marinomonas* sp.,

Mesorhizobium ciceri biovar. *biserrulae* WSM1271, *Halomonas elongata*, *Chromohalobacter* sp., *Escherichia coli* CFT073, *Sinorhizobium meliloti* M11 y *Labrenzia alexandrii* DFL-11 (secuencias con los números de acceso CP000949.1, CP000749.1, CP002447.1, AJ238780.1, JN426961.1, AE014075.1, CP001830.1 y EQ973121.1, respectivamente) utilizando el programa CLUSTAL Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>; Figura 10).

Las condiciones de la amplificación por PCR fueron: desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 minutos, 34 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 20 segundos, alineamiento a 57,2 °C durante 10 segundos y extensión a 72 °C durante 50 segundos, seguido de una extensión final a 75 °C durante 5 minutos.

```

Marinomonas      GCAACT----TCTTCTACACTCGTCGCGAGCCCTCTCGGTATTGTGCGGGCATTTGGCGCA 444
Marinobacter     GCGATT----TCTACTACACCCGCGGGAGCCGCTGGGCATCTGTGCGGGCATTTGGTGCC 435
Pseudomonas     AAAGCTCG--TTCGTCTACACCCGCGCGAGCCGCTGGGCGTGACCCGTCGGTATCGGTGCC 453
E. coli          AGACGTCA--TTTGTTTATACCCGCGCGAACCCTGGGCGTAGTGGCGGGGATTTGGCGCA 456
Halomonas       AT-ACTGGGCTTGTTTACACCCGCGCGAGCCGCTAGGTGTGATCGGGCCCATTTGGTGCC 453
Chromohalobacter AAGACTCC--TTTGTCTATACCCGCGCGAGCCGCTTGGCGCTCTGCGCAGGCATTTGGCGCC 453
Mesorhizobium   GACCCCT---TCGCCTACACAAGGCGCGAAGCGCTCGGCGCTCTGTGTCCGCATCGGCGCA 450
Sinorhizobium   GCGACT---TCGCCTATACGAAGCGGGTCCGCGCTCGGCGCTCTGCGTCCGCATCGGCGCC 453
Labrenzia       GTCCTCT---TTGCTTACACAAGCGTGAACCGCTTGGCATTGTGCTTCGGGATCGGCGCG 450
                *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

Marinomonas      TGGAACTACCCGATTCRAATCGCCATGTGGAAATCAGGCCCTTGGCGTGGC-TGCAGTAA 503
Marinobacter     TGGAACTATCCGATCCAGATCGCCTGCTGGAAGTCCGGCCCGGCCCTGGCCTGC-GGCRA 494
Pseudomonas     TGGAACTACCCGATCCAGATCGCCTGCTGGAAGTCCGGCCCGGCCCTGGC-CGCGGGCAA 512
E. coli          TGGAACTACCCGATCCAGATTTGCTTTGTGGAAATCCGCCCGCGCGCTGGC-GGCGGGTAA 515
Halomonas       TGGAACTACCCGATTCRAATCGCCTGCTGGAAGCGGCTCCGGCACTCGC-CGCTGGCAA 512
Chromohalobacter TGGAACTACCCGATCCAGATCGCCTGCTGGAAAATCGGCACCTTGCCCTTGC-CACCGGCAA 512
Mesorhizobium   TGGAACTACCCGATCCAGATCGCCTGCTGGAATCGGCACCGCGCGCTCGC-CATGGGCAA 509
Sinorhizobium   TGGAACTATCCGAGCAGATCGCCTGCTGGAAGGGTGGCGCTTGCCTCGT-CGCGGGCAA 512
Labrenzia       TGGAACTACCCGATCCAGATCGCGTGTGGAAGGCGGCCCTTGCCCTTGT-ATGCGGCAA 509
                ***** *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

Marinomonas      GTACGCGATGAAATCTTCGGCCCTGTTATGTCACTACTAAGCTTACAGATGAAGACGA 1193
Marinobacter     GTGAAGGAAGAGATCTTCGGCCCGGTGATGTCTGTGCTCACCTTCCGCGACGAAGACGA 1187
Pseudomonas     GTCAAGGAAGAGATCTTCGGCCCGGTGATGAGCATCTCACCTACGAACCGAAGAAGA 1208
E. coli          GTGCGCGAAGAGATTTTCGGCCCGGTGATGTCCATTCTGACCTACGAGTCGGAAGACGA 1211
Halomonas       GTCARAAGAGGAGATCTTTGGCCCGGTGATGTCACTACTCGCCTTCGACGACGAAGAGGA 1205
Chromohalobacter GTGCGTGAAGAGATTTTCGGCCCGGTGATGTCCGTTACTGAGCTTTCGAGGACGAGGACGA 1205
Mesorhizobium   GCGCGTGAAGAAATTTTCGGACCAAGTGTGAGCGGTGTTGAAATTCGACGCGGAGGACGA 1199
Sinorhizobium   GCGCGCGAAGAAATCTTCGGACCGGTGATGTGCGTGTCTGACTTCGACGACGAGGTGGA 1199
Labrenzia       GCACAGGAAGAAATCTTTGACCGGTGCTCAGCGTTCCTCAATTTTACAGATGAAGACGA 1199
                *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

```

Figura 10. Alineamiento de las secuencias del gen de la betaína aldehído deshidrogenasa (*betB*) de diferentes géneros, mostrando las regiones conservadas elegidas para diseñar los cebadores degenerados *betBF* (recuadro rojo) y *betBR* (recuadro negro).

Posteriormente, con los productos de las PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con RedSafe™, en tampón TAE 1X a 100 V durante 30 minutos. El gel se visualizó bajo luz UV y se comprobó la existencia de bandas con el tamaño esperado: 900 pb para el gen *etcBC* y 700 pb para el gen *betB*.

8. Actividades enzimáticas.

Las actividades enzimáticas analizadas fueron: ADNasa, amilasa, catalasa, celulasa, lipasa, oxidasa, pectinasa, proteasa y quitinasa. Todos los medios utilizados se suplementaron con solución SW30 para tener una fuerza iónica final de 0,3 M.

8.1. Actividad ADNasa.

La actividad ADNasa se evaluó sembrando las bacterias aisladas en el medio Agar ADN (Scharlau, España) e incubando las placas a 28 °C durante 7 días. Pasado este tiempo, se revelaron las placas añadiéndoles 10 ml de HCl 1 M. La aparición de halos transparentes alrededor del crecimiento bacteriano en un fondo oscuro identificó las bacterias con esta actividad (Figura 11A). Como control positivo se utilizó la cepa *Pseudoalteromonas shioyasakiensis* SMJ25 (Mesa *et al.*, 2015b).

Agar ADN: 20 g de triptona; 2 g de ADN; 5g de NaCl; 15 g de agar y agua destilada hasta completar 1 litro. pH ajustado a 7,3. Se esteriliza en autoclave 20 min a 121 °C y 1 atm de sobrepresión.

8.2. Actividad amilasa.

Para detectar la presencia de amilasa, se incubaron las bacterias en placas con Agar almidón durante 7 días a 28 °C. Después de la incubación, las placas se revelaron con la adición de 10 ml de lugol. La formación de halos transparentes

alrededor del crecimiento bacteriano en un fondo añil indica que la prueba es positiva (Figura 11B). Como control positivo se utilizó la cepa *Bacillus aryabhatai* SMJ17 (Mesa *et al.*, 2015b).

Agar almidón: 2 g de agar levadura glucosa almidón (Scharlau); 3 g de extracto de carne; 5 g de peptona; 20 g de agar y agua destilada hasta completar 1 litro. pH ajustado a 7,2. Se esteriliza en autoclave 20 min a 121 °C y 1 atm de sobrepresión.

8.3. Actividad catalasa y oxidasa.

La actividad catalasa se identificó por la producción de burbujas al añadir unas gotas de H₂O₂ al 3% (v/v) sobre las colonias de las bacterias aisladas.

Para evaluar la actividad oxidasa, se añadió el reactivo tetrametil-p-fenilendiamina al 1% (Becton, Dickinson & Co., México) a las muestras de las bacterias extendidas en un papel de filtro con un palillo de madera. La presencia de esta actividad enzimática fue observada por la aparición de un color azul antes de 10-15 segundos.

8.4. Actividad celulasa.

La actividad celulasa se examinó utilizando el medio CMC, siguiendo el protocolo descrito en Elbeltagy *et al.* (2000). Las bacterias crecieron en dicho medio durante 7 días a 28 °C. La actividad celulasa se visualizó tras la inundación de las placas con una solución de Rojo Congo al 0,1% (p/v) durante 20 minutos, seguido de un descoloramiento de las placas con NaCl 1 M. La presencia de esta enzima se determinó por la aparición de un halo claro alrededor del crecimiento bacteriano (Figura 11C). Se usó como control positivo la cepa *P. shioyasakiensis* SMJ25.

CMC: Formado por 4 soluciones: (A) 0,25 g de NaCl; 1,5 g de K_2HPO_4 ; 2,5 g de carboximetil celulosa y 400 ml de agua destilada (añadiendo el CMC lentamente para evitar la formación de agregados); (B) solución acuosa de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 1 M; (C) 3 g de $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$; 5 g de NH_4Cl ; 9 ml de glicerol al 30%; 0,5 g de extracto de levadura; 6,5 g de agar y 100 ml de agua destilada; (D) $CaCl_2$ al 7,5% (p/v). Estas cuatro soluciones se esterilizaron en autoclave por separado durante 20 min a 121 °C y 1 atm de sobrepresión y, posteriormente, las soluciones A y C fueron combinadas, estando aún calientes, luego se le añadió 1 ml de la solución B y 1 ml de la D dentro de la campana de flujo laminar (Elbeltagy *et al.*, 2000).

8.5. Actividad lipasa.

La presencia de lipasa se identificó en placas con medio Tween80 incubadas durante 7 días a 28 °C. La presencia de halos alrededor del crecimiento bacteriano indica la presencia de la enzima (Figura 11D). Se utilizó como control positivo la cepa *P. shioyasakiensis* SMJ25.

Tween80: Formado por dos soluciones: (A) 10 ml de Tween80; (B) 25 g de agar y 990 ml de agua destilada. Se esterilizan en autoclave ambas soluciones durante 20 min a 121 °C y 1 atm de sobrepresión. Añadir la solución A a la solución B con agitación constante dentro de la campana de flujo laminar (Prescott, 2002).

8.6. Actividad pectinasa.

La actividad pectinasa se examinó cultivando las bacterias en el medio AMA durante 7 días a 28 °C (Elbeltagy *et al.*, 2000). Después de la incubación, la pectina no hidrolizada por las bacterias formó un precipitado alrededor del crecimiento bacteriano al añadir CTAB al 2% (p/v) a las placas (Figura 11E).

AMA: 2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 3 g de KH_2PO_4 ; 4,5 g de Na_2HPO_4 ; 1,5 g de extracto de levadura; 5 g de pectina (añadir lentamente); 1,22 ml de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 M; 0,2 ml de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 mg/10 ml); 10 ml de CaCl_2 (20 mg/100 ml); 32,34 ml de H_3BO_3 0,05 M; 59,17 μl de MnSO_4 0,01 M; 59,23 μl de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,01 M; 40 μl de $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,05 M; 41,3 μl de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M; 15 g de agar y agua destilada hasta completar 1 litro. pH ajustado a 7,2. Se esteriliza en autoclave 20 min a 121 °C y 1 atm de sobrepresión.

8.7. Actividad proteasa.

Para detectar la presencia de esta actividad en las bacterias aisladas, éstas crecieron en el medio Agar caseína durante 7 días a 28 °C, siguiendo el protocolo descrito en Prescott (2002). La aparición de un halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano se consideró prueba positiva para esta actividad (Figura 11F). Se utilizó como control positivo la cepa *P. shioyasakiensis* SMJ25.

Agar caseína: Formado por dos soluciones: (A) 20g de leche en polvo y 500 ml de agua destilada. Se esteriliza en autoclave 10 min a 121 °C y 1 atm de presión; (B) 5 g de extracto de levadura; 20 g de agar y 500 ml de agua destilada. pH ajustado a 7,2. Se esteriliza en autoclave 20 min a 121 °C y 1 atm de sobrepresión. Añadir poco a poco la solución A a la solución B en constante agitación dentro de la campana de flujo laminar.

8.8. Actividad quitinasa.

La actividad quitinasa se investigó sembrando las bacterias en placas con medio mínimo suplementado con quitina coloidal, e incubándolas a 28 °C durante 7 días. La presencia de halos mostró la capacidad de degradar la quitina por parte de

las bacterias (Figura 11G). Como control positivo se utilizó la cepa *P. shioyasakiensis* SMJ25.

Medio mínimo suplementado con quitina coloidal: 15 g de quitina coloidal; 2,7 g de K_2HPO_4 ; 0,3 g de KH_2PO_4 , 0,7 g de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$; 0,5 g de KCl; 0,13 g de extracto de levadura; 15 g de agar y agua destilada hasta completar 1 litro. Ajustar el pH a 7 y se esteriliza en autoclave 20 min a 121 °C y 1 atm de sobrepresión.

Quitina coloidal: 4 g de quitina y 36 ml de HCl concentrado. Disolver en agitación durante 2 h en campana de extracción de gases. Completar la disolución con agua destilada hasta 1 litro y dejar decantar toda la noche. Descartar el sobrenadante y resuspender el sedimento con 1 litro de agua destilada y volver a dejar decantar toda la noche. Repetir el proceso de lavado/decantado 7 veces o hasta que el pH del sobrenadante sea de 5,5-6. Después del último lavado, mezclar vigorosamente y pasar por un filtro de 0,5 mm. El efluente se conserva en un recipiente opaco a 4 °C. Para determinar el contenido total de quitina se mete una muestra en una estufa a 80 °C durante 24 h y se pesa.

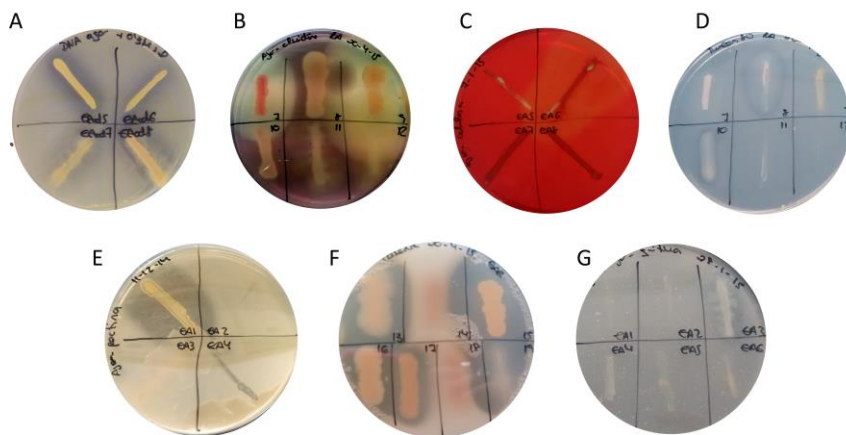


Figura 11. Placas de Petri con resultados positivos y negativos de las diferentes actividades enzimáticas estudiadas. (A) Placa de Agar ADN; (B) placa de Agar almidón; (C) placa de CMC; (D) placa de Tween80; (E) placa de AMA; (F) placa de Agar caseína; (G) placa de quitina coloidal.

9. Caracterización enzimática, bioquímica y nutricional de las bacterias aisladas.

A las posibles especies nuevas se les determinó las características enzimáticas y bioquímicas, además de la resistencia a algunos antibióticos. Las características enzimáticas y bioquímicas se determinaron utilizando los sistemas comerciales API 20NE, API 20Strep y API Zym (bioMérieux, Francia) (Figura 12). Las galerías de estos sistemas se inocularon con una solución de bacterias adecuada según las instrucciones del fabricante. Las galerías del API 20NE y del API 20Strep se interpretaron tras 24 horas de incubación a 28 °C, siguiendo las instrucciones del fabricante, y se realizó una segunda lectura tras 48 horas.

Las galerías del API Zym se leyeron tras 4 horas de incubación a 28 °C, después de añadir los reactivos ZYM A y ZYM B como establece el fabricante.



Figura 12. Galerías API utilizadas en la identificación de las posibles especies nuevas con resultados positivos y negativos. (A) API 20Strep; (B) API 20NE; (C) API Zym.

Para determinar las características nutricionales, así como la resistencia frente a algunos antibióticos se usaron las microplacas GEN III (Biolog). Para ello, se sembraron las bacterias en placas con medio TSA 0,3 M y se incubaron durante 24 horas a 28 °C. A partir de este cultivo, se realizó una suspensión de cada bacteria en un líquido inoculante viscoso llamado IF C, suplementado con SW30 estéril hasta una fuerza iónica de 0,3 M, hasta llegar a una transmitancia del 90-95%. Esta se añadió a las microplacas y se incubaron durante 3 días a 30 °C en un dispositivo Omnilog (Biolog). Los resultados se analizaron con el paquete opm para R (Vaas *et al.*, 2012; 2013) v.0.9.23. A las cepas tipo de referencia también se les realizaron estas pruebas para poder comparar los resultados obtenidos.

10. Estudios quimiotaxonómicos de las bacterias seleccionadas como nuevas especies.

Para poder realizar los estudios quimiotaxonómicos (excepto para los ácidos grasos), primero se tuvieron que liofilizar los cultivos bacterianos. Para ello, las bacterias se incubaron en 1 litro de medio TSB 0,3 M durante 3 días a 28 °C en agitación continua. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron durante 10 minutos a 8500 rpm. Se recogieron los sedimentos en tubos Falcon de 50 ml y se guardaron a -20 °C durante 48 horas. Una vez congeladas las biomasas bacterianas se liofilizaron durante 48 horas.

Todas las pruebas quimiotaxonómicas fueron realizadas bajo una campana de extracción de gases.

10.1. Estudios del ácido diaminopimélico.

Este estudio sólo se realizó para las cepas Gram positivas, siguiendo el método descrito en Staneck y Roberts (1974). El protocolo realizado se divide en dos partes: una hidrólisis y una cromatografía en capa fina.

Para la hidrólisis, se pesaron 10 mg de la biomasa liofilizada en tubos eppendorf, y se mezclaron con 200 μ l de HCl 6 N. La mezcla se incubó a 100 °C durante 12-16 horas, tapando los eppendorf con papel de parafina. Luego se centrifugaron los tubos durante 5 minutos a 5000 rpm y el sobrenadante se transfirió a un tubo de cristal. Estas muestras se secaron en un evaporador durante 20 minutos, aproximadamente, a 40 °C. Una vez completamente secas, el residuo final se disolvió en 100 μ l de agua destilada y se volvió a evaporar. Por último, los residuos se disolvieron en 20 μ l de agua destilada y se guardaron a 4 °C hasta su uso. Una vez utilizada, el resto de la solución se guarda a -20 °C.

El siguiente paso es la realización de la cromatografía en capa fina. A la placa de celulosa 20 x 20 cm (Merk 1.0576.0001) se le practicaron dos líneas a cada lado a 0,5 cm del borde. Luego, se dibujó una línea a 1 cm del borde inferior con un lápiz. Las muestras se colocaron con una pipeta Pasteur sobre esta línea y se secaron al aire. Las muestras se repartieron en líneas de 1 cm y separadas unas de otras por 1,5 cm (Figura 13A). Junto con las muestras, también se depositó en la placa de celulosa una solución estándar que sirvió como marcador. Una vez preparada la placa de celulosa, se introdujo en una cubeta de cristal con 120 ml del solvente, formado por metanol: agua destilada: HCl 6 N: piridina (80:26:4:10 v/v), y dos papeles de filtro a ambos lados de la cubeta, hasta que el solvente llegara, aproximadamente, a 2 cm del final de la placa (alrededor de 3 horas). Después, la placa se dejó secar durante 30 minutos fuera de la cubeta y se roció con un espray de ninhidrina (ninhidrina 0,2% en acetona) y se calentó a 100 °C durante 5 minutos. Los aminoácidos fueron visibles después de este paso y se determinó el tipo de isómero por comparación con el estándar. El solvente utilizado debe ser preparado un día antes de su uso.

10.2. Análisis de los azúcares de membrana.

Este análisis también se llevó a cabo sólo en las bacterias Gram positivas, siguiendo el protocolo descrito en Lechevalier y Lechevalier (1970). Lo primero fue pesar 25 mg de la biomasa liofilizada, en un tubo de cristal con rosca forrado con teflón, y se le adicionó 1 ml de H_2SO_4 1 N. Estos tubos se calentaron a $95\text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 horas y, posteriormente, se enfriaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se le añadió el volumen de una pipeta Pasteur de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ saturado y la mezcla se transfirió a un vaso de precipitado de 10 ml. El pH se ajustó a 5-5,5 usando $\text{Ba}(\text{OH})_2$ saturado o H_2SO_4 1 N. Se transfirió la muestra a un tubo de hidrólisis y se centrifugó a 1800 rpm durante 5 minutos. La fase líquida se pasó a un tubo de cristal tapado con algodón y se congelaron con una inclinación de 45 ° a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ durante 2-3 horas. Pasado este tiempo, la muestra se liofilizó durante toda la noche. Finalmente, se disolvió en 0,5 ml de agua destilada y se transfirió a un tubo eppendorf.

Como en el caso anterior, en este estudio también se realizó una cromatografía en capa fina. La placa de celulosa se preparó de la misma manera que en el caso del ácido diaminopimélico, con la diferencia de que se colocaron 5 μl de la muestra con una jeringuilla a lo largo de 2 cm. También se utilizó un estándar de azúcares, cada uno a una concentración del 1% (ramnosa, ribosa, xilosa, arabinosa, D-manosa, D-(+) glucosa y galactosa). La cromatografía se realizó, como se ha descrito en el apartado anterior, durante 2 horas, utilizando el solvente etilacetato: piridina: agua destilada (100:35:25 v/v). Una vez terminada la cromatografía, la placa se secó durante 15-30 minutos y, posteriormente, se roció con un spray de ftalato de anilina y se calentó a $105\text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 minutos. Los puntos de azúcares fueron visibles después de este paso y se determinó el tipo de azúcar en comparación con la solución estándar.

10.3. Estudio de los lípidos polares.

Los lípidos polares se analizaron según el protocolo de Minnikin *et al.* (1984) siguiendo las modificaciones del protocolo descritas en Kroppenstedt y Goodfellow (2006). Se necesitaron 100 mg de biomasa liofilizada de las bacterias que se colocaron en un tubo de teflón de 10 ml. Se les añadió 2 ml de metanol acuoso y 2 ml de éter de petróleo y se mezcló durante 15 minutos en un rotador. Luego, se centrifugaron durante 5 minutos a 1800 rpm a temperatura ambiente y se formaron dos capas. La capa superior se recuperó en tubos de cristal tapados con papel de aluminio para el análisis de las quinonas y se guardó a -20 °C en oscuridad.

A la capa inferior se le añadió 1 ml de éter de petróleo, se mezcló durante 5 minutos y se volvió a centrifugar con las mismas condiciones. Se volvieron a formar dos capas y la superior se volvió a guardar para el análisis de las quinonas. La capa inferior se mezcló con un agitador y se calentó durante 5 minutos en un baño a 99 °C. A continuación, los tubos se enfriaron a 37 °C durante 5 minutos. Se les añadió 2,3 ml de cloroformo: metanol: NaCl al 0,3% (p/v) (90:100:30 v/v) y se mezclaron durante 1 hora en un rotador. Pasado este tiempo, se centrifugaron los tubos durante 5 minutos a 1800 rpm y el sobrenadante se pasó a tubos limpios. Posteriormente, se les añadió a los sedimentos 2,3 ml de cloroformo: metanol: NaCl al 0,3% (p/v) (50:100:40 v/v), se mezclaron durante 30 minutos y se volvió a centrifugar, unificando los sobrenadantes con los del paso anterior. A los sobrenadantes recopilados se les añadió 1,3 ml de Cloroformo y 1,3 ml de NaCl al 0,3% (p/v) y se mezcló cuidadosamente durante 20 segundos, se volvieron a centrifugar los tubos y la fase inferior se pasó a un tubo de cristal y se concentró usando un evaporador a 40 °C durante 20-30 minutos. El residuo final se disolvió en 0,4 ml de cloroformo: metanol (2:1) y se guardó a -20 °C.

A las muestras obtenidas se les hizo una cromatografía, utilizando placas de aluminio 10 x 10 (Macherey-Nagel). Se cargaron 20 μ l de las muestras con una jeringuilla en la esquina inferior izquierda de la placa y se secaron con aire caliente seco. Se hicieron 4 placas por muestra y se rotularon en la esquina superior izquierda (Figura 13C). Las muestras corrieron dos veces en distintas posiciones. La primera cromatografía se realizó utilizando el solvente cloroformo: metanol: agua destilada (195:75:12) durante 30 minutos, aproximadamente, (hasta que el solvente llegue al final de la placa). Las placas se colocaron en la posición en la que el punto donde se pusieron las muestras quedara en la esquina inferior derecha y el nombre de la muestra en la esquina inferior izquierda (Figura 13B). Posteriormente, se secaron durante 30 minutos y se introdujeron en otra cubeta para la segunda cromatografía. Esta cubeta contenía el solvente cloroformo: ácido acético glacial: metanol: agua destilada (80:12:15:4). Las muestras se sometieron a cromatografía durante 30 minutos, aproximadamente, (hasta que el solvente llegue al final de la placa), con las placas en la posición en la que el nombre de la muestra quedara en la esquina superior izquierda y el punto de la muestra en la inferior izquierda (Figura 13C). Por último, se dejaron secar durante 30 minutos.

La detección de los lípidos se realizó de la siguiente manera:

- Detección de los grupos amino: se roció la placa 1 con un espray de ninhidrina 0,2%, calentada a 80 °C durante 10 minutos y enfriada a temperatura ambiente. Después de este paso, aparecieron puntos de color rosa que se marcaron con un lápiz y, finalmente, se escanearon las placas.
- Detección de los grupos glico: la placa 2 se roció con un espray de ácido α -nafto-sulfúrico y se trató como en el caso anterior. Se escanearon los puntos marrones que aparecieron.
- Detección de los grupos fosfato: la placa 1 se roció con el espray de ninhidrina 0,2% con azul molibdeno al 1,3% diluido en ácido sulfúrico 4,5 M

(1:1). La placa se secó a temperatura ambiente y aparecieron puntos azules.

- Detección de lípidos totales: se roció la placa 3 con un spray de ácido molibdatofosfórico al 5% en etanol, se calentó a 150 °C durante 20 minutos, luego a 170 °C durante otros 20 minutos y finalmente, se enfriaron a temperatura ambiente. Después de estos pasos aparecieron puntos de color negro.
- Detección de los grupos colina: se roció suavemente la placa 4 con un spray con el reactivo Dragendorff. La placa se secó a temperatura ambiente y aparecieron puntos de color amarillo-naranja (Tindall, 1990).

Metanol acuoso: 10 ml de una solución de NaCl al 0,3% en 90 ml de metanol.

Espray con ácido α -nafto-sulfúrico: 40,5 ml de etanol; 4 ml de agua destilada; 6,5 ml de ácido sulfúrico concentrado y 10,5 ml de α -naftol (15 g/l en etanol).

Reactivo Dragendorff: yoduro de potasio 0,11 M y subnitrito de bismuto 0,6 mM en ácido acético 3,5 M.

10.4. Análisis de las quinonas.

Para los análisis de las quinonas se recuperaron las muestras recogidas durante la extracción de los lípidos polares, guardadas en oscuridad a -20 °C. Estas muestras se secaron completamente en el evaporador y el residuo formado se disolvió en 400 μ l de acetona. Los extractos se cargaron en placas pequeñas TLC (gel de sílice TLC 60 F254.1.05735.0004 Merk), usando una pipeta Pasteur. En cada placa se cargaron dos muestras en 2 cm, a 1 cm del borde inferior. Se hizo una cromatografía de estas placas durante 30 minutos, aproximadamente, (el solvente no debe llegar al final de la placa) en una cubeta que contenía el solvente éter de petróleo: dietil éter (85:15 v/v), siempre fresco. Posteriormente, las placas se

dejaron secar a temperatura ambiente durante 30 minutos y se observaron bajo luz UV. Las marcas negras fuertes se marcaron con un lápiz, se rasparon y el sílice raspado se introdujo en una jeringuilla de cristal con un filtro. A la jeringuilla se le añadieron dos volúmenes de una pipeta Pasteur de dietil éter para la elución de las quinonas. El producto obtenido se secó completamente en el evaporador a 40 °C y el residuo final se disolvió con 200 µl de isopropanol para HPLC y se transfirió a un vial pequeño.

Las quinonas se identificaron por HPLC.

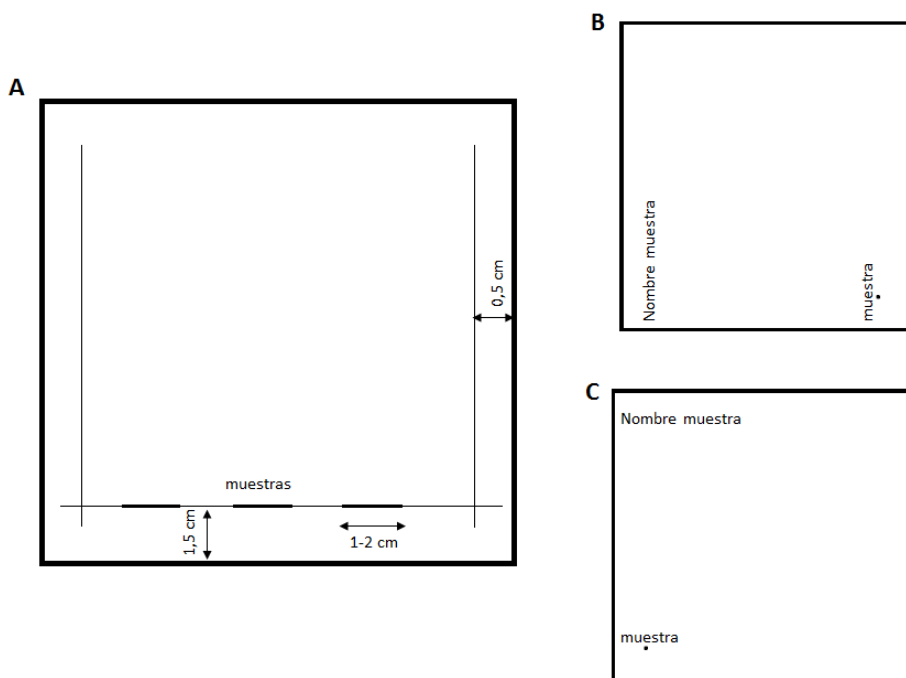


Figura 13. Diseño de las placas usadas en la cromatografía durante los análisis quimiotaxonómicos. (A) Placa de celulosa 20 x 20 para realizar los estudios de los ácidos diaminopimélicos y los azúcares de membrana; (B) placa de aluminio 10 x 10 para el análisis de los lípidos polares en la posición de la primera cromatografía; (C) placa de aluminio 10 x 10 para el análisis de los lípidos polares en la posición de la segunda cromatografía.

10.5. Análisis de los ácidos grasos

La extracción de los ácidos grasos se realizó en todas las cepas estudiadas como especies nuevas y en las cepas tipo de referencia de cada una, siguiendo el protocolo descrito por Sasser (1990).

En primer lugar, se sembraron las bacterias problema y las de referencia con las mismas condiciones en placas de medio TSA 0,3 M a 28 °C. Para las cepas de *Pseudoalteromonas* y *Bacillus*, las placas se incubaron durante 24 horas, mientras que para el caso de *Kushneria*, *Halomonas* y *Staphylococcus* fueron necesarias 48 horas. Pasado el tiempo de incubación se recogieron de estas placas 40 mg de biomasa, y se pasaron a un tubo de cristal con tapón de rosca, y se guardaron a -20 °C. Para la realización de la extracción, se siguieron 4 pasos: saponificación, metilación, extracción y lavado.

Para la saponificación, se añadió 1 ml del Reactivo 1 a cada tubo con las bacterias, se mezclaron con el agitador y se calentaron en agua a 99 °C durante 5 minutos. Pasado este tiempo, se volvieron a agitar las muestras durante 5-10 segundos y se devolvieron al baño durante 30 minutos más. Finalmente, se enfriaron en agua helada durante 5 minutos.

Para la metilación, se les añadió a los tubos 2 ml del Reactivo 2, se mezclaron brevemente con el agitador, se calentaron a 80 °C durante 10 minutos (este paso es crítico en el tiempo y la temperatura) y, por último, se enfriaron en agua helada durante 5 minutos.

Para realizar la extracción de los ácidos grasos, se añadió a las muestras 1,25 ml de Reactivo 3, se voltearon en un rotador durante 5 minutos. A continuación, se centrifugaron los tubos a 1800 rpm durante 5 minutos y se descartó la fase acuosa (la inferior).

El último paso fue el lavado. Para ello, se añadió 4 ml del Reactivo 4 a los tubos y se voltearon durante 5 minutos en el rotador. Posteriormente, se les añadió un volumen de una pipeta Pasteur del Reactivo 5 y se transfirió la capa superior a un vial y se guardó a 4 °C hasta su análisis.

Para el análisis e identificación de los ácidos grasos, los viales con las muestras se enviaron a una compañía externa, que usaron el sistema MIDI para la identificación.

Reactivo 1: 45 g de NaOH; 150 ml de metanol (para HPLC) y 150 ml de agua destilada.

Reactivo 2: 325 ml de HCl 6N y 275 ml de metanol (para HPLC).

Reactivo 3: 200 ml de hexano (para HPLC) y 200 ml de metil terc-butil éter.

Reactivo 4: 10,8 g de NaOH y 900 ml de agua destilada.

Reactivo 5: 40 g de NaCl y 100 ml de agua destilada.

11. Resistencia a sal y a metales pesados.

Con el fin de determinar la resistencia a NaCl, las bacterias se sembraron en placas de medio TSA suplementadas con concentraciones crecientes de SW30 desde una fuerza iónica de 0,5 M hasta 4 M (preparadas añadiendo la cantidad correspondiente de SW30). Estas placas se incubaron a 28 °C durante 3 días.

De manera similar, la resistencia a metales pesados se realizó en placas de medio TSA 0,3 M. Las placas se prepararon añadiendo cantidades crecientes de metales pesados a partir de soluciones stock de los metales probados: NaAsO₂ 0,5 M; CdCl₂ 1 M; CuSO₄ 1 M; CoCl₂ 1 M; NiCl₂ 0,5 M; Pb(NO₃)₂ 0,5 M y ZnSO₄ 1 M. Las concentraciones finales de los metales en las placas fueron del rango de 0,1 a 60

mM de As; de 0,1 a 3,5 mM de Cd y Cu; de 0,1 a 25 mM de Co, Ni, y Pb; y de 0,1 a 5 mM de Zn. Las bacterias se incubaron en estas placas durante 3-4 días a 28 °C.

12. Propiedades PGP.

Las propiedades PGP estudiadas fueron la producción de auxinas, la producción de sideróforos, la solubilización de fosfato, la fijación de nitrógeno, la presencia de la actividad ACC desaminasa y la formación de biopelículas. Todos los medios utilizados se suplementaron con SW30 hasta alcanzar una fuerza iónica de 0,3 M. Estas propiedades también se estudiaron en presencia de metales pesados, y para ello, a los medios utilizados se les añadió el metal correspondiente a partir de las soluciones stock descritas en el apartado anterior, hasta llegar a 1 mM para As, Co, Cu, Ni, Pb, Zn y a 0,25 mM para el Cd. La producción de auxinas y la fijación de nitrógeno no se pudieron realizar en presencia de Pb debido a que la solución stock lleva nitrógeno y daría un falso positivo en la fijación de nitrógeno y, en el caso de las auxinas, el Pb precipitaba en presencia del reactivo de Salkowski.

12.1. Producción de IAA.

Para la producción de IAA, las bacterias se sembraron en 4 ml de NB (Biolife) con L-triptófano (añadir 100 mg/l) durante 72 horas en agitación continua a 28 °C. Pasado este tiempo de incubación, se centrifugaron 1,5 ml de los cultivos durante 5 minutos a 13000 rpm y 1 ml del sobrenadante formado se transfirió a un tubo de cristal al que, posteriormente, se le añadió 4 ml del reactivo de Salkowski. Las mezclas se agitaron e incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. La aparición de un color rojo indica que la prueba es positiva (Figura 14A). Ese cambio de coloración se cuantificó en un espectrofotómetro (Lambda25; PerkinElmer) a 535 nm de longitud de onda, utilizando como blanco la mezcla del medio NB con el

reactivo de Salkowski. Se registraron las absorbancias de las muestras y se calculó la producción de IAA usando la fórmula deducida a partir de una curva patrón.

La curva patrón se realizó con IAA (200 mg/l) como se muestra en la Tabla 1. Después de incubar 20 minutos, se midieron las absorbancias de las distintas concentraciones de IAA y con los datos se creó una recta de regresión y su respectiva fórmula. Se utilizaron controles positivos y negativos. El control negativo fue *Bacillus subterraneus* SMT46 (Mesa *et al.*, 2015a) y el positivo fue *Pantoea agglomerans* RSO6 (Paredes-Páliz *et al.*, 2016a).

Tabla 1. Datos para realizar la curva patrón de la producción de IAA.

	Patrones (mg/l)									
	200	150	100	75	50	20	10	5	2	0
Volumen de IAA (200 mg/l) (ml)	1	0,75	0,5	0,375	0,25	0,1	0,05	0,025	0,01	0
Volumen de NB (ml)	0	0,25	0,5	0,625	0,75	0,9	0,95	0,975	0,99	1
Volumen de reactivo Salkowski (ml)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

NB: 5 g peptona; 3 g de extracto de carne y agua destilada hasta completar 1 litro. Se esteriliza en autoclave 20 min a 121 °C y 1 atm de sobrepresión.

Reactivo de Salkowski: 250 ml de agua destilada; 7,5 ml de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,5 M y 150 ml de H_2SO_4 (Patten y Glick, 2002).

12.2. Producción de sideróforos.

Para evaluar la producción de sideróforos, se hicieron cultivos líquidos de las bacterias en 3 ml de TSB 0,3 M y se incubaron 24 horas a 28 °C en agitación continua. Después de la incubación, se depositaron 100 µl de cada cultivo en un pocillo en placas con medio CAS. Estas placas se incubaron durante 7 días a 28 °C y la aparición de un halo de color naranja alrededor del pocillo indicó que la bacteria producía sideróforos (Figura 14B). El diámetro de los halos se midió en mm. Se utilizó un control negativo (*B. subterraneus* SMT46) y un control positivo (*Salinicola peritrichatus* SMJ30 (Mesa *et al.*, 2015b)).

CAS (cromo-azurol-S): Este medio se preparó mezclando 4 soluciones: (A) 10 ml de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 1 M (en 10 mM de HCl); 50 ml de solución acuosa CAS (1,21 mg/l) y 40 ml de una solución acuosa de CTAB (1,82 mg/l). Se esteriliza en autoclave 20 min a 121 °C y 1 atm de sobrepresión; (B) 0,3 g de KH_2PO_4 ; 0,5 g de NaCl; 1 g de NH_4Cl ; 30,24 g de PIPES; 15 g de agar y 800 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 6,8 y esterilizar en autoclave 20 min a 121 °C y 1 atm de sobrepresión; (C) 2 g de glucosa; 2 g de manitol; 493 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 11 mg de CaCl_2 ; 1,17 ml de MnSO_4 0,1% (p/v); 1,4 ml de H_3BO_3 0,1% (p/v); 40 µl de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,1% (p/v); 1,2 ml de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,1% (p/v); 1 ml de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,1% (p/v) y agua destilada hasta 70 ml. Se esteriliza en autoclave durante 20 min a 121 °C y 1 atm de sobrepresión; (D) 3 g de casaminoácidos y 30 ml de agua destilada. Filtrar usando una jeringuilla con un filtro de 0,45 µm de diámetro de poro. A la solución B aún caliente y en agitación, se le añadió 70 ml de la solución C, 30 ml de la solución D y 100 ml de la solución A en la campana de flujo laminar (Alexander y Zureber, 1991). El medio se vertió en placas de Petri que tenían en la base anillos de metal estériles para formar los pocillos.

12.3. Solubilización de fosfato.

Esta prueba se realizó de forma similar a la anterior. Se prepararon placas con medio NBRIP en las que se indujo la formación de pocillos como en el caso anterior. A cada pocillo se le añadió 100 µl de los cultivos y se incubaron las placas durante 7 días a 28 °C. Las bacterias capaces de solubilizar fosfatos presentaron un halo transparente alrededor del pocillo donde crecieron (Figura 14C). Se midió el diámetro de los halos (mm). Se utilizó un control negativo (*B. subterraneus* SMT46) y un control positivo (*S. peritrichatus* SMJ30).

NBRIP: 10 g de glucosa; 5 g de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; 5 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; 0,25 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,2 g de KCl; 0,1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 16 g de agar y agua destilada hasta completar 1 litro. Ajustar el pH a 7 y esterilizar en autoclave 20 min a 121 °C y 1 atm de sobrepresión. El medio se vertió en placas de Petri que tenían en la base anillos de metal estériles para formar los pocillos (Pikovskaya, 1948).

12.4. Fijación de nitrógeno.

Para la fijación de nitrógeno, las bacterias se sembraron en placas con el medio NFB y se incubaron durante 7 días a 28 °C. La presencia de crecimiento pasado este tiempo indicó que la bacteria podía fijar nitrógeno. Se usaron al mismo tiempo controles negativos y positivos. Se utilizaron como controles la cepa *B. subterraneus* SMT46 (negativo) y la cepa *B. aryabhatai* SMT50 (positivo).

NFB: 5 g de ácido málico; 480 mg de KH_2PO_4 ; 160 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 80 mg de NaCl; 212 µl de CaCl_2 7,5% (p/v); 8 ml de FeCl_3 % (p/v); 1,3 ml de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,1% (p/v); 240 µl de H_3BO_3 0,1 % (p/v); 0,8 µl de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,1% (p/v); 192 µl de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,1% (p/v); 15 g de agar y agua destilada hasta completar 1 litro. Ajustar el pH a 6,8 y esterilizar en autoclave 20 min a 121 °C y 1 atm de sobrepresión (Ji *et al.*, 2014).

A



B



C

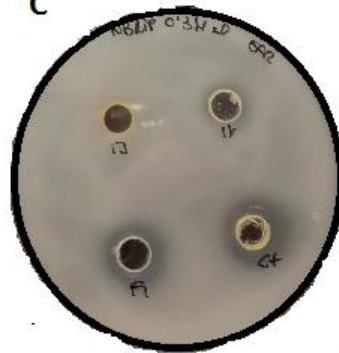


Figura 14. Resultados positivos y negativos de algunas de las propiedades PGP estudiadas. (A) Detección de IAA; (B) placa con medio CAS; (C) placa con medio NBRIP.

12.5. Presencia de actividad ACC desaminasa.

Para detectar la presencia de la actividad ACC desaminasa se utilizó el protocolo descrito por Penrose y Glick, (2002). Se prepararon cultivos líquidos de las bacterias en 3 ml de medio DF suplementado con nitrógeno y se incubaron en agitación constante a 28 °C durante 24 horas. Se transfirieron 60 µl de los cultivos a

tubos con 3 ml de medio DF suplementado con ACC 3 mM, como única fuente de nitrógeno, y se incubaron 24 horas a 28 °C en agitación constante. Las bacterias que crecieron en este medio son las que presentaron la actividad ACC desaminasa. Se utilizó como control negativo la cepa *Pseudomonas putida*. UW4 *acds*⁻ (Li *et al.*, 2000) y como control positivo la cepa *Pseudomonas putida* UW4 (Glick, 1995).

DF: Este medio está formado por tres soluciones. (A) 10 mg de H₃BO₃; 11,19 mg de MnSO₄·H₂O; 124,6 mg de ZnSO₄·7 H₂O; 78,22 mg de CuSO₄·5 H₂O; 20 mg de Na₂MoO₄·2H₂O y 100 ml de agua destilada. Guardar a -20 °C; (B) 100 g de FeSO₄·7 H₂O y 10 ml de agua destilada. Guardar a -20 °C; (C) 4 g de KH₂PO₄; 6 g de NaH₂PO₄; 0,2 g de MgSO₄·7 H₂O; 2 g de glucosa; 2 g de ácido glucónico; 2 g de ácido cítrico y agua destilada hasta completar un litro. A la solución C se le añade 0,1 ml de la solución A y 0,1 ml de la solución B. Ajustar el pH a 7,2 y esterilizar en autoclave 20 min a 121 °C y 1 atm de sobrepresión. Cuando se suplementa con nitrógeno, a la solución C se le añade 2 g de (NH₄)₂SO₄. Cuando se suplementa con ACC 3 mM, se le añade al medio completo, después de ser autoclavado, 6 ml/l de ACC 0,5 M filtrado.

12.6. Formación de biopelículas.

Para ver si las bacterias eran capaces de formar biopelículas se siguió la metodología descrita en del Castillo *et al.* (2012). Se preparó un cultivo líquido de las bacterias en 3 ml de TSB 0,3 M y se incubó a 28 °C durante 24 horas en agitación constante. A continuación, se añadieron 20 µl de los cultivos crecidos en cada pocillo de una placa de microtitulación, de forma que hubiera 4 réplicas de cada bacteria. Como control negativo se utilizaron el medio TSB sin inocular y un cultivo con la cepa *B. subterraneus* SMT46, que no formaba biopelículas, y como control positivo se utilizó la cepa *Bacillus methylophilus* SMT38 (Mesa *et al.*, 2015a), capaz de formar biopelículas. Las placas se incubaron a 28 °C durante 4 días. Pasado este tiempo, los pocillos se lavaron con agua destilada 5 veces, se tiñeron con 200 µl de cristal violeta al 0,01% durante 20 minutos y se lavaron de nuevo 3

veces con la misma cantidad de agua destilada. Después, se añadieron 100 µl de ácido acético al 33% disuelto en etanol al 95% y se midió la absorbancia de los pocillos a 570 nm/595 nm en un lector de microplacas ASYS UVM-340. Con los resultados obtenidos se calculó la media de las 4 réplicas y se compararon con los controles.

13. Selección de consorcios bacterianos.

Para la formación de los consorcios, se escogieron las mejores cepas bacterianas considerando la resistencia a los metales y/o sal, la presencia de propiedades PGP y las actividades enzimáticas. Se formaron tres consorcios diferentes: CE (consorcio de endofitos de *A. macrostachyum* en las marismas del Odiel), CR (consorcio de rizosféricos de *A. macrostachyum* en las marismas del Odiel) y el consorcio formado por los endofitos de las filosferas de *A. macrostachyum* en Lebrija. Los dos primeros consorcios estaban formados por 4 bacterias cada uno, mientras que el último estuvo formado por 3 bacterias.

Para ver la compatibilidad de crecimiento *in vitro* de las bacterias de los consorcios, las bacterias que constituyen un mismo consorcio se incubaron conjuntamente en un matraz con 50 ml de medio TSB 0,3 M y se incubaron durante 24 horas a 28 °C en agitación continua. Pasada la incubación, se realizaron diluciones seriadas de dichos cultivos y se sembraron las diluciones 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} y 10^{-11} en placas de TSA 0,3 M. Estas placas se incubaron a 28 °C durante 24-48 horas. Después de 48 horas se comprobó que las colonias de todas las bacterias que forman cada consorcio estuvieran presentes en las placas.

14. Inoculación de las semillas de *A. macrostachyum*.

14.1. Preparación de los inóculos bacterianos.

Para poder inocular tanto las semillas como las plantas de *A. macrostachyum*, las cepas seleccionadas se incubaron por separado en 50 ml de TSB 0,3 M durante 18-24 horas a 28 °C en agitación continua hasta alcanzar la concentración de 10⁸ células/ml. Para ello, se midió la densidad óptica de una muestra de cada cultivo con el espectrofotómetro a 600 nm y se comprobó que la densidad fuera alrededor de 0,9-1,0. Después, los cultivos se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 minutos. Los sedimentos se lavaron con 50 ml de solución salina estéril al 0,9% (p/v) y se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones. El sedimento formado se resuspendió en 5 ml de solución salina estéril al 0,9% (p/v). Los cultivos de las bacterias que formaban el mismo consorcio se mezclaron en un tubo Falcon de 50 ml.

14.2. Germinación de las semillas en presencia de metales.

Las semillas de *A. macrostachyum* se recolectaron en marzo de 2015 de las marismas del Odiel (Huelva, España) (37° 13'N-6° 57'O). Se utilizaron para el experimento 600 semillas y, en primer lugar, se desinfectaron superficialmente. Para ello, se sumergieron en hipoclorito de sodio al 10% (p/v) durante 10 minutos en agitación. Pasado este tiempo, se lavaron 6 veces con agua destilada estéril. Una vez desinfectadas, se preinocularon 200 semillas con el consorcio CE y otras 200 con el consorcio CR. La preinoculación se realizó sumergiendo las semillas en 20 ml del cultivo de las bacterias (que contenía 5 ml de cada bacteria) durante 1 hora en agitación continua. Las 200 semillas restantes fueron utilizadas como control, para lo que se sumergieron durante 1 hora en agitación continua en 20 ml de solución salina estéril al 0,9% (p/v).

Se prepararon 12 placas de agar-agua al 9% (p/v) y otras 12 placas de agar-agua al 9% (p/v) suplementadas con una mezcla de metales pesados, conteniendo 25 μM de cada metal (As, Cu, Pb y Zn). De esta manera, se crearon 6 condiciones de germinación: germinación de las semillas en presencia de metales, inoculadas con el consorcio CE, con el consorcio CR y sin inocular; y germinación en ausencia de metales pesados, inoculadas con el consorcio CE, con el consorcio CR y sin inoculación.

Las semillas se germinaron en estas placas (25 semillas por placa y 4 placas por condición) en una cámara de germinación AGP-700-HR ESP (Radiber, Barcelona, España) durante 21 días en las siguientes condiciones: 10 horas a 20 °C, 50% de humedad y 100% de iluminación (400-700 nm, 35 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$) y 14 horas a 5 °C, 50% de humedad y 0% de iluminación.

La germinación de las semillas se observó cada día durante 3 semanas para poder determinar la cinética de germinación.

14.3. Germinación de las semillas en presencia de sal.

Para este ensayo las semillas se recogieron en marzo de 2015 en Lebrija (Sevilla, España) (36° 54'N-6° 12'E) y se guardaron a 4 °C en oscuridad hasta que se utilizaron. El experimento de germinación comenzó en mayo de 2015. En primer lugar, se esterilizaron superficialmente 600 semillas de la misma manera que se describe en el apartado anterior. A continuación, se preinocularon 300 semillas con el consorcio de bacterias y las otras 300 se utilizaron como control, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior.

Se prepararon 8 placas de agar-agua al 9% (p/v), 8 placas de agar-agua al 9% (p/v) suplementadas con 510 mM de NaCl y otras 8 placas de agar-agua al 9% (p/v) suplementadas con 1030 mM de NaCl. De esta manera, se crearon 6 condiciones

de germinación: germinación de las semillas en ausencia de sal inoculadas con el consorcio y sin inocular; germinación en presencia de 510 mM de NaCl inoculadas con el consorcio y sin inocular; y germinación de semillas en presencia de 1030 mM de NaCl inoculadas con el consorcio y sin inocular.

Las semillas germinaron en estas placas de manera similar a como se describe en el apartado anterior y en las mismas condiciones de crecimiento.

La germinación de las semillas se observó cada día para poder determinar la cinética de germinación.



Figura 15. Semillas germinadas de *A. macrostachyum* en una placa de Petri con agar-agua al 9% (p/v).

15. Ensayo de las plantas en suelos contaminados.

Las semillas germinadas en ausencia de metales (n=30) se traspasaron a macetas individuales con perlita y se mantuvieron en las mismas condiciones que las plántulas del apartado anterior durante 4 meses. Transcurrido este tiempo, las plantas se traspasaron de nuevo a macetas individuales, pero con sedimentos homogenizados de las marismas del Odiel. Las plantas se asignaron de forma aleatoria en 3 bandejas dependiendo del tratamiento de inoculación (sin inocular, inoculadas con el consorcio CE e inoculadas con el consorcio CR) y mantenidas en las mismas condiciones de invernadero durante 4 meses.

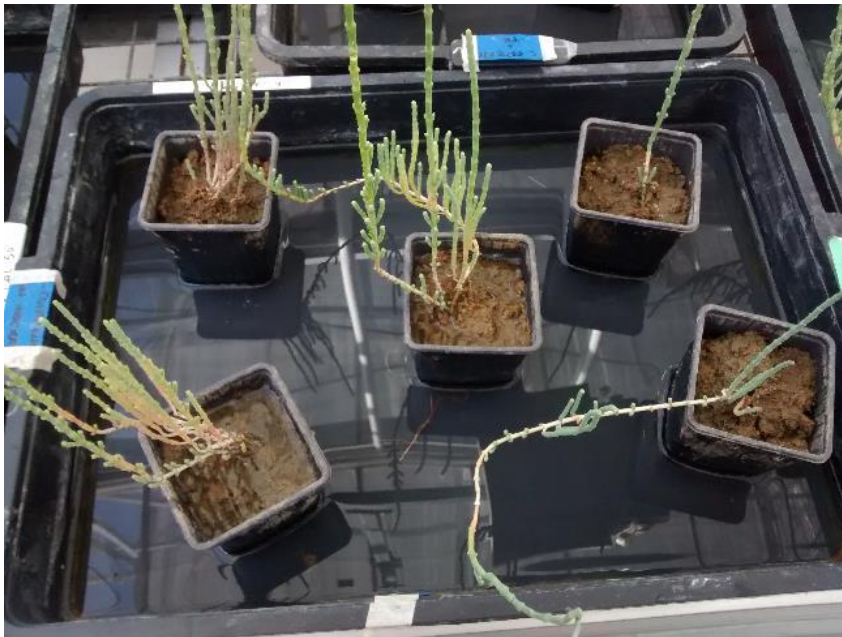


Figura 16. Bandeja del tratamiento sin inocular con macetas de *A. macrostachyum* con suelo de las marismas del Odiel.

Durante el experimento, las plantas se inocularon con los consorcios una vez a la semana durante el primer mes, y luego, dos veces al mes. Esta inoculación se hizo mezclando los inóculos con 500 ml de agua corriente y cada maceta se regó con 50 ml de la mezcla. Las plantas no inoculadas se regaron con 50 ml de agua corriente por maceta.

Las plantas estuvieron inundadas todo el tiempo en un litro de agua corriente, dejando 1 cm de profundidad, y los niveles se monitorizaron durante todo el experimento. Además, cada semana se cambió el agua de las bandejas.

Una vez acabado el experimento, se reaislaron las bacterias de los tejidos de las plantas y de los sedimentos como se describe en el apartado 2, con el fin de observar la presencia de las bacterias utilizadas en los consorcios.

16. Ensayo de las plantas en presencia de sal.

Las semillas germinadas en las placas sin sal se transfirieron a macetas individuales con perlita y separadas en diferentes bandejas según su tratamiento de inoculación. Los semilleros se mantuvieron en una temperatura controlada entre 21 °C y 25 °C, 46-60% de humedad relativa, luz diurna natural de $35 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$ como mínimo y $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$ como luz máxima. Las bandejas siempre estuvieron inundadas por una solución Hoagland al 20%.

En septiembre de 2015, las macetas con plantas de 4 meses se traspasaron a diferentes bandejas, asignadas aleatoriamente, para comenzar con los tratamientos de sal (0, 510 y 1030 mM de NaCl), manteniendo las inoculaciones (n=54, 9 plantas x 3 concentraciones de sal x 2 tratamientos de inoculación).

Para mantener los tratamientos de inoculación, las plantas derivadas de las semillas preinoculadas se reinocularon con 200 μl del inóculo bacteriano cada

semana durante las 3 primeras semanas del experimento, y una vez al mes durante el resto del experimento (3 meses).

Las macetas estuvieron inundadas por la solución Hoagland al 20% suplementadas con la cantidad de NaCl correspondiente según el tratamiento. Así, al principio, se vertieron 3 litros de cada solución (0, 510 y 1030 mM) en cada bandeja, dejando una profundidad de 1 cm, y este nivel se monitorizó y se mantuvo durante todo el experimento. Además, la solución de cada bandeja se cambió cada semana.

Una vez finalizado el experimento, se reisolaron las bacterias de las filosferas de las plantas como se describe en el apartado 2, con el fin de observar la presencia de las bacterias usadas en el consorcio.

Solución Hoagland al 20% (Hoagland y Arnon, 1938): 0,115 g de $\text{NH}_4(\text{H}_2\text{PO}_4)$ 1 M; 0,606 g de KNO_3 1 M; 0,944 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 1 M; 0,492 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 1 M; 1 ml de solución de micronutrientes; 2 ml de solución de hierro y agua destilada hasta completar 1 litro. Esta solución se diluyó en agua destilada al 20%. La solución de micronutrientes consta de 2,86 g de H_3BO_3 ; 0,18 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$; 0,22 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,08 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$; 0,02 g de $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y agua destilada hasta completar 1 litro. La solución de hierro es 5 mg de quelato y agua destilada hasta completar 1 litro.

17. Análisis del crecimiento.

Se utilizaron 3 plantas al principio de los experimentos para poder estimar la biomasa seca inicial que tenían las plantas antes de los tratamientos. Al final de los experimentos, se cosecharon 7 plantas de cada tratamiento para obtener la masa seca final. Para ello, se separaron las raíces y la parte aérea de las plantas y se secaron a 60 °C durante 48 horas y luego se pesaron en una balanza. La tasa de

crecimiento relativo (RGR) de las plantas completas se calculó usando la siguiente fórmula con la media de los pesos obtenidos:

$$RGR = (\ln B_f - \ln B_i) \cdot D^{-1} \text{ (g g}^{-1}\text{día}^{-1}\text{)}$$

donde B_f = la masa seca final, B_i = masa seca inicial y D = la duración del experimento (días).

18. Concentración de iones en los tejidos de las plantas.

Al final de los experimentos, los tallos y las raíces de 7 plantas de cada tratamiento se lavaron cuidadosamente con agua destilada antes de los análisis y se secaron a 60 °C durante 48 horas. Luego, las muestras secas se molieron y se enviaron al Centro de Edafología y Biología aplicada del Segura-CSIC (Murcia, España) para medir la concentración total de As, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn y Na por ICP-OES, mediante el servicio de ionómica.

19. Intercambio de gases y análisis de fluorescencia de la clorofila.

Las medidas de intercambio de gas instantáneo se tomaron de ramas primarias seleccionadas aleatoriamente de cada planta en los diferentes tratamientos. Las medidas se hicieron usando un analizador de gas infrarrojo (IRGA) en un sistema abierto (LI-6400XT, LI-COR Inc., Nev., EEUU) equipado con una cámara de luz para la hoja (Li-6400-02B, Li-Cor Inc.) para obtener la tasa fotosintética neta (A_N), la conductancia estomática (g_s) y la concentración intracelular de CO_2 (C_i).

Las medidas se realizaron entre las 10 de la mañana y las 2 de la tarde, bajo una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (con un 15% de luz azul para maximizar la apertura estomática), un déficit de presión de vapor de 2-3 kPa, una temperatura de alrededor de 25 °C y un ambiente de concentración

de CO₂ (C_a) de 400 μmol·mol⁻¹ de aire y, antes de cada medida, se permitió que el intercambio de gases se equilibrara (120 s). El área fotosintética usada en cada medida fue aproximadamente como media área de las ramas cilíndricas, ya que solo la mitad de arriba recibió iluminación unilateral en la cámara de hojas (Redondo-Gómez *et al.*, 2010b). Para saber el área fotosintética, se midió el ancho de cada rama medida.

En paralelo al análisis del intercambio de gases, la fluorescencia de la clorofila se midió en ramas primarias aleatorias de todas las plantas de los experimentos, usando un fluorímetro modulado portátil (FMS-2, Hansatech Instrument Ltd., Inglaterra). Los parámetros de fluorescencia adaptados a la oscuridad y a la luz se midieron a medio día (1500 μmol·m⁻²·s⁻¹). Las ramas se adaptaron a la oscuridad durante 30 minutos usando unos clips de hojas diseñados para este propósito. Los niveles mínimos de fluorescencia en el estado de oscuridad adaptada (F₀) se midieron usando un pulso modulado de <0,05 μmol·m⁻²·s⁻¹ durante 1,8 μs. Este pulso es tan pequeño como para inducir los cambios fisiológicos significativos en la planta (Schreiber *et al.*, 1986). Los datos que se almacenaron fueron un promedio tomados en un periodo de 1,6 s. La máxima fluorescencia es este estado (F_m) se midió después de aplicar un pulso luminoso actínico saturante de 15000 μmol·m⁻²·s⁻¹ durante 0,7 s (Bolhàr-Nordenkampf y Öquist, 1993). Los valores de F_m se grabaron como la media más alta de dos puntos consecutivos. Se utilizó la misma rama para medir los parámetros adaptados a la luz. El rendimiento de fluorescencia en estado estacionario (F_s) se almacenó después de adaptar las ramas a un ambiente de luz durante 30 minutos. Se utilizó un pulso luminoso actínico saturante de 15000 μmol·m⁻²·s⁻¹ durante 0,7 s para producir el máximo rendimiento de fluorescencia (F'_m) inhibiendo temporalmente la fotoquímica del fotosistema II (PSII).

Utilizando los parámetros de fluorescencia determinados en estados adaptados a la oscuridad y a la luz, se calculó la máxima eficiencia cuántica de la fotoquímica del PSII ($F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m$) y la eficiencia cuántica del PSII ($\Phi_{PSII} = (F'_m - F_s) / F'_m$; (Genty *et al.*, 1989)).

20. Análisis de enzimas antioxidantes.

Para estimar el efecto de la presencia de metales pesados sobre el sistema antioxidante, se determinaron las actividades enzimáticas en las plantas cultivadas en sedimentos contaminados.

Para este análisis, se recogieron 500 mg de los tejidos frescos de los tallos y de las raíces de plantas seleccionadas aleatoriamente de cada tratamiento al final del experimento en tubos Falcon, y se introdujeron en un tanque con nitrógeno líquido al momento de cortarlos. Después de recoger todas las muestras, estas se mantuvieron a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su utilización.

En primer lugar, se homogeneizaron las muestras en 8 ml de tampón de extracción frío con un homogenizador y se centrifugaron a 9000 rpm durante 20 minutos a $4\text{ }^\circ\text{C}$. El sobrenadante se repartió en tubos eppendorf enfriados previamente y se guardaron a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso. Se utilizó un tubo eppendorf para cada enzima que se midió. Las actividades enzimáticas obtenidas se expresaron como unidades (U) por μg de proteína y se hicieron tres réplicas para cada actividad enzimática.

Para conocer la cantidad de proteínas presentes en las muestras, se mezclaron $750\text{ }\mu\text{l}$ de tampón de extracción con $50\text{ }\mu\text{l}$ del extracto vegetal y $200\text{ }\mu\text{l}$ de reactivo de Bradford (Sigma Aldrich) y se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 5 minutos. Al mismo tiempo se mezclaron $800\text{ }\mu\text{l}$ de tampón de extracción con $200\text{ }\mu\text{l}$ de Bradford para obtener el blanco y también se incubó

durante 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, las muestras se midieron en el espectrofotómetro a 595 nm. Las medidas se realizaron por triplicado y la cantidad de proteínas se calculó usando una fórmula creada a partir de una curva patrón.

La curva patrón se realizó creando 10 concentraciones diferentes de la proteína albúmina de suero bovino (BSA) (Tabla 2), y mezclando 50 μl de cada concentración conocida con 750 μl de tampón de extracción y 200 μl de reactivo de Bradford (Bradford, 1976). La mezcla se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se midió en el espectrofotómetro y con los datos se creó una recta de regresión y su fórmula correspondiente.

Tabla 2. Datos para crear las diferentes concentraciones de BSA usadas para construir una curva patrón de proteínas.

	Concentración de BSA (mg/ml)									
	0	0,025	0,05	0,075	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Volumen de BSA (1 mg/ml) (μl)	0	1,25	2,5	3,75	3,75	5	10	20	40	50
Volumen de tampón de extracción (μl)	50	50	50	50	45	40	30	20	10	0

Tampón de extracción (fosfato 50 mM): 1,073 g de fosfato de sodio monohidratado; 10,13 g de fosfato disódico heptahidratado; 0,034 g de Na-EDTA y agua destilada hasta completar 1 litro. Ajustar el pH a 7,6. Conservar a 4 °C.

20.1. Ensayo de la actividad catalasa.

Para determinar la actividad catalasa en las muestras se midió la desaparición de H_2O_2 viendo la absorbancia a 240 nm, utilizando el programa

“plantcat” en el espectrofotómetro y, para ello, hay que hacer un ensayo de autooxidación. Se colocaron en el espectrofotómetro dos cubetas de cuarzo con 1 ml de tampón de extracción para estimar el cero en la medida. Posteriormente, se retiró la cubeta de la primera posición y se adicionaron 990 μl de tampón de extracción para obtener el blanco, añadiéndose posteriormente 10 μl de H_2O_2 al 15% (v/v) y midiendo la absorbancia a 240 nm durante 120 segundos.

Una vez analizada la autooxidación, se pasó a hacer el ensayo enzimático. Se colocaron dos cubetas de cuarzo con una mezcla de 900 μl de tampón de extracción y 100 μl del extracto vegetal para estimar el cero en la medida. A continuación, se retiró la cubeta de la primera posición y se añadieron 890 μl de tampón de extracción y 100 μl de extracto vegetal para obtener el blanco. Posteriormente, se le añadió 10 μl de H_2O_2 al 15% (v/v) y se midió la absorbancia a 240 nm durante 120 segundos.

Con los datos obtenidos se construyeron gráficas y los valores correspondientes a la pendiente se extrapolaron, para expresar los datos en unidades por μg de proteína, a las siguientes fórmulas:

$$AOX = ((A_f - A_i) / \epsilon) / t$$

$$\text{Actividad (U)} = [((A_f - A_i) / \epsilon) - AOX] / t$$

$$\text{Actividad (U)} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{ de proteína} = U \cdot \text{min}^{-1} / (\mu\text{g de proteína} \cdot v)$$

donde AOX= autooxidación, A_i = absorbancia inicial, A_f = absorbancia final, $\epsilon=39,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, t= tiempo transcurrido (min) entre las dos absorbancias, y v=volumen de muestra (ml).

NOTA: El H_2O_2 y las muestras tienen que estar en hielo durante todo el proceso de medida.

20.2. Ensayo de la actividad ascorbato peroxidasa.

Para medir esta actividad se utilizó el programa “plantpx”, en el que se midió la oxidación del ascorbato a 290 nm. Se colocaron dos cubetas de cuarzo con una mezcla de 897 μl de tampón de ensayo, 100 μl del extracto vegetal y 2,7 μl de H_2O_2 2 mM para estimar el cero en la medida. Luego se retiró la cubeta de la primera posición y se le añadieron 895 μl de tampón de ensayo, 100 μl de extracto vegetal y 2,72 μl de H_2O_2 2 mM, y se estableció el blanco. Luego, se le añadió 2,5 μl de ascorbato 0,1 M y se midió la absorbancia a 290 nm durante 120 segundos.

Con los datos obtenidos se construyeron gráficas y los valores correspondientes a la pendiente se extrapolaron, para expresar los datos en unidades por μg de proteína, a la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad (U)} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{ de proteína} = [(A_f - A_i) / t] / (\mu\text{g de proteína} \cdot v)$$

donde A_i = absorbancia inicial, A_f = absorbancia final, t = tiempo transcurrido (min) entre las dos absorbancias, y v =volumen de muestra (ml).

NOTA: El ascorbato debe estar en hielo y protegido de la luz y el H_2O_2 también tiene que estar en hielo, al igual que las muestras.

Tampón de ensayo (fosfato 50 mM): 2,918 g de fosfato de sodio monohidratado; 7,733 g de fosfato disódico heptahidratado y agua destilada hasta completar 1 litro. Ajustar el pH a 7. Conservar a 4 °C.

20.3. Ensayo de la actividad superóxido dismutasa.

Para determinar la actividad superóxido dismutasa, se utilizó el programa “plantsod” en el espectrofotómetro, que mide la disminución de pirogalol a 325 nm. Para estimar esta actividad también hizo falta medir la autooxidación. Para

ello, se pusieron en el espectrofotómetro dos cubetas de cuarzo con 360 μl de agua ultra pura y 640 μl de tampón de ensayo para estimar el cero en la medida. A continuación, se retiró la cubeta de la primera posición y se le añadieron 360 μl de agua ultra pura y 560 μl tampón de ensayo para obtener el blanco y luego se le añadió 80 μl de pirogalol 3 mM y se midió la absorbancia a 325 nm durante 120 segundos.

Una vez realizada la autooxidación, se pasó a hacer el ensayo enzimático. Se pusieron en el espectrofotómetro dos cubetas de cuarzo con 360 μl de agua ultra pura, 630 μl de tampón de ensayo y 10 μl del extracto vegetal para estimar el cero. A continuación, se retiró la cubeta de la primera posición y se le añadieron 360 μl de agua ultra pura, 550 μl tampón de ensayo y 10 μl del extracto vegetal para obtener el blanco y luego se le añadió 80 μl de pirogalol 3 mM y se midió la absorbancia a 325 nm durante 120 segundos.

Con los datos obtenidos se construyeron gráficas y los valores correspondientes a la pendiente se extrapolaron, para expresar los datos en unidades por μg de proteína, a la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad (U)} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{ de proteína} = [\text{pendiente} / (\text{pendiente AOX} \cdot 0,5)] / (\mu\text{g de proteína} \cdot v)$$

donde AOX= autooxidación y v=volumen de muestra (ml).

NOTA: El pirogalol tiene que estar en hielo, al igual que las muestras.

20.4. Ensayo de la actividad guaiacol peroxidasa.

Para medir la actividad guaiacol peroxidasa se utilizó el programa “plantgpx”, que mide la formación de guaiacol oxidado a 470 nm. En primer lugar, se prepararon tubos de ensayo con la solución A (5,9 ml de tampón de ensayo, 100 μl

de extracto vegetal y 2 ml de H₂O₂ 50 mM). Se colocaron dos cubetas de cuarzo con una mezcla de 1 ml de la solución A para estimar el cero. Luego se retiró la cubeta de la primera posición y se le añadieron 800 µl de solución A y se obtuvo el blanco. Luego se le adicionó 200 µl de guaiacol 20 mM y se midió la absorbancia a 470 nm durante 120 segundos.

Con los datos obtenidos se construyeron gráficas y los valores correspondientes a la pendiente se extrapolaron, para expresar los datos en unidades por µg de proteína, a la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad (U)} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{ de proteína} = [(A_f - A_i) / t] / (\mu\text{g de proteína} \cdot v)$$

donde A_i= absorbancia inicial, A_f= absorbancia final, t= tiempo transcurrido (min) entre las dos absorbancias, y v=volumen de muestra (ml).

NOTA: El guaiacol y el H₂O₂ tienen que estar en hielo, al igual que las muestras.

21. Análisis estadísticos.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el programa “Statistica” versión 6.0 (Statsoft Inc.). Las comparaciones entre las medias en los diferentes tratamientos al final de los experimentos se hicieron usando el ANOVA de una variable (F-test) para los experimentos de los metales y el ANOVA de dos variables (F-test) para la salinidad. Los datos se probaron primero para determinar su normalidad con el test de Kolmogorov-Smirnov y para la homogeneidad de la varianza se usó el test Brown-Forsythe. A los resultados significativos de los test se les realizó el test de Tukey, para la identificación de contrastes importantes. Las diferencias entre la concentración de iones en tallos y raíces también se compararon por el test de Student (t-test).



CAPÍTULO 1

Arthrocnemum macrostachyum como
herramienta de fitorremediación de metales pesados

OBJETIVOS

El objetivo principal que se persigue en este Capítulo es aislar bacterias del microbioma de plantas de *Arthrocnemum macrostachyum* crecidas en sedimentos contaminados con metales pesados de las marismas del Odiel y estudiar el efecto de las mismas en la capacidad fitoestabilizadora de la planta. Para ello, se han abordado los siguientes objetivos específicos:

- Aislar bacterias rizosféricas y endofíticas de plantas de *A. macrostachyum* crecidas en las marismas del Odiel.
- Caracterizar las bacterias aisladas: resistencia a metales pesados y a sal, presencia de propiedades que promuevan el crecimiento de la planta (PGP) y efectos de los metales pesados sobre las propiedades PGP presentes en las bacterias.
- Seleccionar las mejores bacterias aisladas en base a sus propiedades PGP y su resistencia a metales, tanto de la rizosfera como del interior de la planta, para formar consorcios bacterianos.
- Observar el efecto de los consorcios bacterianos sobre la germinación de las semillas de *A. macrostachyum*, en presencia y ausencia de metales, y sobre el desarrollo de plantas de *A. macrostachyum* cultivadas en suelo contaminado de las marismas del Odiel en condiciones de invernadero.

RESULTADOS

1. Aislamiento e identificación de las bacterias cultivables de la rizosfera y los tejidos de *A. macrostachyum*.

Las propiedades fisicoquímicas de las muestras de suelo procedentes de las marismas del Odiel se muestran en la Tabla 3. Se midieron también la concentración de los metales/metaloideos en los tejidos de *A. macrostachyum* y en el suelo rizosférico recogido del estuario del río Odiel (Tabla 3). Los datos del suelo fueron similares a los publicados por Mesa *et al.* (2015a).

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas del suelo y concentraciones finales de arsénico (As), cadmio (Cd), cobalto (Co), cobre (Cu), níquel (Ni), plomo (Pb) y zinc (Zn) en el suelo y en las raíces y tallos de las plantas de *A. macrostachyum* de las marismas del Odiel.

Propiedades fisicoquímicas							
	Textura (%)	Conductividad (mS·cm ⁻¹)	Potencial redox (mV)	pH			
Suelo	71/20/9	11,2 ± 0,4	135 ± 13	6,8 ± 0,2			
Concentración de metales pesados (mg·kg ⁻¹)							
	As	Cd	Co	Cu	Ni	Pb	Zn
Suelo	253,8 ± 5,1	2,4 ± 0,1	9,5 ± 0,2	856,1 ± 17,1	18,0 ± 0,4	319,6 ± 6,4	1516,3 ± 30,03
Raíces	52,8 ± 1,1	0,3 ± 0,0	1,5 ± 0,0	117,9 ± 2,4	16,8 ± 0,3	29,5 ± 0,6	137 ± 2,8
Tallos	7,2 ± 0,5	<0,1	<0,5	32,1 ± 0,6	1,9 ± 0,0	5,0 ± 0,0	61,1 ± 1,2
Los valores son la media ± S.E. de cinco réplicas. Textura (porcentajes de limo/arcilla/arena).							

De acuerdo con la morfología de las colonias y la tinción de Gram, se aislaron 48 bacterias cultivables diferentes de la parte aérea, raíces y rizosfera de plantas de *A. macrostachyum* crecidas en las marismas del río Odiel (Tabla 4). Once cepas bacterianas fueron endofitos aislados de la filosfera (parte aérea de las plantas; nombradas como EAod) y 19 de las raíces de las mismas plantas (nombradas como EAR), mientras que 18 aislamientos diferentes se recuperaron de sus rizosferas (nombradas como RA). Casi el 50% de las especies aisladas de la rizosfera se recuperaron de las raíces como endofitos.

Los bacilos Gram negativos representaron el 75% de los aislados, mientras que el 21% fueron bacilos Gram positivos y el 4% cocos Gram positivos. Cabe destacar que la mayoría de las bacterias Gram positivas fueron aisladas de la rizosfera de las plantas. Las secuencias del gen del ARNr 16S apuntaban a los géneros *Bacillus*, *Pseudoalteromonas*, *Vibrio*, *Staphylococcus*, *Kushneria* y *Halomonas* como los más abundantes (Tabla 4), pero el género *Kushneria* estuvo solo presente en la filosfera. Se obtuvieron las secuencias parciales del gen del ARNr 16S de algunos aislados y las secuencias casi completas de las cepas seleccionadas para los experimentos de inoculación de semillas y plantas (Tabla 4).

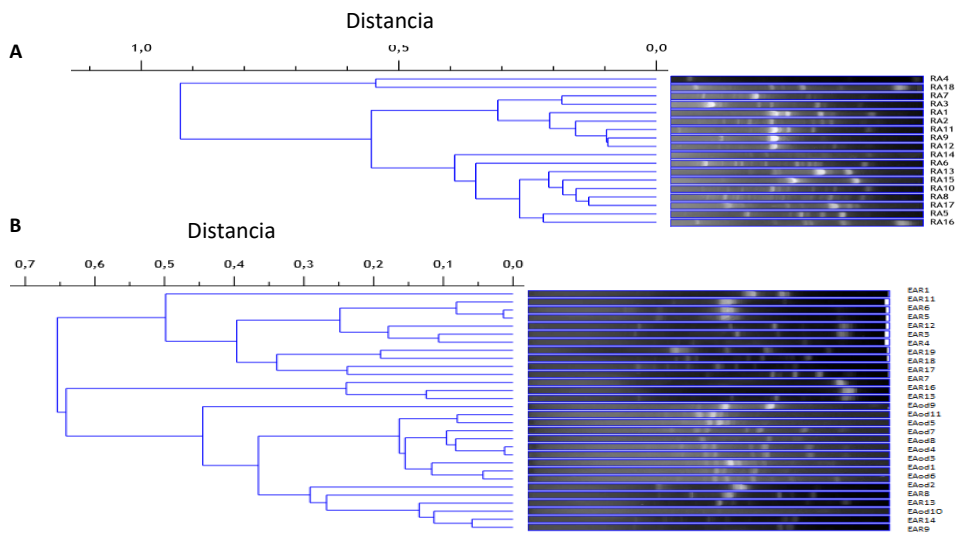


Figura 17. Patrones de la Box-PCR comparados usando un dendrograma, en las bacterias rizosféricas (A) y endofíticas (B), aisladas de plantas de *A. macrostachyum* crecidas en las marismas del Odiel. Las escalas encima de cada dendrograma representan la similitud.

Tabla 4. Especies cercanas a las cepas aisladas de *A. macrostachyum* en base a la secuencia parcial del gen ARNr 16S. En negrita: cepas seleccionadas para los ensayos en plantas.

Cepa	Nº de acceso	Especies relacionadas	Fragmento secuenciado (pb)	Identidad (%)
EAod1	KU320854	<i>Halomonas songnenensis</i>	1186	75,76
EAod2	KU320855	<i>Halomonas arcis</i>	1402	96,43
EAod3	KU320856	<i>Kushneria marisflavi</i>	1467	98,63
EAod4	KU320857	<i>Kushneria marisflavi</i>	1413	98,08
EAod5	KU320858	<i>Halomonas arcis</i>	1404	95,50
EAod6	KU320859	<i>Halomonas songnenensis</i>	1151	85,39
EAod7	KU320860	<i>Kushneria marisflavi</i>	1418	97,23
EAod8	KU320861	<i>Kushneria indalinina</i>	1423	98,58
EAod9	KU320862	<i>Vibrio sagamiensis</i>	1410	95,14
EAod10	KX446974	<i>Micrococcus aloeverae</i>	1421	97,97
EAod11	KU320864	<i>Halomonas arcis</i>	1403	97,50
EAR1	KU320865	<i>Vibrio kanaloae</i>	1253	96,93
EAR2	KU320866	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1110	98,10
EAR3	KU320867	<i>Pseudoalteromonas undina</i>	1327	96,64
EAR4	KU320868	<i>Pseudoalteromonas prydzensis</i>	1187	98,12
EAR5	KU320869	<i>Pseudoalteromonas agarivorans</i>	1158	88,16
EAR6	KU320870	<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	1030	83,67
EAR7	KU320871	<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	1136	84,24
EAR8	KU320872	<i>Bacillus vietnamensis</i>	1374	97,80
EAR9	KU320873	<i>Halomonas zincidurans</i>	1364	94,49
EAR10	KU320874	<i>Alteromonas halophila</i>	1367	94,72
EAR11	KU320875	<i>Pseudoalteromonas prydzensis</i>	1131	96,55
EAR12	KU320876	<i>Pseudoalteromonas agarivorans</i>	947	98,40
EAR13	KU320877	<i>Pseudoalteromonas agarivorans</i>	1076	98,23
EAR14	KU320878	<i>Halomonas zincidurans</i>	1085	97,51
EAR15	KU320879	<i>Bacillus hwajinpoensis</i>	1385	97,07
EAR16	KU320880	<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	877	83,47
EAR17	KU320881	<i>Pseudoalteromonas espejiana</i>	1337	95,14
EAR18	KU320882	<i>Halomonas zincidurans</i>	1262	96,59
EAR19	KU320883	<i>Marinobacter nanhaiticus</i>	1358	97,54
RA1	KU588386	<i>Vibrio kanaloae</i>	1425	96,54
RA2	KU588387	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1324	97,86
RA3	KU588388	<i>Acinetobacter ursingii</i>	912	86,70
RA4	KU588389	<i>Pseudoalteromonas undina</i>	1365	98,14
RA5	KU588390	<i>Pseudoalteromonas prydzensis</i>	805	95,30
RA6	KU588391	<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	1129	98,05
RA7	KU588392	<i>Bacillus vietnamensis</i>	976	88,82
RA8	KU588393	<i>Pseudoalteromonas distinct</i>	1366	98,76
RA9	KU588394	<i>Bacillus hwajinpoensis</i>	1148	94,12
RA10	KU588395	<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	957	95,09
RA11	KU588396	<i>Halomonas alkaliantarctica</i>	628	78,12
RA12	KU588397	<i>Bacillus timonensis</i>	1235	91,84
RA13	KU588398	<i>Bacillus cereus</i>	1260	97,21
RA14	KU588399	<i>Bacillus enclensis</i>	1122	79,87
RA15	KU588400	<i>Pseudoalteromonas prydzensis</i>	1389	97,55
RA16	KU5883401	<i>Bacillus anthracis</i>	488	96,61
RA17	KU5883402	<i>Pseudoalteromonas issachenkonii</i>	997	89,90
RA18	KU5883403	<i>Staphylococcus warneri</i>	1428	97,53

La diversidad genética se estudió mediante Box-PCR (Figura 17). Solo las cepas EAod3 y EAod4, relacionadas con especies de *Kushneria marisflavi*, mostraron el mismo perfil de bandas.

Aunque las secuencias del gen del ARNr 16S y los perfiles de la Box-PCR sugieren que varios de los aislados pertenecían a la misma especie, podrían ser consideradas como cepas distintas, ya que mostraron diferentes propiedades y características a lo largo de estos estudios.

No se caracterizaron las cepas RA16 (Tabla 4), RA2, RA13 y EAR2 (datos no mostrados) debido a que las secuencias preliminares del gen del ARNr 16S revelaron una alta identidad con el patógeno *Bacillus anthracis*.

2. Caracterización de las cepas aisladas de *A. macrostachyum*.

2.1. Cribado de las actividades enzimáticas y la movilidad.

Para la caracterización de las bacterias aisladas, se estudió en primer lugar, la presencia de varias actividades enzimáticas, incluyendo proteasa, lipasa, amilasa, ADNasa, celulasa, pectinasa y quitinasa (Tabla 5 y Figura 18).

La mayoría de las cepas presentaron la actividad ADNasa y, en menor medida, la actividad proteasa, mientras que las actividades lipasa y amilasa aparecieron en el 50% de los aislados, aproximadamente.

Se observaron pequeñas diferencias en la presencia de estas actividades entre las bacterias endofitas y las rizosféricas. Por el contrario, fue menos frecuente la presencia de celulasa, pectinasa y quitinasa entre los aislados.

Tabla 5. Actividades enzimáticas mostradas por las cepas aisladas (+: presencia de la actividad; -: ausencia de la actividad). M: movilidad. EAod: endofitos aislados de la filosfera, EAR: endofitos aislados de las raíces, RA: aislados de la rizosfera.

Cepa	proteasa	lipasa	amilasa	ADNasa	celulasa	pectinasa	quitinasa	M
EAod1	-	-	-	+	+	-	-	+
EAod2	+	-	-	-	+	-	-	+
EAod3	+	-	+	+	-	-	-	+
EAod4	+	-	+	+	-	-	-	+
EAod5	+	-	-	+	+	-	-	+
EAod6	-	-	-	+	-	-	-	-
EAod7	-	-	+	+	-	-	-	+
EAod8	-	-	+	+	-	-	-	+
EAod9	+	-	+	+	+	-	-	+
EAod10	+	-	+	-	-	-	-	-
EAod11	+	-	-	+	-	-	-	+
EAR1	+	-	+	+	-	-	+	+
EAR3	+	+	+	+	-	-	-	+
EAR4	+	+	-	+	-	+	+	-
EAR5	+	+	+	+	-	-	+	+
EAR6	+	+	-	+	-	-	+	+
EAR7	+	+	+	+	-	-	+	+
EAR8	+	-	-	+	-	-	-	-
EAR9	-	+	+	+	-	-	-	+
EAR10	+	+	-	+	-	-	-	+
EAR11	+	-	-	+	+	+	+	+
EAR12	+	+	-	+	-	-	-	+
EAR13	+	+	-	+	-	-	-	+
EAR14	-	-	+	-	-	-	-	+
EAR15	+	-	+	+	-	-	-	-
EAR16	+	+	+	+	-	-	-	+
EAR17	+	+	+	+	+	-	-	+
EAR18	-	-	-	-	-	-	-	+
EAR19	+	+	-	+	-	-	+	+
RA1	+	-	+	+	-	-	+	+
RA3	+	+	-	+	-	+	+	-
RA4	+	+	+	+	-	-	-	+
RA5	+	+	+	+	-	+	+	+
RA6	+	+	-	+	-	-	-	-
RA7	+	-	-	+	-	-	-	-
RA8	+	+	+	+	-	-	-	-
RA9	+	-	-	+	-	-	-	-
RA10	+	+	-	+	+	-	-	-
RA11	-	-	+	+	-	-	-	+
RA12	-	-	-	+	-	+	-	+
RA14	+	-	-	+	-	-	-	-
RA15	+	+	+	+	-	+	+	-
RA17	+	+	-	+	-	-	+	-
RA18	-	-	-	-	-	-	-	-

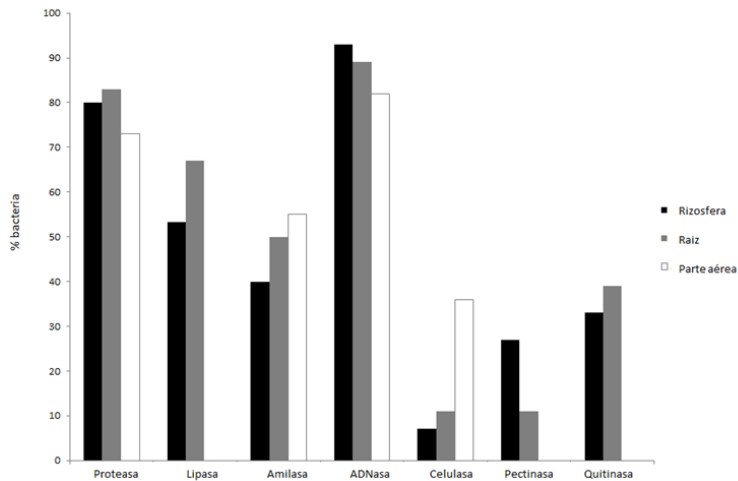


Figura 18. Actividades enzimáticas presentes en las cepas aisladas. Se comparan los porcentajes de cada actividad presente en los grupos de los aislados.

La actividad celulasa apareció de manera más habitual en los endofitos, mientras que un mayor número de cepas mostraron la actividad pectinasa en la rizosfera. Finalmente, el número de bacterias con quitinasa fue similar tanto en las bacterias de la rizosfera como en las aisladas del interior de la planta (Figura 18).

Con respecto a la movilidad, el 83% de los endofitos eran móviles, frente al 33% de las bacterias rizosféricas.

2.2. Resistencia a sal y a metales pesados.

Una característica importante para el uso de estas bacterias en suelos contaminados con metales pesados es la resistencia a estos metales. La mayoría de las bacterias presentaron multiresistencia a varios metales pesados (Tabla 6), creciendo alguna de ellas a concentraciones tan altas como 56 mM de As (EAod10), 23 mM de Ni (EAod7), 21 mM de Co (EAR1 y RA1), 20 mM de Pb (EAod3, 4 y 10), 4,5 mM de Zn (EAR11) o 3 mM de Cd (RA3).

En general, los valores más altos de la resistencia para un determinado metal se encontraron en cepas de endofitos. La abundancia de cepas resistentes a diferentes metales entre los tres grupos de aislados se muestra en la Figura 19A.

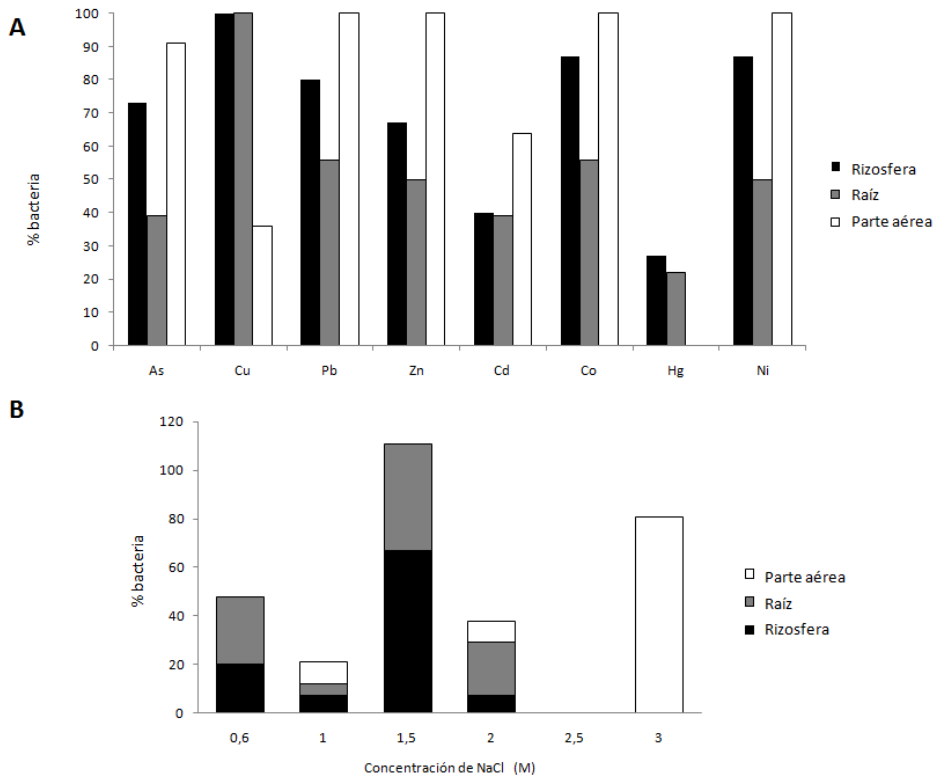


Figura 19. Resistencias de las cepas aisladas a metales pesados (A) y NaCl (B). El porcentaje de bacterias capaces de crecer a concentraciones superiores a 1 mM de As, Cu, Pb, Zn, Co o Ni y superiores a 0,5 mM de Cd o Hg fueron consideradas como resistentes en (A). El porcentaje de bacterias capaces de crecer a cada MTC está representado en (B).

Todos los aislados de las raíces de las plantas y de la rizosfera crecieron en un rango de concentración de Cu de 2-3 mM (Figura 20). Sin embargo, el 64% de los endofitos aislados de la filósfera no crecieron a 0,1 mM de Cu y el 36% de ellos fueron capaces de crecer a la máxima concentración de 1 mM (Figura 20 y Tabla 6).

Tabla 6. Concentraciones máximas tolerables (MTC) para los metales pesados y el NaCl para cada aislado. H cepa halófila (+). EAod: endofitos aislados de la filósfera, EAR: endofitos aislados de las raíces, RA: aislado recuperados de la rizosfera.

Cepa	As (mM)	Cu (mM)	Pb (mM)	Zn (mM)	Cd (mM)	Co (mM)	Hg (mM)	Ni (mM)	NaCl (M)	H
EAod1	2	<0,1	16	1,2	0,8	3	<0,1	8	3	-
EAod2	1,2	<0,1	16	1,2	0,4	5	<0,1	4	3	+
EAod3	2	1	20	1,2	1,3	2	<0,1	2	3	-
EAod4	4	1	20	1,2	1,3	2	<0,1	4	3	-
EAod5	2	<0,1	16	1,2	0,5	3	<0,1	8	3	-
EAod6	2	<0,1	16	1,2	0,5	4	<0,1	4	3	-
EAod7	2	1	16	1,2	1,3	2	<0,1	23	3	-
EAod8	2	<0,1	16	1,2	<0,1	2	<0,1	10	3	-
EAod9	<0,1	<0,1	11	1,2	0,4	2	<0,1	19	3	+
EAod10	56	1	20	2	1,3	11	<0,1	19	1	-
EAod11	2	<0,1	16	1,2	0,3	4	<0,1	8	2	-
EAR1	14	2	8,4	0,3	0,3	21	0,3	0,3	0,6	+
EAR3	<0,1	2	8,4	4	0,3	7,7	<0,1	8,5	1,5	+
EAR4	<0,1	2	0,5	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,6	-
EAR5	13	2	0,5	0,3	0,3	8,7	0,3	0,3	1,5	+
EAR6	<0,1	2	8,2	3,3	0,3	14	0,2	7,5	1,5	-
EAR7	5	2	8,6	1	1,3	7,6	0,6	8,5	1,5	-
EAR8	8	2	9	4	2	8,4	0,6	15	1,5	-
EAR9	0,3	3	0,3	0,3	0,3	0,3	<0,1	0,3	2	+
EAR10	0,3	2	0,3	0,3	0,3	0,3	<0,1	0,3	0,6	+
EAR11	<0,1	2	0,5	4,5	1,9	0,3	0,3	0,3	0,6	-
EAR12	<0,1	2	8,2	4	0,3	14	0,3	8,5	1,5	+
EAR13	<0,1	2	9	4	0,7	18	0,3	7,5	2	+
EAR14	0,3	2	0,3	0,8	2	0,3	0,1	0,3	2	+
EAR15	32	2	8,2	0,9	0,3	8,4	0,6	8,5	1,5	-
EAR16	6	2	8,2	4	1,2	16	0,8	8,5	1	-
EAR17	<0,1	2	0,3	0,3	0,2	0,3	<0,1	0,3	2	-
EAR18	0,3	2	0,5	0,3	2	0,3	<0,1	0,2	1,5	+
EAR19	7	3	9	1	<0,1	0,3	<0,1	7	0,6	+
RA1	0,3	2	8,2	0,3	2,5	21	0,3	7	0,6	+
RA3	12	2	8,2	4	3	11	<0,1	8,5	1,5	+
RA4	6	2	8,2	4	0,1	11	0,4	7,8	0,6	-
RA5	18	2	0,5	4	1,9	0,3	0,8	13	1,5	-
RA6	6	2	8,6	4	0,3	8,7	0,3	7	1,5	-
RA7	20	2	8,2	0,9	0,3	7,7	<0,1	7,8	1,5	-
RA8	16	2	0,5	4	0,1	8,5	0,3	7,8	2	+
RA9	18	2	8,2	3	0,2	7,7	<0,1	7	1,5	-
RA10	<0,1	2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,1	1,5	+
RA11	<0,1	3	8,9	3	0,7	8,5	0,8	9	0,6	-
RA12	12	3	8,2	0,3	1,2	5	0,8	5	1,5	-
RA14	18	3	8,2	3	2,5	7,7	0,6	7,8	1	-
RA15	12	3	8,2	3,3	0,2	7,6	0,2	0,8	1,5	-
RA17	<0,1	2	8,2	4	0,4	16	0,2	7,8	1,5	+
RA18	3	3	11,6	0,8	0,3	7,5	<0,1	15	1,5	-

Las marismas del Odiel están principalmente contaminadas con As, Cu, Pb y Zn (Tabla 3). Aproximadamente el 50% de las bacterias rizosféricas fueron capaces de crecer a concentraciones de As superiores a 10 mM de arsenito, mientras que solo el 10% de los endofitos lo hizo (Figura 19). Por el contrario, el 38% de los endofitos de raíz no crecieron a la mínima concentración de As ensayada (0,1 mM) (Figura 20 y Tabla 6).

El comportamiento de los aislados frente al Pb fue particular. Los endofitos de la filosfera fueron resistentes a altas concentraciones de Pb, en un rango desde 11 a 20 mM (Figura 20) y estos valores fueron siempre mayores que los observados en las cepas aisladas tanto de la raíz como de la rizosfera (Tabla 6). La mayoría de las bacterias rizosféricas y de los endofitos de raíz mostraron una alta resistencia frente al Pb, con una concentración media de 8 mM (Figura 20 y Tabla 6).

La resistencia general frente al Zn estuvo en el rango de 0,3 a 4,5 mM (Tabla 6). Los endofitos aislados de la filosfera y algunos aislados de la raíz crecieron a concentraciones de Zn superiores a 2 mM, mientras que varios endofitos de raíz crecieron a concentraciones entre 3 y 4,5 mM de Zn. La mayoría de las bacterias rizosféricas crecieron a concentraciones entre 3 y 4 mM de Zn (Figura 20 y Tabla 6).

Con respecto a los otros metales probados, los valores más altos de resistencia a Cd y Hg (dos metales con una alta toxicidad) los mostraron las bacterias rizosféricas y los endofitos de raíz. Varias cepas presentaron valores de resistencia entre 1,3 y 3 mM de Cd y de 0,3 hasta 0,8 mM de Hg. Las mayores diferencias entre los grupos bacterianos se observaron para el Hg, ya que los endofitos de la filosfera no crecieron a la mínima concentración probada (0,1 mM) (Figura 19A y Tabla 6). Finalmente, el 70% de las bacterias aisladas, aproximadamente, crecieron en presencia de concentraciones superiores a 2 mM de Ni o Co (Figura 19A), sin diferencias significativas entre las cepas rizosféricas y

endofíticas. Sin embargo, los valores más altos de resistencia al Ni aparecieron en los endofitos aislados de la filosfera de la planta (Tabla 6).

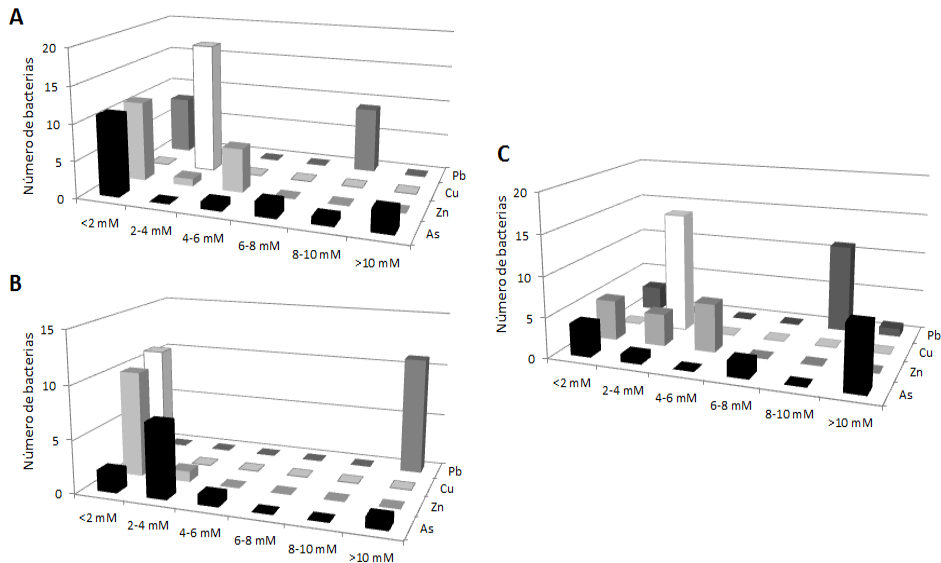


Figura 20. Número de endofitos aislados de la raíz (A), de la parte aérea (B) y número de aislados rizosféricos (C) agrupados de acuerdo al rango de resistencia a As, Cu, Pb o Zn.

En lo que respecta a la resistencia a la sal, la mayoría de las bacterias crecieron a elevadas concentraciones de sales y podrían ser consideradas halotolerantes (Tabla 6). Además, el 36% de las bacterias no crecieron en ausencia de sal, por lo que estas podrían ser consideradas bacterias halófilas (Tabla 6). Los endofitos de la filosfera mostraron los valores más altos de resistencia a la sal, mientras que no se observaron diferencias significativas para esta característica entre las bacterias rizosféricas y los endofitos de raíz (Figura 19B).

3. Cribado para las propiedades PGP *in vitro*.

La presencia de propiedades PGP en los aislados es un aspecto crucial para su uso como inoculantes con propósitos de fitorremediación. Todas las cepas mostraron al menos una propiedad PGP (Figura 21). Una alta proporción de las bacterias (86%) produjo sideróforos, la propiedad PGP más frecuente entre los aislados (Figura 21). El test semicuantitativo reveló que las cepas RA1, EAR1 y EAR8 eran capaces de producir de forma significativa mayores cantidades de sideróforos que el resto de cepas (Tabla 7).

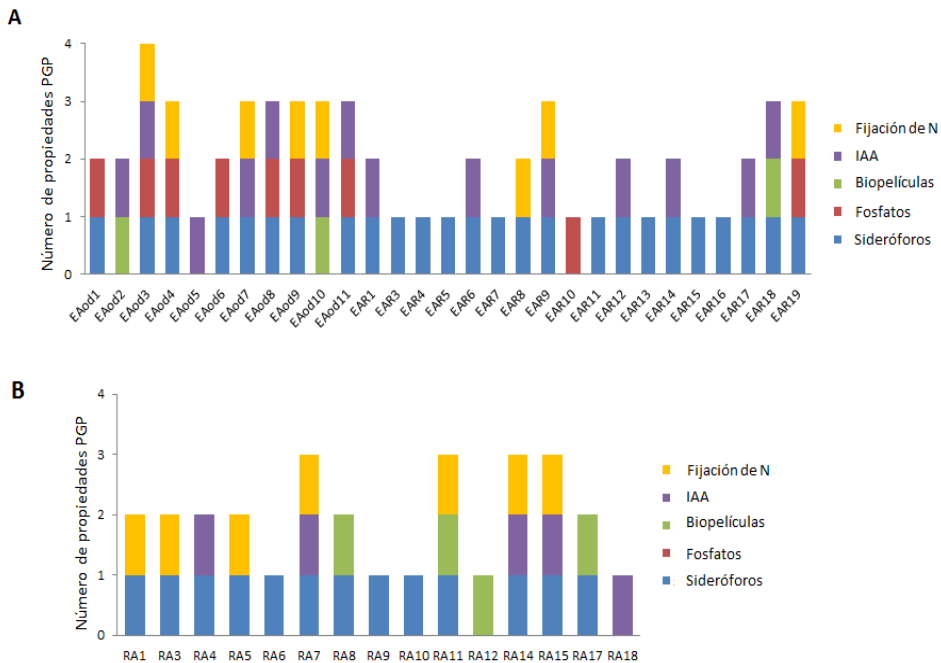


Figura 21. Presencia de propiedades PGP en los endofitos (A) y en las cepas rizosféricas (B). Para la producción de IAA, solo se consideraron aquellas cepas capaces de producir ≥ 1 mg·l⁻¹.

Tabla 7. Propiedades PGP presentes en las cepas aisladas. (+: presencia de la propiedad; -: ausencia de la propiedad; +/-: presencia débil de la propiedad). EAod: endofitos aislados de la filosfera, EAR: endofitos aislados de las raíces, RA: aislados recuperados de la rizosfera.

Cepa	Producción de sideróforos (diámetro del halo mm)	Producción de IAA (mg·l ⁻¹)	Formación de biopelículas	Fijación de nitrógeno	Solubilización de fosfato (diámetro del halo mm)
EAod1	16	0,84	-	-	16
EAod2	-	5,34	+	-	-
EAod3	17	2,18	-	+/-	17
EAod4	15	-	-	+/-	15
EAod5	-	1,29	-	-	-
EAod6	15	0,31	-	-	15
EAod7	22	3,56	-	+/-	-
EAod8	17	2,01	-	-	17
EAod9	16	0,90	-	+	16
EAod10	-	9,05	+	+/-	-
EAod11	16	3,55	-	-	16
EAR1	26	1,80	-	-	-
EAR3	15	0,84	-	-	-
EAR4	14	0,47	-	-	-
EAR5	14	0,42	-	-	-
EAR6	15	1,58	-	-	-
EAR7	15	0,11	-	-	-
EAR8	25	-	-	+	-
EAR9	14	3,59	-	+	-
EAR10	-	0,22	-	-	14
EAR11	14	0,47	-	-	-
EAR12	16	1,11	-	-	-
EAR13	14	0,11	-	-	-
EAR14	16	1,16	-	-	-
EAR15	14	-	-	-	-
EAR16	18	-	-	-	-
EAR17	14	1,68	-	-	-
EAR18	14	2,05	+	-	-
EAR19	13	0,47	-	+	15
RA1	28	0,63	-	+	-
RA3	15	0,92	-	+	-
RA4	15	1,51	-	-	-
RA5	15	-	-	+	-
RA6	15	0,84	-	-	-
RA7	14	1,26	-	+	-
RA8	15	0,65	+/-	-	-
RA9	16	0,87	-	-	-
RA10	16	-	-	-	-
RA11	13	0,21	+/-	+	-
RA12	-	0,53	+	-	-
RA14	12	1,74	-	+	-
RA15	16	1,58	-	+	-
RA17	19	0,90	+	-	-
RA18	-	2,84	-	-	-

Para el IAA, se consideraron solo los valores superiores a $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Tabla 7). EAod10 y EAod2 produjeron las mayores cantidades de IAA, $9,05$ y $5,35 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, respectivamente. En lo relativo a la solubilización de fosfato, el 20% de los aislados mostró esta propiedad (Figura 21), siendo EAod3 y EAod8 las cepas que mostraron la mayor capacidad de solubilización (Tabla 7). Por su parte, sólo el 15% de las bacterias aisladas fue capaz de formar biopelículas (Tabla 7).

Finalmente, se estudió también la presencia de la actividad ACC desaminasa en los aislados, pero ninguna de las cepas mostró esta propiedad.

4. Efecto de los metales pesados en las propiedades PGP *in vitro*.

Con el fin de determinar cómo la presencia de los metales pesados podría afectar a las propiedades PGP mostradas por los diferentes aislados, estos mismos análisis se realizaron en presencia de los metales pesados más abundantes en los suelos de las marismas del Odiel (As, Cu, Pb y Zn), y en presencia de Cd.

En general, hubo un descenso en el número de bacterias con propiedades PGP en presencia de los metales pesados. Sin embargo, el número de bacterias que produjeron IAA y solubilizaron fosfato se incrementó en presencia de As y Cd, respectivamente (Figura 22).

Si bien hubo una reducción en el número de bacterias que producían sideróforos en presencia de los diferentes metales, el Cd fue el elemento que mayor influencia tuvo en esta propiedad (Figura 22). Sin embargo, la cepa RA18 fue capaz de producir sideróforos exclusivamente en presencia de metales pesados (Tabla 8).

El número de aislados que producían IAA disminuyó en presencia de los metales probados, excepto cuando el medio contenía As (Figura 22). En este caso, no solo aumentó el número de productores, sino que también se incrementó la

cantidad de IAA producida (Tabla 9). Una proporción importante de las bacterias rizosféricas, el 73%, produjo más de 2 mg·l⁻¹ y casi el 50% de los endofitos más de 3 mg·l⁻¹. Bacterias como EAod10 produjeron casi cuatro veces más cantidad de la detectada en ausencia de As y EAR11 más de 20 veces (10,27 vs. 0,47 mg·l⁻¹). A pesar de la disminución de la cantidad de bacterias productoras de esta hormona en presencia del resto de metales, algunas de las bacterias fueron capaces de producir altos niveles de IAA (Tabla 9). La producción de IAA se vio particularmente afectada por la presencia de Cu.

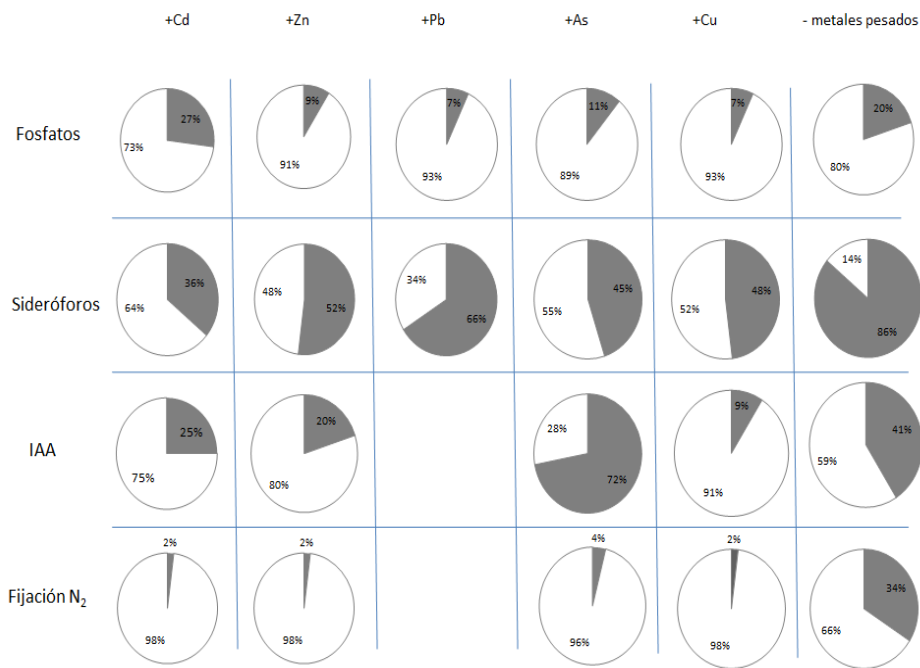


Figura 22. Efectos de los metales pesados en las propiedades PGP. Porcentaje de aislados con las diferentes propiedades PGP en ausencia y presencia de metales. Los medios se suplementaron con 1 mM de As, Cu, Pb o Zn, ó 0,25 mM de Cd. La fijación de N₂ en presencia de plomo no se pudo determinar por utilizar PbNO₃ como sal de Pb. La reducción de IAA en presencia de Pb tampoco se pudo determinar debido a la interferencia de este elemento con el reactivo de Salkovski.

Tabla 8. Propiedades PGP de las bacterias aisladas en presencia de As (1 mM), Cd (0,25 mM), Cu (1 mM), Pb (1 mM) o Zn (1 mM). (+: presencia de la propiedad; -: ausencia de la propiedad) EAod: endofitos aislados de la filosfera, EAR: endofitos aislados de las raíces, RA: aislados recuperados de la rizosfera.

Cepa	Producción de sideróforos					Fijación de N ₂					Solubilización de fosfato				
	As	Cd	Cu	Pb	Zn	As	Cd	Cu	Pb	Zn	As	Cd	Cu	Pb	Zn
EAod3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
EAod4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
EAod7	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
EAod9	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
EAod10	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
EAR1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EAR3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EAR4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EAR5	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EAR6	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EAR7	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
EAR8	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EAR9	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
EAR10	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EAR11	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EAR12	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
EAR13	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EAR14	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EAR15	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EAR16	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EAR17	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EAR18	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EAR19	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RA1	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
RA3	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RA4	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RA5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RA6	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RA7	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RA8	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
RA9	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
RA10	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RA11	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RA15	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
RA17	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RA18	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Tabla 9. Producción de IAA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) por las bacterias aisladas en presencia de metales pesados. EAod: endofitos aislados de la filosfera. (-: ausencia de producción). EAR: endofitos aislados de las raíces, RA: aislados recuperados de la rizosfera.

Cepa	As (1mM)	Cd (0.25mM)	Cu (1mM)	Zn (1mM)
EAod1	-	3,79	-	-
EAod2	-	1,68	-	-
EAod3	3,11	-	3,74	5,19
EAod4	2,05	-	-	-
EAod5	-	3,47	-	-
EAod7	-	1,53	-	-
EAod9	1,92	-	-	2,51
EAod10	33,54	5,32	-	6,51
EAR3	3,84	-	-	2,09
EAR4	1,08	-	-	-
EAR5	3,01	-	-	-
EAR6	-	-	-	1,11
EAR7	8,17	-	-	-
EAR8	1,64	-	-	-
EAR9	9,39	-	-	-
EAR10	9,35	-	-	-
EAR11	10,27	4,60	-	1,75
EAR12	4,79	-	-	-
EAR13	3,81	1,33	-	1,22
EAR14	8,09	6,84	-	-
EAR15	1,27	-	-	-
EAR16	3,18	1,77	-	-
EAR17	5,16	-	-	-
EAR18	5,10	3,78	-	-
EAR19	1,96	-	-	-
RA1	2,21	-	-	-
RA3	5,03	-	1,33	-
RA4	3,63	-	1,72	-
RA5	7,37	-	-	-
RA6	4,16	-	-	-
RA7	2,66	-	-	-
RA8	5,79	-	-	2,24
RA10	1,22	-	-	-
RA11	-	-	-	-
RA12	3,10	-	-	-
RA14	-	2,41	-	-
RA15	8,21	-	-	-
RA17	2,47	-	1,13	1,13

La propiedad PGP más sensible a la presencia de metales fue la fijación de nitrógeno. De hecho, solo RA1 fijó nitrógeno en presencia de todos los metales pesados y EAod10 en presencia de As (Figura 22).

Finalmente, el número de bacterias que solubilizaron fosfato se incrementó en presencia de Cd (Figura 22). Cepas como RA8, RA9, RA15, EAR4 y EAR7, incapaces de solubilizar fosfato en ausencia de Cd, mostraron esta propiedad en presencia de dicho metal (Tabla 8).

5. Selección de bacterias para la formación de consorcios bacterianos.

Para el posterior estudio del efecto de la inoculación sobre el desarrollo de las plantas, se seleccionaron las bacterias con mejores características y se constituyeron dos consorcios: CE (consorcio de bacterias endofitas) y CR (consorcio de bacterias rizosféricas).

El consorcio CE se formó con los mejores endofitos aislados de las plantas de *A. macrostachyum*: *Kushneria* sp. EAod3, *Micrococcus* sp. EAod10, *Bacillus* sp. EAR8 y *Halomonas* sp. EAR18. EAod3 fue capaz de producir sideróforos tanto en presencia como en ausencia de metales pesados. También produjo auxinas en presencia de metales pesados. Además, esta cepa es la que toleró la mayor cantidad probada de Pb, Cu y Cd.

EAod10 es posiblemente la mejor cepa de todos los aislados porque presentaba casi todas las propiedades PGP en presencia de metales (fijación de nitrógeno, producción de sideróforos e IAA y solubilización de fosfato) y tenía los mejores valores de MTC en la resistencia a todos los metales. Además, esta cepa le aporta al consorcio la formación de biopelículas. También se seleccionaron EAR8 y EAR18, presentando así el consorcio una mezcla de bacterias aisladas de las raíces y de la parte aérea de las plantas. EAR8 fijaba nitrógeno, solubilizaba fosfato en

presencia de Pb y es una de las cepas que mayor cantidad de sideróforos produjo, además de crecer en altas concentraciones de metales pesados. EAR18, por su parte, fue capaz de formar biopelículas y producir auxinas en presencia y ausencia de metales pesados.

Para formar el consorcio CR, se seleccionaron las cepas *Vibrio* sp. RA1, *Pseudoalteromonas* sp. RA8, *Pseudoalteromonas* sp. RA15 y *Staphylococcus* sp. RA18, a partir de los aislados de la rizosfera. Estas cepas eran capaces de producir sideróforos con y sin metales en el medio (excepto RA18 que solo produce en presencia de metales pesados) y RA1 produjo la mayor cantidad de sideróforos de todos los aislados. RA1 y RA8 producían también IAA en presencia de metales pesados, mientras que RA15 y RA18 lo hicieron en ausencia de metales en el medio. Además, RA15 y RA18 fueron capaces de solubilizar fosfato cuando había metales en el medio. La fijación de nitrógeno es proporcionada por RA1 y la formación de biopelículas por RA18. Finalmente, estas cepas toleraban grandes concentraciones de metales pesados.

6. Efecto de los consorcios seleccionados en la germinación de semillas.

Para estudiar el efecto de las bacterias seleccionadas en la germinación, se inocularon semillas de *A. macrostachyum* con ambos consorcios por separado. Además, las semillas germinaron en medios con y sin metales pesados. Aunque la germinación fue monitorizada durante 21 días, no se observó ningún cambio en el número de semillas germinadas después de 1 semana (Figura 23).

En ausencia de metales pesados, no hubo diferencias significativas en la cinética de germinación entre las semillas no inoculadas y las inoculadas con el consorcio CE (Figura 23A). Sin embargo, la germinación se aceleró en las semillas

inoculadas con el consorcio CR, ya que ésta comenzó entre los días 2 y 3, con más del 80% de semillas germinadas en 4 días y cerca del 100% en 5 días (Figura 23A).

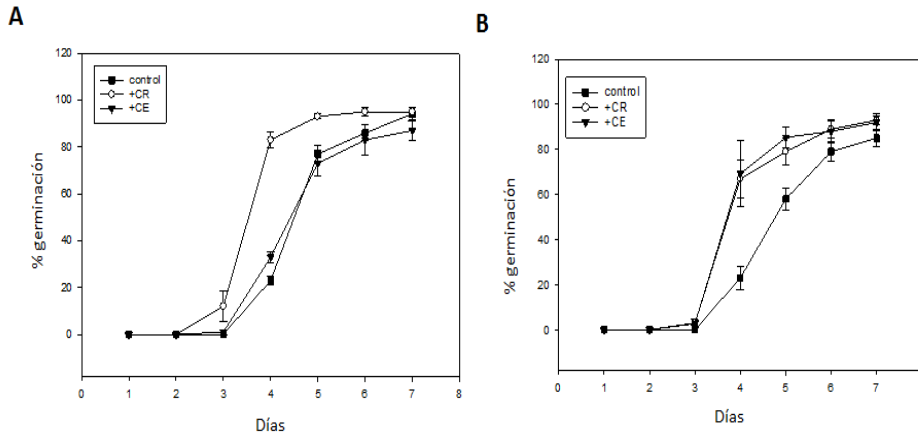


Figura 23. Cinética de germinación de las semillas de *A. macrostachyum* en ausencia (A) y presencia (B) de metales pesados. Control: semillas no inoculadas; +CR: semillas inoculadas con el consorcio CR; +CE: semillas inoculadas con el consorcio CE. Los resultados son la media \pm S.D. de cuatro placas independientes con 25 semillas por placa.

Por el contrario, la cinética de germinación de las semillas inoculadas tanto con los consorcios CE y CR fue muy similar en presencia de pequeñas concentraciones de metales pesados (Figura 23B). En este caso, ambos grupos de inoculantes aceleraron la germinación cuando se comparan con las semillas no inoculadas, con un 70% vs. 20% de semillas germinadas en 4 días, o el 85% vs. 55% en 5 días (Figura 23B). Después de una semana, el 97% de las semillas inoculadas habían germinado, y cerca del 90% de las semillas no inoculadas también.

7. Impacto de la bioaumentación de los sedimentos en la captación de iones y la capacidad de transporte de los mismos por la planta.

Para dilucidar el papel de los dos consorcios en la captación de metales por *A. macrostachyum* y en la capacidad de esta planta de transportarlos desde las

raíces hasta las hojas, se determinó la concentración de diferentes metales en los tejidos de plantas inoculadas crecidas en sedimentos de las marismas del Odiel y se comparó con los resultados obtenidos en plantas sin inocular. Los resultados de los análisis confirmaron que *A. macrostachyum* fue capaz de acumular grandes cantidades de metales en sus tejidos. De esta manera, al final del experimento (120 días), la concentración de iones fue mayor en las raíces que en los tallos en todos los tratamientos (*t*-test, $P < 0,01$; Figura 24), y el contenido de As, Cr, Cu, Pb y Zn superó los umbrales de toxicidad crítica para estas concentraciones de metales en los tejidos de las plantas (Kabata-Pendias y Pendias, 2001).

Además, los resultados indicaron que los sedimentos bioaumentados con ambos consorcios bacterianos favorecieron la capacidad de *A. macrostachyum* de acumular iones en sus raíces, aunque sin grandes diferencias entre ellas (ANOVA de una variable, $P < 0,05$; Figura 24).

Así, los aumentos en la concentración de iones en las raíces para los tratamientos CE y CR fueron de 112% y 61% para As, de 33% y 37% para el Cr, de 89% y 30% para el Cu, de 114% y 84% para el Pb, de 34% y 42% para el Ni y de 117% y 69% para el Zn, respectivamente.

Por otro lado, la concentración de iones en la parte aérea se incrementó en las plantas inoculadas con el consorcio CE, mejorando cerca del 335%, 107%, 133%, 267%, 185% y 46% para el As, Cr, Cu, Pb, Ni y Zn, respectivamente, respecto a las plantas no inoculadas y las inoculadas con el consorcio CR (ANOVA de una variable, $P < 0,05$; Figura 24). Estos resultados sugieren que el consorcio formado por endofitos parece tener un efecto positivo en la habilidad de *A. macrostachyum* de transferir metales desde las raíces hasta las hojas, hecho que podría contribuir en la mejora de su potencial acumulador.

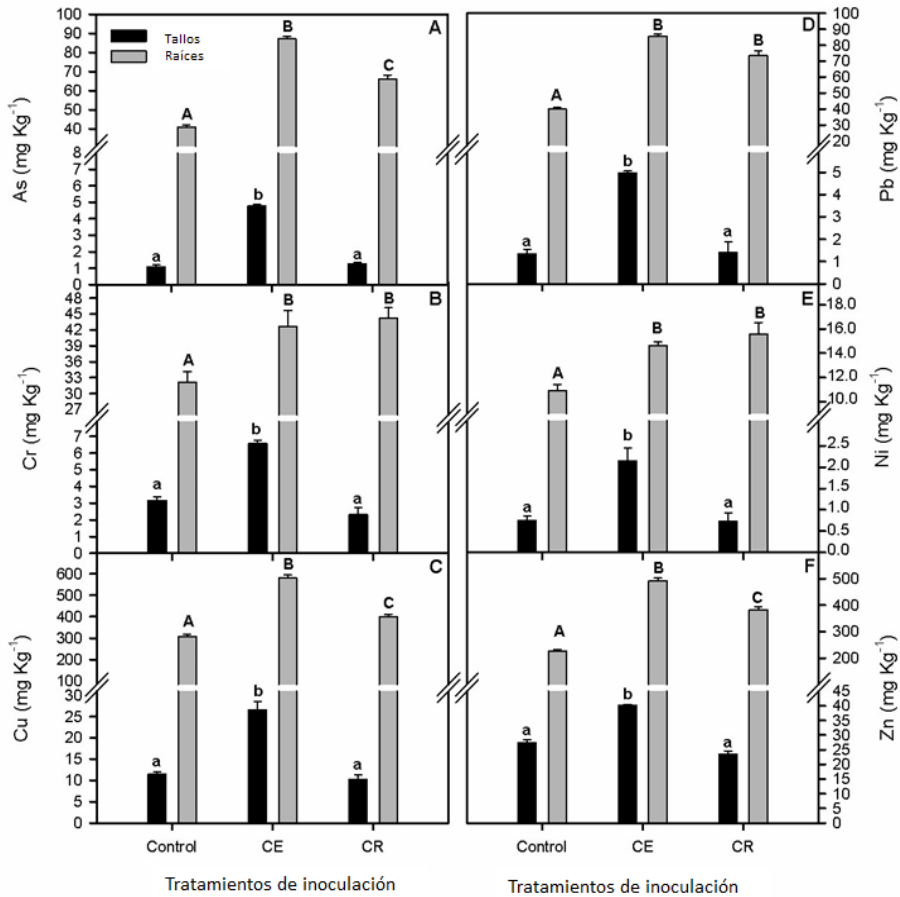


Figura 24. Efecto de los tratamientos de bioaumentación (control, sin inoculación; CR, inoculación con consorcio CR; CE, inoculación con el consorcio CE; detalles en Materiales y Métodos) en el total de As (A), Cr (B), Cu (C), Pb (D), Ni (E) y Zn (F) para los tallos y las raíces de las plantas de *A. macrostachyum* crecidas en sedimentos naturales de las marismas del Odiel durante 120 días. Los valores son la media \pm S.E. (n=7). Las distintas letras indican resultados que son significativamente diferentes (P<0,05).

8. Impacto de la bioaumentación de los sedimentos en la tolerancia de la planta al estrés por metales.

8.1. Efectos sobre el crecimiento de las plantas en sedimentos contaminados.

El incremento de la concentración de metales en los tejidos de las plantas inoculadas con ambos consorcios, descrito en el apartado anterior, no llevó aparejado una inhibición del crecimiento de las plantas. De hecho, la RGR de las plantas de *A. macrostachyum* crecidas en sedimentos contaminados de las marismas del Odiel tendió a aumentar de manera similar con los dos tratamientos de bioaumentación (ANOVA, $P > 0,05$; Figura 25A).

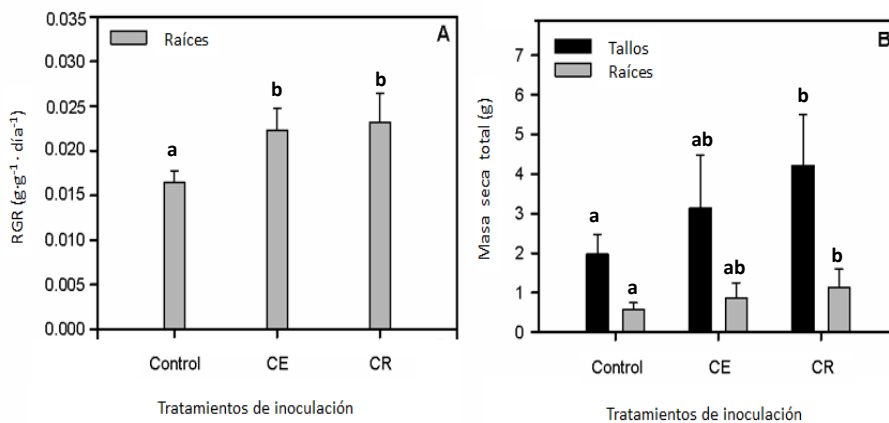


Figura 25. Efecto de los tratamientos de bioaumentación (control, sin inoculación; CR, inoculación con el consorcio CR y CE, inoculación con el consorcio CE; detalles en Materiales y Métodos) sobre la RGR (A) y sobre la masa seca total (B) en las plantas de *A. macrostachyum* crecidas en sedimentos naturales procedentes de las marismas del Odiel durante 120 días. Los valores son la media \pm S.E. (n=7). Las distintas letras indican resultados que son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Además, esta tendencia positiva se vio reflejada en el peso seco tanto de los tallos como de las raíces, que mostraron un incremento significativo del 37% y 53%

para los tallos y del 34% y 49% para las raíces en las plantas inoculadas con los consorcios CE y CR, respectivamente (Figura 25B).

8.2. Efectos sobre el aparato fotosintético de *A. macrostachyum*.

Con respecto al impacto de la bioaumentación sobre el aparato fotosintético de *A. macrostachyum*, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral revelaron que los valores de la A_N fueron mayores en las plantas crecidas en los sedimentos bioaumentados con los consorcios bacterianos, mostrando en ambos casos (tratamiento CE y CR) un incremento del 60% respecto a las plantas no inoculadas después de 120 días de tratamiento (ANOVA de una variable, $P < 0,01$; Figura 26A).

La g_s y la C_i mostraron tendencias que eran muy similares a la A_N , con incrementos de alrededor del 60% y del 30% para la g_s y la C_i , respectivamente (ANOVA de una variable, $P < 0,01$; Figura 26B y C). Además, los valores de F_v/F_m y de Φ_{PSII} a medio día no variaron con los tratamientos de bioaumentación respecto al control después de 120 días del experimento, con valores alrededor de 0,82 y 0,57 para la F_v/F_m y la Φ_{PSII} , respectivamente (datos no mostrados).

8.3. Efectos sobre las actividades de las enzimas antioxidantes de la planta.

En relación al efecto provocado sobre las enzimas antioxidantes presentes en la planta durante este experimento, los estudios mostraron que las actividades de estas enzimas se vieron afectadas significativamente por la inoculación con los consorcios bacterianos, tanto en los tallos como en las raíces (ANOVA de una variable, $P < 0,01$; Figura 27).

De esta forma, la actividad APx mejoró de forma significativa en los tallos con la inoculación con ambos consorcios, y las actividades de la GPx y la SOD se

incrementaron solo en las plantas crecidas en sedimentos bioaumentados con el consorcio CE. Por su parte, la actividad de la CAT no varió significativamente con los tratamientos de bioaumentación (Figura 27A-D). Por otro lado, los datos de las actividades de las cuatro enzimas en las raíces fueron significativamente menores en las plantas que habían crecido en presencia del consorcio CE, comparadas con el control y la inoculación con CR (ANOVA de una variable, $P < 0,01$; Figura 27).

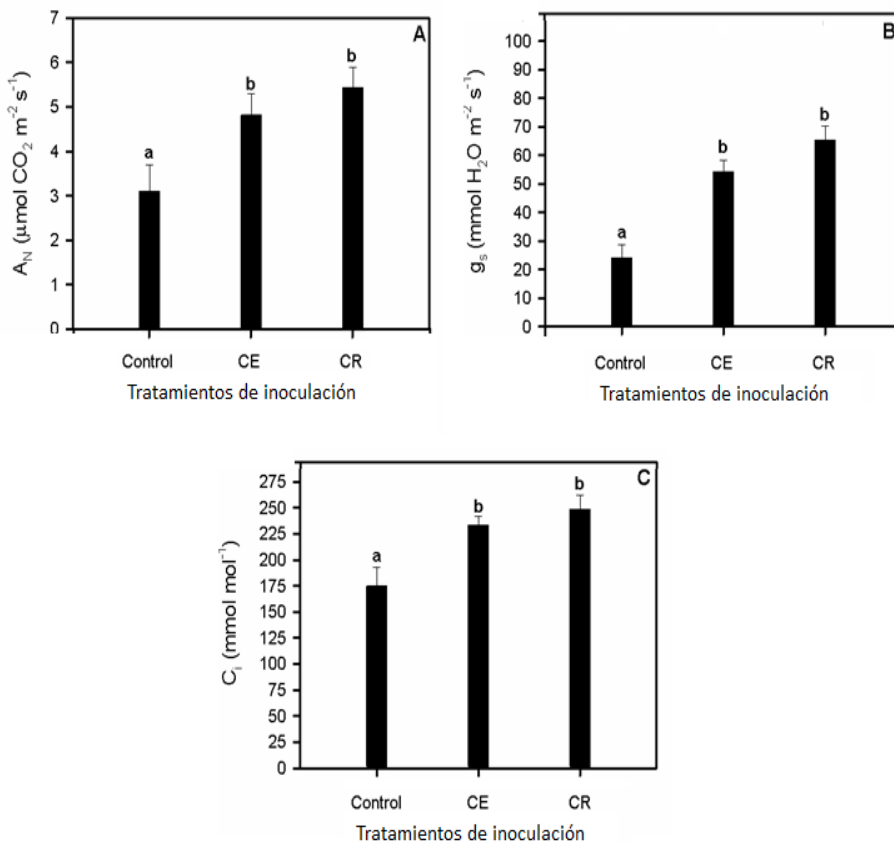


Figura 26. Efecto de los tratamientos de bioaumentación (control, sin inoculación; CR, inoculación con el consorcio CR y CE, inoculación con el consorcio CE; detalles en Materiales y Métodos) sobre la tasa la A_N (A), la g_s (B) y la C_i (C) en ramas primarias aleatorias de las plantas de *A. macrostachyum* crecidas en sedimentos naturales procedentes de las marismas del Odiel durante 120 días. Los valores son la media \pm S.E. ($n=7$). Las diferentes letras indican resultados que son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

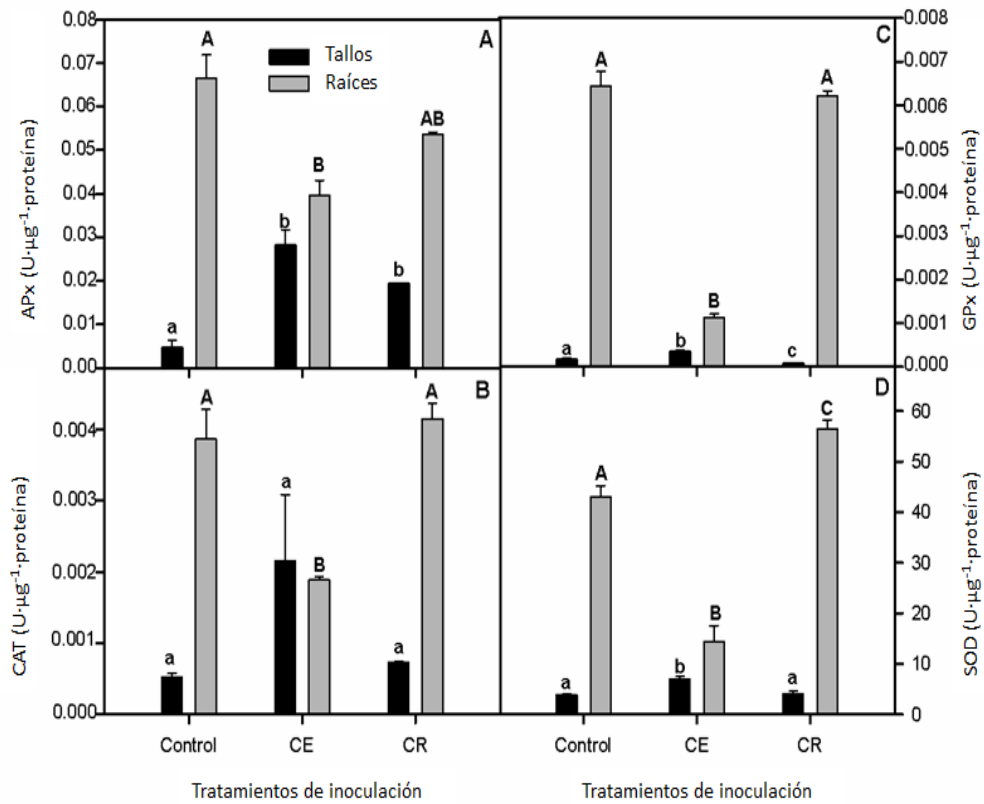


Figura 27. Efecto de los tratamientos de bioaumentación (control, sin inoculación; CR, inoculación con el consorcio CR y CE, inoculación con el consorcio CE; detalles en Materiales y Métodos) sobre la APx (A), CAT (B), GPx (C) y SOD (D) en tallos y raíces de las plantas de *A. macrostachyum* crecidas en sedimentos naturales procedentes de las marismas del Odiel durante 120 días. Los valores son la media \pm S.E. ($n=3$). Las distintas letras indican resultados que son significativamente diferentes ($P < 0,05$).



CAPÍTULO 2

Arthrocnemum macrostachyum como
herramienta de fitodesalinización

OBJETIVOS

El objetivo principal que se persigue en este Capítulo es determinar el efecto de las bacterias aisladas de la filosfera de plantas de *Arthrocnemum macrostachyum* crecidas en las marismas de Lebrija en su capacidad de acumular NaCl. Para ello, se han abordado los siguientes objetivos específicos:

- Aislar y caracterizar las bacterias endofíticas de la parte aérea de plantas de *A. macrostachyum* que crecen de forma natural en las marismas de Lebrija.
- Caracterizar las bacterias aisladas: resistencia a diferentes concentraciones de sal, presencia de genes relacionados con la síntesis de osmoprotectores (betaínas y ectoínas) y presencia de propiedades que promuevan el crecimiento de la planta (PGP).
- Seleccionar las mejores bacterias aisladas en base a sus propiedades PGP y resistencia a la sal, para formar un consorcio bacteriano con fines de inoculación.
- Observar el efecto del consorcio bacteriano sobre la germinación de las semillas de *A. macrostachyum* en presencia y ausencia de sal, y sobre el desarrollo de plantas de *A. macrostachyum* cultivadas en sustratos inertes con diferentes concentraciones de sal en condiciones de invernadero.

RESULTADOS

1. Aislamiento e identificación de bacterias endofitas de *A. macrostachyum*.

En base a la morfología de las colonias bacterianas aparecidas en los medios TSA y TSA con 0,3 M, se aislaron ocho cepas bacterianas diferentes de la parte aérea de plantas de *A. macrostachyum*. Todas eran bacilos Gram positivos formadores de esporas. Las secuencias del gen del ARNr 16S indicaron que los aislados pertenecían a los géneros *Bacillus*, *Oceanobacillus* y *Gracilibacillus* (Tabla 10). Aunque EA1 y EA5, y EA4 y EA6 mostraron una alta identidad con las mismas especies, presentaban propiedades distintas y fueron consideradas como aislados diferentes.

Tabla 10. Especies cercanas a las bacterias aisladas de *A. macrostachyum* en base a las secuencias parciales del gen del ARNr 16S.

Cepa	Nº acceso	Especies relacionadas	Fragmento secuenciado (pb)	Identidad (%)
EA1	KT963445	<i>Bacillus alcalophilus</i>	1417	98,69%
EA2	KT963446	<i>Bacillus gibsonii</i>	1440	99,51%
EA3	KT963447	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1460	99,93%
EA4	KT963448	<i>Oceanobacillus picturae</i>	1453	99,65%
EA5	KT963449	<i>Bacillus alcalophilus</i>	1417	98,48%
EA6	KT963450	<i>Oceanobacillus picturae</i>	1455	99,66%
EA7	KT963451	<i>Oceanobacillus kimchii</i>	1455	100%
EA8	KT963452	<i>Gracilibacillus saliphilus</i>	1458	98,83%

2. Resistencia bacteriana a la sal y presencia de genes relacionados con la tolerancia a sal.

Las bacterias se incubaron en placas de medio TSA con concentraciones crecientes de sal. La resistencia a la sal estuvo en el rango desde 0,75 M hasta 2,5 M (Tabla 11).

Tabla 11. Actividades enzimáticas, movilidad y tolerancia a la sal de las cepas endofíticas. (+) Presencia de actividad enzimática o movilidad, (-) ausencia de actividad enzimática o movilidad.

Cepa	Amilasa	Proteasa	Celulasa	Lipasa	ADNasa	Quitinasa	Pectinasa	Movilidad	NaCl (M)
EA1	-	+	-	-	-	-	+	+	2
EA2	-	-	+	-	-	-	-	-	1
EA3	+	+	+	-	-	+	-	+	2,5
EA4	-	+	-	-	-	-	-	+	2,5
EA5	+	-	+	-	-	-	-	-	0,75
EA6	-	-	+	-	-	-	-	+	2,5
EA7	-	-	-	-	+	-	-	+	2,5
EA8	+	-	-	-	-	-	-	-	2,5

La mayoría de los aislados podrían ser considerados halotolerantes. Sin embargo, EA8 no creció en placas de medio TSA sin sal y comenzó a crecer en las placas suplementadas con, al menos, 0,3 M de fuerza iónica, por lo que se consideró halófila. Debido a esta alta tolerancia a la sal, se investigó la presencia de genes relacionados con la síntesis de osmoprotectores, como los genes *ectBC* (para la síntesis de ectoínas) y *betB* (codifica para la betaína aldehído deshidrogenasa, implicada en la síntesis de betaínas). Estos genes se investigaron mediante amplificación por PCR, usando cebadores degenerados, tanto descritos en la literatura como diseñados en esta Tesis Doctoral. Para la amplificación del gen *betB*, los cebadores degenerados *betBF* y *betBR* se diseñaron como se describe en el apartado de Materiales y Métodos (Figura 10).

Después de la amplificación por PCR, todos los aislados mostraron la presencia de bandas de los tamaños esperados en ambos genes (Figura 28). Las secuencias de estas bandas mostraron altas identidades con *ectBC* o con *betB*, descritos previamente en las bases de datos (datos no mostrados).

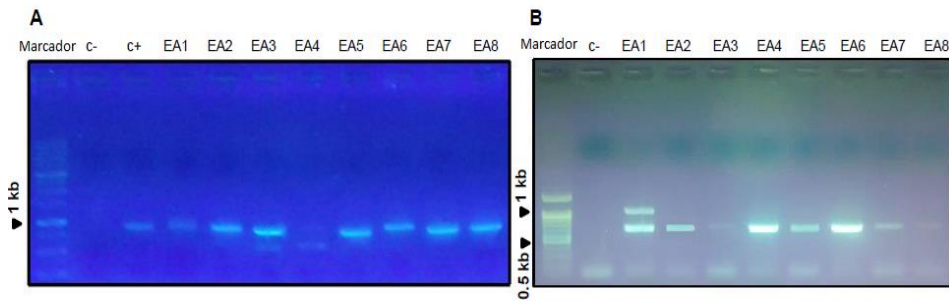


Figura 28. Presencia de genes para la síntesis de osmoprotectores en las cepas de la EA1 a la EA8. (A) Amplificación de los genes *ectBC*. Se utilizó el marcador DNA ladder BLUE (Intron Biotechnology) de 1 kb para estimar el tamaño de la banda. c-: control negativo (sin ADN); c+: control positivo (amplificación con ADN de *Chromohalobacter salixigens* CHR61 (Cánovas *et al.*, 1997)). Se observaron bandas de alrededor de 0,9 kb en todas las cepas. (B) Amplificación del gen *betB*. Se utilizó el marcador Plus BLUE (GeneOn) de 100 pb para estimar el tamaño de la banda. c-: control negativo (sin ADN). Se observaron bandas de alrededor de 0,7 kb en todas las cepas.

3. Actividades enzimáticas y las propiedades PGP mostradas por las cepas en presencia de NaCl.

Ya que algunas bacterias no crecieron en medios sin sales o con baja concentración de sales, los ensayos de las actividades enzimáticas y de las propiedades PGP se realizaron en medios con presencia de una fuerza iónica de 0,3 M.

La actividad pectinasa estuvo presente únicamente en la cepa EA1, y la actividad quitinasa en la cepa EA3, mientras que cuatro aislados, incluyendo EA3, mostraron actividad celulasa (Tabla 11). Con respecto a las otras actividades enzimáticas, la amilasa y la proteasa aparecieron en tres cepas, mientras que sólo EA7 presentó la actividad ADNasa. Finalmente, no se encontró actividad lipasa en las cepas aisladas (Tabla 11).

Una característica interesante de los endofitos es la movilidad, que permite a la bacteria alcanzar la localización adecuada dentro de la planta. Los resultados mostraron que la mitad de los aislados eran móviles (Tabla 11).

Respecto a las propiedades PGP, todas las cepas tuvieron al menos una propiedad beneficiosa para el crecimiento de la planta. Siete de los ocho aislados fueron productores de auxinas, produciendo cantidades que iban desde 0,64 mg·l⁻¹ (EA2) hasta 4,17 mg·l⁻¹ (EA8; Tabla 12). Cuatro cepas fueron capaces de solubilizar fosfato, siendo EA1, EA2 y EA5 los mejores solubilizadores (Tabla 12). En el caso de los sideróforos, solo EA3 y EA8 produjeron estos compuestos, siendo EA3 el mejor productor (Tabla 12). Finalmente, la mitad de las bacterias aisladas fueron capaces de formar biopelículas. También se investigaron la fijación de nitrógeno y la actividad ACC desaminasa, pero estas propiedades no aparecieron en las bacterias aisladas.

Tabla 12. Propiedades PGP de los endofitos aislados. (+: presencia de la propiedad; -: ausencia de la propiedad).

Cepa	Solubilización de fosfato*	Producción de sideróforos*	Producción de auxinas (mg·l ⁻¹)	Formación de biopelículas
EA1	7	0	3,40	+
EA2	7	0	0,34	+
EA3	4	7	-	+
EA4	0	0	0,81	-
EA5	7	0	2,72	-
EA6	0	0	1,34	+
EA7	6	0	1,59	-
EA8	0	5	4,17	-

*Diámetro del halo (mm).

4. Formación del consorcio bacteriano.

En base a las propiedades PGP, las actividades enzimáticas y resistencia al NaCl, se seleccionó un consorcio bacteriano formado por las cepas *Bacillus alcalophilus* EA1, *Bacillus thuringiensis* EA3 y *Gracilibacillus saliphilus* EA8 para

Llevar a cabo los experimentos con semillas y plantas. La cepa EA8 mostró una alta producción de auxinas (y también produjo sideróforos) y las cepas EA1 y EA3 presentaron tres propiedades PGP cada una. Combinando EA1, EA3 y EA8, cada propiedad PGP estuvo representada en dos de las cepas seleccionadas (Figura 29). Además, EA1 tenía la actividad pectinasa y la cepa EA3, las actividades celulasa y quitinasa.

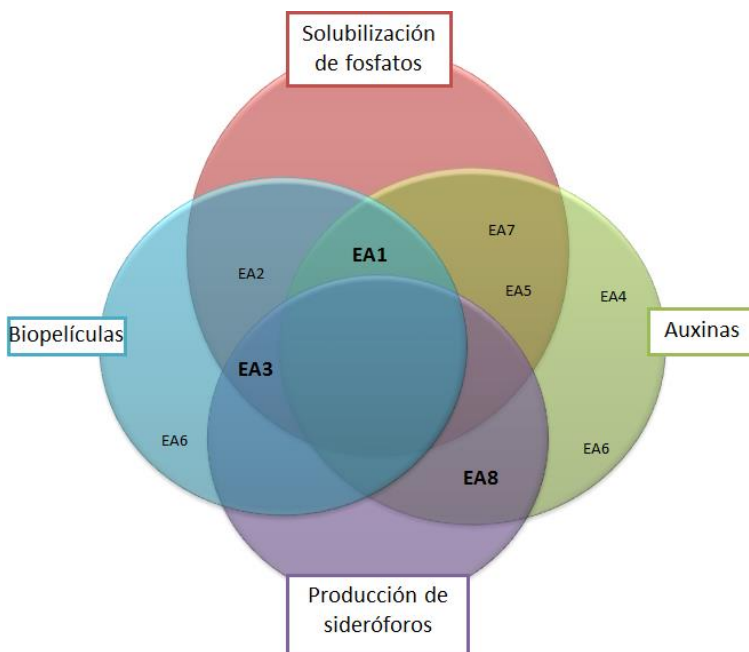


Figura 29. Diagrama de Venn de las propiedades PGP presentes en las bacterias aisladas. En negrita: bacterias seleccionadas para el consorcio.

5. Respuesta de la germinación de las semillas a la inoculación bacteriana.

La inoculación de las semillas mejoró considerablemente la cinética de germinación y el porcentaje final de germinación de *A. macrostachyum* en ausencia de sal (Figura 30). Así, tanto la velocidad de la germinación como el número de

semillas germinadas fueron mayores en las semillas inoculadas, alcanzando un 50% de la germinación en 5 días, mientras que las semillas no inoculadas necesitaron una semana para alcanzar este porcentaje de germinación. La tasa de germinación después de 10 días fue del 80% para las semillas inoculadas vs. el 57% para las semillas no inoculadas (Figura 30).

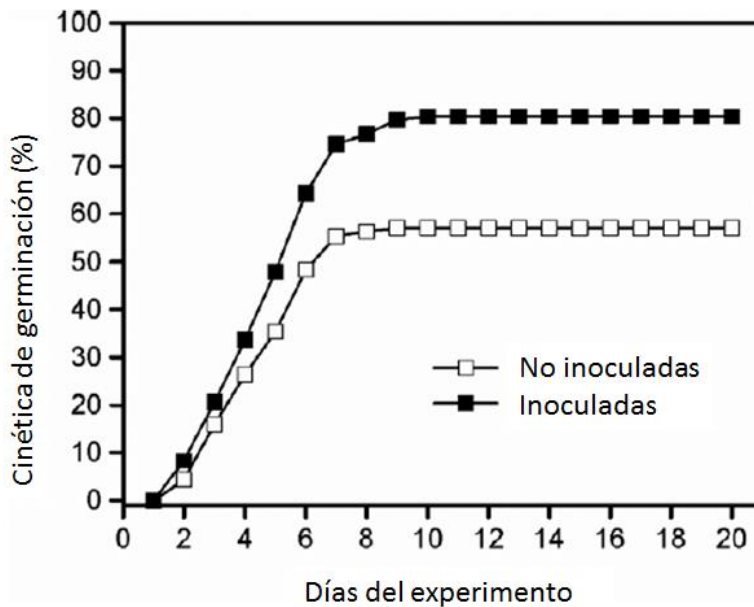


Figura 30. Cinética de germinación de las semillas de *A. macrostachyum* sin y con una preinoculación bacteriana durante 20 días. Los valores representan la media de cinco réplicas.

En presencia de 510 mM de NaCl, las semillas no fueron capaces de germinar. Sólo un pequeño número germinó al cabo de dos semanas de incubación, no habiendo diferencia entre las inoculadas y las no inoculadas (datos

no mostrados). Por otro lado, ninguna semilla creció a 1030 mM durante la duración del experimento de germinación (datos no mostrados).

6. Respuesta de la planta al combinar el efecto de la salinidad y la inoculación bacteriana.

Los efectos de la salinidad y de la inoculación bacteriana en el crecimiento de las plantas fueron significativos después de 3 meses de tratamiento (ANOVA de dos variables, $P < 0,05$). La masa seca total de los tallos y de las raíces fue óptima a 510 mM de NaCl de salinidad externa con respecto al tratamiento control (*i.e.* 0 mM de NaCl), y no mostraron diferencias entre los tratamientos de inoculación en ambos niveles de salinidad.

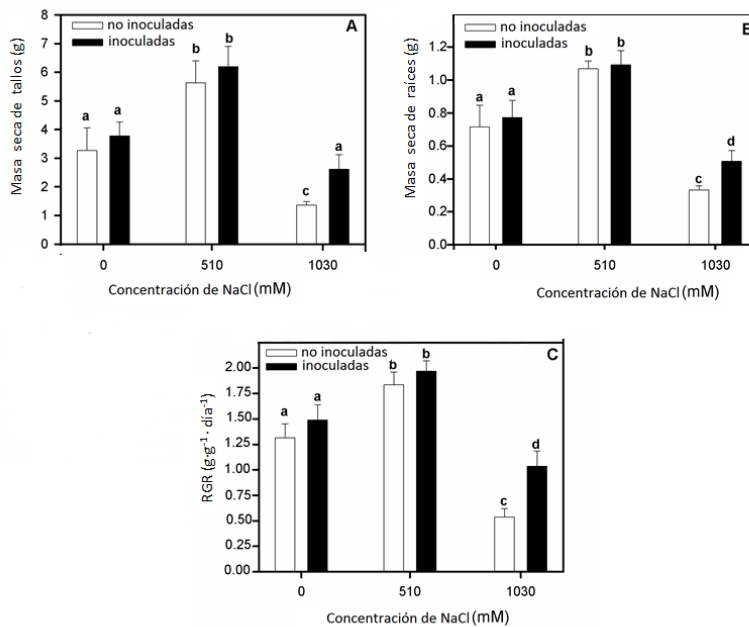


Figura 31. Análisis del crecimiento de *A. macrostachyum* en respuesta a un rango de concentraciones de NaCl y ausencia (no inoculadas) o presencia (inoculadas) de bacterias después de 3 meses. (A) Masa seca de los tallos; (B) masa seca de las raíces; (C) RGR. Los valores representan la media \pm S.E, $n=6$. Las distintas letras indican resultados que son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Por otra parte, ambos parámetros decrecieron considerablemente en las plantas cultivadas con una salinidad externa del 1030 mM de NaCl. Sin embargo, esta reducción se mitigó en las plantas inoculadas con el consorcio bacteriano (Figura 31A y B).

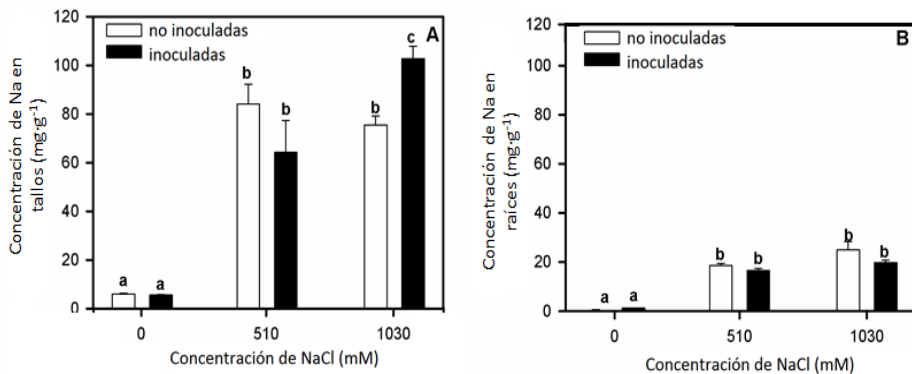
Unas tendencias similares se observaron en el RGR, con una reducción del 45% y del 72% en las plantas crecidas a 1030 mM de NaCl con y sin inoculación bacteriana, respectivamente (Figura 31C).

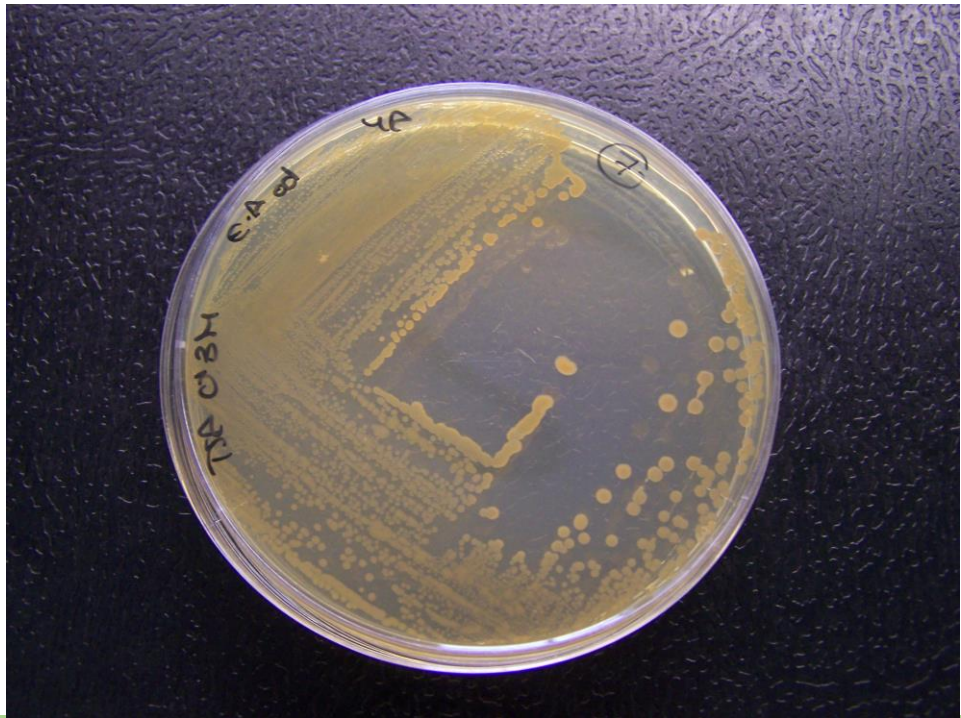
Con respecto a las respuestas fotosintéticas, los resultados indicaron que la A_N , la g_s y la C_i se vieron significativamente influenciadas por la concentración de sal (ANOVA de dos variables, $P < 0,05$), con valores máximos en las plantas crecidas a 510 mM de NaCl de salinidad externa, mientras que los tratamientos de inoculación no tuvieron un efecto significativo en estos parámetros en ninguna de las concentraciones de sal (Tabla 13). Además, la F_v/F_m y la Φ_{PSII} a medio día no variaron con los tratamientos de salinidad e inoculación, con valores alrededor de 0,78 y 0,70 en todos los tratamientos de inoculación y salinidad, respectivamente (Tabla 13)

Finalmente, la concentración de Na^+ en los tejidos de *A. macrostachyum* se incrementó marcadamente en las plantas que crecieron en presencia de 510 mM de NaCl en el medio con respecto a las plantas control, con valores medios de $70 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ y de $20 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, aproximadamente, para los tallos y las raíces, respectivamente, para ambos tratamientos de inoculación (Figura 32). Por otro lado, las plantas inoculadas que crecieron en presencia de 1030 mM de NaCl mostraron un incremento significativo, de aproximadamente un 20%, en la concentración de Na^+ en los tallos de hasta $103 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (Figura 32A).

Tabla 13. Tasa de fotosíntesis neta, A_N ; conductancia estomática, g_s ; concentración intercelular de CO_2 , C_i ; máxima eficiencia cuántica de la fotoquímica del PSII, F_v/F_m y eficiencia cuántica del PSII, Φ_{PSII} en ramas de *A. macrostachyum* seleccionadas aleatoriamente en respuesta al tratamiento con un rango de concentraciones de NaCl sin y con inoculación bacteriana durante 3 meses. Los valores representados significan \pm S.E., $n=6$.

Parámetros	0 mM NaCl		510 mM NaCl		1030 mM NaCl	
	No inoculadas	Inoculadas	No inoculadas	Inoculadas	No inoculadas	Inoculadas
A_N ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	4,2 \pm 0,7	4,8 \pm 0,5	5,7 \pm 0,5	6,0 \pm 0,2	3,3 \pm 0,3	3,8 \pm 0,3
g_s ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	38,2 \pm 2,6	43,7 \pm 4,9	62,9 \pm 9,9	67,3 \pm 4,3	29,4 \pm 2,7	32,1 \pm 5,9
C_i ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)	190 \pm 7	218 \pm 10	244 \pm 6	246 \pm 5	181 \pm 5	170 \pm 15
F_v/F_m	0,76 \pm 0,01	0,77 \pm 0,01	0,78 \pm 0,01	0,79 \pm 0,01	0,78 \pm 0,01	0,78 \pm 0,01
Φ_{PSII}	0,68 \pm 0,01	0,67 \pm 0,02	0,73 \pm 0,02	0,72 \pm 0,01	0,71 \pm 0,01	0,70 \pm 0,02





CAPÍTULO 3

Descripción de posibles nuevas especies pertenecientes al microbioma de *Arthrocnemum macrostachyum*

OBJETIVOS

El objetivo que se persigue en este último Capítulo es la caracterización y la descripción de nuevas especies bacterianas aisladas de la rizosfera y la endosfera de plantas de *A. macrostachyum* crecidas en las marismas del Odiel. Para ello, se planteó alcanzar los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar las condiciones óptimas de crecimiento para cada especie.
- Estudiar la morfología y la caracterización fenotípica tanto de las bacterias como de las colonias que forman.
- Realizar estudios filogenéticos y del ADN de cada bacteria en comparación con cepas de referencia.
- Realizar pruebas bioquímicas y nutricionales a cada posible especie nueva.
- Realizar análisis quimiotaxonómicos de cada posible especie nueva en comparación con las cepas de referencia.

RESULTADOS

1. Morfología y caracterización fenotípica.

Después del aislamiento de las bacterias rizosféricas y endofíticas de plantas de *A. macrostachyum* crecidas en las marismas del Odiel, algunas de ellas presentaron un porcentaje de identidad, en su secuencia del gen ARNr 16S, menor del 99% con bacterias previamente descritas (Tabla 4). De estas cepas solo se seleccionaron para estudiar más en profundidad las que formaban parte de los consorcios CR y CE, junto con otras tres cepas pertenecientes a los géneros *Kushneria* y *Vibrio*, géneros a los que pertenecían cepas seleccionadas para el consorcio. Estas cepas fueron *Kushneria* sp. EAod3^T (=CECT 9073^T=LMG 29856^T), *Kushneria* sp. EAod4^T (=CECT 9074^T=LMG 29857^T), *Kushneria* sp. EAod7^T (=CECT 9075^T=LMG 29858^T), *Vibrio* sp. EAod9^T (CECT 9027^T= LMG 29724^T), *Vibrio* sp. RA1^T (=CECT 9082^T), *Pseudoalteromonas* sp. RA15^T (=CECT 9079^T =LMG 29860^T), *Halomonas* sp. EAR18^T (=CECT 9077^T=LMG 29859^T), *Bacillus* EAR8^T (=CECT 9072^T=DSM 103900^T) y *Staphylococcus* sp. RA18^T (=CECT 9076^T=DSM 103902^T).

1.1. Género *Kushneria*.

En este apartado se describen 3 posibles especies nuevas.

Kushneria sp. EAod3^T son bacilo-cocos Gram negativos móviles, no formadores de esporas, y se observan bacterias solitarias o formando parejas cuando se observan al microscopio óptico. El tamaño de estas bacterias es de 0,1 x 0,2-0,3 μm. Son aerobias y forman colonias brillantes, opacas, de forma irregular, elevadas con un margen ondulado y de aspecto viscoso, tienen un tamaño de 3 mm de diámetro y un color salmón claro. Estas son las características cuando crecen en medio TSA con las condiciones óptimas durante 48 horas. Estas condiciones son 2,5% de sales, pH alrededor de 7 y 30 °C de temperatura. Además de estas

condiciones, esta bacteria es capaz de crecer en un medio con un pH entre 5 y 8 y una temperatura desde 4 °C hasta 37 °C, aunque a 4 °C el crecimiento es débil. Tolera hasta un 25% de sales en el medio y requiere, al menos, de 0,5% de sales en el medio para crecer, por lo que es un microorganismo halófilo moderado. Esta cepa también crece en medio MA y en agar MacConkey suplementado con sal.

Kushneria sp. EAod4^T son bacilo-cocos Gram negativos móviles, no formadores de esporas, y se observan bacterias solitarias cuando se observan al microscopio óptico. El tamaño de estas bacterias es de 0,1 x 0,2-0,4 µm. Son aerobias y forman colonias brillantes, opacas, de forma irregular, elevadas con un margen ondulado y de aspecto viscoso, tienen un tamaño de 2,6 mm de diámetro y un color salmón claro. Estas son las características cuando crecen en medio TSA con las condiciones óptimas durante 48 horas. Estas condiciones son 2,5% de sales, pH alrededor de 7 y 30 °C de temperatura. Además de estas condiciones, esta bacteria es capaz de crecer en un medio con un pH entre 6 y 8 y una temperatura desde 4 °C hasta 37 °C, aunque a 4 °C el crecimiento es débil. Tolera hasta un 25% de sales en el medio y no necesita sal en el medio para crecer, por lo que es un microorganismo halotolerante. Esta cepa también crece en medio MA y en agar MacConkey suplementado con sal.

Kushneria sp. EAod7^T son bacilo-cocos Gram negativos móviles, no formadores de esporas, y se observan bacterias solitarias cuando se observan al microscopio óptico. El tamaño de estas bacterias es de 0,1 x 0,2-0,3 µm. Son aerobias y forman colonias brillantes, opacas, de forma irregular, elevadas con un margen ondulado y de aspecto viscoso, tienen un tamaño de 2,6 mm de diámetro y un color salmón claro. Estas son las características cuando crecen en medio TSA con las condiciones óptimas durante 48 horas. Estas condiciones son 2,5% de sales, pH alrededor de 7 y 30 °C de temperatura. Además de estas condiciones, esta

bacteria es capaz de crecer en un medio con un pH entre 5 y 8 y una temperatura desde 4 °C hasta 37 °C, aunque a 4 °C el crecimiento es débil. Tolera hasta un 25% de sal en el medio y requiere, al menos, de 0,5% de sal en el medio para crecer, por lo que es un microorganismo halófilo moderado. Esta cepa también crece en medio MA y en agar MacConkey suplementado con sal.

1.2. Género *Vibrio*.

Este género se estudió por el personal de la CECT en Valencia junto con el grupo de la Dra. Pujalte en la Universidad de Valencia.

Vibrio sp. EAod9^T es una bacteria Gram negativa móvil con forma de bacilo-coco (0,5-0,6 x 0,5-1,5 µm) y es anaerobia facultativa. Cuando crece en medio MA forma colonias regulares, translucidas y no pigmentadas. Esta bacteria crece a temperaturas de 15 °C a 28 °C en medios que presenten de un 1% a un 10% de NaCl (p/v). No hubo crecimiento en Agar TCBS (tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa).

Por otro lado, la cepa *Vibrio* sp. RA1^T es un bacilo-coco Gram negativo móvil. El resto de características morfológicas y fenotípicas están siendo estudiadas por el personal de la CECT junto con el grupo de la Dra. Pujalte en la Universidad de Valencia.

1.3. Género *Pseudoalteromonas*.

Las bacterias de *Pseudoalteromonas* sp. RA15^T son bacilos Gram negativos que se encuentran separados o formando parejas cuando se observan al microscopio óptico, no forman esporas, no son móviles y son aerobios. Tienen un tamaño de 0,1 x 0,3-0,4 µm y forman colonias de 3,75 mm de diámetro cuando crecen en medio TSA con las condiciones óptimas durante 24 horas. Estas colonias son de color crema, opacas, mucosas, irregulares y convexas, con un borde

ondulado y de aspecto viscoso. Después de 7 días de incubación, las colonias se mezclan unas con otras formando colonias más grandes de 6 mm aproximadamente, y se vuelven líquidas y muy mucosas. Las condiciones óptimas para el crecimiento fueron medio TSA 2,5% de sal, pH alrededor de 7 y una temperatura de 28 °C. Aunque en estas condiciones se observó un mejor crecimiento, la cepa RA15^T es capaz de crecer en un rango de pH de 5,5 a 9 y a temperaturas desde 4 °C hasta 32 °C. Además, tolera hasta un 15% de sal en el medio. Esta cepa es capaz de crecer en ausencia de sal, aunque el crecimiento es débil, por lo que *Pseudoalteromonas* sp. RA15^T es un microorganismo halotolerante. Además de crecer en medio TSA, RA15^T también crece en medio MA.

1.4. Género *Halomonas*.

Halomonas sp. EAR18^T es una bacteria Gram negativa móvil con forma de bacilo-coco con un tamaño de 0,1 x 0,2-0,3 µm. Estas bacterias suelen aparecer de manera aislada cuando se observan al microscopio óptico, no forman esporas y son aerobias. Cuando crecen en las condiciones óptimas (medio TSA con un 2,5% de sal a un pH de 7 y 30 °C) durante 48 horas, forman colonias de 1 mm, de color naranja claro, brillantes, opacas, puntiformes, convexas, con el margen un poco ondulado y de aspecto viscoso. Después de 7 días en las mismas condiciones de crecimiento, las colonias aumentan su tamaño hasta 2 mm, se vuelven circulares y de color marrón claro con los bordes más claros. Además de las condiciones óptimas de crecimiento, la cepa EAR18^T crece en medios con un pH desde 5,5 hasta 9, y a temperaturas desde 15 °C hasta 37 °C. Crece en medios sin sal y tolera hasta un 25% de sal, por lo que se considera un microorganismo halotolerante. Además de crecer en medio TSA, también crece en medio MA y en agar MacConkey.

1.5. Género *Bacillus*.

De este género se estudió la cepa *Bacillus* sp. EAR8^T. Son bacterias Gram positivas con forma de bacilo de 0,1 x 0,3-0,6 µm de tamaño, formadoras de esporas, aerobias y no móviles. Se suelen observar de forma aislada bajo el microscopio óptico. Estas bacterias, cuando crecen en medio TSA en las condiciones óptimas durante 24 horas, forman colonias de color beige, opacas, irregulares, elevadas, de forma mantecosa y con el borde ondulado. Dichas colonias miden 3,8 mm de diámetro. Después 7 días bajo las mismas condiciones, las colonias pasan a tener el borde un poco rizado.

Esta bacteria crece en un intervalo de pH de 5,5 a 9, un rango de temperatura de 15 a 45 °C y un porcentaje de sal entre 0 y 25% de sales, teniendo el crecimiento óptimo a pH 7, 37 °C de temperatura y 2,5% de sales en el medio. Al no necesitar de sal para crecer, se considera un microorganismo halotolerante. También se observó crecimiento en el medio MA.

1.6. Género *Staphylococcus*.

Staphylococcus sp. RA18^T es una bacteria Gram positiva no móvil, con forma de coco de 0,1 µm de diámetro, que pueden aparecer de forma aislada, en pareja o formando racimos cuando se observan al microscopio óptico. Es una bacteria anaerobia facultativa. Cuando crece bajo las condiciones óptimas (medio TSA 2,5% de sal, pH de 7 y a 37 °C) durante 48 horas, forma colonias de 1 mm, blanquecinas, opacas, puntiformes, convexas, con el borde entero y de aspecto viscoso.

Además de las condiciones óptimas, esta cepa crece en medios con un pH de entre 5 y 9 y a temperaturas de entre 15 °C y 45 °C. Tolera hasta 25% de sal y puede crecer en ausencia de esta, por lo que es una bacteria halotolerante. Además de crecer en medio TSA, *Staphylococcus* sp. RA18^T también crece en medio MA.

2. Análisis filogenéticos, composición de bases del ADN e hibridación ADN-ADN.

Al secuenciar el gen del ARNr 16S de estas cepas bacterianas, todas mostraron una identidad con las secuencias depositadas en las bases de datos de menos del 99%, como se muestra en la Tabla 4 del Capítulo 1. Estas secuencias se compararon con secuencias del gen del ARNr 16S de las mismas especies, géneros y/o familias para la creación de árboles filogenéticos. A partir de los árboles filogenéticos se determinaron las especies tipo que se usaron de referencia para compararlas con las cepas estudiadas en este Capítulo.

2.1. Género *Kushneria*.

La longitud de las secuencias del gen del ARNr 16S de las cepas EAod3^T, EAod4^T y EAod7^T fue de 1467, 1413 y 1418 pb, respectivamente (Tabla 4). Las comparaciones de estas secuencias mostraron las siguientes semejanzas: EAod3^T mostró una alta semejanza con EAod4^T (99,23%), *K. marisflavi* DSM 15357^T (99,04%), *K. indalinina* CECT 5902^T (98,55%), EAod7^T (98,44%) y *K. pakistanensis* KCTC 42082^T (98,43%). EAod4^T, por su parte, mostró una alta semejanza con EAod3^T (99,43%), *K. marisflavi* DSM 15357^T (98,51%), EAod7^T (98,37%), *K. indalinina* CECT 5902^T (98,06%) y *K. pakistanensis* KCTC 42082^T (97,86%). Finalmente, EAod7^T estuvo relacionada con EAod3^T (98,44%), EAod4^T (98,37%), *K. marisflavi* DSM 15357^T (97,59%), *K. indalinina* CECT 5902^T (97,27%) y *K. pakistanensis* KCTC 42082^T (96,94%).

El árbol filogenético creado por los métodos de Máxima Verosimilitud y Máxima Parsimonia mostraron que las tres cepas estudiadas pertenecen al género *Kushneria* (Figura 33). Las cepas de referencia elegidas fueron *K. marisflavi* DSM 15357^T, *K. indalinina* CECT 5902^T y *K. pakistanensis* KCTC 42082^T.

De acuerdo con Meier-Kolthoff *et al.* (2013), serán necesarios estudios de hibridación ADN-ADN entre las cepas EAod3^T y EAod4^T (semejanza de 99,43%) y entre la cepa EAod3^T y *K. marisflavi* DSM 15357^T (semejanza del 99,04%). Estos estudios se están realizando.

2.2. Género *Vibrio*.

La longitud de las secuencias del gen del ARNr 16S de las cepas EAod9^T y RA1^T fue de 1410 y 1425 pb, respectivamente (Tabla 4). La secuencia de la cepa EAod9^T mostró semejanzas de menos del 97% con todas las especies del género *Vibrio*, siendo *V. sagamiensis* la especie más cercana con un 96,8% de semejanza en sus secuencias. Los árboles filogenéticos basados en la Máxima Verosimilitud y Máxima Parsimonia muestran que esta cepa se une al clado Gazogenes dentro del género *Vibrio*, estando la secuencia en la periferia del grupo (Figura 34). El nodo está soportado por cifras del 90% y se recupera en todos los árboles. Estos datos sugieren que esta cepa podría representar una nueva especie del género *Vibrio*.

Se secuenció el genoma de la cepa EAod9^T (ERP019551) y sobre él se realizaron las hibridaciones ADN-ADN. Los valores obtenidos se encontraron entre un 18,6% de semejanza con el genoma de la cepa tipo *V. rhizosphaerae* CECT 7877^T y un 20% con el genoma de la cepa tipo *V. gazogenes* CECT 5068^T. Estos resultados vuelven a resaltar la novedad de la cepa.

Por último, a esta cepa también se le determinó el contenido en G+C, que fue del 43,4%, encontrándose este valor dentro del rango del género *Vibrio*.

Estos estudios se están realizando en la actualidad para la cepa RA1^T.

2.3. Género *Pseudoalteromonas*.

La secuencia del gen del ARNr 16S de la cepa RA15^T tenía una longitud de 1389 pb (Tabla 4). Esta secuencia mostró las mayores semejanzas con *P. prydzensis* DSM 14232^T (98,13%) y con la especie *P. mariniglutinosa* DSM 15203^T (97,82%). El árbol filogenético creado siguiendo los criterios de Máxima Verosimilitud y Máxima Parsimonia confirmó la presencia de esta cepa dentro del género *Pseudoalteromonas* (Figura 35) y las dos cepas tipo nombradas anteriormente se utilizaron como cepas de referencia.

De acuerdo con Meier-Kolthoff *et al.* (2013), no fueron necesarios estudios de hibridación ADN-ADN.

2.4. Género *Halomonas*.

La secuencia del gen del ARNr 16S de la cepa EAR18^T mostró una longitud de 1262 pb (Tabla 4). Esta secuencia se comparó con las secuencias del gen del ARNr 16S de todas las especies que componen la familia *Halomonadaceae* y se obtuvo una semejanza del 96,65% con *H. zincidurans* JCM 18472^T y del 94,74% con *H. xinjiangensis* KCTC 22608^T. Entre estos valores aparecían cuatro semejanzas con especies de *Chromohalobacter*. Las semejanzas obtenidas con especies de *Chromohalobacter* fueron debidas a la teoría neutral de la evolución. La secuencia ha ido evolucionando de manera que se parece más a especies de este género que al género *Halomonas*, pero evolutivamente, esta secuencia pertenece al género *Halomonas*.

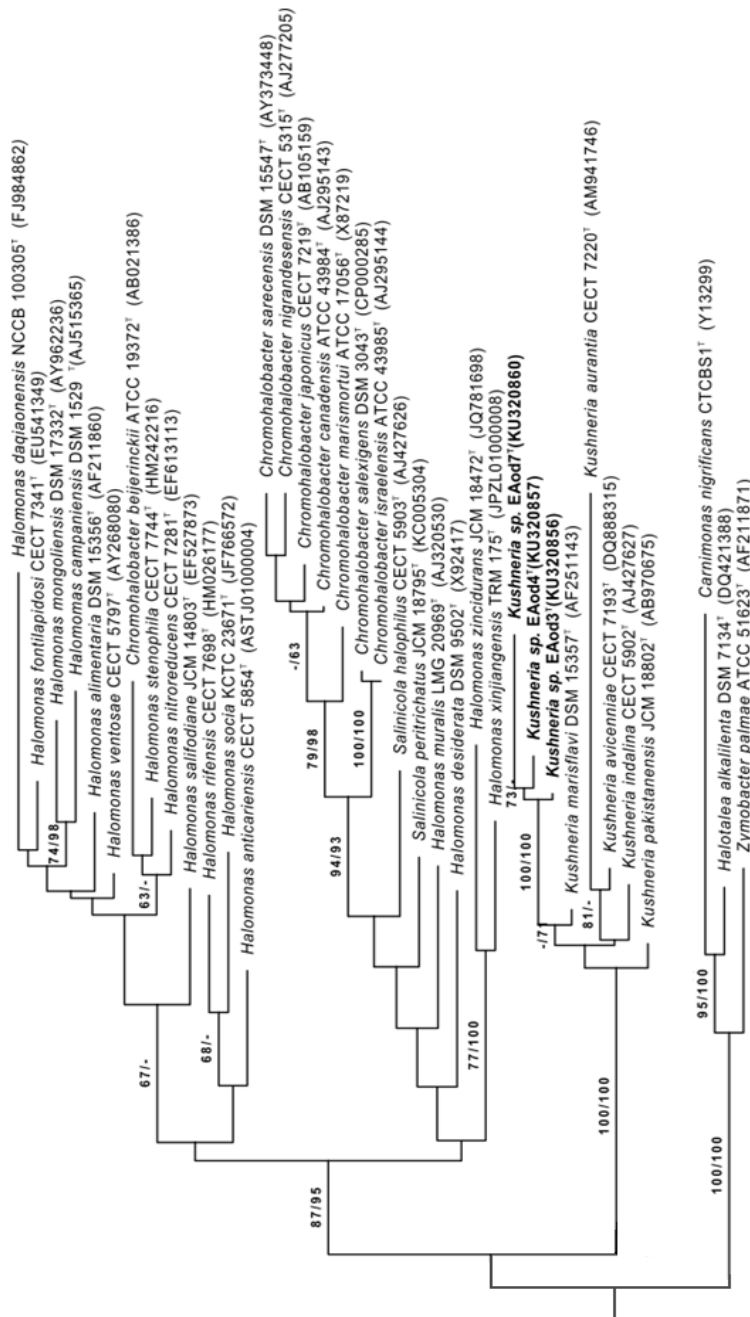


Figura 33. Árbol filogenético basado en la Máxima Parsimonia de las secuencias parciales de las secuencias del gen ARNr 16S de *Kushneria* sp. EAod3[†], EAod4[†] y EAod7[†], más las cepas tipo de otras especies de *Kushneria*. Entre paréntesis se indican los números de acceso de las secuencias.

Esto se demuestra en el árbol filogenético creado por la Máxima Verosimilitud y Máxima Parsimonia, donde se observa que esta especie se encuentra dentro de este género (Figura 36). Por esta razón, las cepas que se eligieron de referencia fueron *H. xinjiangensis* KCTC 22608^T y *H. zincidurans* JCM 18472^T.

De acuerdo con Meier-Kolthoff *et al.* (2013), no fueron necesarios estudios de hibridación ADN-ADN.

2.5. Género *Bacillus*.

La cepa EAR8^T presentó una secuencia del gen del ARNr 16S de 1374 pb (Tabla 4). La comparación de esta secuencia con las de las bases de datos mostró semejanzas con *B. vietnamensis* DSM 18898^T (98,17%), *B. aquimaris* DSM 16205^T (97,81%) y *B. aoryzaecorticis* JCM 19602^T (97,09%).

Al realizar el árbol filogenético, siguiendo la Máxima Verosimilitud y la Máxima Parsimonia, los resultados mostraron que esta cepa se encuentra dentro del género *Bacillus* (Figura 37), pudiendo ser una nueva especie. Las cepas de referencia fueron *B. vietnamensis* DSM 18898^T y *B. aquimaris* DSM 16205^T.

Esta cepa no necesitó de estudios de hibridación ADN-ADN, de acuerdo con los criterios establecidos por Meier-Kolthoff *et al.* (2013).

2.6. Género *Staphylococcus*.

La secuencia del gen del ARNr 16S de la cepa RA18^T tuvo una longitud de 1424 pb (Tabla 4). Al calcular las semejanzas de esta secuencia con todas las del género *Staphylococcus*, los resultados mostraron una semejanza del 99,08% con *S. warneri* CECT 236^T y del 98,58% con *S. pasteurii* CECT

5329^T, siendo los valores más altos. Estas dos cepas fueron seleccionadas como cepas de referencia.

El árbol filogenético creado por los métodos de Máxima Verosimilitud y Máxima Parsimonia mostró que la cepa RA18^T pertenecía al género *Staphylococcus*, pudiendo ser una nueva especie (Figura 38).

De acuerdo con Meier-Kolthoff *et al.* (2013), serán necesarios estudios de hibridación ADN-ADN entre las cepas RA18^T y *S. warneri* CECT 236^T, debido a que la semejanza entre ambas secuencias fue del 99,08%. Estos estudios se están realizando.

3. Análisis bioquímicos y nutricionales.

Para los análisis bioquímicos y nutricionales se utilizaron los sistemas API (Tabla 14) y Biolog, además de otros estudios realizados en placas (Tabla 5).

3.1. Género *Kushneria*.

Kushneria sp. EAod3^T fue positiva para la catalasa y negativa para la oxidasa. Fue capaz de hidrolizar almidón, caseína y ADN en placa. Mediante el sistema API Zym se demostró que la cepa EAod3^T presenta las enzimas fosfatasa alcalina, esterasa (C4), esterasa lipasa (C8), lipasa (C14), leucina arilamidasa, α -quimotripsina, fosfatasa ácida, naftol-AS-BI-fosfofohidrolasa, β -galactosidasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa y leucina aminopeptidasa. Esta cepa es positiva para la hidrólisis de esculina y producción de acetona (positiva para Voges-Proskauer) y es capaz de reducir los nitratos a nitritos, fermentar la D-glucosa, asimilar el gluconato potásico y el ácido málico.

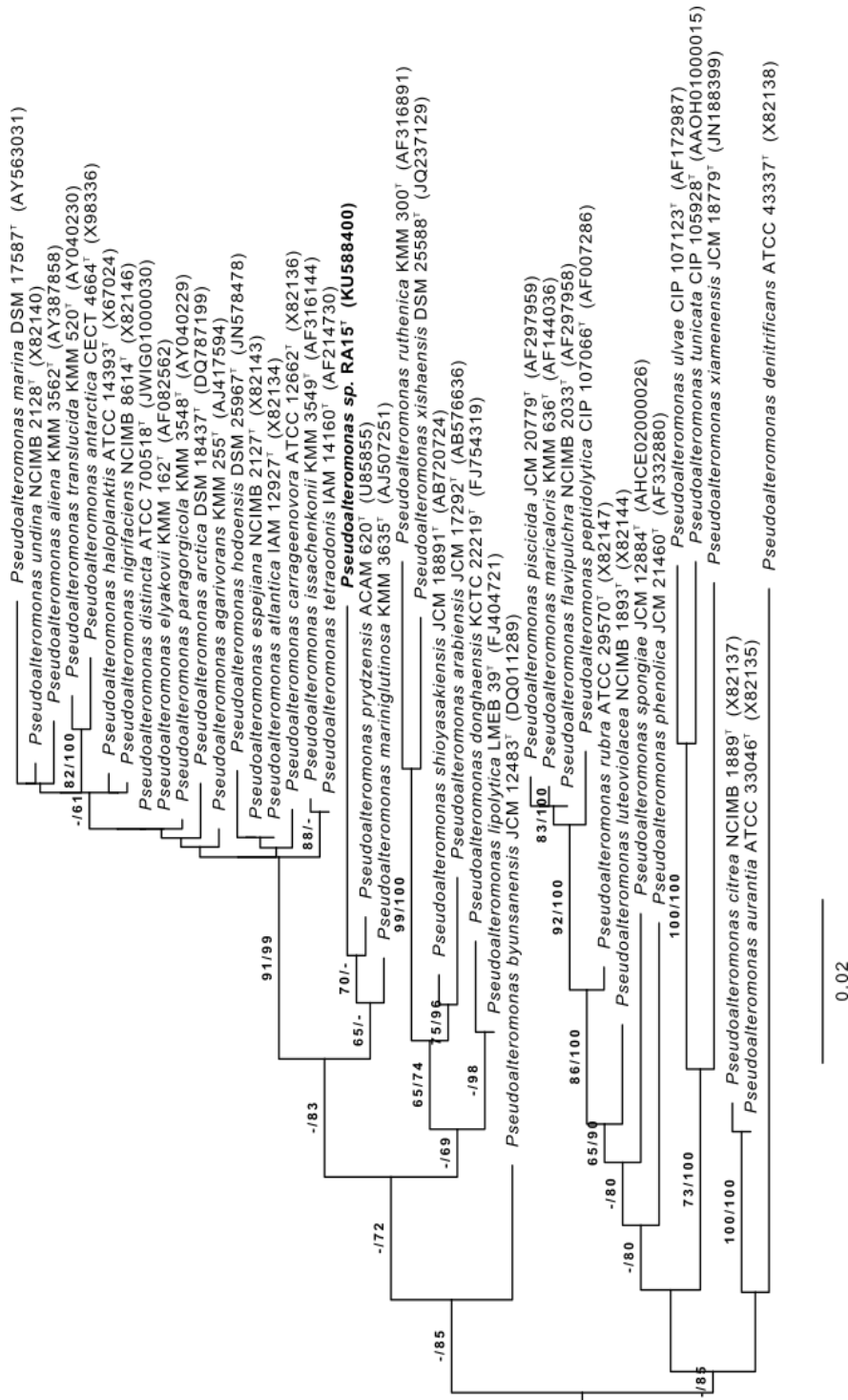


Figura 35. Árbol filogenético basado en la Máxima Parsimonia de las secuencias parciales de las secuencias del gen *ARNr* 16S de *Pseudoalteromonas* sp. RA15^T, más las cepas tipo de otras especies de *Pseudoalteromonas*. Entre paréntesis se indican los números de acceso de las secuencias.

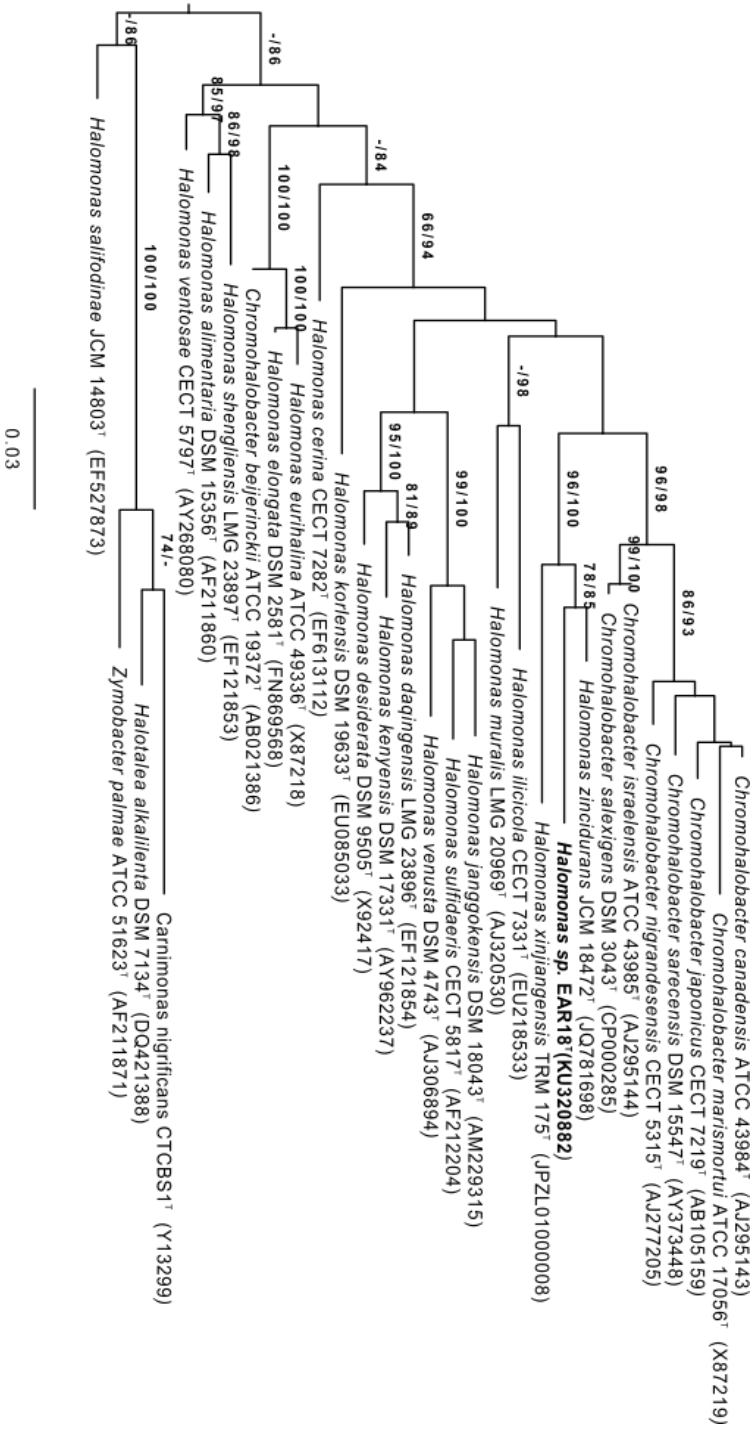


Figura 36. Árbol filogenético basado en la Máxima Parsimonia de las secuencias parciales de las secuencias del gen ARNr 16S de *Halomonas* sp. EAR18^T, más las cepas tipo de otras especies de *Halomonas*. Entre paréntesis se indican los números de acceso de las secuencias.

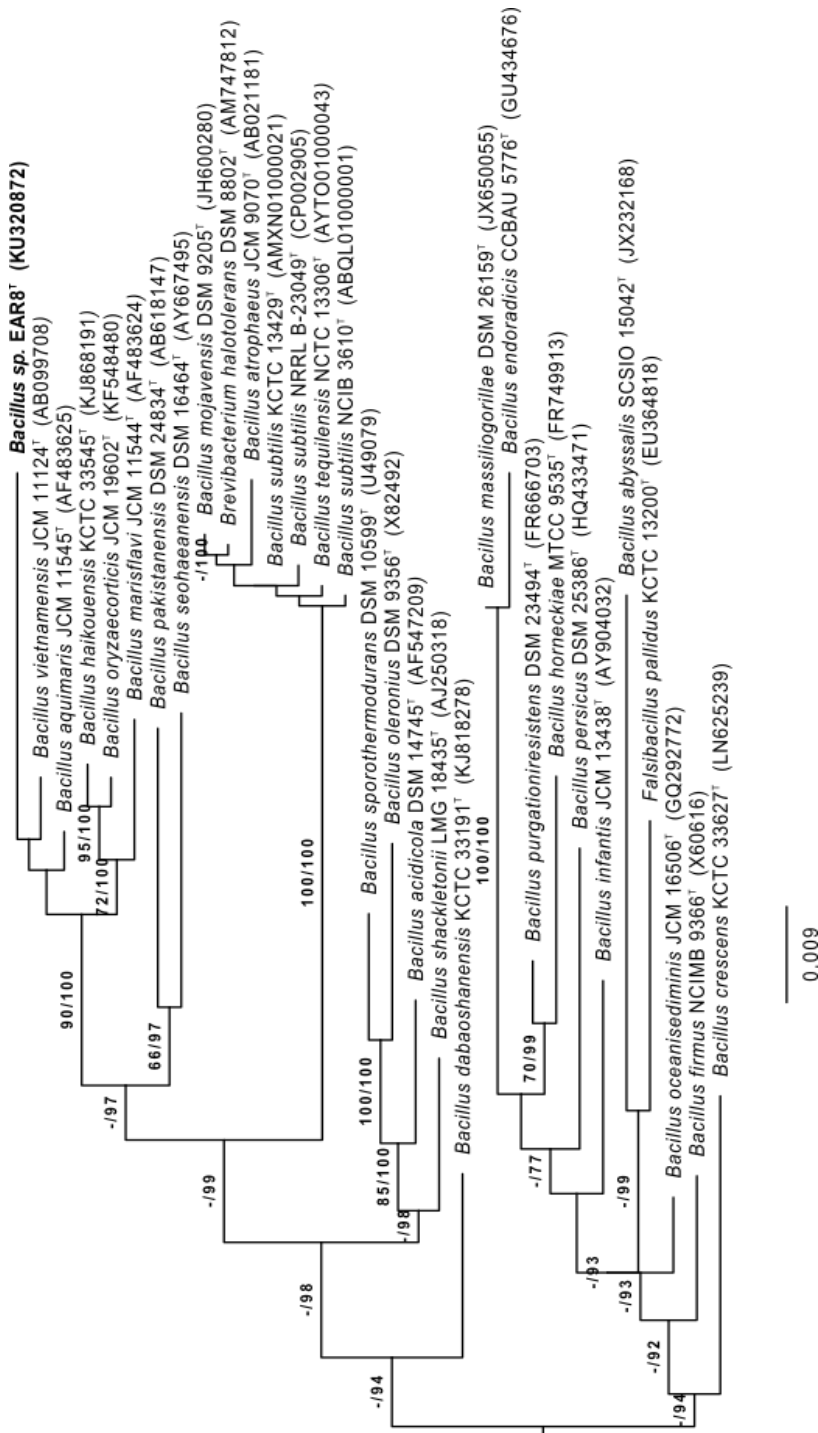


Figura 37. Árbol filogenético basado en la Máxima Parsimonia de las secuencias parciales de las secuencias del gen ARNr 16S de *Bacillus* sp. EAR8^T, más las cepas tipo de otras especies de *Bacillus*. Entre paréntesis se indican los números de acceso de las secuencias.

Además, produce ácidos a partir de la D-trehalosa. A partir de los datos obtenidos con el sistema Biolog, EAod3^T es capaz de oxidar D-maltosa, D-trehalosa, sacarosa, turanosa, D-glucosa, D-fructosa, D-galactosa, D-fucosa, inosina, lactato de sodio 1%, D-arabitol, glicerol, ácido L-glutámico, ácido L-piroglutámico, L-serina, pectina, ácido D-galacturónico, L-galactónico, ácido gamma lactona, ácido D-glucónico, ácido D-glucurónico, glucuronamida, ácido místico, ácido D-sacárico, ácido p-hidroxi-fenilacético, metil piruvato, ácido cítrico, ácido (D- y L-) málico, ácido bromo-succínico, ácido gamma-amino-n-butírico, ácido acetoacético, formiato sódico y ácido butírico. Además, crece en presencia de rifampicina, vancomicina, violeta de tetrazolio, azul de tetrazolio, niaproof 4, cloruro de litio, telurito de potasio y bromato de sodio.

La cepa EAod4^T fue positiva para la catalasa y negativa para la oxidasa. Fue capaz de hidrolizar en placa almidón, caseína y ADN. Las enzimas que presenta esta cepa fueron la fosfatasa alcalina, esterasa lipasa (C8), fosfatasa ácida, α -quimotripsina, α -glucosidasa, β -glucosidasa, arginina dihidrolasa, ureasa, leucina aminopeptidasa, pirrolodonalilamidasa, esterasa (C4), lipasa (C14), leucina arilamidasa, naftol-AS-BI-fosfosfohidrolasa y β -galactosidasa. Además, esta cepa dio positiva la hidrólisis de esculina y la producción de acetona (positiva para Voges-Proskauer). Puede reducir nitratos a nitritos, fermentar la D-glucosa y asimilar L-arabinosa, D-manosa, D-maltosa, gluconato potásico y ácido málico. Es capaz de producir ácidos a partir de la D-trehalosa. Los resultados obtenidos con el sistema Biolog mostraron que EAod4^T es capaz de oxidar dextrina, D-trehalosa, sacarosa, turanosa, D-glucosa, D-manosa, D-fructosa, D-galactosa, D-fucosa, inosina, lactato de sodio 1%, D-arabitol, glicerol, ácido L-glutámico, ácido L-piroglutámico, L-serina, pectina, ácido D-galacturónico, L-galactónico, ácido gamma lactona, ácido D-glucónico, ácido D-glucurónico, glucuronamida, ácido místico, ácido D-sacárico, ácido p-hidroxi-fenilacético, metil piruvato, ácido cítrico, ácido (D-

y L-) málico, ácido gamma-amino-n-butírico, ácido acético, formiato sódico y ácido butírico. Además, crece en presencia de rifampicina, lincomicina, vancomicina, violeta de tetrazolio, azul de tetrazolio, niaproof 4, cloruro de litio y bromato de sodio.

Por su parte, la cepa EAod7^T también fue positiva para la catalasa y negativa para la oxidasa. Hidroliza en placa el almidón y el ADN y presenta enzimas como la fosfatasa alcalina, esterasa (C4), esterasa lipasa (C8), lipasa (C14), leucina arilamidasa, fosfatasa ácida, α -glucosidasa, β -glucosidasa, leucina aminopeptidasa, α -quimotripsina, naftol-AS-BI-fosfosfohidrolasa, α -galactosidasa y β -galactosidasa. EAod7^T también fue positiva para la hidrólisis de esculina y también reduce los nitratos a nitritos. Es capaz de asimilar el D- manitol, el gluconato potásico y el ácido málico, además de producir ácidos desde la D-trehalosa. Los datos del sistema Biolog mostraron que esta cepa es capaz de oxidar los siguientes compuestos: D-maltosa, D-trehalosa, sacarosa, turanosa, D-glucosa, D-manosa, D-fructosa, D-galactosa, D-fucosa, inosina, lactato de sodio 1%, D-arabitol, glicerol, glicil L-prolina, ácido L-glutámico, L-serina, pectina, ácido D-galacturónico, L-galactónico, ácido gamma lactona, ácido D-glucónico, ácido D-glucurónico, glucuronamida, ácido múcico, ácido D-sacárico, ácido p-hidroxi-fenilacético, metil piruvato, ácido cítrico, ácido (D- y L-) málico, ácido gamma-amino-n-butírico, formiato sódico y ácido butírico. Además, crece en presencia de rifampicina, lincomicina, vancomicina, violeta de tetrazolio, azul de tetrazolio, niaproof 4 y bromato de sodio.

Tabla 14. Características bioquímicas de las cepas estudiadas como posibles especies nuevas basadas en los test API 20NE, API 20Strep y API Zym. (+) presencia de actividad; (-) ausencia de actividad.

	EAod3 ^T	EAod4 ^T	EAod7 ^T	EAR8 ^T	EAR18 ^T	RA15 ^T	RA18 ^T
Fosfatasa alcalina	+	+	+	+	+	+	-
Esterasa (C4)	+	+	+	+	+	+	-
Esterasa lipasa (C8)	+	+	+	+	+	+	+
Lipasa (C14)	+	+	+	-	-	-	+
Leucina arilamidasa	+	+	+	+	+	+	+
Valina arilamidasa	-	-	-	-	-	+	-
Cistina arilamidasa	-	-	-	-	-	+	-
Tripsina	-	-	-	-	-	+	-
α-quimotripsina	+	+	+	-	-	+	-
Fosfatasa ácida	+	+	+	+	+	+	+
Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	+	+	+	+	+	+	-
α-galactosidasa	-	-	+	-	-	+	-
β-galactosidasa	+	+	+	-	-	-	-
β-glucuronidasa	-	-	-	-	-	-	-
α-glucosidasa	+	+	+	+	-	+	+
β-glucosidasa	+	+	+	+	+	+	+
N-acetil-β-glucosaminidasa	-	-	-	-	-	+	-
α-manosidasa	-	-	-	-	-	-	-
α-fucosidasa	-	-	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer	+	+	-	+	-	+	+
Hidrólisis esculina	+	+	+	+	-	+	+
Pirolidonil arilamidasa	-	-	-	-	+	+	+
Leucina aminopeptidasa	+	+	+	-	-	+	-
Arginina dihidrolasa	-	-	-	-	+	+	+
Acidificación D-ribosa	-	-	-	-	-	+	-
Acidificación L-arabinosa	-	-	-	-	-	-	-
Acidificación D-manitol	-	-	-	-	-	-	-
Acidificación D-sorbitol	-	-	-	-	-	-	-
Acidificación D-lactosa	-	-	-	+	-	-	-
Acidificación D-trehalosa	+	+	+	+	-	+	+
Acidificación inulina	-	-	-	-	-	-	-
Acidificación D-rafinosa	-	-	-	-	-	-	-
Acidificación almidón	-	-	-	+	-	+	-
Acidificación glucógeno	-	-	-	-	-	+	-
Reducción nitratos	+/-nitritos	+/-nitritos	+/-nitritos	+/-nitritos	+/-nitritos	+/-nitritos	+/-N ₂
Producción indol	-	-	-	-	-	-	-
Fermentación glucosa	+	+	-	+	-	-	+
Ureasa	-	-	-	+	+	-	+
Hidrólisis gelatina	-	-	-	+	-	+	-
Asimilación D-glucosa	+	+	-	+	+	+	+
Asimilación L-arabinosa	-	+	-	+	-	+	-
Asimilación D-manosa	-	+	-	+	+	+	-
Asimilación D-manitol	-	-	+	+	-	+	+
Asimilación N-acetil-glucosamina	-	-	-	+	-	+	-
Asimilación D-maltosa	-	+	-	+	-	+	-
Asimilación gluconato potásico	+	+	+	-	+	+	+
Asimilación ácido cáprico	-	-	-	-	-	-	-
Asimilación ácido adípico	-	-	-	-	-	+	-
Asimilación ácido málico	+	+	+	+	-	+	-
Asimilación citrato de sodio	-	-	-	-	-	-	-
Asimilación ácido fenilacético	-	-	-	-	-	-	-
Oxidasa	-	-	-	-	-	+	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+

3.2. Género *Vibrio*.

La cepa EAod9^T es capaz de fermentar carbohidratos. Esta cepa es positiva para la catalasa y negativa para la oxidasa. Es capaz de reducir los nitratos a nitritos y fermenta la glucosa con producción de gases.

Es positiva para la prueba del Voges-Proskauer, del orto-nitrofenil- β -galactosidasa (ONPG), de las fosfatasas alcalina y ácida, de la leucina arilamidasa, β -glucosidasa y β -galactosidasa. Esta cepa fermenta glicerol, L-arabinosa, D-ribosa, D-galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, D-manitol, N-acetil-D-glucosamina, amigdalina, arbutina, esculina, salicina, D-celobiosa, D-maltosa, D-lactosa, D-sacarosa, D-gentibiosa y D-arabitol.

Las pruebas de la cepa RA1^T no han estado disponible antes de la finalización de esta Tesis.

3.3. Género *Pseudoalteromonas*.

La cepa *Pseudoalteromonas* sp. RA15^T fue positiva para la catalasa y para la oxidasa. Hidroliza en placa almidón, caseína, Tween80, quitina, pectina y ADN y presenta enzimas como la fosfatasa alcalina, esterasa (C4), esterasa lipasa (C8), leucina arilamidasa, valina arilamidasa, cistina arilamidasa, tripsina, α -quimotripsina, fosfatasa ácida, naftol-AS-BI-fosfosfohidrolasa, α -galactosidasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa, N-acetil- β -glucosaminidasa, pirolidonil arilamidasa, leucina aminopeptidasa y arginina dihidrolasa. Esta cepa también fue positiva para la hidrólisis de esculina y gelatina, para la prueba de Voges-Proskauer y también reduce los nitratos a nitritos. Es capaz de asimilar D-glucosa, L-arabinosa, D-manosa, D-manitol, N-acetil-D-glucosamina, D-maltosa, gluconato potásico, ácido adípico y ácido málico, además de producir ácidos desde la D-ribosa, D-trehalosa, almidón y glucógeno.

Además, esta cepa puede oxidar compuestos como dextrina, D-maltosa, D-trehalosa, D-celobiosa, β -gentiobiosa, sacarosa, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil- β -manosamina, N-acetil-D-galactosamina, D-glucosa, D-fructosa, D-galactosa, L-fucosa, L-ramnosa, inosina, lactato de sodio 1%, ácido fusídico, D-serina, D-manitol, D-glucosa-6-fosfato, D-fructosa-6-fosfato, gelatina, glicil L-prolina, L-alanina, L-arginina, ácido L-aspartico, ácido L-glutámico, L-histidina, L-serina, pectina, ácido D-galacturónico, L-galactónico, ácido gamma lactona, ácido D-glucónico, ácido D-glucurónico, ácido L-málico, tween 40, ácido α -ceto-butírico, ácido acetoacético, ácido propiónico y ácido acético. Además, crece en presencia de rifampicina, violeta de tetrazolio, azul de tetrazolio y telurito de potasio.

3.4. Género *Halomonas*.

La cepa EAR18^T del género *Halomonas* fue positiva para la catalasa y negativa para la oxidasa. No fue capaz de hidrolizar ningún sustrato en placa. EAR18^T presenta las enzimas fosfatasa alcalina, leucina arilamidasa, fosfatasa ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolasa, α -glucosidasa, pirolidonil arilamidasa, arginina dihidrolasa, ureasa, esterasa (C4), esterasa lipasa (C8) y β -glucosidasa. Es capaz de reducir los nitratos a nitritos y asimilar D-glucosa, D-manosa y gluconato potásico. No fue capaz de producir ácidos a partir de ninguno de los sustratos probados.

Los datos del sistema Biolog mostraron que esta cepa es capaz de oxidar los siguientes compuestos: N-acetil-D-glucosamina, D-glucosa, D-manosa, D-fructosa, D-galactosa, D-fucosa, L-ramnosa, inosina, lactato de sodio 1%, D-sorbitol, D-manitol, D-arabitol, mio-inositol, glicerol, L-alanina, L-arginina, ácido L-glutámico, L-histidina, ácido L-piroglutámico, L-serina, ácido D-galacturónico, L-galactónico, ácido γ -lactona, ácido D-glucónico, ácido D-glucurónico, ácido mícico, ácido quinínico, ácido D-sacárico, ácido p-hidroxi-fenilacético, metil piruvato, ácido L-láctico, ácido α -ceto-glutámico, ácido (D- y L-) málico, ácido bromo-succínico, ácido

γ -amino-n-butírico, ácido α -hidroxi-butírico, ácido β -hidroxi-butírico, ácido acético y formiato sódico. Además, crece en presencia de lincomicina, azul de tetrazolio y aztreonam.

3.5. Género *Bacillus*.

La cepa EAR8^T resultó ser positiva para la catalasa y para la prueba de Voges-Proskauer y negativa para la oxidasa. Hidroliza la caseína y el ADN en placa, además de la esculina y la gelatina. Presenta fosfatasa alcalina, esterasa (C4), esterasa lipasa (C8), leucina arilamidasa, fosfatasa ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa y ureasa. Reduce los nitratos a nitritos y es capaz de asimilar D-glucosa, L-arabinosa, D-manosa, D-manitol, N-acetil-D-glucosamina, D-maltosa y ácido málico, además de fermentar la D-glucosa. EAR8 forma ácidos a partir de D-lactosa, D-trehalosa y almidón.

Los resultados del sistema Biolog indican que la cepa EAR8^T puede oxidar dextrina, D-maltosa, D-trehalosa, sacarosa, β -metil-D-glucósido, D-salicina, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil- β -manosamina, D-glucosa, D-manosa, D-fructosa, D-fucosa, D-manitol, mio-inositol, glicerol, D-fructosa-6-fosfato, gelatina, glicil-prolina, L-arginina, ácido L-aspártico, ácido L-glutámico, L-histidina, ácido L-piroglutámico, L-serina, pectina, L-galactónico, ácido γ -lactona, ácido D-glucónico, ácido D-glucurónico, ácido D-sacárico, D-éster-metílico de ácido láctico, ácido L-láctico, metil piruvato, ácido cítrico, ácido α -ceto-glutámico, ácido L-málico, tween 40, ácido β -hidroxi-butírico, ácido acetoacético y ácido acético. Además, crece en presencia de cloruro de litio, telurito de potasio y aztreonam.

3.6. Género *Staphylococcus*.

Staphylococcus sp. RA18^T es positiva para las pruebas catalasa y Voges-Proskauer y negativa para la oxidasa. Presenta como enzimas a la esterasa lipasa (C8), lipasa (C14), leucina arilamidasa, fosfatasa ácida, α -glucosidasa, β -glucosidasa, pirrolidonil arilamidasa, arginina dihidrolasa y ureasa. No hidroliza ningún sustrato probado en placa, pero sí hidroliza la esculina en el sistema API 20NE. Reduce los nitratos a N₂ y es capaz de asimilar D-glucosa, D-manitol y gluconato potásico, además de fermentar la glucosa. Esta cepa produce una acidificación del medio en presencia de D-trehalosa.

Los resultados del sistema Biolog indican que esta cepa puede oxidar dextrina, D-maltosa, D-trehalosa, β -gentiobiosa, sacarosa, turanosa, β -metil-D-glucósido, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil- β -manosamina, D-glucosa, D-manosa, D-fructosa, 3-metil-D-glucosa, inosina, lactato de sodio 1%, D-serina, D-manitol, D-arabitol, D-fucosa, D-manitol, glicerol, D-fructosa-6-fosfato, L-alanina, L-arginina, ácido L-aspártico, ácido L-glutámico, L-histidina, ácido L-piroglutámico, L-serina, pectina, ácido D-glucónico, ácido D-sacárico, metil piruvato, ácido L-láctico, ácido α -ceto-glutámico, ácido α -hidroxi-butírico, ácido acetoacético, ácido propiónico, ácido acético y ácido butírico. Además, crece en presencia de cloruro de litio, telurito de potasio, ácido nalidíxico y aztreonam.

4. Análisis quimiotaxonómicos.

El estudio de los lípidos polares de todas las cepas problema aún se están llevando a cabo, y el análisis de las quinonas sólo está disponible, por el momento, para las cepas de *Kushneria*.

Tabla 15. Perfil de ácidos grasos más abundantes (%) presentes en las cepas problemáticas en comparación con las cepas tipo de referencia de cada género. (-) ausencia del ácido graso.

Cepas	12:0 3OH	15:0 iso	15:0 anteiso	16:0	16:1 w7c/ 6c	17:0	17:0 anteiso	17:0 iso	17:1 w8c	17:0 ciclo	18:0	18:1 w7c	19:0 ciclo w8c	20:0
EAo03	9,2	-	-	26,4	13,7	-	0,5	-	-	-	0,5	44,8	-	-
EAo04	8,9	-	-	26,3	12,9	-	0,3	-	-	-	0,5	45,3	-	-
EAo07	8,7	-	-	26,9	13	-	0,3	-	-	-	0,4	44,6	-	-
<i>K. marisflavi</i> DSM 15357 ^r	8,4	-	-	30,7	7,6	-	0,3	-	-	1,1	1,6	39	3,7	-
<i>K. indolina</i> CECT 5902 ^r	8,1	-	-	22,7	11,2	-	0,5	-	-	0,3	0,5	49,8	1,5	-
<i>K. pakistanensis</i> KCTC 42082 ^r	9,8	-	-	23,7	9,1	-	0,3	-	-	-	0,8	49,3	-	-
RA15	5,2	-	0,2	12,2	35,3	4,5	0,7	0,6	16,7	-	0,8	6,38	-	-
<i>P. pydzensis</i> DSM 14232 ^r	6,3	-	0,5	20,8	38,7	2,7	1,2	0,5	7,9	-	0,8	4,7	-	-
<i>P. mariniglutinosa</i> DSM 15203 ^r	6,4	-	-	16,7	33,3	3,7	1,2	-	11,7	-	1,1	4,7	-	-
EAR18	8,1	-	-	19,1	6,3	0,6	0,3	0,5	-	9,4	0,8	15	26,7	-
<i>H. xinjiangensis</i> KCTC 22608 ^r	7	-	-	7,4	23,7	-	0,7	-	-	1,2	0,6	47,2	1,9	-
EAR8	-	21,6	52,1	0,8	-	-	5,7	0,6	-	-	0,3	-	-	-
<i>B. aquimaris</i> DSM 16205 ^r	-	19,9	34,8	2,4	-	-	16,5	4,3	-	-	2,9	-	-	3,4
RA18	-	5,9	42,3	2,9	-	0,8	13,6	10,6	-	-	7,5	-	-	6,5
<i>S. warneri</i> CECT 236 ^r	-	3,5	44,4	1,1	-	-	19,2	6,1	-	-	5,7	-	-	6,5
<i>S. pasteurii</i> CECT 5329 ^r	-	3,6	49,5	1,7	-	-	18,1	4,2	-	-	5,2	-	-	6,6

4.1. Género *Kushneria*.

Las cepas EAod3^T, EAod4^T y EAod7^T mostraron como quinona mayoritaria la Q9, con los valores de 84,4%, 85,3% y 85%, respectivamente, al igual que todas las especies del género *Kushneria* (datos no mostrados).

Por otro lado, contenían como ácidos grasos mayoritarios C_{16:0}, C_{16:1}ω7c/ C_{16:1}ω6c y C_{18:1}ω7c, presentes en las tres cepas estudiadas y en las utilizadas de referencia (Tabla 15).

En cuanto a los lípidos polares, las tres cepas estudiadas mostraron difosfatidilglicerol (DPG), fosfatidilglicerol (PG) y fosfatidiletanolamina (PE), además de un aminoglicolípido no identificado (AGL) y otros fosfolípidos no identificados (PL) (Figura 39A, B y C).

4.2. Género *Vibrio*.

Para las cepas del género *Vibrio*, sólo se realizó el estudio de los ácidos grasos. Los resultados mostraron que los principales ácidos grasos presentes en la cepa EAod9^T fueron C_{16:1} (43%) y C_{16:0} (20%), seguidos por C_{18:1} (13%). En menores cantidades también se encontraron C_{12:0}, C_{12:0} 3OH y C_{14:0} (4-6%).

Las pruebas de la cepa RA1^T no han estado disponibles antes de la finalización de esta Tesis.

4.3. Género *Pseudoalteromonas*.

La cepa RA15^T presentó C_{16:0}, C_{16:1}ω7c/ C_{16:1}ω6c y C_{17:1}ω8c como los principales ácidos grasos, al igual que sus cepas de referencia (Tabla 15).

Los lípidos polares mostrados por esta cepa fueron fosfatidilglicerol y fosfatidiletanolamina (Figura 39D).

Los resultados de las quinonas no se encuentran disponibles aún.

4.4. Género *Halomonas*.

La cepa *Halomonas* sp. EAR18^T presentó como ácidos grasos mayoritarios C_{16:0} y C_{19:0} ciclo ω8c, aunque la cepa de referencia *H. xinjiangensis* KCTC 22608^T mostró como mayoritarios los ácidos grasos C_{16:1}ω7c/ C_{16:1}ω6c y C_{18:1}ω7c (Tabla 15). El análisis de los ácidos grasos de la cepa de referencia *H. zincidurans* JCM 18472^T aún se está realizando.

Esta cepa mostró como lípidos polares a difosfatidilglicerol, fosfatidilglicerol y fosfatidiletanolamina, junto con algunos fosfolípidos no identificados (Figura 39E).

Las quinonas presentes en dicha cepa aún se están analizando.

4.5. Género *Bacillus*.

Al ser una bacteria Gram positiva, a la cepa EAR8^T se le analizó la presencia de ácido diaminopimérico. El resultado obtenido en la cromatografía mostró que la cepa *Bacillus* sp. EAR8^T presenta el isómero LL-diaminopimérico (Figura 40).

En cuanto a los ácidos grasos presentes en dicha cepa, los principales fueron C_{15:0} iso y C_{15:0} anteiso (Tabla 15). La cepa de referencia *B. aquimaris* DSM 16205^T mostró además C_{17:0} anteiso como mayoritario (Tabla 15). Aún faltan por analizar los datos obtenidos de la cepa de referencia *B. vietnamensis* DSM 18898^T.

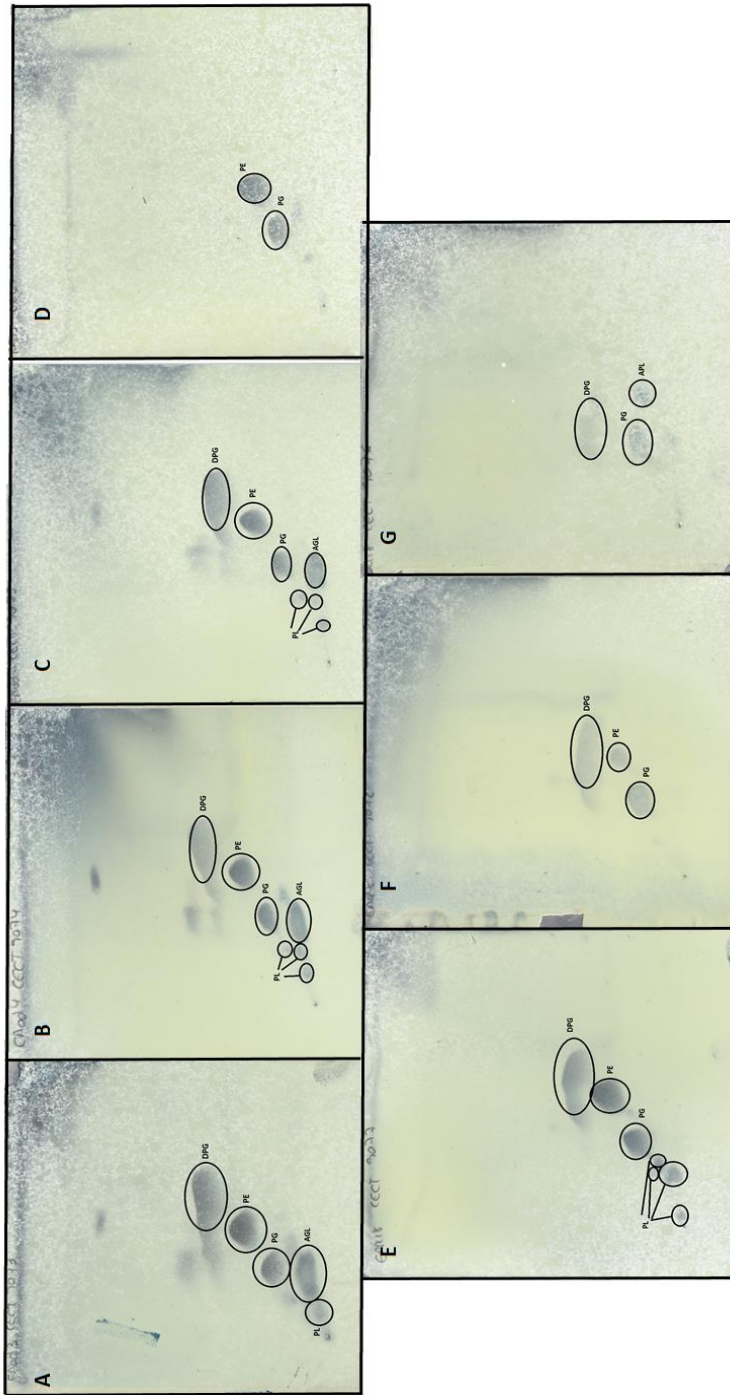


Figura 39. Perfiles de los lípidos polares totales de las cepas EAod3^T (A), EAod4^T (B), EAod7^T (C), RA15^T (D), EAR18^T (E), EAR8^T (F) y RA18^T (G).



Figura 40. Placa cromatográfica revelada que muestra los datos obtenidos para del ácido diaminopimérico (DAP). La solución estándar estaba formada por los isómeros meso-diaminopimérico (marcado como 1) y LL-diaminopimérico (marcado con el 2). Las flechas señalan la banda que corresponde al isómero de cada cepa.

Los lípidos presentes en EAR8^T fueron difosfatidilglicerol, fosfatidilglicerol y fosfatidiletanolamina (Figura 39F).

Las quinonas respiratorias mayoritarias se están analizando, junto con el estudio de los azúcares de membrana.

4.6. Género *Staphylococcus*.

Como RA18^T es una bacteria Gram positiva también se analizó la presencia del ácido diaminopimérico. Al contrario que la cepa *Bacillus* sp. EAR8^T, esta cepa mostró el isómero meso-diaminopimérico (Figura 40).

En cuanto a los ácidos grasos, los principales fueron C_{15:0} anteiso y C_{17:0} anteiso, tanto en la cepa problema como en las de referencia (Tabla 15).

Los lípidos polares mostrados fueron difosfatidilglicerol, fosfatidilglicerol y un aminofosfolípido no identificado (APL) (Figura 39G).

Los resultados de las quinonas y azúcares de membrana aún se están analizando.



DISCUSIÓN

1. *Arthrocnemum macrostachyum* como herramienta para la fitorremediación de metales pesados.

Para la revegetación de una zona contaminada deben utilizarse plantas capaces de crecer en presencia de los contaminantes, capaces de propagarse por sí mismas de manera rápida y, sobre todo, que permanezcan durante un período de tiempo muy amplio en el ecosistema (Méndez y Maier, 2008). En base a estas indicaciones, se diseñó una estrategia para las marismas de los ríos Tinto y Odiel en la que se utilizaran plantas de *Spartina* para hacer una repoblación rápida de las marismas y posteriormente plantas más robustas y que fueran más duraderas en el tiempo. Esta segunda planta podría ser *A. macrostachyum*, ya que, como se ha mencionado previamente, es una planta hipertolerante e hiperacumuladora de Cd (Redondo-Gómez *et al.*, 2010b) y capaz de captar múltiples elementos traza (Conesa y Schulin, 2010; Madejón *et al.*, 2009).

Parece cada vez más evidente que los microorganismos presentes en el suelo y aquellos capaces de colonizar los tejidos de las plantas juegan un importante papel en el desarrollo de las mismas, especialmente en ambientes contaminados, entre otros, por metales pesados (Mesa *et al.*, 2015a; b; c; Wan *et al.*, 2012). Por ello, uno de los objetivos del presente trabajo era estudiar las bacterias de la microbiota de plantas de *A. macrostachyum* en las marismas del Odiel. Como antecedentes a este trabajo sólo cabe mencionar el estudio del papel ecológico de las micorrizas en la rizosfera de *A. macrostachyum* en marismas contaminadas del Mediterráneo (Carrasco *et al.*, 2006) y, más recientemente, el estudio mediante pirosecuenciación de la diversidad de endofitos y epifitos presentes en dichas plantas (Mora-Ruiz *et al.*, 2015; 2016).

El número de aislamientos que se correspondían con bacterias Gram positivas en la rizosfera fue superior al presente en el interior de los tejidos de la

planta, especialmente del género *Bacillus*. Este hecho es común en estudios de diversidad de suelos (Garbeva *et al.*, 2003). El género *Bacillus* es uno de los más predominantes en la rizosfera (Singh *et al.*, 2007), encontrándose en lugares contaminados (Abou-Shanab *et al.*, 2007; Roane y Kellogg, 1996) debido a su capacidad de tolerar metales y sal (Nies y Silver, 2007).

Como se mencionó en la Introducción de este trabajo, la entrada de los endofitos en el interior de la planta tiene lugar a través de las raíces secundarias principalmente (Dong *et al.*, 2003; Lamb *et al.*, 1996), por lo que no es extraño que el 39% de las bacterias rizosféricas también se encuentren en el interior de la raíz de la planta.

Por otro lado, la cantidad de bacterias aisladas de la parte aérea fue inferior al de bacterias aisladas de la raíz o de la rizosfera, hecho que podría ser debido a la gran concentración de sal presente en la filosfera de *A. macrostachyum* (Redondo-Gómez *et al.*, 2010a), y que coincide con lo observado por Mora-Ruíz *et al.* (2015), esto es, una disminución de la abundancia en el patrón microbiano con el incremento en la concentración de sal. Las bacterias aisladas de la parte aérea son totalmente diferentes de los aislamientos de la misma planta crecida en una zona no contaminada con metales (marismas de Lebrija) y que han sido también objeto de estudio en el presente trabajo. Este dato indica que la diversidad de los endofitos varía dependiendo de la localización de la planta (Mora-Ruíz *et al.*, 2015) y debe estar influenciada por los niveles de contaminación del suelo en el que crecen. Los géneros más abundantes en la filosfera de la planta fueron *Kushneria* y *Halomonas*. Estos géneros también fueron los más representados entre los aislados de la filosfera en plantas de la familia *Amaranthaceae*, siendo el género *Kushneria* exclusivo como endofito en todas las muestras (Mora-Ruíz *et al.*, 2015), resultados que coinciden con los de la presente Tesis Doctoral.

En este trabajo se ha observado la presencia de actividades enzimáticas en las bacterias aisladas, que son importantes para penetrar en la planta (en el caso de los endofitos) y, también, para degradar los residuos de la planta y adquirirlos como nutrientes (Wang y Dai, 2010). Las enzimas más importantes son la celulasa, la pectinasa y la quitinasa, que están presentes tanto en las bacterias rizosféricas como en las endofíticas. La actividad quitinasa producida por las bacterias podría incrementar la resistencia de la planta a hongos (Quecine *et al.*, 2012; Trotel-Aziz *et al.*, 2008) y esta actividad se encontraba mayoritariamente en las bacterias de la rizosfera. Por otro lado, la actividad celulasa apareció con mayor frecuencia en los endofitos, lo que les permitiría degradar la pared celular vegetal y entrar en la planta. La movilidad también fue más frecuente entre los endofitos, una ventaja para poder desplazarse a través de los tejidos de la planta (Compant *et al.*, 2010).

La presencia de un bajo porcentaje de identidad de algunas bacterias podría indicar que pertenecen a nuevas especies no descritas, mostrando la gran diversidad desconocida de bacterias presentes en las marismas del Odiel, como se mostró en el Capítulo 3.

En cuanto a la tolerancia a la sal, las bacterias aisladas eran capaces de crecer en altas concentraciones de sal, por lo que fueron consideradas halófilas o halotolerantes. Las bacterias que toleraban la mayor concentración de sal fueron aisladas de la parte aérea de la planta, probablemente debido a que *A. macrostachyum* acumula la sal en su parte aérea (Redondo-Gómez *et al.*, 2010a).

Con respecto a la resistencia a metales pesados de las bacterias aisladas, la mayoría fueron multirresistentes y un gran número de ellas resistía elevadas cantidades de As, Cu, Pb y Zn, los contaminantes más relevantes en las marismas de Odiel (Nieto *et al.*, 2007; Sáinz y Ruíz, 2006). Muchas de las cepas crecieron en presencia de altas concentraciones de Pb (8->10 mM), siendo la mayoría endofitos

aislados de la parte aérea de la planta. EAod3, EAod4 y EAod10 fueron las cepas más resistentes al Pb llegando a tolerar hasta 20 mM. Estudios previos indican que esta planta acumula grandes cantidades de Pb ($100\text{-}960\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) en su parte aérea (Álvarez-Rogel *et al.*, 2004; Conesa y Schulin, 2010; García *et al.*, 2003; Méndez y Maier, 2008). Esto podría indicar que estos endofitos pueden ayudar a la planta a captar este metal de las áreas contaminadas. También se ha descrito que *A. macrostachyum* acumula gran cantidad de Cd en sus estructuras subterráneas (Redondo-Gómez *et al.*, 2010b) y algunas de las cepas más resistentes al Cd, EAR8, EAR15 y EAR18 (2 mM), fueron aisladas de la raíz. El As fue el metal más tolerado por las bacterias aisladas, ya que muchas de las cepas toleraban altas concentraciones ($8\text{-}10\text{ mM}$). En general, las bacterias rizosféricas mostraron mayor resistencia a los metales pesados que los endofitos.

La presencia de propiedades PGP se estudió en todas las bacterias aisladas y, al menos, una de estas propiedades estuvo presente en cada una de ellas. El 86% de las bacterias producían sideróforos, siendo RA1 la mayor productora. Los sideróforos producidos por estas bacterias podrían influir en la captación de metales pesados por las plantas (Gururani *et al.*, 2012), además de servir como un mecanismo de biocontrol (Gaiero *et al.*, 2013). Otra característica que presentan las bacterias productoras de sideróforos es la propiedad antifúngica (Li *et al.*, 2010). Otra propiedad PGP importante es la producción de auxinas ya que, como se ha citado en el apartado de introducción, ayudan al desarrollo de las raíces (Brader *et al.*, 2014; Lambrecht *et al.*, 2000). Muchas de las bacterias aisladas eran productoras de IAA, siendo EAod10 la de mayor producción (hasta $9,05\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Esta propiedad contribuye a incrementar la extensión y la profundidad del sistema radicular, lo cual es una característica imprescindible para la fitorremediación (Méndez y Maier, 2008). Las mejores solubilizadoras de fosfato, propiedad

importante para hacer disponible el fósforo para las plantas (Frey-Klett *et al.*, 2005; Hameeda *et al.*, 2008), fueron EAod3 y EAod8 (17 mm de diámetro). La fijación de nitrógeno también estuvo presente en casi la mitad de las bacterias aisladas, que podrían proveer a la planta de nitrógeno (Bhattacharyya y Jha, 2012). La propiedad PGP que menos se observó fue la formación de biopelículas (16% de las bacterias). Esta característica puede estar relacionada con la capacidad de las bacterias de eliminar los metales pesados del medio (Das *et al.*, 2012). Es importante hacer notar que la resistencia a metales pesados de algunas especies bacterianas es diferente cuando crecen aisladas o formando biopelículas (Teitzel y Parsek, 2003).

En presencia de metales pesados, hubo una disminución en el número de bacterias que presentaban propiedades PGP. Sin embargo, hubo algunas propiedades, como la solubilización de fosfato o la producción de IAA, donde se incrementó el número de bacterias que las tenían en presencia de Cd y As, respectivamente. En el caso del As, la producción de IAA se incrementó bastante hasta alcanzar valores de $33,54 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (EAod10), mientras que, en presencia de Cd, aumentó el número de aislados que solubilizaban fosfato. Este efecto de los metales pesados sobre la producción de propiedades PGP también ha sido estudiado recientemente por Mesa *et al.* (2015a) y por Mendoza-Hernández *et al.* (2016), observándose en ambos casos resultados similares y concluyendo que los metales pesados afectan a las propiedades PGP de una manera impredecible. Estos datos son importantes para tratar de conocer el comportamiento real de las bacterias en los suelos contaminados.

Diversos autores han probado que el uso de las poblaciones microbianas, tanto de la rizosfera (Mesa *et al.*, 2015b; Pajuelo *et al.*, 2014) como de la endosfera (Doty, 2008; Mesa *et al.*, 2015c; Newman y Reynolds, 2005; Rajkumar *et al.*, 2009), hacen más eficiente la fitorremediación. Por ello, se seleccionaron cuatro bacterias

aisladas de la rizosfera y cuatro endofitos (dos procedentes de la parte aérea y dos de la raíz) con el fin de hacer dos consorcios diferentes y ver sus efectos en la germinación y en el crecimiento de las plantas en situación de contaminación, utilizando para ello suelos de las marismas del Odiel.

Uno de los cuellos de botella a la hora de implementar proyectos de fitorremediación *in situ* es el bajo porcentaje de germinación que se observa en presencia de metales pesados (Sethy y Ghosh, 2013). Para mejorar este problema, la inoculación bacteriana aceleró la germinación de *A. macrostachyum* en ausencia y, particularmente, en presencia de metales pesados, mostrando mayor nivel de germinación en pocos días. La mejora en la germinación en presencia de metales pesados gracias a la inoculación con bacterias también se ha observado recientemente con semillas de *Spartina densiflora*, otra planta halófila presente en las marismas del Odiel (Paredes-Páiz *et al.*, 2016b). Ambos consorcios (CR y CE) aceleraron la germinación en presencia de pequeñas concentraciones de metales, mientras que en ausencia de estos, la aceleración solo fue relevante en aquellas semillas inoculadas con el consorcio rizosférico. Este efecto beneficioso del consorcio rizosférico se podría explicar por la presencia de actividades enzimáticas, como la pectinasa y la quitinasa, que son importantes para romper la pared celular y podría contribuir a mejorar la hidratación de las semillas. En presencia de metales, el IAA producido por ambos consorcios puede actuar como un antagonista contra el etileno producido por las semillas en condiciones de estrés por metales (Burd *et al.*, 2000), contribuyendo así a la mejora de la germinación. Estos resultados claramente sugieren que las bacterias seleccionadas podrían utilizarse como inoculantes para favorecer el establecimiento de *A. macrostachyum* en marismas contaminadas con metales pesados, usando semillas para la propagación de la planta.

En los ensayos en plantas, los resultados de los análisis de los metales confirman, como han descrito diversos autores (Conesa y Schulín, 2010; Pérez-Sirvent *et al.*, 2008; Redondo-Gómez *et al.*, 2010b), que *A. macrostachyum* es capaz de acumular grandes cantidades de metal en sus tejidos, concretamente en las raíces. En este trabajo, la inoculación de las plantas con los consorcios bacterianos favoreció esta capacidad de *A. macrostachyum* para acumular metales en las raíces. Varios autores han observado que las poblaciones microbianas (incluyendo bacterias rizosféricas y endofíticas) podrían ser de gran importancia en el ciclo de los elementos traza entre el suelo y los compartimentos de las plantas, mediante la liberación de agentes quelantes, la acidificación, la solubilización de fosfato y los cambios redox (Gadd, 2004; Ullah, 2015), pudiendo jugar un papel importante en la movilidad y la absorción de metales por la planta (Glick, 2010), por lo que es posible que estos mecanismos puedan contribuir a la mejora del potencial fitoestabilizador de *A. macrostachyum* mediante el incremento del contenido de metal en sus raíces. De los dos consorcios, el consorcio CE demostró tener un efecto mejor a la hora de acumular metales en las raíces. Esto puede ser debido a que los endofitos que forman este consorcio podrían tener cierta capacidad de captación de metales a través de uniones inespecíficas de los cationes de la superficie de la bacteria o por un mecanismo de captación intracelular dependiente del metabolismo (Gadd y Griffiths, 1978), y podrían contribuir a mejorar el transporte de metales al interior de las plantas, ya que algunos de ellos también presentan movilidad.

A veces el potencial de las plantas empleadas como herramientas en la remediación de metales está comprometido por la inhibición del crecimiento debido al incremento de la toxicidad de los metales en los tejidos, y especialmente cuando esta acumulación ocurre en los tejidos fotosintéticos que son más sensibles al exceso de metales (Mateos-Naranjo *et al.*, 2008; Pérez-Romero *et al.*, 2016). En

relación a este problema, Redondo-Gómez *et al.* (2010b) mostraron que el incremento de la concentración de Cd en los tejidos de *A. macrostachyum* se acompañó de una reducción del 25% de la biomasa después de un mes de crecimiento en el invernadero en presencia de 1,35 mM de Cd. Por el contrario, los experimentos de esta Tesis muestran que el incremento de la concentración de los metales en las raíces de ambos tratamientos y en los tallos de las plantas inoculadas con el consorcio CE no causa inhibición del crecimiento. De hecho, las plantas tratadas con ambos consorcios tendieron a incrementar su biomasa. Esta respuesta podría ser ocasionada por la presencia de propiedades PGP en las bacterias que forman ambos consorcios y/o por la reducción bacteriana de la fitotoxicidad de los metales en la planta hospedadora (Haferburg y Kothe, 2007). Una de estas propiedades presentes en ambos consorcios bacterianos es la producción de auxinas, implicadas en la división celular, la elongación y la diferenciación de los tejidos de las plantas (Patten y Glick, 2002), además de tener un papel principal en el crecimiento de la raíz y la formación de las raíces laterales (Ljung, 2013; Remans *et al.*, 2008; Zhao, 2010), por lo que podría contribuir a explicar el mejor crecimiento de las plantas de *A. macrostachyum* en presencia de ambos consorcios. Estos resultados ya fueron observados en otros trabajos, donde el crecimiento de las plantas mejoró después de la inoculación con bacterias rizosféricas y endofíticas (Abou-Shanab *et al.*, 2003; Mesa *et al.*, 2015b).

Con respecto a la reducción bacteriana de la fitotoxicidad del metal en las plantas, hay trabajos que indican que las bacterias resistentes a metales pueden disminuir el estrés del metal en las plantas (Ahemad y Kibret, 2014; Mesa *et al.*, 2015a, b; Rajkumar *et al.*, 2012; Ullah *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2009). Como se ha visto en los resultados, las cepas EAod10, EAR18 y RA8 presentan la habilidad de formar biopelículas y esto podría contribuir a hacer que la fitotoxicidad decreciera

mediante el secuestro de metales y de minimizar el traspaso de excesivo metal a los tallos. Además, se ha descrito que los contaminantes tóxicos tomados por la planta podrían ser degradados dentro de la misma planta por los endofitos (Khan y Doty, 2011), aunque los mecanismos no son bien conocidos. Otros efectos bacterianos beneficiosos para la tolerancia de la planta a los metales se han relacionado con el ajuste osmótico, la modulación de los sistemas antioxidantes y la mejora de la captación de minerales (Compant *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2015; Rajkumar *et al.*, 2009), tanto como la protección de las funciones fotosintéticas (Mesa *et al.*, 2015b; Rincon *et al.*, 2008). Con respecto al impacto de la inoculación en el aparato fotosintético de *A. macrostachyum*, los resultados obtenidos en esta Tesis muestran que los valores de la A_N , la g_s y la C_i fueron mayores en las plantas que crecieron en presencia de los consorcios bacterianos. Además, los valores de la F_v/F_m y de la Φ_{PSII} a mediodía no variaron con los tratamientos de bioaumentación con respecto al control. Estos resultados sugieren que el incremento de crecimiento podría ser atribuido a la mejora de la asimilación fotosintética de carbono de las plantas de *A. macrostachyum* crecidas en los suelos bioaumentados.

Además, otro efecto fisiológico durante este estudio fue la modulación diferencial de las respuestas antioxidantes de las plantas de *A. macrostachyum* crecidas en los sedimentos bioaumentados. La toxicidad de los metales en las plantas induce la generación de ROS y como consecuencia daños oxidativos, que afectan al crecimiento y al desarrollo de la planta (Redondo-Gómez *et al.*, 2011). Sin embargo, las plantas tienen la habilidad de modular estos daños con la presencia de actividades enzimáticas como la ascorbato peroxidasa (APx), catalasa (CAT), guaiacol peroxidasa (GPx) y superóxido dismutasa (SOD), que contribuyen a mantener la homeostasis de los altos niveles de ROS (Dazy *et al.*, 2009; Mesnoua *et al.*, 2016; Redondo-Gómez *et al.*, 2011). Las actividades de estas enzimas antioxidantes, tanto en tallo como en raíces de *A. macrostachyum*, se vieron

significativamente afectadas por la inoculación con las bacterias. Así, hubo un incremento de las actividades de la SOD y la GPx en las plantas inoculadas con el consorcio CE, sugiriendo que la inoculación con endofitos podría contribuir a reducir el estrés oxidativo derivado de las grandes cantidades de metales acumuladas en el interior de estas plantas. De esta manera, la SOD puede convertir los radicales superóxidos en H_2O_2 , mientras que la GPx puede catalizar la descomposición de H_2O_2 en H_2O (Dazy *et al.*, 2009; Qiu *et al.*, 2008), pudiendo contribuir a mantener la función fotosintética (Redondo-Gómez *et al.*, 2011), a pesar de los altos niveles de metal dentro de las plantas de *A. macrostachyum*. Por otro lado, las actividades de la APx, CAT, GPx y SOD en las raíces fueron significativamente menores en las plantas crecidas con el consorcio CE, comparadas con las que crecieron inoculadas con el consorcio CR y las plantas control. Esta respuesta sugiere que los endofitos podrían contribuir en la modulación de los niveles de estrés por metal en las raíces, como ya se vio en plantas de *Solanum nigrum* inoculadas con el endofito *Serratia* sp. RSC-14 (Khan *et al.*, 2015). Es posible, como previamente se indicó, que en cierto grado los metales acumulados en el interior las raíces pudieran ser secuestrados por los endofitos, evitando su interacción con los procesos esenciales del metabolismo de las plantas de *A. macrostachyum*, aunque esta hipótesis necesitaría estudios con mayor profundidad.

2. *Arthrocnemum macrostachyum* como herramienta de fitodesalinización.

Con respecto a la salinización, en esta Tesis Doctoral se ha tratado de elucidar el papel de un grupo de endofitos seleccionados, aislados de *A. macrostachyum*, en la tolerancia de esta planta al estrés salino en dos fases de su ciclo de vida: la germinación y el desarrollo de la planta. Para este propósito, se aislaron de plantas de *A. macrostachyum*, crecidas en suelos afectados por la sal,

ocho bacterias endofitas, pertenecientes al género *Bacillus* y a otros géneros relacionados. Como se ha dicho anteriormente, estos géneros son aislados frecuentemente a partir de suelos degradados debido a su capacidad para tolerar contaminantes y altas concentraciones de sal (Abou-Shanab *et al.*, 2007; Mesa *et al.*, 2015b) y, además, el género *Bacillus* ha sido aislado previamente como endofito de otras plantas (Qin *et al.*, 2014). Durante esta Tesis, también se han aislado 11 cepas de la filosfera de esta planta crecida en las marismas del Odiel. Aunque estas cepas fueron completamente distintas a las descritas en este apartado, la gran mayoría de ellas también pertenecían a sólo un par de géneros. El alto nivel de concentración de NaCl en la filosfera de esta halófito (Redondo-Gómez *et al.*, 2010a) podría explicar el pequeño número de aislamientos y la reducida biodiversidad encontrada, ya que, como se ha comentado anteriormente, el incremento de sal disminuye la diversidad de las bacterias (Mora-Ruíz *et al.*, 2015). Debido a la alta concentración de sal en la filosfera de esta planta, no es de extrañar que todas las cepas aisladas fueran halotolerantes y que incluso alguna fuera halófila. Además, todas las cepas presentaron los genes *etcBC* y *betB* para la síntesis de solutos compatibles, que podrían estar relacionados con la gran tolerancia a la sal presentada.

Todas las cepas presentaban actividades enzimáticas, incluyendo celulasas, quitinasas y pectinasas, gracias a las cuales las cepas podrían haber entrado en los tejidos de la planta y haberse establecido como endofitos, ayudados también por la movilidad (Compant *et al.*, 2010; Quecine *et al.*, 2012; Trotel-Aziz *et al.*, 2008). Aunque todas las cepas aisladas presentaban alguna propiedad PGP y alguna actividad enzimática, las cepas seleccionadas para formar el consorcio fueron *Bacillus alcalophilus* EA1, *Bacillus thuringiensis* EA3 y *Gracilibacillus saliphilus* EA8, con el fin de evaluar su papel en la germinación de las semillas de *A. macrostachyum* y su desarrollo bajo condiciones de estrés salino. En este consorcio

estaban presentes la producción de auxinas, la solubilización de fosfato, la producción de sideróforos y la capacidad de formación de biopelículas. Generalmente, el uso de un consorcio para la inoculación de plantas garantiza una mayor promoción del crecimiento de las mismas que la inoculación con una sola bacteria, debido a los efectos sinérgicos de las propiedades PGP presentes en las diferentes cepas (Kumar *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2014).

La inhibición de la germinación de las semillas causada por la salinidad no es inusual en las plantas halófitas (Baskin y Baskin, 1998; Ungar, 1978; Woodell, 1985), y puede ser atribuida a la reducción del potencial osmótico causada por la salinidad (Beadle, 1952; Osmond *et al.*, 1980; Ungar y Khan, 2001), lo que dificulta la hidratación de las semillas (Ramoliya y Pandey, 2002). Varios estudios demuestran una mejora en la germinación en otras plantas halófitas al inocular las semillas con bacterias (Jha *et al.*, 2012; Qin *et al.*, 2014). En lo que respecta a *A. macrostachyum*, diversos estudios han indicado que las semillas eran capaces de germinar en altos porcentajes en presencia de NaCl (Pujol *et al.*, 2000; Rubio-Casal *et al.*, 2002; Vicente *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral muestran que tanto la velocidad de la germinación como el número de semillas germinadas mejoraron con la inoculación bacteriana en ausencia de sal en el medio. Un resultado similar se obtuvo en la germinación de semillas de *Salicornia europaea*, donde el porcentaje de germinación mejoró con la inoculación con 5 endofitos aislados de la propia planta (Zhao *et al.*, 2016). Este efecto beneficioso se podría explicar por la presencia de enzimas en las bacterias empleadas en la inoculación, como pectinasas, celulasas y quitinasas, que, como se ha mencionado anteriormente, son importantes a la hora de romper la pared celular, lo que podría contribuir a mejorar la hidratación de las semillas bajo condiciones salinas. De esta

manera se podría facilitar la colonización de los suelos salinos por *A. macrostachyum* a través de las semillas.

Con respecto a los experimentos del desarrollo de la planta, los resultados expuestos en esta Tesis muestran que *A. macrostachyum* está extremadamente bien adaptada a la salinidad, con un crecimiento óptimo a 510 mM de NaCl y sin diferencias entre las plantas inoculadas y sin inocular, ya que los mayores valores del peso seco de raíz y tallo y del RGR se registraron a este nivel de salinidad. Sin embargo, el crecimiento de *A. macrostachyum* decreció considerablemente en las plantas crecidas a 1030 mM de NaCl, siendo esta reducción mitigada en las plantas inoculadas con el consorcio de bacterias. A la vista de este resultado, es evidente la acción de algunos mecanismos de la actividad microbiana que ayudan a tolerar mejor el estrés salino en la planta.

El efecto de la salinidad en el crecimiento de *A. macrostachyum* se vio muy apoyado por las medidas en el intercambio de gases, que mostraron respuestas a la salinidad que, generalmente, se corresponden bien con el RGR. Esta relación ha sido previamente descrita por Redondo-Gómez *et al.* (2010). Así, la A_N fue estimulada por la salinidad superior a 510 mM de NaCl, ante una drástica reducción con 1030 mM, que podría ser atribuida a la directa limitación estomática en la ruta de difusión del CO_2 , como indicaron los bajos valores de g_s y C_i en ambos extremos de salinidad (0 y 1030 mM de NaCl). Sin embargo, al contrario de lo esperado, la mitigación de los efectos deletéreos del exceso de NaCl observados en el crecimiento no se vio reflejado en la A_N , g_s o en términos de funcionalidad del PSII, ya que nuestros resultados mostraron que F_v/F_m y Φ_{PSII} no variaron entre la inoculación y los tratamientos salinos. Con estos resultados, los efectos positivos de la inoculación en *A. macrostachyum* a altas concentraciones de sal pueden ser atribuidos a un efecto beneficioso indirecto en la asimilación fotosintética global de

la planta, debido al aumento de las áreas fotosintéticas, junto a una mejora en la captación de nutrientes (N, P y Fe) en plantas inoculadas. Por lo tanto, un A_N similar podría ser más que compensado por una gran área fotosintética a 1030 mM, como resultado de la estimulación de la biomasa del tallo inducido por las PGPB empleadas en la inoculación. Estas PGPB mejorarían el crecimiento de la planta, incrementando la accesibilidad y/o el suministro de nutrientes bajo estas condiciones de estrés (Bashan, 1998). La producción de auxinas por las cepas EA1 y EA8 podría ayudar al desarrollo de la planta a través de un incremento de la superficie de la raíz (Brader *et al.*, 2014). Además, las auxinas participarían en la tolerancia de la planta a la sal, actuando como antagonista de la producción del etileno producido por las plantas en las condiciones de estrés. También, EA1 podría incrementar la disponibilidad de fósforo en la planta debido a su habilidad de solubilizar fosfato y la capacidad de EA3 y EA8 de producir sideróforos mejoraría la solubilización de hierro y su captación. De esta forma se mejoraría el estado nutricional de la planta empobrecido por la salinidad (Burd *et al.*, 2000; Kpombrekou y Tabatabai, 2003). Así, este efecto promotor en el crecimiento proporcionaría una retroalimentación positiva, ya que mayores áreas fotosintéticas inducirían tasas de crecimiento más altas que volverían a inducir más área fotosintética, amplificando la diferencia, con el tiempo, entre las plantas inoculadas y las no inoculadas a 1030 mM de NaCl. Aunque el incremento de la tolerancia a la sal podría ser atribuido a la presencia de las propiedades PGP en las bacterias seleccionadas, otros mecanismos conocidos de las plantas frente al estrés osmótico, como la acumulación de solutos orgánicos o la disminución de las enzimas antioxidantes, podrían también ser inducidos por estas bacterias. Se necesitan investigaciones futuras más eficientes para detallar el mecanismo concreto que conduce a esta mejora en la tolerancia a la sal y para establecer la base para la selección de las PGPB.

En términos de la acumulación de Na⁺, en esta Tesis Doctoral se muestra una marcada acumulación de Na⁺ en la biomasa seca de raíces y tallos al incrementar la salinidad externa, que se relaciona con el consumo de sal para la osmorregulación, como indican Redondo-Gómez *et al.* (2006; 2010a). Además, el desarrollo de la biomasa por la inoculación bacteriana a 1030 mM fue también acompañado por mayores concentraciones de Na⁺ en los tallos, indicando que el consorcio bacteriano parece haber aumentado el potencial de *A. macrostachyum* para acumular Na⁺ en sus tallos. Los ajustes osmóticos, la regulación estomática y la mejora en la captación de minerales son efectos beneficiosos atribuidos a los endofitos (Compant *et al.*, 2005; Rajkumar *et al.*, 2009). Una mejora en la captación de Na⁺ por el consorcio de endofitos a altas concentraciones de sal podría explicar el incremento de la acumulación de Na⁺ en las plantas inoculadas. Además, la acumulación de Na⁺ dentro de los endofitos que colonizan las partes aéreas de la planta podría también ayudar a este incremento en la fitoextracción de sal. Varios estudios han documentado que las PGPB se podrían utilizar para promover el crecimiento de las plantas halófitas y no halófitas bajo condiciones salinas (de-Bashan *et al.*, 2012; Gamalero *et al.*, 2009; Rueda-Puente *et al.*, 2007). Aunque el incremento en el rendimiento de la planta por las PGPB conduciría a mejorar la fitoextracción de sal (Chang *et al.*, 2014), y se haya demostrado que plantas infectadas por hongos endofitos mejoran la fitoextracción de sal de dichas plantas (Yin *et al.*, 2014), no hay estudios en la literatura que muestren un incremento de la fitoextracción de sal relativa como resultado de la adición de PGPB (Jesús *et al.*, 2015), por lo que este sería el primer estudio que lo describa.

3. La microbiota de *Arthrocnemum macrostachyum* como fuente de nuevas especies bacterianas.

Las bacterias aisladas en esta Tesis Doctoral, tanto de la rizosfera como del interior de las plantas de *A. macrostachyum* crecidas en las marismas del Odiel, mostraron un bajo porcentaje de identidad en sus secuencias del gen del ARNr 16S con respecto a las depositadas en las bases de datos. La mayoría de ellas no presentaba una longitud adecuada de dicha secuencia, sin embargo, hubo cepas cuyas secuencias tenían alrededor de 1400 pb.

Se estudiaron tres cepas aisladas de la rizosfera de *A. macrostachyum* procedentes de las marismas del Odiel (RA1, RA15 y RA18) que pertenecen a los géneros *Vibrio*, *Pseudoalteromonas* y *Staphylococcus*. Del interior de la planta, los endofitos que se estudiaron fueron EAod3, EAod4, EAod7, EAod9 (aislados de la filosfera) y EAR8 y EAR18 (aislados de la raíz). Estas cepas pertenecen a los géneros *Kushneria* (las tres primeras), *Vibrio*, *Halomonas* y *Bacillus*, respectivamente.

Con los resultados de los árboles filogenéticos creados, todas estas cepas encajan dentro de los géneros nombrados y las semejanzas calculadas demuestran que son cepas novedosas en comparación con las cepas tipo de cada género.

Dentro del género *Kushneria*, la cepa EAod3^T presenta resultados obtenidos con el sistema Biolog parecidos a los obtenidos en las tres cepas de referencia, mostrando más resultados en común con *K. pakistanensis* KCTC 42082^T. Además, presenta dos características que no se encuentran en ninguna de las cepas de referencia, como es la oxidación de ácido acetoacético y el crecimiento en presencia de telurito de potasio.

La cepa EAod4^T presenta una mayor similitud con la cepa *K. indalinina* CECT 5902^T en base a los resultados del sistema Biolog, aunque también presenta muchas semejanzas con las otras dos cepas de referencia.

En cuanto los estudios realizados con el sistema Biolog, la cepa EAod7^T muestra resultados similares tanto a *K. indalinina* CECT 5902^T como a *K. marisflavi* DMS 15357^T.

Además de estos resultados, las tres cepas problemas presentan la quinona Q9 como ubiquinona mayoritaria, al igual que todas las especies del género *Kushneria* (Sánchez-Porro *et al.*, 2009) y comparten los mismos ácidos grasos que con las cepas de referencia.

Por su parte, los resultados obtenidos con la cepa EAod9^T confirmaron que se trata de una nueva especie del género *Vibrio*, a la que se ha dado el nombre de *Vibrio palustris* (Lucena *et al.*, en prensa).

La cepa *Pseudoalteromonas* sp. RA15^T mostró en los resultados obtenidos con el sistema Biolog una gran similitud con las dos cepas de referencia seleccionadas, presentando, además, algunas características propias como la capacidad de oxidar D-galactosa y el crecimiento en presencia de compuestos como la rifampicina, violeta de tetrazolio y azul de tetrazolio. También presentó los mismos ácidos grasos mayoritarios que las cepas con las que se comparó.

Con respecto al género *Halomonas*, la cepa EAR18^T presentó similitudes en los resultados obtenidos con el sistema Biolog con ambas cepas de referencia, mostrando un mayor parecido con *H. xinjiangensis* KCTC 22608^T. A pesar de su parecido, EAR18^T mostró hasta 14 características propias. Además de estas diferencias, esta cepa presentó también otros ácidos grasos mayoritarios distintos a los presentes en la cepa de referencia.

La cepa *Bacillus* sp. EAR8^T presentó en los resultados obtenidos con el sistema Biolog características propias como la oxidación de D-salicina, D-manosa, mio-inositol, ácido D-sacárico, ácido cítrico y ácido L-málico, aunque la mayoría de los resultados tuvieron gran similitud con las cepas utilizadas como referencia. Con respecto a los ácidos grasos, esta cepa mostró los mismos que la cepa de referencia.

Por último, la cepa RA18^T, perteneciente al género *Staphylococcus*, mostró una gran similitud con la cepa *S. pasteurii* CECT 236^T en los datos obtenidos en el sistema Biolog, teniendo también muchos resultados en común con *S. warneri* CECT 5329^T. A diferencia de las demás cepas estudiadas, RA18^T no mostró ninguna propiedad diferente a las cepas de referencia con respecto a los resultados obtenidos con el sistema Biolog. Así mismo, comparte idéntico perfil de ácidos grasos con dichas cepas.

Los datos muestran similitudes de cada cepa con las cepas de referencia, lo que demuestra que cada una de las cepas estudiadas tiene características que la incluyen dentro de cada género. Al mismo tiempo, se observan en los resultados algunas diferencias, indicando que las cepas estudiadas son novedosas dentro de cada género.

Además de las cepas que se estudian en esta Tesis Doctoral, hubo otras cepas aisladas de la rizosfera de *A. macrostachyum* crecidas en las marismas de Lebrija que se han descrito recientemente como nuevas especies, como es el caso de *Microbulbifer rhizosphaerae* (Camacho *et al.*, 2016a) y *Labrenzia salina* (Camacho *et al.*, 2016b).

La presencia de nuevas especies asociadas a la halófito *A. macrostachyum* no es un hecho aislado, ya que se han descrito especies nuevas asociadas a otras

plantas halófitas crecidas en las mismas marismas. Una de estas plantas es *Spartina maritima*, de donde se aislaron *Marinomonas spartinae* (Lucena *et al.*, 2016) y *Vibrio spartinae* (Lucena *et al.*, en prensa).

Todas estas cepas estudiadas para ser descritas como nuevas especies y las ya descritas como tal, muestran la gran diversidad de bacterias que interaccionan con este tipo de plantas que aún se desconocen, colocando a las plantas halófitas en general, y a *A. macrostachyum* en particular, junto con las marismas del Odiel y Lebrija, en herramientas y áreas, respectivamente, de potencial interés para el estudio de nuevas especies con propiedades para la promoción del crecimiento de plantas en ambientes afectados por la contaminación con metales pesados y/o el exceso de sal.



CONCLUSIONES

1. Las bacterias cultivables asociadas a *Arthrocnemum macrostachyum* mostraron una gran diversidad tanto en la rizosfera como en el interior de la planta, habiendo diferencias según el grado de contaminación.
2. Las bacterias aisladas de las marismas del Odiel pueden crecer en presencia de altas concentraciones de metales pesados y sal. Por su parte, los aislados de Lebrija también toleran altas concentraciones de sal.
3. Todas las bacterias aisladas en esta Tesis Doctoral tienen alguna propiedad promotora del crecimiento de la planta. Además, los aislados de las marismas del Odiel mostraron altos valores incluso en presencia de metales pesados.
4. En general, los metales pesados disminuyen el número de bacterias que presentan propiedades PGP, pero en presencia de estos, hay bacterias que producen alguna propiedad PGP que no mostraban en ausencia de metales.
5. Las bacterias que forman tanto el consorcio endofítico como el rizosférico contribuyen a mitigar el nivel de toxicidad relacionado con la acumulación de metales en los tejidos de las plantas, mostrando altos valores de RGR y asimilación fotosintética. Además, la bioaumentación también participa en la modulación de la maquinaria de enzimas antioxidantes.
6. La inoculación de las plantas de *A. macrostachyum* con ambos consorcios mejoran la germinación de las semillas y la captación de metales por la planta y aumentan la acumulación de metales en las raíces, mientras que el consorcio formado por endofitos incrementa además la acumulación de metales en los tallos de las plantas.

7. Los endofitos seleccionados de la filosfera de *A. macrostachyum* parecen tener un papel importante en la tolerancia de la planta a concentraciones estresantes de sal, mejorando la germinación de las semillas, el crecimiento de la planta en altas concentraciones de NaCl y favoreciendo la capacidad fitoextractora de Na⁺.
8. Varias de las cepas aisladas, tanto de *A. macrostachyum* como de su rizosfera, se caracterizaron como nuevas especies, mostrando la gran diversidad bacteriana presente en las marismas del Odiel.
9. La utilización combinada de *A. macrostachyum* y su microbioma puede ser una adecuada herramienta para la adaptación de la planta al medio, la fitoextracción de Na⁺ y la fitoestabilización de metales pesados durante la recuperación de suelos degradados.



CONCLUSIONS

1. Bacteria associated with *Arthrocnemum macrostachyum* showed a great diversity both in the rhizosphere and within the plant, showing differences depending on the pollution level.
2. The isolated bacteria from Odiel marshes could grow in presence of high concentrations of heavy metals and salt. On the other hand, the isolated bacteria from Lebrija also tolerated high salt concentrations.
3. All bacteria isolated in this work showed some plant growth-promoting (PGP) properties. Furthermore, the isolates from Odiel marshes showed high values of PGP activities even in presence of heavy metals.
4. In general, the presence of heavy metals decreased the number of bacteria able to show PGP properties. However, some bacteria displayed additional PGP activities in the presence of metals, which were not detected in their absence.
5. Bacteria forming the endophytic and rhizospheric *consortia* contributed to mitigate phytotoxicity level related to metal accumulation in plant tissues, as revealed by greater RGR and photosynthetic assimilation values. In addition, the bioaugmentation also ascribed to the modulation of antioxidative enzyme machinery.
6. Inoculation of *A. macrostachyum* plants with both *consortia* improved the germination and metal uptake and accumulation in roots, while CE *consortium* increased the capacity of *A. macrostachyum* to accumulate metals in its shoots.
7. Endophytes selected from the phyllosphere of *A. macrostachyum* seem to play an important role in plant tolerance towards stressful concentrations of

NaCl, improving seed germination rate, enhancing plant growth at high NaCl concentrations, and favoring Na⁺ phytoextraction capacity.

8. Some isolated bacteria, both from *A. macrostachyum* tissues and from its rhizosphere, were identified as putative new species, thus revealing the great diversity of bacteria interacting with this halophyte in the Odiel marshes.
9. The combined use of *A. macrostachyum* and its microbiome can provide an adequate tool to enhance plant adaptation, Na⁺ phytoextraction and phytostabilization of heavy metals during the restoration of degraded soils.



BIBLIOGRAFÍA

Abideen, Z., Ansari, R., Khan, M.A. (2011). Halophytes: potential source of ligno-cellulosic biomass for ethanol production. *Biomass Bioenergy* 35: 1818–1822. doi: 10.1016/j.biombioe.2011.01.023.

Abou-Shanab, R., Angle, J., Delorme, T., Chaney, R., Van Berkum, P., Moawad, H., Ghanem, K., Ghazlan, H. (2003). Rhizobacterial effects on nickel extraction from soil and uptake by *Alyssum murale*. *New Phytologist* 158: 219–224. doi: 10.1046/j.1469-8137.2003.00721.x.

Abou-Shanab, R.A.I., van Berkum, P., Angle, J.S. (2007). Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in Gram-positive and Gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere* 68: 360–367. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.12.051>.

Acosta, J.A., Jansen, B., Kalbitz, K., Faz, A., Martínez-Martínez, S. (2011). Salinity increases mobility of heavy metals in soils. *Chemosphere* 85: 1318–1324. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.07.046>.

Ahemad, M., Khan, M.S. (2011). Functional aspects of plant growth promoting rhizobacteria: recent advancements. *Insight Microbiology* 1: 39–54. <http://dx.doi.org/10.5567/IMICRO-IK.2011.39.54>.

Ahemad, M., Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science* 26: 1–20. doi: 10.1016/j.jksus.2013.05.001.

Air Pollution Information System. (2016). Heavy metals. Disponible en: http://www.apis.ac.uk/overview/pollutants/overview_HM.htm (acceso el 8 de septiembre de 2016).

Akcil, A., Koldas, S. (2006). Acid Mine Drainage (AMD): causes, treatment and case studies. *Journal of Cleaner Production* 14: 1139–1145. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2004.09.006>.

Alexander, D.B., Zuberer, D.A. (1991). Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility Soils* 12: 39–45. doi: 10.1007/BF00369386.

Ali, H., Khan, E., Sajad, M.A. (2013). Phytoremediation of heavy metals Concepts and applications. *Chemosphere* 91: 869–881. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.01.075.

Álvarez-Rogel, J., Ramos, M.J., Delgado, M.J., Arnaldos, R. (2004). Metals in soils and above-ground biomass of plants from a salt marsh polluted by mine wastes in the coast of the Mar Menor lagoon, SE Spain. *Fresenius Environmental Bulletin* 13: 274–8.

Andrades-Moreno, L., del Castillo, I., Parra, R., Doukkali, B., Redondo-Gómez, S., Pérez-Palacios, P., Caviedes, M.A., Pajuelo, E., Rodríguez-Llorente, I.D. (2014). Prospecting metal-resistant plant-growth promoting rhizobacteria for rhizoremediation of metal contaminated estuaries using *Spartina densiflora*. *Environmental Science and Pollution Research* 21: 3713-3721. doi: 10.1007/s11356-013-2364-8.

Anjum, N.A., Ahmad, I., Válega, M., Mohmood, I., Gill, S.S., Tuteja, N., Duarte, A.C., Pereira, E. (2014). Salt marsh halophyte services to metal-metalloid remediation: assessment of the processes and underlying mechanisms. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 44: 2038-2106. <http://dx.doi.org/10.1080/10643389.2013.828271>.

Arora, N.K., Khare, E., Oh, J.H. (2008). Diverse mechanisms adopted by *Pseudomonas fluorescens* PGC2 during the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora capsici*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 581–585. doi: 10.1007/s11274-007-9505-5.

Aslam, R., Bostan, N., Nabgha-e, A., Maria, M., Safdar, W. (2011). A critical review on halophytes: salt tolerant plants. *Journal of Medicinal Plants Research* 5: 7108–7118. doi: 10.5897/JMPRx11.009.

Aydemir, S., Sünger, H. (2011). Bioreclamation effect and growth of a leguminous forage plant (*Lotus corniculatus*) in calcareous saline sodic soil. *African Journal of Biotechnology* 10: 115571–115577. doi: 10.5897/AJB11.2775.

Baker, A.J.M., Brooks, R.R. (1989). Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements-A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1: 81–126. doi: 10.3389/fpls.2013.00281.

Bangash, A., Iftikhar, A., Saira, A., Takuji, K., Armghan, S., Toru, F., Moriya, O. (2015). *Kushneria pakistanensis* sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium isolated from rhizosphere of a plant (*Saccharum spontaneum*) growing in salt mines of the Karak area in Pakistan. *Antoine van Leeuwenhoek* 107: 991-1000. doi: 10.1007/s10482-015-0391-9.

Barceló, J., Poschenrieder, C. (1990). Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. *Journal of Plant Nutrition* 13: 1–37. <http://dx.doi.org/10.1080/01904169009364057>.

Bashan, Y. (1998). Inoculants for plant growth-promoting bacteria in agriculture. *Biotechnology Advance* 16: 729–770. doi: 10.1016/S0734-9750(98)00003-2.

Baskin, C., Baskin, J.M. (1998). *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. Academic Press, San Diego, California.

Beadle, N.C.W. (1952). Studies in halophytes. 1. The germination of the seed and establishment of the seedlings in five species of *Atriplex* in Australia. *Ecology* 33: 49–62. doi: 10.2307/1931251.

Benhizia, Y., Benhiza, H., Benguedouar, A., Muresu, R., Giacomini, A., Squartini, A. (2004). Gamma proteobacteria can nodulate legumes of genus *Hedysarum*. *Systematic and Applied Microbiology* 27: 462-468. <http://dx.doi.org/10.1078/0723202041438527>.

Berg, G., Grube, M., Schloter, M., Smalla, K. (2014). Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives. *Frontiers in Microbiology* 5: 148. doi: 10.3389/fmicb.2014.00148.

Bhattacharyya, P.N., Jha, D.K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28: 1327–1350. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-01-0979-9>.

Brader, G., Compant, S., Mitter, B., Trognitz, F., Sessitsch, A. (2014). Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 27: 30–37. doi: 10.1016/j.copbio.2013.09.012

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

Bolhàr-Nordenkamp, H.R., Öquist, G. (1993). Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: Hall, D.O., Scurlock, J.M.O., Bolhàr-Nordenkamp, H.R., Leegood, R.C., Long, S.P. (Eds.) *Photosynthesis and Production in a Changing Environment: a Field and Laboratory Manual* (pp. 193–206). Chapman & Hall, Londres.

Bouyoucos, G.J. (1936). Directions for making mechanical analyses of soil by the hydrometer method. *Soil Science* 42: 225–229. <http://dx.doi.org/10.1097/00010694-193609000-00007>.

Burd, G., Dixon, D.G., Glick, B. (2000). Plant growth promoting bacteria that decreases heavy metal toxicity in plants. *Canadian Journal Microbiology* 46: 237–245. doi: 10.1139/w99-143.

Burdman, S., Jurkevitch, E., Okon, Y. (2000). Recent advances in the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture. In: Subba Rao, N.S., Dommergues, Y.R., (Eds.) *Microbial Interactions in Agriculture and Forestry*. (pp. 229–250). Science Publishers, Enfield, NH, USA.

Callaham, D.L., Baker, A.J.M., Kolev, S.D., Weed, A.G. (2006). Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 114: 169-189.

Camacho, M., Montero-Calasanz, M.C., Redondo-Gómez, S., Rodríguez-Llorente, I., Schumann, P., Klenk, H.P. (2016a). *Microbulbifer rhizosphaerae* sp. nov., isolated from the rhizosphere of the halophyte *Arthrocnemum macrostachyum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66: 1844-1850. doi: 10.1099/ijsem.0.000955.

Camacho, M., Redondo-Gómez, S., Rodríguez-Llorente, I., Rohde, M., Spröer, C., Schumann, P., Klenk, H.P., Montero-Calasanz, M.C. (2016b). *Labrenzia salina* sp. nov., isolated from the rhizosphere of the halophyte *Arthrocnemum macrostachyum*. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66: 5173-5180. doi: 10.1099/ijsem.0.001492.

Cambrollé, J., Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Figueroa, M.E. (2008). Comparison of the role of two *Spartina* species in terms of phytostabilization and bioaccumulation of metals in the estuarine sediment. *Marine Pollution Bulletin* 56: 2037-2042. doi: 10.1016/j.marpolbul.2008.08.008.

Cánovas, D., Vargas, C., Iglesias-Guerra, F., Csonka, L.N., Rhodes, D., Ventosa, A., Nieto, J.J. (1997). Isolation and characterization of salt-sensitive mutants of the moderate halophile *Halomonas elongata* and cloning of the ectoine synthesis genes. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 25794-25801.

Carrasco, L., Caravaca, F., Álvarez-Rogel, J., Roldán, A. (2006). Microbial processes in the rhizosphere soil of a heavy metals-contaminated Mediterranean salt marsh: A facilitating role of AM fungi. *Chemosphere* 64: 104-111. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.11.038>.

Cervantes, C., Espino-Saldaña, A.E., Acevedo-Aguilar, F., León-Rodríguez, I.L., Rivera-Cano, M.E., Avila-Rodríguez, M., Wróbel-Kaczmarczyk, K., Wróbel-Zasada, K., Gutiérrez-Corona, J.F., Rodríguez-Zavala, J.S., Moreno-Sánchez, R. (2006). Interacciones microbianas con metales pesados. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 48: 203-210.

Chang, P., Gerhardt, K.E., Huang, X-D., Yu, X-M., Glick, B.R., Gerwing, P.D., Greenberg B.M. (2014). Plant growth-promoting bacteria facilitate the growth of barley and oats in salt-impacted soil: implications for phytoremediation of saline soils. *International Journal of Phytoremediation* 16: 1133-1147. doi: 10.1080/15226514.2013.821447.

Chen, L., Luo, S., Xiao, X., Guo, H., Chen, J., Wan, Y., Li, B., Xu, T., Xi, Q., Rao, C., Liu, C., Zeng, G. (2010). Application of plant growth-promoting endophytes (PGPE) isolated from *Solanum nigrum* L. for phytoextraction of Cd-polluted soils. *Applied Soil Ecology* 46: 383-389. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.10.003>.

Choudhary, D.K., Sharma, K.P., Gaur, R.K. (2011). Biotechnological perspectives of microbes in agro-ecosystems. *Biotechnology Letters* 33: 1905–1910. doi: 10.1007/s10529-011-0662-0.

Chun, J., Lee, J.-H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B.K., Lim, Y.W. (2007). EzTaxon: a webbased tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 2259–2261. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.64915-0>.

Cobbett, C. (2003). Heavy metals and plants – model systems and hyperaccumulators. *New Phytologist* 159: 289–293. doi: 10.1046/j.1469-8137.2003.00832.x.

Compant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Nowak, J., Clément, C., AitBarka, E. (2005). Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 1685–1693. doi: 10.1128/AEM.71.4.1685-1693.2005.

Compant, S., Clément, C., Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 669–678. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>.

Conesa, H.M., Schulin, R. (2010). The Cartagena-La Unión mining district (SE Spain): a review of environmental problems and emerging phytoremediation solutions after fifteen years research. *Journal of Environmental Monitoring* 12: 1225–1233. doi: 10.1039/c000346h.

Curado, G., Rubio-Casal, A.E., Figueroa, E., Castillo, J.M. (2013). Potential of *Spartina maritima* in restored salt marshes for phytoremediation of metals in a highly polluted estuary. *International Journal of Phytoremediation* 16: 1209–1220. doi: 10.1080/15226514.2013.821451.

Dajic, Z. (2006). Salt stress. In: Madhava Rao, K.V., Raghavendra, A.S., Janardhan Reddy, K. (Eds.) *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plant* (pp. 41–99) Springer, Amsterdam, The Netherlands.

Das, N., Geentanjali Basak, L.V., Salam J.A., Abigail, E.A. (2012). Application of biofilms on remediation of pollutants – an overview. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* 2: 783–790.

Davis, R.A., Welty, A.T., Borrego, J., Morales, J.A., Pendon, J.G., Ryan, J.G. (2000). Rio Tinto estuary (Spain): 5000 years of pollution. *Environmental Geology* 39: 1107. doi: 10.1007/s002549900096.

Dazy, M., Masfaraud, J.-F., Ferard, J.-F. (2009). Induction of oxidative stress bio-markers associated with heavy metal stress in *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Chemosphere* 75: 297e302. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.12.045>.

de-Bashan, L.E., Hernandez, J-P., Bashan, Y. (2012). The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation-a comprehensive evaluation. *Applied Soil Ecology* 61: 171-189. doi: 10.1016/j.apsoil.2011.09.003.

del Castillo, I., Hernández, P., Lafuente, A., Rodríguez-Llorente, I.D., Caviedes, M.A., Pajuelo, E. (2012). Self-bioremediation of cork-processing wastewaters by (chloro)phenol-degrading bacteria immobilized onto residual cork particles. *Water Research* 46: 1723-1734. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2011.12.038>.

Dong, Y., Iniguez, A.L., Triplett, E.W. (2003). Quantitative assessments of the host range and strain specificity of endophytic colonization by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Plant Soil* 257: 49-59. doi: 10.1023/A:1026242814060.

Doty, S.L. (2008). Enhancing phytoremediation through the use of transgenics and endophytes. *New Phytologist* 179: 318–333. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02446.x.

El Fanroussi, S., Agathos, S.N. (2005). Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Current Opinion in Microbiology* 8: 269-275.

Elbeltagy, A., Nishioka, K., Suzuki, H., Sato, T., Sato, Y.I., Morisaki, H., Mitsui, H., Minamisawa, K. (2000). Isolation and characterization of endophytic bacteria from

wild and traditionally cultivated rice varieties. *Soil Science and Plant Nutrition* 46: 617–629. <http://dx.doi.org/10.1080/00380768.2000.10409127>.

Enamorado, S., Abril, J.M., Delgado, A., Más, J.L., Polvillo, O., Quintero, J.M. (2014). Implications for food safety of the uptake by tomato of 25 trace-elements from a phosphogypsum amended soil from SW Spain. *Journal of Hazardous Materials* 266: 122-131. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.12.019>.

Favas, P.J.C., Pratas, J., Varun, M., D'Souza, R., Paul, M.S. (2014). Phytoremediation of soils contaminated with metals and metalloids t mining areas: potential of native flora. In: Hernandez-Soriano, M.C. (Eds.) *Environmental risk assessment of soil contamination* (pp. 485-517). Tech Editorial. ISBN 978-953-51-1235-8.

Flores-Felix, J.D., Silva, L.R., Rivera, L.P. Marcos-García, M., García-Fraile, P., Martínez-Molina, E., Mateos, P.F., Velázquez, E., Andrade, P., Rivas, R. (2015). Plants probiotics as a tool to produce highly functional fruits: The case of *Phyllobacterium* and vitamin C in strawberries. *PLoS ONE* 10: e0122281. doi: 10.1371/journal.pone.0122281.

Flowers, T.J., Colmer, T.D. (2008). Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist* 179: 945–963. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02531.x.

Flowers, T.J., Colmer, T.D. (2015). Plant salt tolerance: adaptations in halophytes. *Annals of Botany* 115: 327-331. doi:10.1093/aob/mcu267.

Flowers, T.J., Munns, R., Colmer, T.D. (2014). Sodium chloride toxicity and the cellular basis of salt tolerance in halophytes. *Annals of Botany* 115: 419-431. doi: 10.1093/aob/mcu217.

Frey-Klett, P., Chavatte, M., Clause, M.L., Courier, S., Roux, C.L., Raaijmakers, J., Martinotti, M.G., Pierrat, J.C., Garbaye, J. (2005). Ecto-mycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent *Pseudomonas*. *New Phytologist* 165: 317–28. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01212.x.

Gadd, M.G. (2004). Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma* 122: 109-119. <http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2004.01.002>.

Gadd, M.G., Griffiths, A.J. (1978). Microorganisms and Heavy Metal Toxicity. *Microbial Ecology* 4 (4): 303-317. <http://www.jstor.org/stable/4250539>.

Gaiero, J.R., McCall, C., Thompson, K.A., Day, N.J., Best, A.S., Dunfield, K.E. (2013). Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. *American Journal of Botany* 100: 1738–1750. doi: 10.3732/ajb.1200572.

Gamalero, E., Lingua, G., Berta, G., Glick, B.R. (2009). Beneficial role of plant growth promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on plant responses to heavy metal stress. *Canadian Journal of Microbiology* 55: 501–514. <http://dx.doi.org/10.1139/W09-010>.

Garbeva, P., van Veen, J.A., van Elsas, J.D. (2003). Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE. *Microbial Ecology* 45: 302-316. doi: 10.1007/s00248-002-2034-8.

García, G., Faz, Á., Conesa, H.M. (2003). Selection of autocnothous plant species from SE Spain for soil lead phytoremediation purposes. *Water, Air and Soil Pollution* 3: 243-250.

García-Fraile, P., Menéndez, E., Rivas, R. (2015). Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. *AIMS Bioengineering* 2: 183–205. doi: 10.3934/bioeng.2015.3.183.

Genty, B., Briantais, J.M., Baker, N.R. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *BBA-Gen Subjects* 990: 87-92. doi:10.1016/S0304-4165(89)80016-9.

Gerhardt, K.E., Huang, X-D., Glick, B.R., Greenberg, B.M. (2009). Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: potential and challenges. *Plant Science* 176: 20-30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.09.014>.

Glenn, E.P., Brown, J.J., Blumwald, E. (1999). Salt tolerance and crop potential of halophytes. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18: 227–255. doi: 10.1080/07352689991309207.

Gil, S.S., Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016.

Glenn, E.P., Anday, T., Chaturvedi, R., Martinez-Garcia, R., Pearlstein, S., Soliz, D., Nelson, S.G., Felger, R.S. (2013). Three halophytes for saline-water agriculture: an oilseed, a forage and a grain crop. *Environmental and Experimental Botany* 92: 110-121. doi: 10.1016/j.envexpbot.2012.05.002.

Glick, B.R. (1995). Bacterial ACC deaminase and the alleviation of plant stress. *Advances in Applied Microbiology* 56: 291-312. doi: 10.1016/S0065-2164(04)56009-4.

Glick, B.R. (2010). Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology Advances* 28: 367-374. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.02.001>.

Glick, B.R. (2012) Plant growth promoting bacteria: Mechanisms and applications. *Scientifica* 2012: ID 963401. doi: 10.6064/2012/963401.

Glick, B.R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research* 169: 30-39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009>.

Grande, J.A., Borrego, J., Morales, J.A., de la Torre, M.L. (2003). A description of how metal pollution occurs in the Tinto-Odiel rias (Huelva-Spain) through the application of cluster analysis. *Marine Pollution Bulletin* 46: 475-480. [http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00452-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00452-6).

Greger, M., Ögren, E. (1991). Direct and indirect effects of Cd²⁺ on photosynthesis in sugar beet (*Beta vulgaris*). *Physiologia Plantarum* 83: 129-135.

Gururani, M.A., Upadhyaya, C.P., Baskar, V., Venkatesh, J., Nookaraju, A., Park, S.W. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria enhance abiotic stress tolerance in *Solanum tuberosum* through inducing changes in the expression of ROS-scavenging enzymes and improved photosynthetic performance. *Journal of Plant Growth Regulation* 32: 245-258. doi: 10.1007/s00344-012-9292-6.

Haferburg, G., Kothe, E. (2007). Microbes and metals: interactions in the environment. *Journal of Basic Microbiology* 47: 453-467. doi: 10.1002/jobm.200700275.

Hameeda, B., Harini, G., Rupela, O.P., Wani, S.P., Reddy, G. (2008). Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiological Research* 163: 234-42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2006.05.009>.

Hallman, J., Quadt-Hallman, A., Mahaffe, W.F., Kloepper, J.W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 896-914. doi: 10.1139/m97-131.

Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Fujita, M., Ahmad, P., Chandna, R., Prasad, M.N.V., Ozturk, M. (2013). Enhancing plant productivity under salt stress—relevance of poly-omics. In: Ahmad, P., Azooz, M.M. y Prasad, M. N. V. (Eds.) *Salt Stress in Plants: Omics, Signaling and Responses* (pp. 113–156). Springer, Berlin, Germany.

Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, M.M., Bhowmilk, P.C., Hossain, M.A., Rahman, M.M., Vara Prasad, M.N., Ozturk, M., Fujita, M. (2014). Potencial Use of Halophytes to Remediate Saline Soils. *Biomed Research International* 2014: ID 589341. 12 páginas. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/589341>.

Hatje, V., Payne, T.E., Hill, D.M., McOrist, G., Birch, G.F., Szymczak, R. (2003). Kinetics of trace element uptake and release by particles in estuarine waters: effects of pH, salinity, and particle loading. *Environment International* 29: 619–629. [http://dx.doi.org/10.1016/S0160-4120\(03\)00049-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0160-4120(03)00049-7).

Hayat, R., Ali, S., Amara, U. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review. *Annals of Microbiology* 60: 579–598. doi: 10.1007/s13213-010-0117-1.

Hoagland, D., Arnon, D.I. (1938). The water culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Bulletin* 347: 1–39.

Hogan, M.C. (2010). *Heavy metal*. Encyclopedia of Earth. National Council for Science and the Environment. Disponible en: <http://www.eoearth.org/view/article/153463> (acceso el 28 de diciembre de 2015).

Hossain, M.A., Piyatida, P., Teixeira da Silva, J., Fujita, M. (2012). Molecular mechanism of heavy metals toxicity and tolerance in plants: Central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *Journal of Botany 2012*: ID 872875. 37 páginas doi:10.1155/2012/872875.

IARC (International Agency for Research on Cancer). (1987). *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some metals and metallic compounds*. Volumen 23. Disponible en: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol1-42/mono23.pdf> (acceso el 8 de septiembre de 2016).

IARC. (1993). *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Beryllium, Cadmium, Mercury and exposures in the glass manufacturing industry*. Volumen 58. Disponible en: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol58/index.php> (acceso el 8 de septiembre de 2016).

IARC. (2006). *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Inorganic and organic lead compounds*. Volumen 87. Disponible en: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol87/index.php> (acceso el 8 de septiembre de 2016).

IARC. (2012). *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Arsenite, metals, fibres, and dusts. A review of human carcinogens*. Volumen 100C. Disponible en: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100C/index.php> (acceso el 8 de septiembre de 2016).

Jeffries, P., Gianinazzi, S., Perotto, S., Turnau, K., Barea, J.M. (2003). The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility Soils* 37: 1–16. doi: 10.1007/s00374-002-0546-5.

Jesus, J.M., Danko, A.S., Fiúza, A., Borges, M-T. (2015). Phytoremediation of salt-affected soils: a review of processes, applicability, and the impact of climate change. *Environmental Science and Pollution Research* 22: 6511-6525. doi: 10.1007/s11356-015-4205-4.

Jha, B., Gontia, I., Hartmann, A. (2012). The roots of the halophyte *Salicornia brachiata* are a source of new halotolerant diazotrophic bacteria with plant growth-promoting potential. *Plant and Soil* 356: 265–277. doi: 10.1007/s11104-011-0877-9.

Ji, S.H., Gururani, M.A., Chun, S-C. (2014). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbial Research* 169: 83-98. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.06.003>.

Jobson, J. (1991). *Appl. Multivariate Data Anal.* Volumen 1 (p. 621). Springer Verlag, New York, USA.

Kabata-Pendias, A., Pendias, H. (2001). *Trace Elements in Soils and Plants*. CRC Press, Boca Ratón, Florida.

Kaymak, D.C. (2010). Potential of PGPR in agricultural innovations. In: Maheshwari, D.K. (Ed.) *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, Alemania.

Khan, Z., Doty, S.L. (2011). Endophyte-assisted phytoremediation. *Current Topics in Plant Biology* 12: 97–105.

Khan, A.R., Ullah, I., Khan, A.L., Park, G.S., Waqas, M., Hong, S.J., Jung, B.K., Kwak, Y., Lee, I.J., Shin, J.H. (2015). Improvement in phytoremediation potential of *Solanum nigrum* under cadmium contamination through endophytic-assisted *Serratia* sp RSC-14 inoculation. *Environmental Science and Pollution Research* 22: 14032-14042. doi: 10.1007/s11356-015-4647-8.

Kpombrekou, A. K., Tabatabai, M.A. (2003). Effect of low-molecular weight organic acids on phosphorus release and phytoavailability of phosphorus in phosphate rocks added to soils. *Agriculture, Ecosystem & Environment* 100: 275–284. doi: 10.1016/S0167-8809(03)00185-3.

Krämer, U. (2010). Metal hyperaccumulation in plants. *Annual Review of Plant Biology* 61: 517-534. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112156.

Kroppenstedt, R.M., Goodfellow, M. (2006). The family *Thermonosporaceae*: *Actinocorallia*, *Actinomadura*, *Spirillispora* y *Thermomonospora*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (Eds.). *Archaea y Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes: The Prokariotes*, volumen 3, 3ª edición (pp. 682-724). Springer, Nueva York.

Kuklinsky-Sobral, J., Araújo, W.L., Mendes, R., Geraldi, I.O., Pizzirani-Kleiner, A.A., Azevedo, J.L. (2004). Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental Microbiology* 6: 1244–1251. doi: 10.1111/j.1462-2920.2004.00658.x.

Kumar, H., Bajpai, V.K., Dubey, R.C., Maheshwari, D.K., Kang, S.C. (2010). Wilt disease management and enhancement of growth and yield of *Cajanus cajan* (L) var. Manak by bacterial combinations amended with chemical fertilizer. *Crop Protection* 29: 591-598. doi: 10.1016/j.cropro.2010.01.002.

Kumar, A., Maurya, B.R., Ragghuwanshi, R. (2014). Isolation and characterization of PGPR and their effect on growth, yield and nutrient content in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 3: 121-128. doi: 10.1016/j.bcab.2014.08.003.

Kumar, M., Mishra, S., Dixit, V., Kumar, M., Agarwal, L., Chauhan, P.S., Nautiyal, C.S. (2016). Synergistic effect of *Pseudomonas putida* and *Bacillus amyloliquefaciens* ameliorates drought stress in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Signaling and Behaviour* 11: 1 e1071004. doi: 10.1080/15592324.2015.1071004.

Lamb, T.G., Tonkyn, D.W., Kluepfel, D.A. (1996). Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue. *Canadian Journal of Microbiology* 42: 1112-1120. doi: 10.1139/m96-143.

Lambrech, M., Okon, Y., Vande Broek, A., Vanderleyden, J. (2000). Indole-2-acetic: a reciprocal signaling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends in Microbiology* 8: 298-300. [http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01732-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01732-7).

Langella, F., Grawunder, A., Stark, R., Weist, A., Merten, D., Haferburg, G., Büchel, G., Hothe, E. (2014). Microbially assisted phytoremediation approaches for two multi-element contaminated sites. *Environmental Science and Pollution Research* 21: 6845–6858. doi: 10.1007/s11356-013-2165-0.

Laudicina, V., Hurtado, M., Badalucco, L., Delgado, A., Palazzolo, E., Panno, M. (2009). Soil chemical and biochemical properties of a salt-marsh alluvial Spanish area after long-term reclamation. *Biology and Fertility Soils* 45: 691–700. doi:10.1007/s00374-009-0380-0.

Leblanc, M., Morales, J.A., Borrego, J., Elbaz-Poulichet, F. (2000). 4500-Year-old mining pollution in the southwestern Spain: long-term implications for modern mining pollution. *Economic Geology* 95: 655-662. doi: 10.2113/gsecongeo.95.3.655.

Lechevalier, M.P., Lechevalier, H.A. (1970). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology* 20: 435-443. doi: 10.1099/00207713-20-4-435.

Li, J., Ovakim, D., Charles, T.C., Glick, B.R. (2000). An ACC deaminase minus mutant of *Enterobacter cloacae* UW4 no longer promotes root elongation. *Current Microbiology* 41: 101-105. doi: 10.1007/s002840010101.

Li, C.H., Zhao, M.W., Tang, C.M., Li, S.P. (2010). Population dynamics and identification of endophytic bacteria antagonistic toward plant-pathogenic fungi in cotton root. *Microbial Ecology* 59: 344-356. doi: 10.1007/s00248-009-9570-4.

Ljung, K. (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* 140: 943-950. doi: 10.1242/dev.086363.

Lloret, L., Martínez-Romero, E. (2005). Evolution and phylogeny of rhizobia. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 47: 43–60.

Lokhande, V.H., Suprasanna, P. (2012). Prospects of halophytes in understanding and managing abiotic stress tolerance. In: Ahmad, P. y Prasad, M.N.V. (Eds.) *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change* (pp. 29–56). Springer, NewYork, USA.

Lombi, E., Wenzel, W.W., Gobran, G.R., Adriano, D.C. (2001). Dependency of phytoavailability of metals on indigenous and induced rhizosphere processes: a review. *In*: Gobran, G.R., Wenzel, W.W., Lombi, E. (Eds.). *Trace elements in the rhizosphere* (pp. 3–24). Boca Raton, FL: CRC Press.

Lucena, T., Mesa, J., Rodríguez-Llorente, I.D., Pajuelo, E., Caviedes, M.A. Ruvira, M.A., Pujalte, M.J. (2016). *Marinomas spartinae* sp. nov., a novel species with plant-beneficial properties. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66: 1686-1691. doi: 10.1099/ijsem.0.000929.

Lucena, T., Arahál, D.R., Ruvira, M.A., Navarro-Torre, S., Mesa, J., Pajuelo, E., Rodríguez-Llorente, I.D., Rodrigo-Torres, L., Piñar, M.J., Pujalte, M.J. (En prensa). *Vibrio palustris* sp. nov. and *Vibrio spartinae* sp. nov., two new members of the Gazogenes clade, isolated from salt-marsh plants (*Arthrocnemum macrostachyum* and *Spartina maritima*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

Lugtenberg, B.J., Chin A-Woeng, T.F., Bloemberg, G.V. (2002). Microbe-plant interactions: Principles and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 373–383. doi: 10.1023/A:1020596903142.

Lutts, S., Lefèvre, I. (2015). How can we take advantage of halophyte properties to cope with heavy metal toxicity in salt-affected areas?. *Annals of Botany* 115: 509–528. doi: 10.1093/aob/mcu264.

Madejón, P., Burgos, P., Murillo, J.M., Cabrera, F., Madejón, E., (2009). Bioavailability and accumulation of trace elements in soils and plants of highly contaminated estuary (Domingo Rubio tidal channel, SW Spain). *Environmental Geochemistry and Health* 31: 629–642. doi: 10.1007/s10653-008-9221-6.

Mahajan, S, Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444: 139–158. <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2005.10.018>.

Manchanda, G., Garg, N. (2008). Salinity and its effects on the functional biology of legumes. *Acta Physiologiae Plantarum* 30: 595–618. doi: 10.1007/s11738-008-0173-3.

Mastretta, C., Taghavi, S., van der Lelie, D., Mengoni, A., Galardi, F., Gonnelli, C., Barac, T., Boulet, J., Weyens, N., Vangronsveld, J. (2009). Endophytic bacteria from seeds of *Nicotiana tabacum* can reduce cadmium phytotoxicity. *International Journal of Phytoremediation* 11: 251–267. doi: 10.1080/15226510802432678.

Mateos-Naranjo, E., Redondo-Gómez, S., Cambrollé, J., Figueroa-Clemente, M.E. (2008). Growth and photosynthetic responses to copper stress of an invasive cordgrass, *Spartina densiflora*. *Marine Environmental Research* 66: 459–465. doi: 10.1016/j.marenvres.2008.07.00.

Mateos-Naranjo, E., Andrades-Moreno, L., Redondo-Gómez, S. (2011). Comparison of germination, growth, photosynthetic responses and metal uptake between three populations of *Spartina densiflora* under different soil pollution conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74: 2040-2049. doi: 10.1016/j.ecoenv.2011.06.019.

Meier-Kolthoff, J. P., Göker, M., Spröer, C., Klenk, H.-P. (2013). When should a DDH experiment be mandatory in microbial taxonomy? *Archives of Microbiology* 195: 413–418. doi: 10.1007/s00203-013-0888-4.

Méndez, M.O., Glen, E.P., Maier, R.M. (2007). Phytoestabilization potential of quailbush for mine tailings: growth, metal accumulation, and microbial community changes. *Journal of Environmental Quality* 36: 245-253. doi: 10.2134/jeq2006.0197.

Méndez, M.O., Maier, R.M. (2008). Phytoestabilisation of mine tailings in arid and semiarid environments: an emerging remediation technology. *Environmental Health Perspective* 116: 278-283. doi: 10.1289/ehp.10608.

Mendoza-Hernández, J.C., Perea-Vélez, Y.S., Arriola-Morales, J., Martínez-Simón, S.M., Pérez-Osorio, G. (2016). Assessing the effects of heavy metals in ACC deaminase and IAA production on plant growth-promoting bacteria. *Microbiological Research* 188-189: 53-61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2016.05.001>.

Mesa, J., Mateos-Naranjo, E., Caviedes, M.A., Redondo-Gómez, S., Pajuelo, E., Rodríguez-Llorente, I.D. (2015a). Scouting contaminated estuaries: Heavy metal resistant and plant growth promoting rhizobacteria in the native metal rhizoaccumulator *Spartina maritima*. *Marine Pollution Bulletin* 90: 150-159.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.11.002>.

Mesa, J., Mateos-Naranjo, E., Caviedes, M.A., Redondo-Gómez, S., Pajuelo, E., Rodríguez-Llorente, I.D. (2015b). Endophytic cultivable bacteria of the metal bioaccumulator *Spartina maritima* improve plant growth but not metal uptake in polluted marshes soils. *Frontiers in Microbiology* 6: 1450. doi: 10.3389/fmicb.2015.01450.

Mesa, J., Rodríguez-Llorente, I.D., Pajuelo, E., Caviedes, M.A., Barcia-Piedras, J.M., Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E. (2015c). Moving closer towards restoration of contaminated estuaries: bioaugmentation with autochthonous rhizobacteria improves metal rhizoaccumulation in native *Spartina maritima*. *Journal of Hazardous Materials* 300: 263–271. doi: 10.1016/j.jhazmat.2015.07.006.

Mesnoui, M., Mateos-Naranjo, E., Barcia-Piedras, J.M., Pérez-Romero, J.A., Lotmani, B., Redondo-Gómez, S. (2016). Physiological and biochemical mechanisms preventing Cd-toxicity in the hyperaccumulator *Atriplex halimus* L. *Plant Physiology and Biochemistry* 106: 30-38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.041>.

Miller, H. (2010). Bioestimulation as a form of bioremediation of soil pollutants. *MMG445 Basic Biotechnology eJournal* 6:1.

Minnikin, D.E., O'Donnell, A.G., Goodfellow, M., Alderson, G., Athayle, M., Schaal, K., Parlett, J.H. (1984). An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. *Journal of Microbiological Methods* 2: 233-241. [http://dx.doi.org/10.1016/0167-7012\(84\)90018-6](http://dx.doi.org/10.1016/0167-7012(84)90018-6).

Mitter, B., Petric, A., Shin, M.W., Chain, P.S., Hauberg-Lotte, L., Reinhold-Hurek, B., Nowak, J., Sessitsch, A. (2013). Comparative genome analysis of *Burkholderia phytofirmans* PsJN reveals a wide spectrum of endophytic lifestyles based on interaction strategies with host plants. *Frontiers in Plants Science* 4: 1–15. doi: 10.3389/fpls.2013.00120.

Montero-Calasanz, M.C., Göker, M., Pötter, G., Rohde, M., Spröer, C., Schumann, P., Gorbushina, A.A., Klenk, H.-P. (2012). *Geodermatophilus arenarius* sp. nov., a xerophilic actinomycete isolated from Saharan desert sand in Chad. *Extremophiles* 16: 903–909. doi: 10.1007/s00792-012-0486-4.

Mora-Ruiz, M.D.R., Font-Verdera, F., Díaz-Gil, C., Urdiain, M., Rodríguez-Valdecantos, G., González, B., Orfila, A., Rosselló-Móra, R. (2015). Moderate halophilic bacteria colonizing the phylloplane of halophytes of the subfamily *Salicornioideae* (*Amaranthaceae*). *Systematic and Applied Microbiology* 38: 406–416. <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2015.05.004>.

Mora-Ruiz, M.D.R., Font-Verdera, F., Orfila, A., Rita, J., Rosselló-Móra, R. (2016). Endophytic microbial diversity of the halophyte *Arthrocnemum macrostachyum* across plant compartments. *FEMS Microbiology Ecology* 92: 9. doi: 10.1093/femsec/fiw145.

Moreno, F., Arrue, J.L., Murillo, J.M., Pérez, J.L., Martín, J. (1980). Mineralogical composition of clay fraction in marsh soils of SW Spain. *Polish Journal of Soil Science* 13: 65-72.

Moreno-Jiménez, E., Esteban, E., Carpena-Ruiz, R.O., Lobo, M.C., Peñalosa, J.M. (2012). Phytostabilization with Mediterranean shrubs and liming improved soil quality in a pot experiment with a pyrite mine soil. *Journal of Hazardous Materials* 202: 52-9. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.11.013.

Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist* 167: 645–663. doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01487.x.

Nagajyoti, P.C., Lee, K.D., Sreekanth, T.V.M. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants, a review. *Environmental Chemistry Letters* 8: 199-216. doi: 10.1007/s10311-010-0297-8.

Nelson, C.H., Lamothe, P.J. (1993). Heavy metal anomalies in the Tinto and Odiel river and estuary system, Spain. *Estuaries* 16: 496–511. doi: 10.2307/1352597.

Newman, L.A., Reynolds, C.M. (2005). Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants. *Trends in Biotechnology* 23: 6–8. doi: 10.1016/j.tibtech.2004.11.010.

Nieto, J.M., Sarmiento, A.M., Olias, M., Delvalls, A. (2007). Acid mine drainage pollution in the Tinto and Odiel rivers (Iberian Pyrite Belt, SW Spain) and bioavailability of the transported metals to the Huelva Estuary. *Environment International* 33: 445-455. doi: 10.1016/j.envint.2006.11.010.

Nies, D.H., Silver, S. (2007). *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. Springer, Berlin. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-69771-8>.

Oren, A. (2015). Halophilic microbial communities and their environments. *Current Opinion in Biotechnology* 33: 119-124. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2015.02.005>.

Osmond, C.B., Bjorkman, O., Anderson, D.J. (1980). *Physiological processes in plant ecology, toward a synthesis with Atriplex, Ecological Studies*, volumen 36. Heidelberg, New York.

Padmavathamma, P.K., Li, L.Y. (2007). Phytoremediation technology: hyper-accumulation metals in plants. *Water, Air and Soil Pollution* 184: 105-126. doi:10.1007/s11270-007-9401-5.

Pajuelo, E., Rodríguez-Llorente, I.D., Lafuente, A., Caviedes, M.A. (2011). Legume-*Rhizobium* symbioses as a tool for bioremediation of heavy metals polluted soils. In: Khan, M.S., Zaidi, A., Goel, R., Musarrat, J. (Eds.) *Biomanagement of metal-contaminated soils. Environmental Pollution* volumen 20 (pp.95-123). Springer, London.

Pajuelo, E., Rodríguez-Llorente, I.D., Lafuente, A., Pérez-Palacios, P., Doukkali, B., Caviedes, M.A. (2014). Engineering the rhizosphere for the purpose of bioremediation: an overview. *CAB Reviews Perspectives in Agriculture Veterinary Science Nutrition and Natural Resources* 9: 1. doi: 10.1079/PAVSNNR20149001.

Paredes-Páliz, K.I., Caviedes, M.A., Doukkali, B., Mateos-Naranjo, E., Rodríguez-Llorente, I.D., Pajuelo, E. (2016a). Screening beneficial rhizobacteria from *Spartina maritima* for phytoremediation of metal polluted salt marshes: comparison of gram-positive and gram-negative strains. *Environmental Science and Pollution Research* 23: 19825-37. doi: 10.1007/s11356-016-7184-1.

Paredes-Páliz, K.I., Pajuelo, E., Doukkali, B., Caviedes, M.A., Rodríguez-Llorente, I.D., Mateos-Naranjo, E. (2016b). Bacterial inoculants for enhanced seed germination of *Spartina densiflora*: Implications for restoration of metal pollutes areas. *Marine Pollution Bulletin* 110: 396-400. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.06.036>.

Park, J.H., Lamb, D., Paneerselvam, P., Choppala, G., Bolan, N., Chung, J.W. (2011). Role of organic amendments on enhanced bioremediation of heavy metal(loid) contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials* 185: 549–74. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.09.082>.

Patten, C.L., Glick, B.R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3795–3801. doi:10.1128/AEM.68.8.3795-3801.2002.

Peng, J.F., Song, Y.H., Yuan, P., Cui, X.Y., Qiu, G.L. (2009). The remediation of heavy metals contaminated sediment. *Journal of Hazardous Materials* 161: 633-640. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.04.061>.

Penrose, D.M., Glick, B.R. (2002). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia plantarum* 118: 10-15. doi: 10.1034/j.1399-3054.2003.00086.x.

Pérez-Romero, J.A., Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E. (2016). Growth and photosynthetic limitation analysis of the Cd-accumulator *Salicornia ramosissima* under excessive cadmium concentrations and optimum salinity conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* 109: 103-113. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.09.011>.

Pérez-Sirvent, C., Martínez-Sánchez, M.J., García-Lorenzo, M.L., Bech, J. (2008). Uptake of Cd and Pb by natural vegetation in soils polluted by mining activities. *Fresenius Environmental Bulletin* 17: 1666–1671.

Pikovskaya, R.I. (1948). Mobilization of phosphorous in soil connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiologiya* 17: 362-370.

Prescott, H. (2002). *Laboratory exercises in Microbiology* (p.466). McGraw-Hill, New York, USA.

Pujol, J.A., Calvo, J.F., Ramírez-Díaz, L. (2001). Seed germination, growth, and osmotic adjustment in response to NaCl in a rare succulent halophyte from southeastern Spain. *Wetlands* 21: 256–264. doi: 10.1672/0277-5212(2001)021[0256:SGGAAO]2.0.co

Qadir, M., Oster, J. (2002). Vegetative bioremediation of calcareous sodic soils: history, mechanisms, and evaluation. *Irrigation Science* 21: 91–101. doi: 10.1007/s00271-001-0055-6.

Qadir, M., Ghafoor, A., Murtaza, G. (2000). Amelioration strategies for saline soils: a review. *Land Degradation and Development* 11: 501–521. doi:10.1002/1099-145x(200011/12)11:6<501::aid-ldr405>3.0.co;2-s.

Qadir, M., Schubert, S., Ghafoor, A., Murtaza, G. (2001). Amelioration strategies for sodic soils: a review. *Land Degradation and Development* 12: 357–386. doi: 10.1002/ldr.458.

Qadir, M., Boers, T.M., Schubert, S., Ghafoor, A., Murtaza, G. (2003). Agricultural water management in water-starved countries: challenges and opportunities. *Agricultural Water Management* 62: 165–185. doi: 10.1016/s0378-3774(03)00146-x.

Qadir, M., Noble, A.D., Oster, J.D., Schubert, S., Ghafoor, A. (2005). Driving forces for sodium removal during phytoremediation of calcareous sodic and saline–sodic soils: a review. *Soil Use and Management* 21: 173–180. doi:10.1111/j.1475-2743.2005.tb00122.x.

Qin, S., Zhang, Y.J., Yuan, B., Xu, P.Y., Xing, K., Wang, J., Jiang, J.H. (2014). Isolation of ACC deaminase-producing habitat-adapted symbiotic bacteria associated with halophyte *Limonium sinense* (Girard) Kuntze and evaluating their plant growth-promoting activity under salt stress. *Plant and Soil* 374: 753–766. doi: 10.1007/s11104-013-1918-3.

Qiu, R.-L., Zhao, X., Tang, Y.-T., Yu, F.-M., Hu, P.-J. (2008). Antioxidative response to Cd in a newly discovered cadmium hyperaccumulator, *Arabis paniculata* F. *Chemosphere* 74: 6e12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.09.069>.

Quecine, M.C., Araújo, W.L., Rossetto, P.B., Ferreira, A., Tsui, S., Lacava, P.T., Mondin, M., Azevedo, J.L., Pizzirani-Kleiner, A.A. (2012). Sugarcane growth promotion by the endophytic bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 7511–7518. Doi: 10.1128/AEM.00836-12.

Rabhi, M., Hafsi, C., Lakhdar, A., Haji, S., Barhoumi, Z., Hamrouni, M.H., Abdellly, C., Smaoui, A. (2009). Evaluation of the capacity of three halophytes to desalinate their rhizosphere as grown on saline soils under nonleaching conditions. *African Journal of Ecology* 47: 463–468. doi:10.1111/j.1365-2028.2008.00989.x.

Rajkumar, M., Ae, N., Freitas, H. (2009). Endophytic bacteria and their potential to enhance heavy metal phytoextraction. *Chemosphere* 77: 153–160. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.06.047.

Rajkumar, M., Sandhya, S., Prasad, M.N.V., Freitas, H. (2012). Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phyto remediation. *Biotechnology Advances* 30: 1562-1574. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.04.011>.

Ramoliya, P.J., Pandey, A.N. (2002). Effect of salinization of soil on emergence, growth and survival of seedlings of *Cordia rothii*. *Forest Ecology and Management* 176: 185–194.

Rascio, N., Navari-Izzo, F. (2011). Heavy metal hyperaccumulating plant: How and why do they do it? And what makes them so interesting?. *Plant Science* 180: 169-181. doi: 10.1016/j.plantsci.2010.08.016.

Rasouli, F., Kiani Pouya, A., Karimian, N. (2013). Wheat yield and physicochemical properties of a sodic soil from semi-arid area of Iran as affected by applied gypsum. *Geoderma* 193–194: 246–255. doi: 10. 1016/j.geoderma.2012.10.001.

Raymond, J., Siefert, J.L., Staples, C.R. (2004). The natural history of nitrogen fixation. *Molecular Biology and Evolution* 21: 541–554. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh047>.

Reboreda, R., Caçador, I. (2008). Enzymatic activity in the rhizosphere of *Spartina maritima*: potential contribution for phyto remediation of metals. *Marine Environmental Research* 65: 77–84. doi: 10.1016/j.marenvres.2007.09.001.

Redondo-Gómez, S., Wharmby, C., Castillo, J.M., Mateos-Naranjo, E., Luque, C.J., de Cires, A., Luque, T., Davy, A.J., Figueroa, M.E. (2006). Growth and photosynthetic responses to salinity in an extreme halophyte, *Sarcocornia frutescens*. *Physiologia Plantarum* 128: 116–124. doi: 10.1111/j.1399-3054.2006.00719.

Redondo-Gomez, S., Mateos-Naranjo, E., Davy, A.J., Fernandez-Munoz, F., Castellanos, M.E., Luque, T., Figueroa, M.E. (2007). Growth and photosynthetic responses to salinity of the salt-marsh shrub *Atriplex portulacoides*. *Annals of Botany* 100: 555–563. <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcm119>.

Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Andrades-Moreno, L. (2010a). Accumulation and tolerance characteristics of cadmium in a halophytic Cd-hyperaccumulator, *Arthrocnemum macrostachyum*. *Journal of Hazardous Materials* 184: 299-307. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.08.036>.

Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Figueroa, M.E., Davy, A.J. (2010b). Salt stimulation of growth and photosynthesis in an extreme halophyte, *Arthrocnemum macrostachyum*. *Plant Biology* 12: 79–87. doi: 10.1111/j.1438-8677.2009.00207.x.

Redondo-Gómez, S., Andrades-Moreno, L., Mateos-Naranjo, E., Parra, R., Valera-Burgos, J., Arcoa, R. (2011). Synergic effect of salinity and zinc stress on growth and photosynthetic responses of the cordgrass, *Spartina densiflora*. *Journal of Experimental Botany* 62 (15): 5521-5530. doi:10.1093/jxb/err234 A.

Reinhold-Hurek, B., Hurek, T. (1998). Life in grasses: Diazotrophic endophytes. *Trends in Microbiology* 6: 139-144. [http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X\(98\)01229-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X(98)01229-3).

Remans, R., Beebe, S., Blair, M., Manrique, G., Tovar, E., Rao, I.M., Croonenborghs, A., Torres-Gutierrez, R., El-Howeity, M., Michiels, J., Vanderleyden, J. (2008). Physiological and genetic analysis of root responsiveness to auxin-producing plant growth-promoting bacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant and Soil* 302: 149–161. doi: 10.1007/s11104-007-9462-7.

Reshetnikov, A.S., Khmelenina, V.N., Mustakhimov, I., Trotsenko, Y.A. (2011). Genes and enzymes of ectoine biosynthesis in halotolerant methanotrophs. *Methods in Enzymology* 45: 15-28. doi: 10.1016/B978-0-12-386905-0.00002-4.

Rincon, A., Valladares, F., Gimeno, T.E., Pueyo, J.J. (2008). Water stress responses of two Mediterranean tree species influenced by native soil microorganisms and inoculation with a plant growth promoting rhizobacterium. *Tree Physiology* 28: 1693–1701. doi: 10.1093/treephys/28.11.1693.

Roane, T.M., Kellogg, S.T. (1996). Characterization of bacterial communities in heavy metal contaminated soils. *Canadian Journal of Microbiology* 42: 593–603.

Rodas, D.S., De La Campa, A.M.S., De La Rosa, J.D., Oliveira, V., Gómez-Ariza, J.L., Querol, X., Alastuey, A. (2007). Arsenic speciation of atmospheric particulate matter (PM10) in an industrialized urban site in southwestern Spain. *Chemosphere* 66: 1485–1493. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.08.043>.

Rodriguez Martin, J.A., Arana, C.D., Miras, J.J.R., Gil, C., Boluda, R. (2015). Impact of 70 years urban growth associated with heavy metal pollution. *Environmental Pollution* 196: 156–163. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2014.10.014>.

Rubio-Casal, A.E., Castillo, J.M., Luque, C.J., Figueroa, M.E. (2003). Influence of salinity on germination and seeds viability of two primary colonizers of Mediterranean salt pans. *Journal of Arid Environmental* 53: 145–154. doi: 10.1006/jare.2002.1042.

Rueda-Puente, E., García-Hernández, J., Preciado-Rangel, P., Murillo-Amador, B., Tarazón-Herrera, M.A., Flores-Hernández, A., Holguin-Peña, J., Aybar, A.N., Barrón Hoyos, J.M., Weimers, D., Mwandemele, O., Kaaya, G., Mayoral, J.L., Troyo-Diéguez, E. (2007). Germination of *Salicornia bigelovii* ecotypes under stressing conditions of temperature and salinity and ameliorative effects of plant growth-promoting bacteria. *Journal of Agronomy and Crop Science* 193: 167–176. doi: 10.1111/j.1439-037X.2007.00254.x.

Sáinz, A., Grande, J.A., De la Torre, M.L. (2004). Characterisation of heavy metal discharge into the Ria of Huelva. *Environmental International* 30: 556–557. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2003.10.013>.

Sáinz, A., Ruíz, F. (2006). Influence of the very polluted inputs of the Tinto-Odiel System on the adjacent litoral sediments of southwestern Spain: a statistical approach. *Chemosphere* 62: 1612–1622. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.06.045.

Sánchez-Porro, C., de la Haba, R.R., Soto-Ramírez, N., Márquez, M.C., Montalvo-Rodríguez, R., Ventosa, A. (2009). Description of *Kushneria aurantia* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Halomonadaceae*, and a proposal for reclassification of *Halomonas marisflavi* as *Kushneria marisflavi* comb. nov., of *Halomonas indalinina* as *Kushneria indalinina* comb. nov. and of *Halomonas*

avicenniae as *Kushneria avicenniae* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 397–405. doi:10.1099/ij.s.0.001461-0.

Sarma, H. (2011). Metal hyperaccumulation in plants: a review focusing on phytoremediation technology. *Journal of Environmental Science and Technology* 4: 118-138. doi: 10.3923/jest.2011.118.138.

Sasser, M. (1990). Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. *USFCC News* 20: 16.

Schmidt, G.T., Vlasova, N., Zuzaan, D., Kersten, M., Daus, B. (2008). Adsorption mechanism of arsenate by zirconyl-functionalized activated carbon. *Journal of Colloid and Interface Science* 317: 228-234. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2007.09.012>.

Schreiber, U., Schliwa, U., Bilger, W. (1986). Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research* 10: 51–62. doi: 10.1007/BF00024185.

Sethy, S.K., Ghosh, S. (2013). Effect of heavy metals on germination of seeds. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine* 4: 272-275. doi: 10.4103/0976-9668.116964.

Shabala, S. (2013). Learning from halophytes: physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops. *Annals of Botany* 112: 1209-1221. doi: 10.1093/aob/mct205.

Shelef, O., Gross, A., Rachmilevitch, S. (2012). The use of *Bassia indica* for salt phytoremediation in constructed wetlands. *Water Research* 46: 3967– 3976. doi: 10.1016/j.watres.2012.05.020.

Singh, B.K., Munro, S., Potts, J.M., Millard, P. (2007). Influence of grass species and soil type on rhizosphere microbial community structure in grassland soils. *Applied Soil Ecology* 36: 147-155. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2007.01.004>.

Singh, S., Kang, S.H., Mulchandani, A., Chen, W. (2008). Bioremediation: environmental clean-up through pathway engineering. *Current Opinion in Biotechnology* 19: 437-444. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2008.07.012>.

Sirguey, C., Ouvrad, S. (2013). Contaminated soils salinity: a threat for phytoextraction? *Chemosphere* 91: 269–274. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.11.024>.

Somers, E., Vanderleyden, J., Srinivasan, M. (2004). Rhizosphere bacterial signalling: A love parade beneath our feet. *Critical Reviews in Microbiology* 30: 205–240. doi: 10.1080/10408410490468786.

Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. In: Uden, F. (Ed.) *FEMS Microbiology Reviews* (pp. 425–448). Blackwell Publishing Ltd. New York, USA.

Staneck, J.L., Roberts, G.D. (1974). Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Applied Microbiology* 28: 226–231.

Tak, H.I., Ahmad, F., Babalola, O.O. (2013). Advances in the application of plant growth-promoting rhizobacteria in phytoremediation of heavy metals. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 223: 33–52. doi: 10.1007/978-1-4614-5577-6_2.

Tanimoto, E. (2005). Regulation and root growth by plant hormones-roles for auxins and gibberellins. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24: 249–265. <http://dx.doi.org/10.1080/07352680500196108>.

Teitzel, G.M., Parsek, M.R. (2003). Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 2313-2320.

Tindall, B.J. (1990). A comparative study of the lipid composition of *Halobacterium saccharovororum* from various sources. *Systematic and Applied Microbiology* 13: 128-130. [http://dx.doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80158-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80158-X).

Tóth, G., Hermann, T., Da Silva, M.R., Montanarella, L. (2016). Heavy metals in agricultural soils of the European Union with implications for food safety.

Environment International 88: 299-309.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2015.12.017>.

Trotel-Aziz P, Couderchet M, Biagiante S, Aziz A. (2008). Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. *Environmental and Experimental Botany* 64: 21–32.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.envexbot.2007.12.009>.

Ullah, A., Mushtaq, H., Ali, H., Munis, M.F.H., Javed, M.T., Chaudhary, H.J., (2015). Diazotrophs-assisted phytoremediation of heavy metals: a novel approach. *Environmental Science and Pollution Research* 22: 2505-2514. doi: 10.1007/s11356-014-3699-5.

Ungar, I.A. (1978). Halophyte seed germination. *Botanical Review* 44: 233–264.
<http://www.jstor.org/stable/4353933>.

Ungar, I.A., Khan, M.A. (2001). Effect of bracteoles on seed germination and dispersal of two species of *Atriplex*. *Annals of Botany* 87: 233–239.
<https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1321>.

Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.-L., Touraine, B., Moënne-Loccoz, Y., Muller, D. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science* 4: 356. doi: 10.3389/fpls.2013.00356.

Valls, M., de Lorenzo, V. (2002). Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiology Reviews* 26: 327-338. doi: 10.1016/S0168-6445(02)00114-6.

Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., Thewys, T., Vassilev, A., Meers, E., Nehnevajova, E., van der Lelie, D., Mench, M. (2009). Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environmental Science and Pollution Research* 16: 765-794. doi: 10.1007/s11356-009-0213-6.

Vaas, L. A. I., Sikorski, J., Michael, V., Göker, M., Klenk, H.-P. (2012). Visualization and curve parameter estimation strategies for efficient exploration of phenotype microarray kinetics. *PLoS One* 7: e34846. doi: 10.1371/journal.pone.0034846.

Vaas, L. A. I., Sikorski, J., Hofner, B., Fiebig, A., Buddruhs, N., Klenk, H.-P., Göker, M. (2013). opm: an R package for analyzing OmniLog (R) phenotype microarray data. *Bioinformatics* 29: 1823–1824. doi: 10.1093/bioinformatics/btt291.

Ventosa, A. (2006). Unusual micro-organisms from unusual habitats: hypersaline environments. In: Logan, N., Lappin-Scott, H. and Oyston, P. (Eds.) *Prokaryotic Diversity: Mechanism and Significance* (pp. 223–254). Cambridge University Press. Cambridge. doi: 10.1017/CB9780511754913.015.

Vicente, O., Boscaiu, M., Naranjo, M.A., Eestrelles, E., Bellés, J.M., Soriano, P. (2004). Responses to salt stress in the halophyte *Plantago crassifolia* (Plantaginaceae). *Journal of Arid Environments* 58: 463–481. doi: 10.1016/j.jaridenv.2003.12.003.

Von Sengbusch, P. (2003). *Halophytes*. Botanik Online, University of Hamburg.

Walker, D.J., Lutts, S., Sánchez-García, M., Correal, E. (2013). *Atriplex halimus* L.: its biology and uses. *Journal of Arid Environments* 100-101: 111-121 doi:10.1016/j.jaridenv.2013.09.004.

Wan, Y., Luo, S., Chen, J., Xiao, X., Chen, L., Zeng, G., Liu, C., He, Y. (2012). Effect of endophyte-infection on growth parameters and Cd-induced phytotoxicity of Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. *Chemosphere* 89: 743-750. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.07.005>.

Wang, F., Cui, X., Dong, C.H. (2013). Ethylene signaling and regulation in plant growth and stress responses. *Plant Cell Reports* 32: 1099-1109. doi: 10.1007/s00299-013-1421-6.

Wang, Y., Dai, C.-C. 2010. Endophytes: a potential resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation. *Annals of Microbiology* 61: 207–215. doi: 10.1007/s13213-010-0120-6.

- Wang, C-Q., Zhao, J-Q., Chen, M., Wang, B-S. (2006). Identification of betacyanin and effects of environmental factors on its accumulation in halophyte *Suaeda salsa*. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology* 32: 195–201.
- Wani, P.A., Khan, M.S., Zaidi, A. (2007). Synergistic effect of the inoculation with nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing rhizobacteria on performance of field-grown chickpea. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 170: 283–287. doi: 10.1002/jpln.200620602.
- Wong, V.N.L., Dalal, R.C., Greene, R.S.B. (2009). Carbon dynamics of sodic and saline soils following gypsum and organic material additions: a laboratory incubation. *Applied Soil Ecology* 41: 29–40. doi: 10.1016/j.apsoil.2008.08.006.
- Woodell, S.R.J. (1985). Salinity and seed germination patterns in coastal halophytes. *Vegetatio* 61: 223–229. doi: 10.1007/BF00039828.
- Wu, X., Cobbina, S.J., Mao, G., Xu, H., Zhang, Z., Yang, L. (2016). A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environmental Science and Pollution Research* 23: 8244–8259. doi:10.1007/s11356-016-6333-x.
- Wuana, R.A., Okieimen, F.E. (2011). Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *ISRN Ecology* 2011: ID 402647. 20 páginas. <http://dx.doi.org/10.5402/2011/402647>.
- Yang, J., Kloepper, J., Ryu, C. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science* 14: 1–4. doi: 10.1016/j.tplants.2008.10.004.
- Yensen, N.P. (2008). Halophyte uses for the twenty-first century. In: Khan, M.A., Weber, D.J. (Eds.) *Ecophysiology of High Salinity Tolerant Plants* (pp. 367–396).
- Yensen, N.P., Biel, K.Y. (2006). Soil remediation via salt-conduction and the hypotheses of halosynthesis and photoprotection ecophysiology of high salinity tolerant plants. In: Khan, M.A., Weber, D.J. (Eds.) *Tasks for vegetation science* 34. Volume 40 (pp 313–344). Springer Netherlands. doi:10.1007/1-4020-4018-0_21.

Yin, L., Ren, A., Wei, M., Wu, L., Zhou, Y., Li, X., Gao, Y. (2014). *Neotyphodium Coenophialum*-Infected Tall Fescue and Its Potential Application in the Phytoremediation of Saline Soils. *International Journal of Phytoremediation* 16(3): 235-246. doi: 10.1080/15226514.2013.773275.

Zeidler, D., Zahringer, U., Gerber, I., Dubery, I., Hartung, T., Bors, W., Hutzler, P., Durner, J. (2004). Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: Lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 101: 15811–15816. doi: 10.1073/pnas.0404536101.

Zhao, Y. (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual Review of Plant Biology* 61: 49–64. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112308.

Zhao, S., Zhou, N., Zhao, Z-Y., Zhang, K., Wu, G-H., Tian, C-Y. (2016). Associated with the Halophyte *Salicornia europaea* and Evaluation of their Promoting Activity Under Salt Stress. *Current Microbiology* 73: 574-581. doi: 10.1007/s00284-016-1096-7.

Zhuang, X., Chen, J., Shim, H., Bai, Z. (2007). New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environment International* 33: 406-413. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2006.12.005>.

Zou, Z., Wang, G. (2010). *Kushneria sinocarnis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a Chinese traditional cured meat. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60: 1881–1886. doi: 10.1099/ijs.0.013797-0.

“La contaminación nunca debería ser el precio de la prosperidad”

Al Gore

