



UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa



Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Posgrado en Biotecnología

TESIS

**“INFLUENCIA DE UN COCULTIVO MICROALGA-BACTERIA SOBRE LA
BIORREMEDIACIÓN DE ARSÉNICO POR *Acacia farnesiana*”**

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta

KELLY JOHANA SANTOS MANCILLA

Matrícula: 2223803738

Contacto: skellyjasm@gmail.com

DRA. TANIA LORENA VOLKE SEPULVEDA

DIRECTORA

Jurado

DRA. NANCY VELASCO ALVAREZ

PRESIDENTA

DR. FRANCISCO JAVIER FIGUEROA MARTINEZ

SECRETARIO

DRA. CALIOPE MENDARTE ALQUISIRA

VOCAL

DRA. ILHUICE NEMI ALCANTARA MARTINEZ

VOCAL

Iztapalapa, Ciudad de México. 12 de noviembre de 2024

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Metropolitana y al Posgrado en Biotecnología por aceptarme y darme las herramientas necesarias para poder llevar a cabo mis estudios y trabajo de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la ayuda económica recibida durante el desarrollo de este proyecto de investigación.

A la Dra. Tania Volke Sepúlveda por todo su apoyo, paciencia, tiempo, esfuerzo, dedicación y consejos que hicieron posible finalizar este trabajo.

A la Dra. Nancy Velasco Alvarez y a la Dra. Caliope Mendarte Alquisira por todas sus asesorías, observaciones, tiempo, consejos y paciencia durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Francisco Figueroa Martínez, a la Dra. Nemi Alcántara Martínez, a la Dra. Ana Paulina Gómez y al Dr. Cesar Rojas Loria por sus consejos, ayuda en la resolución de dudas y comentarios que ayudaron a mejorar este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio y del Posgrado por toda su ayuda y consejos, por todas las risas en los días felices y en los días no tan felices, gracias por cada sonrisa.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis familiares y amigos, gracias por siempre apoyarme, cuidarme y escucharme. Me dan la fuerza y el ánimo para seguir adelante.

A mi madre María Eugenia y a mi padre Enrique Elías por siempre impulsarme a seguir mis sueños y cumplir mis metas, gracias por todo su amor y apoyo a pesar de la distancia. A mi hermana Carol y a mi hermano Daniel, por siempre hacerme sentir especial y por todo su amor incondicional, por todas las risas. A mis sobrinas Emma y Mía, gracias por su ternura y por sacarme siempre sonrisas con sus ocurrencias. A mi abuelo Enrique, a mi tío Luis Eduardo, a mi tía Zoraida, a mi tía Alix, a mi tía Esperanza y a mi tía Jaqueline, por todo su apoyo, amor y consejos. A mi tío Jorge por siempre aconsejarme y acercarme a la ciencia. A mis abuelos Evangelina y Pablo, por su amor incondicional y por todas las historias. A mi abuela Teresa, mi Tata, por cuidarme siempre, gracias por todo tu amor, por cada palabra, por cada carcajada y por cada abrazo.

A mis amigos y primos, por todo su amor, ánimo, risas y consejos, hacen mis días más felices. Gracias Stephanie, Sharon, Mathew, René, Arinda, Dina, Nathalie, Álvaro, Katherine, Luz Adriana, Ángel, Susana, Jorge, Carolina, Alejandra, Natalia, Andrea y Jennifer.

A la familia Vázquez-Solis por hacerme sentir como un miembro más de su familia, por todo su apoyo, palabras, cariño y amor. Gracias Jessica, Janet y Ramón.

A Lorenza y a Cayetana por su amor y por alegrarme los días.

A todos los que en algún momento me ofrecieron una mano o palabras de aliento, gracias infinitas.

RESUMEN

El arsénico es un elemento tóxico que se puede encontrar en altas concentraciones en suelos y aguas, causando daño a la salud humana y al medio ambiente. Por esta razón, se han planteado estrategias para su remoción, como es el uso de plantas y microorganismos asociados a éstas. Dentro de estos microorganismos se encuentran los endófitos, que tienen efectos positivos no solo en la salud de la planta sino en su capacidad de acumular arsénico, además, en cocultivo tienen un efecto mayor gracias a su sinergismo y diversidad metabólica. El objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto de la inoculación de *A. farnesiana* con un cocultivo de los microorganismos endófitos *Coccomyxa simplex* y *Methylobacterium oryzae* sobre su tolerancia y capacidad para acumular arsénico. Para lo que se cultivaron plantas de *A. farnesiana*, *A. farnesiana* en asociación con *C. simplex* y *A. farnesiana* en asociación con el cocultivo, con y sin 580 μM de As, durante 50 ± 3 días en condiciones *in vitro*. La relación de la planta con los microorganismos aumentó la acumulación de arsénico en tallos y raíces, pero no afectó la biomasa vegetal. Sin embargo, la inoculación del cocultivo mejoró la producción de pigmentos fotosintéticos por las plantas, aumentando la concentración de clorofila a ~ 2.08 veces, de clorofila b ~ 2.16 veces y de carotenoides ~ 2.48 veces. Esta mejora se pudo deber parcialmente a la capacidad del cocultivo de producir biopelículas y sideróforos en presencia de arsénico, en contraste con la microalga. Sin embargo, la inoculación de la microalga mantuvo los niveles de los pigmentos similares a los de las plantas control, que no tuvieron contacto con el contaminante. Además, la actividad en conjunto de la defensa antioxidante, peroxidasas y catalasas, y el aumento en la concentración de la molécula glutatión (GSH), fueron factores claves en la protección contra el estrés oxidante en *A. farnesiana*, permitiéndole tolerar arsénico, incluso al aumentar el factor de bioacumulación (FBA) de este elemento tóxico en los tratamientos inoculados, ~ 2.93 veces en las plantas en asociación con el cocultivo y ~ 2.88 veces en las plantas en asociación con la microalga.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	6
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	8
2.1	Contaminación por arsénico	8
2.2	Daños al medio ambiente y a la salud por elementos tóxicos	9
2.2.1	<i>Tolerancia y toxicidad de elementos tóxicos en microorganismos</i>	10
2.2.2	<i>Mecanismos de defensa y toxicidad de elementos tóxicos en plantas</i>	11
2.3	Fitorremediación asistida por microorganismos endófitos	14
2.4	Antecedentes de los organismos en estudio	16
2.4.1	<i>Acacia farnesiana: una planta tolerante a elementos tóxicos</i>	16
2.4.2	<i>Methylobacterium oryzae: una bacteria endófito que mejora la tolerancia vegetal.</i> 17	
2.4.3	<i>Coccomyxa simplex y su tolerancia a metales pesados</i>	18
2.5	Cocultivos alga-bacteria para la remoción de contaminantes	19
3	JUSTIFICACIÓN	22
4	HIPÓTESIS	23
5	OBJETIVOS	23
5.1	Objetivo general	23
5.2	Objetivos específicos	23
6	MATERIALES Y MÉTODOS	24
6.1	Estrategia experimental general	24
6.2	Material biológico	25
6.2.1	<i>Obtención in vitro de plantas de A. farnesiana</i>	26
6.2.2	<i>Evaluación de las condiciones de colonización</i>	26
6.3	Caracterización de los microorganismos endófitos	27
6.3.1	<i>Tolerancia a arsenato de sodio</i>	28
6.3.2	<i>Capacidad de reducción de arsenato de sodio</i>	28
6.3.3	<i>Capacidad de formación de biopelículas</i>	28
6.3.4	<i>Producción de sideróforos</i>	29
6.4	Cultivos de <i>A. farnesiana</i> -endófitos bajo estrés por arsenato	30
6.4.1	<i>Verificación de presencia de microorganismos</i>	31
6.4.1.1	<i>A. farnesiana – C. simplex</i>	31
6.4.1.2	<i>A. farnesiana – M. oryzae</i>	31
6.5	Cambios fisiológicos y acumulación de arsénico por <i>A. farnesiana</i>	31
6.5.1	<i>Crecimiento vegetal</i>	31
6.5.2	<i>Pigmentos fotosintéticos</i>	31
6.6	Cuantificación de arsénico total	32
6.6.1	<i>Digestión ácida asistida por microondas</i>	32
6.6.2	<i>Análisis por espectrometría de absorción atómica (EAA)</i>	32
6.6.3	<i>Capacidad de bioacumulación y translocación de arsénico</i>	33
6.7	Pruebas bioquímicas	33

6.7.1	<i>Obtención de extractos crudos</i>	33
6.7.2	<i>Determinación de glutatión (GSH) total</i>	33
6.7.3	<i>Actividad peroxidasa (POX)</i>	34
6.7.4	<i>Actividad catalasa (CAT)</i>	34
6.8	Análisis estadístico	34
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
7.1	<i>Escarificación de semillas de <i>A. farnesiana</i></i>	35
7.2	<i>Estandarización de las condiciones para el cultivo de <i>A. farnesiana</i></i>	36
7.2.1	<i>Desinfestación superficial de semillas</i>	36
7.2.2	<i>Condiciones para la obtención de plantas</i>	37
7.3	<i>Condiciones para la colonización microbiana</i>	38
7.3.1	<i>Crecimiento</i>	39
7.3.2	<i>Contenido de pigmentos fotosintéticos</i>	40
7.3.3	<i>Actividad peroxidasa (POX)</i>	43
7.3.4	<i>Verificación de presencia de microorganismos</i>	44
7.4	<i>Tolerancia a arsénico por los microorganismos</i>	48
7.4.1	<i>Capacidad de crecer en presencia de arsenato</i>	49
7.4.2	<i>Capacidad de reducción de arsenato</i>	50
7.4.3	<i>Formación de biopelículas</i>	52
7.4.4	<i>Producción de sideróforos</i>	55
7.5	<i>Efecto de un cocultivo en la tolerancia a arsénico de <i>A. farnesiana</i></i>	57
7.5.1	<i>Crecimiento</i>	57
7.5.2	<i>Acumulación de arsénico en <i>A. farnesiana</i></i>	59
7.5.3	<i>Concentración de pigmentos fotosintéticos</i>	61
7.5.4	<i>Defensa antioxidante</i>	63
7.5.4.1	<i>Actividad peroxidasa (POX)</i>	63
7.5.4.2	<i>Actividad catalasa (CAT)</i>	64
7.5.4.3	<i>Glutatión (GSH) total</i>	66
7.5.5	<i>Verificación de presencia de microorganismos</i>	68
8	CONCLUSIONES	71
9	PERSPECTIVAS	72
10	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

1 INTRODUCCIÓN

El arsénico es un metaloide tóxico que está ampliamente distribuido en la superficie terrestre y se puede encontrar en cuatro diferentes estados de oxidación (+5, +3, 0 y -3). De éstos, el arsenato (As(V)) y el arsenito (As(III)) son las formas más comunes en matrices terrestres y acuáticas (Satyapal *et al.*, 2018). La contaminación de estas matrices ocurre principalmente debido a los efluentes provenientes de industrias de fabricación de pesticidas y herbicidas, vidrios, conservadores de madera, fármacos, electrónicos y baterías, pinturas, adhesivos, armas, agricultura y minería (Bertin *et al.*, 2021; Medina-Pizzali *et al.*, 2018; Juncos *et al.*, 2016). En México, la minería es una de las principales fuentes de contaminación de suelos por este elemento tóxico, especialmente en estados como Chihuahua, Coahuila, Durango y San Luis Potosí (Alarcón-Herrera *et al.*, 2020), esto debido a que este metaloide es un residuo de diferentes procesos de extracción de minerales de alto interés comercial, como el cobre y el oro, siendo difícil de recuperar, y acumulándose en residuos mineros, convirtiendo así a la minería en la principal fuente de contaminación de suelos por arsénico en México (Trejo y de la Rosa *et al.*, 2005).

Por todo esto, se han propuesto una serie de estrategias económicas y sostenibles para la remediación de suelos contaminadas con este elemento tóxico. Entre éstas, se encuentran la inmovilización química, la biorremediación y la fitorremediación (Nava-Reyna y Medrano-Macías, 2022). Esta última consiste en el uso de plantas y microorganismos asociados a estas, para remover o estabilizar elementos tóxicos (Mench *et al.* 2009), y supone ventajas sobre otras tecnologías al no producir contaminantes secundarios y poderse realizar *in situ*. Para su implementación, es necesario seleccionar plantas tolerantes que puedan remover o transformar los contaminantes en formas menos tóxicas dentro de sus tejidos vegetales (Li *et al.*, 2022). Estas plantas tienen mecanismos intracelulares que les permiten contrarrestar el daño oxidante que contaminantes como el arsénico puedan causar a su funcionamiento y estructura celular, ya que reemplaza el fósforo presente en el ADN y el que participa en diversas reacciones de fosforilación, causando disrupción de la síntesis de ATP, y afectando la fotosíntesis y la cadena de transporte de electrones. Además, la reducción de As(V) a As(III) lleva a la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO) que puede causar lipoperoxidación de la membrana celular. La respuesta de defensa antioxidante de la planta ante tal situación, incluye enzimas como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasa (POX), además de otras relacionadas con el ciclo glutatión-aspartato como la glutatión-S-transferasa (GST) y la síntesis de moléculas

como el tripéptido glutatión (GSH), que es precursor de fitoquelatinas, y puede unirse al As(III) para acumularlo en las vacuolas (Alcántara-Martínez *et al.*, 2016, 2018).

Acacia (Vachellia) farnesiana, huizache, es un arbusto tolerante a arsénico de la familia Fabaceae. Se caracteriza por ser capaz de crecer en climas semi-áridos y áridos, y en una gran variedad de tipos de suelos, desde arcillas pesadas a arenas (Maldonado-Magaña *et al.*, 2011). Esta planta es una excelente opción para la fitorremediación de As(V), pues es capaz de crecer y completar su ciclo de vida en zonas áridas de México con temperaturas y valores extremos de pH, contaminadas con altas concentraciones de arsénico (Alcántara-Martínez *et al.*, 2022).

Varios estudios han demostrado que la tolerancia de las plantas en presencia de elementos como el arsénico, puede ser mejorada por la simbiosis con microorganismos endófitos que favorecen la producción de pigmentos y ayudan a contrarrestar el estrés oxidante producido por la exposición al contaminante (Ma *et al.*, 2011; Tripathi *et al.*, 2022), lo que es importante porque el estrés oxidante se deriva de un desbalance entre la producción y eliminación de ERO, lo que afectaría la salud de planta (Mendarte-Alquisira *et al.*, 2020). Los endófitos son organismos microscópicos que pueden vivir dentro de los tejidos vegetales y de estimular la biodisponibilidad de elementos químicos en los suelos al modificar el pH, liberar compuestos quelantes como sideróforos, sintetizar fitohormonas, producir metabolitos secundarios, y precipitar elementos tóxicos en la rizosfera (Ma *et al.*, 2011; Sharma, 2021). Se ha reportado que bacterias productoras de sideróforos pueden aumentar la disponibilidad de As y remediar cerca del 90% del contaminante presente en suelos (Nair *et al.*, 2007).

Methylobacterium oryzae es una bacteria endófito y metilótrofa facultativa, Gramnegativa, con actividad CAT y POX positiva, capaz de asociarse con plantas en la rizosfera, filósfera o dentro de los tejidos vegetales. Esta bacteria se ha encontrado asociada con *A. farnesiana* y tiene la capacidad para aumentar su capacidad para tolerar arsénico (Alcántara-Martínez *et al.* 2018). Además de *M. oryzae*, el alga verde *Coccomyxa simplex*, que vive la mayor parte de su ciclo de vida como haploide, se ha encontrado asociada con *A. farnesiana* y se ha sugerido su papel como microorganismo endófito de esta planta; este organismo fotosintético, además de ser tolerante a arsénico, tiene un efecto positivo en la producción de pigmentos fotosintéticos por *A. farnesiana* cuando se encuentran expuestos a este metaloide (Alcántara-Martínez *et al.* 2022).

En este trabajo, se planteó la hipótesis de que el uso de un cocultivo de microorganismos endófitos de *A. farnesiana* -*M. oryzae* y *C. simplex*- podría tener efectos positivos en la tolerancia de la planta a arsénico y aumentar su acumulación. Debido a que se ha reportado que los cocultivos pueden dar beneficios como mayor adaptabilidad a ambientes extremos, mayor

eficiencia en el tratamiento de biorremediación o fitorremediación, y mayor capacidad de tolerar múltiples contaminantes, al compararse con cultivos puros (Li *et al.*, 2022).

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Contaminación por arsénico

El arsénico es un elemento presente en la corteza terrestre, distribuido en el aire, el suelo y el agua, normalmente encontrado en estado de oxidación trivalente y pentavalente cuando se acumula en alimentos y en organismos. Debido a su polaridad y su tamaño, el As(III) puede reaccionar con grupos tiol de cisteínas o con histidinas presentes en proteínas, por lo que puede inactivar múltiples enzimas y afectar el metabolismo (Mateos *et al.*, 2006). Por otro lado, el As(V) puede reemplazar a grupos fosfato en reacciones de fosforilación, además de bloquear la síntesis de proteínas (Hue *et al.*, 2013).

Debido a que el As(V) es un análogo químico de fosfatos, el As puede ser considerado como un contaminante de suelos, alimentos y aguas, al acumularse y alcanzar concentraciones tóxicas que, en algunos sitios cerca a zonas mineras en México, pueden llegar hasta 62,302 mg de As/kg de suelo (Osuna-Martínez *et al.*, 2021). Lo anterior, se debe principalmente a que es un residuo de diferentes actividades antropogénicas (Medina-Pizzali *et al.*, 2018) como, por ejemplo, su uso como componente de algunos herbicidas y pesticidas usados en cultivos agrícolas. En el pasado, el uso de herbicidas con arsénico en campos de caña de azúcar tuvo como consecuencia un aumento en la concentración de este elemento en suelos de Hawái, pasando de 50 a 950 mg de As/kg de suelo (Cutler *et al.*, 2013). Otras actividades antropogénicas que pueden contribuir a aumentar la concentración de arsénico en suelos son las relacionadas con la minería, fabricación de baterías, adhesivos y pinturas, y de fármacos (Medina-Pizzali *et al.*, 2018; Juncos *et al.*, 2016).

En México, se han reportado concentraciones altas de arsénico en varias áreas y se estima que alrededor de 8.81 millones de residentes consumen agua contaminada por este metaloide, en concentraciones mayores a 10 µg/L (Camacho *et al.*, 2011), 14 de los 51 estados tienen concentraciones superiores a 150 µg/L y 21 de 51 por encima de 50 µg/L en aguas subterráneas que son la principal fuente de agua en el país (Osuna-Martínez *et al.*, 2021). En general, las concentraciones más altas de arsénico se encuentran en la zona norte-centro de México, en zonas áridas y semi-áridas, probablemente como consecuencia de las altas tasas de evaporación, las cuales aumentan la acumulación de metales pesados (Nava-Reyna y Medrano-Macías, 2022), incrementando las posibilidades de intoxicación por este elemento.

2.2 Daños al medio ambiente y a la salud por elementos tóxicos

La toxicidad de un metal pesado y de un metaloide depende de factores como su estado de oxidación, tiempo y frecuencia de exposición, concentración o dosis. Además, depende también de las características del organismo expuesto al contaminante (edad, sexo, especie, sensibilidad, genética y factores nutricionales) (Hong *et al.*, 2014). Debido a los daños que pueden ocasionar a la salud y al medio ambiente son definidos como *elementos tóxicos* en esta revisión. Dentro de estos, el arsénico se encuentra en alimentos como una mezcla de compuestos orgánicos e inorgánicos, siendo los primeros los menos tóxicos. El As(III) es considerado más tóxico que el As(V), pero pueden transformarse en la otra por medio de reacciones enzimáticas dentro de las células (Medina-Pizzali *et al.*, 2018).

En los seres humanos, la intoxicación por arsénico puede ocasionar graves daños en órganos vitales (pulmones, riñones e hígado) y piel, al causar estrés oxidante, alteración de la metilación y de los mecanismos de reparación del ADN, daño mitocondrial, proliferación de células, promoción tumoral y carcinogénesis (Malik *et al.*, 2020). Algunos síntomas de intoxicación por este metaloide en animales pueden ser fatiga, colitis, pérdida de peso, debilidad, anorexia, gastritis, pérdida de cabello, hiperqueratosis e hiperpigmentación (Bertin *et al.*, 2021).

Además, disminuye el crecimiento de las plantas al tener un efecto negativo en su metabolismo y fotosíntesis, reduciendo los rendimientos de los cultivos de vegetales, contribuyendo a la erosión de los suelos (Oubane *et al.*, 2021). Ya que, al acumularse en altas concentraciones en suelos disminuye la diversidad de la comunidad microbiana y la modifica de tal forma que disminuyen los genes funcionales asociados con procesos biogeoquímicos, inhibiendo incluso las tasas de nitrificación del suelo (Nahar *et al.*, 2022).

En los alimentos, el arroz es el que presenta una mayor contaminación por arsénico, cuando sus concentraciones en agua potable se encuentran por arriba de 50 µg/L. La cantidad de este metaloide en el arroz podría ser hasta 500 veces mayor en comparación a otros alimentos, entre el 10% al 50% del consumido en el planeta podría tener concentraciones por encima de 500 µg/kg (Banerjee *et al.*, 2013). Otros alimentos de origen vegetal que pueden presentar altas concentraciones de arsénico son la zanahoria, la remolacha y la quinua. En Chile, en el estudio realizado por Pizarro *et al.* (2016), se encontró que la quinua era el alimento evaluado que tenía una mayor concentración de arsénico, pero tenía una bioaccesibilidad reducida al compararse con la zanahoria y la remolacha que obtuvieron un 100% en este parámetro.

2.2.1 Tolerancia y toxicidad de elementos tóxicos en microorganismos

La presencia de elementos tóxicos en altas concentraciones tiene efectos negativos en el metabolismo de los organismos que habitan los suelos contaminados, además de alterar la estructura de enzimas y su función, así como de transportadores transmembranales y proteínas asociadas (Maqsood *et al.*, 2022). Para tratar este tipo de contaminantes en matrices ambientales es necesario convertirlos en formas menos tóxicas, para lo cual, la utilización de microorganismos tolerantes es una excelente opción, pues tienen diversos mecanismos para resistir la presencia de estos compuestos, teniendo así un rol crítico en la estabilización de los ecosistemas. Así, el uso de microorganismos para absorber, depositar o cambiar el estado de oxidación de elementos tóxicos se ha convertido en una alternativa de alto interés (Maqsood *et al.*, 2022).

Por lo general, estos microorganismos (bacterias, microalgas, hongos y levaduras) enlazan estos elementos tóxicos a diferentes grupos funcionales cargados negativamente que se encuentran en el exterior de sus membranas celulares (-COOH, -SH, -OH, -NH₂ y -PO₄⁻³) (Yin *et al.*, 2022), o los secuestran por medio de fitoquelatinas, metalotioneínas, o sideróforos, (Javaid *et al.*, 2021). Los sideróforos son moléculas quelantes de bajo peso molecular que tienen la capacidad de formar complejos con el hierro o con elementos tóxicos como el arsénico, por lo que tienen un potencial como inmovilizadores, y un rol en la tolerancia microbiana (Ferreira *et al.*, 2019). Con relación al As(V), los organismos pueden absorberlo a través de transportadores de fosfato, debido a la similitud química entre ambos, y en cuanto al As(III) por medio de acuaporinas. El As(V) puede luego ser reducido a As(III) por enzimas arsenato reductasas (AR), pudiendo ser extruido de las células o bien ser acumulado en compartimientos celulares al formar conjugados con algunos tioles (Rosen, 2002), además su toxicidad puede ser reducida al unirlo a proteínas o péptidos (Willsky y Malamy, 1980).

En varias bacterias, la resistencia a elementos tóxicos se ha encontrado asociada a genes presentes en plásmidos, así como en cromosomas bacterianos en donde se han identificado genes de tolerancia a cationes y oxianiones de metales pesados y metaloides (Igiri *et al.*, 2018). Como se mencionaron, las bacterias tienen diferentes mecanismos para la remoción de elementos tóxicos, que por lo general involucran biosorción, secuestro, precipitación y reducción a formas menos tóxicas en su interior (Ojha *et al.*, 2022). Algunas bacterias que pueden remover elementos tóxicos son: (i) *Acidithiobacillus ferrooxidans*, con la capacidad de remover Cu²⁺ al formar gránulos de fosfato por la estimulación de la hidrólisis de polifosfato y la formación de complejos metal-fosfato (Alvarez y Jerez, 2004); (ii) *Staphylococcus aureus* y *Citrobacter freundii*, capaces de acumular Pb como un complejo intracelular plomo-fosfato (Levinson y Mahler, 1998);

(iii) *Streptococcus thermophilus* con la capacidad para resistir zinc y cadmio por la presencia de los genes cadASt y cadCSt (Prabhakaran *et al.*, 2018).

En cuanto al arsénico *Klebsiella pneumoniae* se ha reportado como capaz de tolerar hasta 28 mM de arsénico (~2100 mg/L) (Kimura, 1980); y *Methylobacterium* spp. hasta 8 mM (~600 mg/L) (Dourado *et al.*, 2012). De no contar con los mecanismos de defensa mencionados anteriormente, estos microorganismos sufrirían efectos negativos a nivel fisiológico. En *E. coli* se ha observado que el As(V) es un inhibidor potencial de la fosforilación oxidativa, al interrumpir reacciones metabólicas de fosforilación e inhibir la síntesis de ATP, debido a que compite con fosfatos por el ingreso a las bacterias a través de los sistemas de transporte Pit y Pst (Alotaibi *et al.*, 2021).

En eucariotas, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de remover elementos tóxicos de ecosistemas contaminados por medio de procesos de intercambio iónico, siendo también considerada un excelente agente bioabsorbente (Kang *et al.*, 2016). Otros eucariotas como las microalgas producen grandes cantidades de biomasa incluso con bajas concentraciones de nutrientes, y tienen una gran capacidad para absorber estos contaminantes a través de mecanismos de intercambio iónico; por tal razón, son capaces de secuestrar elementos como Cd, Ni y Pb (Gupta *et al.*, 2016; Maqsood *et al.*, 2022).

Se han reportado diversas microalgas para la fitorremediación de elementos tóxicos que, en general, utilizan mecanismos relacionados con biosorción y bioacumulación para la remoción (Ojha *et al.*, 2022). Por ejemplo, *Scenedesmus obliquus* tiene una gran tolerancia al Pb²⁺, la microalga presenta estrés oxidante en presencia de Pb, pero es capaz de controlarlo mediante mecanismos enzimáticos y no enzimáticos que hacen parte de su sistema de defensa antioxidante (Danouche *et al.*, 2020). *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. disminuyen la concentración de cobre, níquel, plomo y zinc de efluentes farmacéuticos (Pratibha *et al.*, 2020). *C. simplex* se ha reportado como capaz de tolerar hasta 2000 µM de As(V) (~276 mg/L de As(V)) (Alcántara-Martínez *et al.*, 2022).

2.2.2 Mecanismos de defensa y toxicidad de elementos tóxicos en plantas

La acumulación de elementos tóxicos en las plantas terrestres ocurre a través del sistema de absorción radicular. Las diferentes formas de los elementos tóxicos son absorbidas de forma selectiva por la raíz de la planta por medio de diferentes rutas y transportadores, cuando se encuentran en altas concentraciones en la rizosfera (Rajkumar & Freitas, 2008). En cuanto al arsénico, el conocimiento sobre los transportadores específicos involucrados en su absorción por las plantas aún no se comprende del todo. Al ser el As(V) y el fosfato (PO₄³⁻) análogos, se ha

sugerido que para atravesar la membrana plasmática de las células radiculares deben utilizar los mismos transportadores (Niazi *et al.*, 2017). No obstante, existen diferentes transportadores de As(V) en diferentes especies de plantas. Por ejemplo, en *Oryza sativa* el arsenato ingresa a las células por medio de transportadores de fosfatos OsPHT1; 1, OsPHT1; 8; en *Arabidopsis thaliana* esto ocurre a través de AtPHT1; 9, AtPHT1; 8, AtPHT1; 7, AtPHT1; 5, AtPHT1; 4, AtPHT1; 1. Además, el transporte de As(V) también está modulado por el facilitador de tráfico del transportador de fosfato 1 (OsPHF1) y la respuesta de inanición de fosfato 2 (PHR2). Para As(III), el transporte ocurre principalmente por medio de canales del tipo de las acuaporinas de la proteína intrínseca (NIP) similar a la nodulina 26, una clase de acuagliceroporinas (Nabi *et al.*, 2021).

La toxicidad del arsénico en plantas depende de la especie vegetal y la especie reactiva del contaminante que esté presente, además de su concentración en suelos (Upadhyay *et al.*, 2020). Diferentes especies de plantas pueden tener diversos mecanismos de defensa en suelos con altas concentraciones de este elemento. Uno de estos mecanismos se relaciona con la reducción de arsenato a arsenito por la enzima citocromo oxidasa, que usa oxígeno como aceptor final de electrones y, por lo tanto, lleva a la formación de ERO como el superóxido (Talukdar, 2013). Otro mecanismo se basa en la metilación del As(III), produciendo diferentes especies orgánicas como ácido mono-metilarsónico, ácido dimetilarsónico, ácido trimetilarsónico, tetrametil arsionato, arsenocolina, arsenobetaína y arsenoazúcares; las cuales son capaces de reaccionar con oxígeno molecular y formar otras ERO, como hidroxilo (-OH) y peróxido de hidrógeno (Cullen, 2014).

Asociados con estos mecanismos de oxidorreducción en plantas, se encuentran el efecto negativo de este elemento sobre la cadena de transporte de electrones y la disminución de la síntesis de clorofila debido principalmente a la falta de ajustes moleculares en los procesos fisiológicos y bioquímicos relacionados con la fotosíntesis en presencia de arsénico orgánico e inorgánico (Zemanová *et al.*, 2021). Por otro lado, el aumento de ERO causa a su vez la lipoperoxidación de la membrana celular, que lleva a un desbalance metabólico y a la pérdida de electrolitos; esto es principalmente causado por los radicales hidroxilo que reaccionan con los átomos de hidrógeno de los lípidos poliinsaturados (Mascher *et al.*, 2002).

Otro efecto negativo del As(III) es su reactividad con los grupos sulfhidrilo (-SH) que contiene la cisteína, causando la interrupción de la formación de enlaces de hidrógeno que tiene a su vez como consecuencia la desnaturalización enzimática, así como la inhibición de los sitios activos que contienen cisteína. Además, también puede reaccionar con los -SH de las proteínas de la

membrana celular, formando complejos que pueden alterar su función y estructura, o bien unirse a transportadores de iones, reduciendo la capacidad de la membrana celular de absorber iones como sodio, potasio y calcio, afectando así el equilibrio iónico en la célula y con esto la homeostasis celular. Además, puede inhibir la acción de proteasas relacionadas con la formación de aminoácidos libres y péptidos, importantes en mecanismos de defensa y señalización celular (Nava-Reyna y Medrano-Macías, 2022).

La toxicidad por arsénico además afecta el crecimiento vegetal, llevando a una disminución en parámetros morfológicos (altura del tallo, crecimiento, peso seco y fresco de hojas, longitud radicular, tamaño de la semilla, área de hojas primarias), en tasas de rendimiento de frutos y en la tasa fotosintética. La reducción de estas características se debe a alteraciones fisicoquímicas en las plantas, deterioro de biomoléculas como pigmentos fotosintéticos, sobreproducción de radicales libres, disrupción de transportadores transmembranales, y alteración de proteínas y enzimas (Nabi *et al.*, 2021). Asimismo, el arsénico en altas concentraciones disminuye la producción de pigmentos fotosintéticos (clorofila a y b), así como la eficiencia del fotosistema II. Se ha reportado también que, en plantas jóvenes, la presencia de concentraciones tóxicas de arsénico puede reducir la tasa de fijación de CO₂ hasta un 20% (Kumari *et al.*, 2018). El arsénico compete por transportadores con los macronutrientes esenciales para la planta y afecta los centros de reacción de los fotosistemas (Abbas *et al.*, 2018).

Las plantas pueden contrarrestar esta serie de daños celulares bajo condiciones de toxicidad por elementos tóxicos a través de la activación de rutas de señalización celular como, por ejemplo, MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos), cascada de fosfato, sistema Ca-calmodulina, señalización de ERO y hormonas. Bajo estrés por arsénico, el primer paso es la percepción de señalización de la proteína, seguido por una regulación positiva de TKL (tipo tirosina quinasa), RLCK (quinasas citoplasmáticas similares a receptores), CRK (regulador CT10 de quinasas), WAK (quinasas asociadas a la pared celular), que inician la cascada de señalización MAPK. Esta cascada de señalización incluye tres proteínas quinasas MAPKKK, MAPKK y MAPK que se activan de forma consecutiva, y finalmente MAPK regula factores de transcripción que inducen la respuesta celular contra el estrés (Nabi *et al.*, 2021). Por otro lado, las fitohormonas como el ácido indol acético (AIA) también juegan un papel vital en la tolerancia y crecimiento vegetal, al activar enzimas que catalizan la degradación de ERO generadas en respuesta a la toxicidad del As(V), como POX y GST (Islam *et al.*, 2015).

Las ERO también actúan como moléculas señalizadoras y activan los mecanismos de defensa antioxidante, que incluyen a la enzima SOD que cataliza la conversión de O₂⁻ a H₂O₂ (Chandrakar

et al., 2017). Otras enzimas importantes que forman parte del mecanismo de defensa antioxidante de la planta contra las ERO y ayudan a la recuperación del daño oxidante incluyen POX como la ascorbato- y glutatión- peroxidasa (APX y G-POX), CAT, glutatión reductasa (GR) y la glutatión-S-transferasa. Además, compuestos no enzimáticos también cumplen un rol importante en el proceso de eliminación de ERO, como el ascorbato (AsA), glutatión (GSH), tocoferoles, alcaloides, carotenoides, prolina y compuestos fenólicos (flavonoides, taninos y lignina) (Rastogi *et al.*, 2019).

Entre las plantas que se han reportado como tolerantes a este elemento tóxico se encuentran *Spirodela polyrhiza*, *Hydrilla verticillata*, *Azolla caroliniana*, *Acacia farnesiana* y *Pteris vittata*; capaces de acumular concentraciones de arsénico en sus tejidos de hasta 26.4 mg/kg, 197.2 mg/kg, 386.1 mg/kg, 7281 mg/kg y 11110 mg/kg, respectivamente (Rahman *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2019; *et al.*, 2017; Alcántara-Martínez *et al.*, 2016; Wei *et al.*, 2019). Por esta razón, son usualmente utilizadas en tecnologías amigables con el medio ambiente que tienen como propósito remediar suelos contaminados por estos metales pesados, como la fitorremediación.

2.3 Fitorremediación asistida por microorganismos endófitos

La fitorremediación es una técnica alternativa y sostenible que requiere bajo capital para la remoción de elementos tóxicos; el proceso implica el uso de plantas y los microorganismos asociados como los de la rizósfera y microorganismos endófitos (Nedjimi, 2021). Las plantas usadas para la fitorremediación de elementos tóxicos son conocidas como metalofitas. Existen tres tipos de metalofitas: las indicadoras de metales, las excluseras y las hiperacumuladoras (Awa y Hadibarata, 2020). Las primeras son aquellas capaces de acumular altas concentraciones de elementos tóxicos en sus tejidos, pero que mueren posteriormente debido a la fitotoxicidad causada. Las segundas son plantas que captan los elementos tóxicos en sus raíces y posteriormente los translocan a sus ramas y hojas. Y las últimas que son las comúnmente utilizadas en esta técnica, son aquellas plantas capaces de acumular altas concentraciones de elementos tóxicos dentro de sus tejidos sin ser afectadas de forma negativa o mostrar señales de fitotoxicidad (Ojha *et al.*, 2022). Las técnicas de fitorremediación también se pueden categorizar con base en el mecanismo de remoción de contaminantes en fitoacumulación, fitoestabilización, fitoextracción, fitodegradación, fitofiltración y fitovolatilización. De particular interés para el caso de elementos tóxicos son la fitoestabilización y la fitoextracción, siendo técnicas de remediación que se pueden diferenciar por la acumulación de estos contaminantes en la porción de la raíz o en las partes aéreas de la planta, respectivamente (Muthusaravanan, *et al.*, 2018; Bertin *et al.*, 2021; Ojha *et al.*, 2022).

La eficiencia de la fitorremediación se puede mejorar por acción de microorganismos endófitos – fitorremediación asistida por endófitos – que ayudan a la movilización de metales en suelos a través de la producción de ácidos orgánicos como oxalato, gluconato, acetato, malato, 2-cetoglutanato, succinato y citrato (Ma *et al.*, 2011). Además, estos organismos inducen la remediación de estos contaminantes por medio del secuestro físico y celular, al unirse a fitoquelatinas, tioles, sideróforos o a diferentes grupos funcionales en la membrana celular (-COOH, -SH, -OH, -NH₂ y -PO₄⁻³), así como gracias a diferentes reacciones de oxidorreducción (Yin *et al.*, 2022; Javaid *et al.*, 2021; Brown *et al.*, 1995). Los microorganismos endófitos producen una variedad de enzimas líticas para la hidrólisis de la pared celular de las plantas, permitiéndoles colonizar su superficie. Además de la ruptura de la pared celular, estas enzimas también pueden asistir a las plantas de forma indirecta contra diferentes microorganismos fitopatógenos (Sharma & Kumar, 2021). Por lo general, los endófitos entran por las raíces de las plantas, pero en algunos casos pueden ingresar a través de flores, hojas, estomas y cotiledones; se pueden encontrar sólo en los tejidos internos adyacentes al punto de entrada o bien estar esparcidos en toda la planta (Rajkumar *et al.*, 2009; Kandasamy y Kathirvel, 2022).

Una ventaja del uso de plantas colonizadas con microorganismos endófitos es que, a pesar de que las plantas pueden abarcar áreas extensas de suelos contaminados, su crecimiento se puede ver afectado por el clima y las características del suelo (Jacoby *et al.*, 2017). Sin embargo, la asociación endosimbiótica les brinda más resistencia a estas condiciones ambientales y promueve el crecimiento vegetal. Asimismo, otorgarles ventajas y mayor tolerancia a concentraciones muy altas de contaminantes que, sin estos microorganismos, podrían inhibir el crecimiento de la planta como consecuencia del estrés oxidante y el daño causado en los sistemas metabólicos, o bien limitar la velocidad de remediación *in situ* (Akansha *et al.*, 2020).

El uso de microorganismos endófitos tiene ventajas frente al uso de los asociados a la rizosfera, a pesar de que ambos tipos de microorganismos tienen mecanismos de control y de promoción de crecimiento vegetal muy similares (Hardoim *et al.*, 2018). Por un lado, los endófitos experimentan menos competencia debido a que se encuentran dentro de los tejidos vegetales y, por otro, están menos expuestos a cambios en las condiciones del suelo (tipo de suelo, pH, temperatura, humedad y concentración de nutrientes) que pueden alterar su proliferación y funcionamiento; en cambio, la salud de la planta, su estado nutricional y su etapa de crecimiento tienen una mayor influencia sobre estos microorganismos (Alves *et al.*, 2022). Los endófitos tienen mayor especificidad metabólica, a pesar de que tanto éstos como los rizosféricos presentan mecanismos de respuesta similares en cuanto a la resistencia a elementos tóxicos (Kong y Glick, 2017).

Algunas especies de endófitos que colonizan el xilema y floema de las plantas son capaces de transmitirse a generaciones futuras a través de las semillas, lo que se considera como un mecanismo de adaptación a metales mediado por microorganismos (Thijs *et al.*, 2017).

Entre los endófitos, los categorizados como facultativos, tienen capacidad para formar biopelículas, lo que les permite tener mayor resistencia a elementos tóxicos, incluyendo el arsénico, así como una mayor capacidad de adsorción. Así, algunos endófitos facultativos son capaces de colonizar el interior de la planta, producir exopolisacáridos y formar biopelículas en la zona de la rizosfera, mejorando su potencial de remediación, aumentando a su vez su capacidad de respuesta rápida y de adaptación a ambientes extremos; todo esto mejora además la resistencia y el crecimiento de las plantas. En el caso particular del arsénico, los microorganismos formadores de biopelículas pueden inmovilizar arsénico y transformarlo en especies orgánicas metiladas que son menos tóxicas, disminuyendo la concentración soluble y reduciendo así el estrés vegetal (Tripathi *et al.*, 2022).

En el estudio realizado por Mukherjee *et al.* (2018), se aislaron microorganismos endófitos de la planta hiperacumuladora de arsénico *Lantana camara*, y se observó que al asociarse con la planta *Solanum nigrum* hubo un incremento en la acumulación de arsénico en esta planta. La importancia de estas cepas endófitas se confirmó en la regulación del transportador MRP (*Multidrug Resistance associated Proteins*) de la raíz, sugiriendo que este consorcio microbiano alteró el proceso de acumulación y detoxificación de arsénico, mejorando la fitorremediación. En el estudio realizado por Yang *et al.* (2012), cuatro cepas bacterianas reductoras de arsénico (*Rhodococcus* sp., *Delftia* sp., *Streptomyces lividans* sp. y *Comamonas* sp.) mejoraron la producción de biomasa vegetal de *Pteris vittata* en 53% y la absorción de arsénico en 44%. Mesa *et al.* (2017), encontraron que los sideróforos producidos por microorganismos endófitos aumentaron la absorción y acumulación de arsénico en raíces y hojas de *Betula celtiberica*. Otra planta reportada como tolerante y acumuladora de arsénico es *Acacia (Vachellia) farnesiana* (Alcántara-Martínez *et al.*, 2016).

2.4 Antecedentes de los organismos en estudio

2.4.1 *Acacia farnesiana*: una planta tolerante a elementos tóxicos

Acacia (Vachellia) farnesiana es una leguminosa conocida comúnmente como “huizache” en México (Olmero-Juárez *et al.*, 2020), que crece en extensas zonas áridas y semiáridas del país en donde se encuentran la gran mayoría de suelos contaminados por elementos tóxicos. Estos

arbustos pertenecen a la clase Fabales y la familia Fabaceae, y se caracterizan por ser árboles perennes, leñosos, de troncos múltiples y ramas espinosas con hojas alternas y pecioladas, con frutos que tienen vainas con semillas en fila (Morales-Domínguez *et al.*, 2019). Este arbusto es tolerante a condiciones de estrés como sequía, se adapta a temperaturas y niveles de pH extremos, y puede crecer en diversos tipos de suelo, incluyendo arenas y arcillas, así como suelos pobres en nutrientes, salinos o muy rocosos (Vozzo, 2002). Además, esta planta puede tolerar altas concentraciones de diferentes elementos tóxicos y por esto puede ser una gran alternativa para la fitorremediación (Maldonado-Magaña *et al.*, 2011).

En el estudio realizado por Garcidueñas-Piña *et al.* (2022), se demostró que *A. farnesiana* es capaz de remover Cu de suelos contaminados de forma eficiente. Por otro lado, Maldonado-Magaña *et al.* (2011), encontraron que esta planta es capaz de fitoestabilizar Pb debido a su tolerancia a concentraciones relativamente altas y su habilidad para acumular grandes cantidades en sus raíces, limitando su translocación a los tejidos aéreos. Puga *et al.* (2006), estudiaron la bioacumulación de zinc y arsénico en plantas de *A. farnesiana* que crecían cerca de presas de relaves en Chihuahua, demostrando su potencial para la remoción de estos contaminantes. Alcántara-Martínez *et al.* (2016), concluyeron que *A. farnesiana* podría ser útil para la remoción de arsénico en zonas altamente contaminadas, reduciendo la propagación de elementos tóxicos en los ecosistemas, al obtener una concentración inhibitoria media (IC₅₀) de 2.8 mM (210 mg/L). Se ha reportado que esta planta es capaz de mejorar su tolerancia a arsénico cuando forma una asociación endosimbiótica con la bacteria *Methylobacterium oryzae*, ya que puede aumentar su acumulación en un 85.3% manteniendo la salud vegetal (Alcántara-Martínez, 2018). Además, de esta planta fue aislada como endófito la microalga *Coccomyxa simplex*, que tiene potencial para la biorremediación de este elemento tóxico (Alcántara-Martínez *et al.*, 2022).

2.4.2 *Methylobacterium oryzae*: una bacteria endófito que mejora la tolerancia vegetal

Las bacterias del género *Methylobacterium*, bacterias metilótrofas facultativas de pigmentación rosa, son los colonizadores dominantes de la filósfera, ya que pueden utilizar compuestos de un carbono (C1), como el metanol. En el estudio realizado por Lodewyckx *et al.* (2001), caracterizaron los endófitos resistentes a Cd y Zn en *T. caerulea* subsp. *calanibarica*; entre los endófitos de los brotes, varias especies de *Methylobacterium* conformaron el 20% de los microorganismos aislados, demostrando además una alta tolerancia a Zn, Cd, Co y Ni.

Este género bacteriano tiene un gran potencial biotecnológico en agricultura, debido a que varias especies promueven el crecimiento vegetal a través de la fijación de N₂, producción de fitohormonas, y protección de la planta frente a patógenos y contaminantes (Torres *et al.*, 2022). Estas bacterias endófitas son capaces de sintetizar altos niveles de citoquininas, especialmente de las formas más activas de trans-Zeatina (tZ) y cis-Zeatina (cZ) (Jorge *et al.*, 2019). Además, las bacterias de este género pueden formar biopelículas, cuya producción se puede ver beneficiada por exudados provenientes de la planta, lo que ayuda al reconocimiento del huésped y a la adhesión a la superficie de la raíz para la posterior formación de biopelículas, seguido de la colonización de los tejidos internos de la planta por la bacteria (Dourado *et al.*, 2015). Asimismo, pueden tolerar condiciones de desecación y sobrevivir en entornos con bajas cantidades de nutrientes, lo que explica su presencia en suelos contaminados con elementos tóxicos (Piotrowska-Seget *et al.*, 2005). De hecho, se ha reportado que pueden tolerar altas concentraciones de diferentes elementos como As, Cd, Cr, Hg y Pb (De Marco *et al.*, 2004). Mishra *et al.* (2018), encontraron que cuatro cepas del género *Methylobacterium* tuvieron resultados positivos en cuanto a la tolerancia a Cd, Cr, Ni, Zn y Cu. En general, las bacterias metilótrofas desempeñan además un papel importante en el correcto funcionamiento de los ecosistemas, al tener un papel activo en varios ciclos biogeoquímicos (De Marco *et al.*, 2004).

Dentro de este género, la especie *oryzae* tiene capacidad para disminuir la toxicidad de elementos tóxicos en plantas (Rajkumar *et al.*, 2012). Madhaiyan *et al.* (2007) aislaron esta bacteria de campos de arroz y encontraron que reduce la toxicidad de Ni y Cd, y que promueve el crecimiento vegetal de plantas de *Lycopersicon esculentum*. Alcántara-Martínez *et al.* (2018) encontraron que la asociación de *A. farnesiana* con la bacteria *M. oryzae* contribuye a compensar el requerimiento de energía durante el estrés por arsénico y a fortalecer el sistema antioxidante de la planta, incrementando el contenido de GSH, disminuyendo la concentración de H₂O₂ y la actividad de enzimas antioxidantes. *M. oryzae* induce además la expresión de proteínas que hacen parte del metabolismo de carbohidratos y aminoácidos azufrados, ayudando a contrarrestar el desequilibrio metabólico inducido por el As(V) bioacumulado en *A. farnesiana*.

2.4.3 *Coccomyxa simplex* y su tolerancia a metales pesados

Las microalgas se protegen de la toxicidad causada por los elementos tóxicos por medio de enzimas antioxidantes, reduciendo compuestos que mantienen el balance redox dentro de las células y ayudando a formar complejos proteína-metal sin comprometer las funciones celulares (Mohsenpour *et al.*, 2021). Otros compuestos organometálicos son almacenados en las vacuolas para controlar la concentración de iones metálicos en el citoplasma y así evitar efectos negativos

en el metabolismo. La biosorción de elementos tóxicos por microalgas ocurre gracias a que la presencia de estos contaminantes estimula la producción de proteínas y péptidos ricos en grupos tiol, además de fitoquelatinas, que forman complejos con éstos y ayudan a disminuir el estrés celular (Priya *et al.*, 2022).

Coccomyxa es un género de alga verde unicelular no móvil y elongada, que pertenece a la clase Trebouxiophyceae (Chlorophyta). Se puede encontrar en diferentes tipos de hábitats, incluyendo ambientes extremos como los que tienen altas concentraciones de elementos tóxicos, bajos valores de pH, temperaturas bajas y altas dosis de radiación ionizante (Řezanka *et al.*, 2019; Aburai *et al.*, 2020). La habilidad de tolerar diversas condiciones de estrés ha ido evolucionando en varias especies de este género de microalgas, por lo que se han convertido en organismos de gran interés biotecnológico (Barcytė y Nedbalová, 2017). Además, varias especies pertenecientes a este género tienen la capacidad de formar biopelículas, lo cual depende de factores ambientales como la luz, pH, concentración de CO₂, limitación de nutrientes, presencia de contaminantes, temperatura y el tipo de superficie. La formación de biopelículas siempre está caracterizada por la producción de exopolisacáridos, ayudando a la adhesión a tejidos vegetales (De Barros, 2015).

En el estudio realizado por Alcántara-Martínez *et al.* (2022) se identificó un alga unicelular verde del género *Coccomyxa* como posible endófito de *A. farnesiana* y potencialmente tolerante a arsénico, siendo el primer informe que sugiere una asociación endófitica entre una microalga y una planta terrestre típica de ambientes áridos. Concluyendo que, aunque el microorganismo tuvo un efecto neutro en el crecimiento de la planta, sí estimula la producción de compuestos fotosintéticos en la planta, independientemente de la presencia de As(V).

2.5 Cocultivos alga-bacteria para la remoción de contaminantes

Los consorcios microbianos entre algas y bacterias heterótrofas son posibles gracias a la relación simbiótica que puede existir entre estos dos grupos de microbianos, debido a que las microalgas son capaces de disolver materia orgánica y carbonato de calcio, fijar CO₂ y liberar O₂, lo cual puede ser utilizado por las bacterias para su proliferación; a su vez, las bacterias liberan CO₂, compuestos orgánicos y vitaminas del complejo B, metabolitos que las microalgas utilizan para aumentar su crecimiento (Croft *et al.*, 2005; Cooper y Smith, 2015; Zhao *et al.*, 2023). Además, estos microorganismos se caracterizan por tener un tamaño pequeño, una gran área superficial, crecimiento y metabolismo rápido, alta actividad biológica, gran capacidad de absorción y de adaptabilidad a diversas condiciones ambientales. Es por esto, que los cocultivos de microalgas-bacterias tienen una gran capacidad metabólica para la absorción de compuestos y elementos

tóxicos en el ambiente (Zhao *et al.*, 2023), además, la formación de biopelículas de las microalgas se puede ver beneficiada por la presencia de bacterias, y esto supone a su vez ventajas en la remediación de contaminantes (De Barros, 2015; Tripathi *et al.*, 2022)

Este tipo de cocultivos tiene muchas aplicaciones, como para el tratamiento de aguas residuales. En el estudio realizado por Li *et al.* (2021), el cocultivo de la bacteria *Bacillus megaterium* y la microalga *Scenedesmus obliquus*, tuvo gran eficiencia en el tratamiento de lodos de biogás, observando que incluso la composición de ácidos grasos en el cocultivo era más apta para la producción de biocombustibles que la del cultivo puro de la microalga. En otro estudio (Wang *et al.* 2023), se analizó el uso de un cultivo puro de la microalga *S. obliquus* y el uso de esta microalga en consorcio con bacterias obtenidas de lodos del lago Sanyuan en China, para la remoción de ciprofloxacina (98%); obteniendo que la microalga en consorcio removió mayor cantidad ($96.1 \pm 0.1\%$) que en cultivo puro ($87.5 \pm 3.5\%$). Este grupo concluyó que las bacterias mejoraron la resistencia de la microalga al contaminante al disminuir el daño celular y aumentar la tasa de remoción, debido a la secreción de ácidos orgánicos, todo esto a su vez relacionado con un co-metabolismo de nitrógeno debido a la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno.

En cuanto a la contaminación por elementos tóxicos, las microalgas tienen la capacidad de desintoxicar y volatilizar algunos de estos contaminantes, ya que son capaces de formar péptidos de unión a metales que controlan su concentración en el citoplasma y con esto neutralizan su toxicidad (Priya *et al.*, 2014). Mubashar *et al.* (2020), evaluaron un cocultivo *Chlorella vulgaris*-*Enterobacter* sp. para la remoción de Cu, Cr y Pb de aguas residuales de la industria textil, concluyendo que la presencia de la bacteria estimuló el crecimiento de la microalga al suplirla con CO₂ adicional y compuestos orgánicos, obteniendo una remoción del 70%. Por otro lado, en el estudio realizado por Tangahu *et al.* (2020), el cocultivo de *C. vulgaris* y *Azotobacter* S8 fue más eficiente en la remoción de cromo en aguas residuales que el cultivo puro de la microalga.

El uso de cultivos mixtos supone algunas ventajas sobre el uso de cultivos puros de microorganismos. La utilización de cocultivos permite interacciones entre diversas especies microbianas que pueden tener como consecuencia capacidades metabólicas y funcionales inesperadas, debido a las interacciones sinérgicas entre estos microorganismos (Jeyasundar *et al.*, 2021). Se ha observado que estos tipos de cultivo pueden mejorar la tolerancia de plantas como el arroz a arsénico y promover su crecimiento (Awasthi *et al.*, 2021), debido a que los microorganismos absorben y transforman al contaminante. Además, estos cocultivos tienen mayores efectos en la promoción del crecimiento de tallos y raíces que los cultivos puros,

probablemente porque promueven el crecimiento de la planta por medio de diferentes mecanismos (Anwar *et al.*, 2019; Spadaro y Gullino, 2005).

3 JUSTIFICACIÓN

Existen diferentes fuentes de exposición a As(V), como son el consumo de agua contaminada, su presencia en agua utilizada para el riego de cultivos alimenticios y la ingesta de alimentos del mar contaminados, por lo que es considerado un gran problema para la salud pública. Además de los daños para la salud humana, este metaloide causa daños en el medio ambiente al provocar alteraciones químicas del suelo y en la salud de los organismos que lo absorben, causando incluso problemas de erosión.

La asociación de plantas con microorganismos es una excelente alternativa para la acumulación de este elemento con fines de fitorremediación, siendo *A. farnesiana* una buena opción por su capacidad para crecer en suelos contaminados, completar su ciclo de vida y abarcar grandes áreas de suelos contaminados. Además, esta planta es capaz de formar asociaciones con microorganismos endófitos que ayudan a aumentar la tolerancia a As(V), tal es el caso de *Coccomyxa simplex* y *Methylobacterium oryzae*. Sin embargo, no existen estudios que analicen el efecto de un cocultivo microalga-bacteria en la tolerancia a arsénico por *A. farnesiana*. Al respecto, se ha demostrado que el uso de cocultivos es una estrategia para aumentar la capacidad para desarrollar funciones más complicadas por las plantas, incrementar la tolerancia a factores ambientales y enfermedades, así como para mejorar la producción de pigmentos y compuestos de interés.

4 HIPÓTESIS

El cocultivo formado por dos microorganismos endófitos de *Acacia farnesiana* – *Methylobacterium oryzae* y *Coccomyxa simplex* – mejorarán su tolerancia a As, aumentando además su acumulación.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la inoculación de *A. farnesiana* con un cocultivo de dos microorganismos endófitos sobre su tolerancia y capacidad para acumular As.

5.2 Objetivos específicos

1. Cuantificar la tolerancia al arsenato de *M. oryzae* y *C. simplex* en monocultivo y cocultivo, y la producción de sideróforos y biopelículas en presencia de este contaminante.
2. Analizar cambios en parámetros fisiológicos (crecimiento y producción de pigmentos fotosintéticos) de *Acacia farnesiana* por efecto de la asociación con *C. simplex* y un cocultivo *C. simplex*–*M. oryzae*.
3. Determinar la tolerancia a As y su bioacumulación por *A. farnesiana* en cultivos asociados con *C. simplex* y con el cocultivo microalga-bacteria.
4. Analizar la influencia de la asociación con *C. simplex* y con el cocultivo *C. simplex*–*M. oryzae* sobre la defensa antioxidante de *A. farnesiana* en presencia de As(V).

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Estrategia experimental general

Con el propósito de cumplir con los objetivos de este proyecto se siguió el modelo experimental de la **Figura 1**. La metodología consistió en 4 partes, la primera para obtener plantas de *A. farnesiana*, se escarificaron sus semillas de forma mecánica para su germinación *in vitro* en medio Murashige-Skoog (MS, Sigma-Aldrich m5519) suplementado con diferentes concentraciones de sacarosa (10 g/L, 20 g/L y 30 g/L) y diferentes tipos de fuente de luz, además se probaron diferentes tratamientos de desinfección superficial.

Luego, en la parte 2 se trasplantaron plantas de 28 ± 3 días a medio MS suplementado con diferentes concentraciones de sacarosa (2.5 g/L, 5 g/L, 10 g/L), y se inocularon las raíces de las plantas con *C. simplex* o con el cocultivo de esta microalga y *M. oryzae*; estas plantas estuvieron en cultivo durante 40 ± 3 días. Se estimó el crecimiento por peso seco de tallos y raíces, se realizó la cuantificación de pigmentos fotosintéticos, y la actividad POX; además, se verificó la presencia de los microorganismos endófitos al sembrar segmentos en placas con medio de cultivo. Esto con el fin de determinar la concentración de sacarosa a utilizar en los tratamientos con arsénico, basándose en el mantenimiento de la salud vegetal y la presencia de los microorganismos.

Por otro lado, en la parte 3 se determinó la capacidad de los microorganismos de tolerar y reducir arsenato de sodio a arsenito de sodio, además de su capacidad de formar biopelículas y producir sideróforos en presencia del contaminante.

Una vez que se determinó la concentración de sacarosa que mantuviera la salud vegetal en presencia de arsenato y se evaluaran las características de interés de los microorganismos, se pasó a la parte 4. En la que plantas que cumplían con las condiciones morfológicas de selección, 3 hojas verdaderas y aproximadamente 3 cm de raíz, fueron trasplantadas a medio MS con arsenato de sodio, y se inocularon sus raíces con *C. simplex* sola y en cocultivo con *M. oryzae*. Las plantas estuvieron expuestas durante 50 ± 3 días a una concentración de As(V) de 580 μ M. Pasado este tiempo, se cuantificó la biomasa seca, la concentración de arsénico total en tallos y raíces, la concentración de pigmentos fotosintéticos, la concentración de GSH total, las actividades POX y CAT. Se verificó la presencia de los microorganismos endófitos por el método de siembra en placa. Para cada ensayo, se realizaron pruebas estadísticas para comparar los tratamientos.

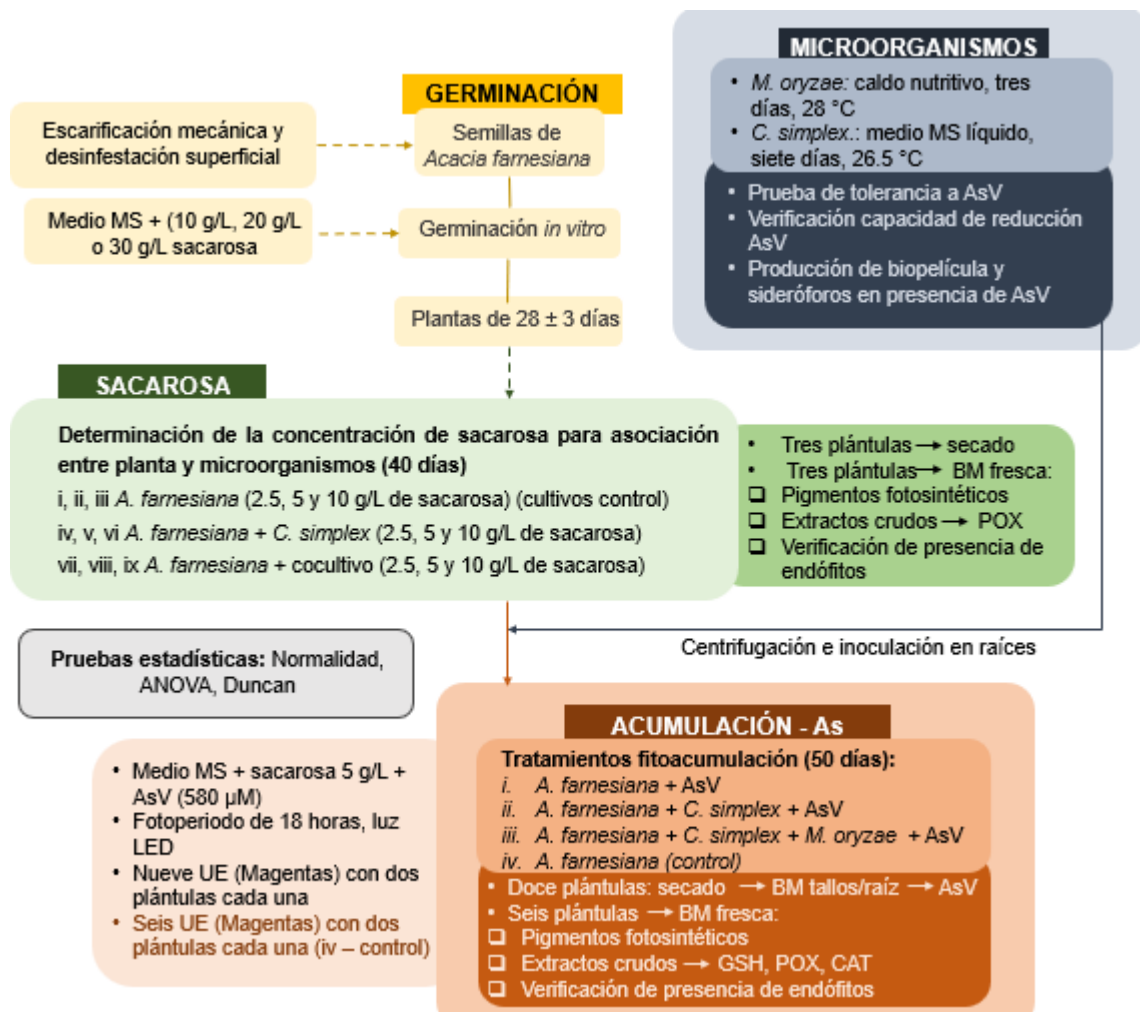


Figura 1. Estrategia experimental general. La parte 1 se refiere a lo que está en color amarillo, la parte 2 se refiere a lo que está en color verde, la parte 3 se refiere a lo que está en color azul y la parte 4 a lo que está en color coral. Los tratamientos de cada parte se encuentran enumerados con números romanos.

6.2 Material biológico

Para este proyecto se utilizaron semillas de *A. farnesiana* (L.) Willd. colectadas en el estado de Querétaro, las semillas se almacenaron en un lugar oscuro y seco para asegurar su preservación, a temperatura ambiente, y tenían un diámetro entre 0.6-0.85 cm. Las cepas de *M. oryzae* (AFM14) y de *C. simplex* usadas en el estudio se aislaron de plantas de *A. farnesiana* creciendo en condiciones *in vitro* (Alcántara-Martínez, 2018; Alcántara-Martínez, 2022).

6.2.1 Obtención *in vitro* de plantas de *A. farnesiana*

Para el cultivo *in vitro* de *A. farnesiana* se seleccionaron las semillas viables mediante el método de flotación en agua (Camacho *et al.*, 1992). Posteriormente, las semillas seleccionadas fueron escarificadas de forma mecánica, lijándose a un costado sin lastimar el embrión. Luego, se realizó una desinfestación superficial de las semillas en donde se probaron tres tratamientos diferentes (**Tabla 1**).

Las semillas desinfestadas fueron sembradas de forma aséptica, cuatro semillas por caja Magenta (Sigma-Aldrich V8505) con medio MS, suplementado con sacarosa y Phytigel (Sigma, 1.8 g/L). El pH del medio se ajustó a 5.7 ± 0.1 utilizando NaOH (1 N), para pasar a la esterilización de las cajas (15 lb/in², 20 min) antes de la siembra. Las semillas se incubaron a 26 ± 1 °C, con fotoperiodos de 18 horas con luz LED (38 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$), hasta que la raíz alcanzó una longitud de aprox. 3 cm y se desarrollaron 3 hojas verdaderas (aprox. 28 días). Luego, las plantas que cumplieron con estas condiciones fueron trasplantadas a cada tratamiento (**Figura 1**).

Tabla 1. Tratamientos de desinfestación superficial de semillas de *A. farnesiana*.

Tratamiento	Descripción
1	30 min en detergente (1%, p/v), 5 lavados con agua destilada estéril, 30 s en etanol (70%, v/v), enjuague con agua destilada estéril, 30 min en hipoclorito de sodio (1.8%, v/v), 6 lavados con agua destilada estéril (Alcántara-Martínez, 2018).
2	30 min en detergente (1% p/v), 5 lavados con agua destilada estéril, 30 s en etanol (70%, v/v), enjuague con agua destilada estéril, 35 min en hipoclorito (1.8%, v/v), 6 lavados con agua destilada estéril.
3	30 min en detergente (1%, p/v), 5 lavados con agua destilada estéril, 40 s en etanol (70%, v/v), enjuague con agua destilada estéril, 40 min en hipoclorito (1.8%, v/v), 6 lavados con agua destilada estéril.

6.2.2 Evaluación de las condiciones de colonización

Para la evaluación de las condiciones de colonización, plantas de 28 ± 3 días aprox., que cumplieron con las características de selección indicadas (**Sección 6.2.1**) se trasplantaron a tubos de cultivo con medio MS sólido con diferentes concentraciones de sacarosa. Siendo los siguientes los tratamientos evaluados:

- (i), (ii), (iii) *A. farnesiana* sin microorganismos, con 2.5, 5 y 10 g/L de sacarosa (cultivos control)
- (iv), (v), (vi) *A. farnesiana* inoculada con *C. simplex* con 2.5, 5 y 10 g/L de sacarosa
- (vii), (viii), (ix) *A. farnesiana* inoculada con *C. simplex* y *M. oryzae* con 2.5, 5 y 10 g/L de sacarosa

Las plantas se mantuvieron en cultivo durante 40 ± 3 días con seis repeticiones por tratamiento. Una vez pasado este tiempo, se evaluó el crecimiento y diferentes características fisiológicas de las plantas, y se realizó además la verificación de la presencia de los microorganismos endófitos.

6.3 Caracterización de los microorganismos endófitos

Para los ensayos de determinación de tolerancia y capacidad de reducción de arsenato de sodio por los microorganismos, estos fueron inoculados e incubados durante 10 días en cajas Petri con medio MS suplementado con sacarosa (20 g/L), Phytigel (Sigma, 2 g/L) y extracto de levadura (2.5 g/L), ajustando el pH a 5.7 ± 0.1 con NaOH (1 N). Se adicionó diferentes concentraciones de arsenato de sodio a los medios de cultivo. Las condiciones de incubación de los microorganismos se presentan en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Datos de cultivo de los ensayos de tolerancia y reducción de As(V).

Microorganismo	Inóculo	Condiciones ambientales
<i>M. oryzae</i>	1.5×10^6 UFC en 25 μ L	28 °C, Luz LED (38 μ mol/m ² s), fotoperiodo de 18 h
<i>C. simplex</i>	1.5×10^6 células en 25 μ L	26.5 °C, Luz LED (38 μ mol/m ² s), fotoperiodo de 18 h
Cocultivo	7.5×10^5 células y 7.5×10^5 UFC en 25 μ L	26.5 °C, Luz LED (38 μ mol/m ² s), fotoperiodo de 18 h

En cuanto a los ensayos para determinar la capacidad de los microorganismos de formar biopelícula y producir sideróforos en presencia del contaminante, se utilizó medio MS suplementado con sacarosa (20 g/L) y extracto de levadura (2.5 g/L), con diferentes concentraciones de arsenato de sodio ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Meyer) y pH ajustado a 5.7 ± 0.1 con NaOH (1 N).

6.3.1 Tolerancia a arsenato de sodio

Se evaluó la capacidad de los microorganismos de crecer en diferentes concentraciones de arsenato de sodio. Para esto, se adicionó el contaminante en diferentes concentraciones al medio de cultivo (50, 100, 200, 350, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500 y 3000 mg/L) en cajas Petri, y se inocularon los microorganismos por medio de una micropipeta, realizando 4 repeticiones para cada concentración de arsenato de sodio. Como control se utilizó medio de cultivo sin el contaminante.

6.3.2 Capacidad de reducción de arsenato de sodio

Se evaluó la capacidad de los microorganismos, solos y en cocultivo, para reducir As(V), utilizando un ensayo con AgNO₃ (0.1 M) en placa (Tripathi *et al.*, 2022). Se adicionó arsenato de sodio a diferentes concentraciones (50, 100, 200, 350, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500 y 3000 mg/L) en medio de cultivo en cajas Petri, y se inocularon los microorganismos por medio de una micropipeta, realizando 4 repeticiones para cada concentración. Como control se utilizó medio de cultivo sin arsenato de sodio.

La reacción entre AgNO₃ y As(III) forma un precipitado de color amarillo debido a la formación de Ag₃AsO₃, confirmando la capacidad de reducción de As(V) de los microorganismos.

6.3.3 Capacidad de formación de biopelículas

La formación de biopelículas por los microorganismos fue evaluada mediante la determinación de la adherencia a una microplaca de poliestireno de 96 pocillos. Para esto, se adicionó 200 µL de medio de cultivo con diferentes concentraciones de arsenato de sodio (0 a 2000 mg/L) en los pocillos, y se inocularon la microalga, la bacteria o el cocultivo (**Tabla 3**). Una vez pasado el tiempo de cultivo (10 días), se descartaron los sobrenadantes y se hicieron tres lavados con amortiguador fosfatos (pH 7), dejando que las microplacas se sequen.

Para la determinación cualitativa de formación de biopelículas, se adicionó a cada pocillo con la microalga 25 µl de azul de lactofenol (1%), y 25 µl de cristal violeta (1%) a cada pocillo con la bacteria. Para el cocultivo se adicionó 25 µl de azul de lactofenol (1%) en algunos pocillos y 25 µl de cristal violeta (1%) en otros. Las microplacas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min, y posteriormente se lavaron con agua destilada estéril, dejándose secar para su observación (O'Toole, 2011).

Para la cuantificación de las biopelículas formadas por la bacteria y el cocultivo, una vez secas las microplacas, se adicionó 200 μL de ácido acético (30%, v/v) en cada pocillo para solubilizar el cristal violeta, y se incubaron las microplacas a temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente, se transfirió el cristal violeta solubilizado a una nueva microplaca y se cuantificó la absorbancia en un lector de microplacas (Spectra Max M5e) a 550 nm (O'Toole, 2011).

Tabla 3. Datos de cultivo del ensayo de formación de biopelículas en presencia de As(V).

Microorganismo	Densidad celular en el volumen sembrado	Condiciones ambientales
<i>M. oryzae</i>	1.5×10^6 UFC en 5 μL	26.5 °C, Luz LED (38 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$), fotoperiodo de 18 h
<i>C. simplex</i>	1.5×10^6 células en 5 μL	26.5 °C, Luz LED (38 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$), fotoperiodo de 18 h
Cocultivo	7.5×10^5 células y 7.5×10^5 UFC en 5 μL	26.5 °C, Luz LED (38 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$), fotoperiodo de 18 h

6.3.4 Producción de sideróforos

Para determinar la producción de sideróforos, los microorganismos se inocularon (**Tabla 4**) en 30 mL de medio MS con diferentes concentraciones de arsenato de sodio (0 a 1500 mg/L) y se incubaron durante 20 días. Una vez pasado el tiempo de incubación, se centrifugaron los cultivos a 3000 rpm por 15 min, y se recuperó el sobrenadante.

Tabla 4. Datos de cultivo del ensayo de producción de sideróforos en presencia de As(V).

Microorganismo	Inóculo	Condiciones ambientales
<i>M. oryzae</i>	1.5×10^6 UFC en 50 μL	26.5 °C, Luz LED (38 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$), fotoperiodo de 18 h
<i>C. simplex</i>	1.5×10^6 células en 50 μL	26.5 °C, Luz LED (38 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$), fotoperiodo de 18 h
Cocultivo	7.5×10^5 células y 7.5×10^5 UFC en 50 μL	26.5 °C, Luz LED (38 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$), fotoperiodo de 18 h

La cuantificación de sideróforos se realizó mediante el ensayo CAS (Cromo Azurol S) líquido (Schwyn y Neilands, 1987). Preparando CAS-Fe con 60.5 mg de CAS (CAS, Sigma-Aldrich 199532), 10 mL de FeCl₃·6H₂O (1 mM), y 72.9 mg de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMA, Sigma-Aldrich H6269) en 100 mL de agua destilada. Se tomaron 100 µL del sobrenadante de los cultivos y se agregaron 100 µL de CAS-Fe en una microplaca de 96 pocillos. Se realizaron tres réplicas por tratamiento, y se utilizó como blanco medio de cultivo sin inocular con la solución CAS-Fe. Cuando hay al menos un sideróforo, este metabolito quela al Fe y libera al colorante CAS, provocando un cambio de color (azul a naranja). La medición se realizó en un lector de microplacas (Spectra Max M5e) a 630 nm y la producción de sideróforos se estimó mediante la ecuación (Zhu *et al.*, 2014):

$$\% \text{ unidades de sideróforos} = \frac{[A_r - A_s]}{A_r} * 100$$

Donde A_r es la absorbancia de referencia (absorbancia del blanco) y A_s es la absorbancia de la muestra.

6.4 Cultivos de *A. farnesiana*-endófitos bajo estrés por arsenato

Las plantas de 28 ± 3 días que cumplieron con las características de selección se trasplantaron a cajas Magenta con medio MS suplementado con sacarosa (5 g/L) y Phytigel (Sigma, 1.8 g/L). Siendo los siguientes los tratamientos evaluados:

- (i) *A. farnesiana* sin As(V) (control)
- (ii) *A. farnesiana* con As(V)
- (iii) *A. farnesiana* con As(V) inoculada con *C. simplex* alrededor de la raíz
- (iv) *A. farnesiana* con As(V) inoculada con *C. simplex* y *M. oryzae* alrededor de la raíz

El arsénico fue adicionado como arsenato de sodio (Na₂HAsO₄·7H₂O) en una concentración final de 580 µM de As(V). Cada tratamiento se evaluó durante 50 ± 3 días con 9 repeticiones y cada repetición constó de una unidad experimental (UE) con dos plantas cada una. El control se evaluó con 6 repeticiones. Al final del periodo, se determinó la concentración de arsénico acumulada en raíces y en la parte aérea de las plantas, concentración de pigmentos fotosintéticos, concentración de GSH total, las actividades CAT y POX, y el peso seco, realizando además la verificación de la presencia de los microorganismos.

6.4.1 Verificación de presencia de microorganismos

Segmentos (de aproximadamente 1 cm) de raíz y tallo de plantas de 50 ± 3 días inoculadas con los microorganismos, creciendo en medio MS semisólido, se esterilizaron superficialmente de la siguiente forma (Alcántara-Martínez, 2018): lavado con detergente comercial en polvo (2%, 30 min), inmersión en etanol (70%, 1 min), inmersión en hipoclorito de sodio (1.8%, 25 min), inmersión en etanol (70%, 1 min), cinco enjuagues con agua destilada estéril (30 s cada uno).

6.4.1.1 *A. farnesiana* – *C. simplex*

Los segmentos de tallos o raíces se sembraron en cajas de Petri con medio MS con 10 g/L de sacarosa y 2 g/L de Phytigel. Con el fin de descartar la presencia extracelular de la microalga, cada segmento se presionó sobre la superficie del medio MS en otra caja antes de su siembra. Los cultivos se incubaron a 26 ± 1 °C hasta la observación de crecimiento. Modificación del método realizado por Alcántara-Martínez *et al.* (2022), en donde no adicionaron sacarosa al medio de cultivo.

6.4.1.2 *A. farnesiana* – *M. oryzae*

Los segmentos de tallos o raíces se sembraron en cajas de Petri con agar nutritivo o, en medio MS con 10 g/L de sacarosa y 2 g/L de Phytigel. Para descartar la presencia extracelular de la bacteria, cada segmento se presionó sobre la superficie del medio en otra caja antes de su siembra. Los cultivos se incubaron a 28 ± 1 °C, hasta la observación de crecimiento bacteriano a partir de los extremos del segmento (Alcántara-Martínez, 2018).

6.5 Cambios fisiológicos y acumulación de arsénico por *A. farnesiana*

6.5.1 Crecimiento vegetal

El crecimiento de *A. farnesiana* se determinó con base en la cuantificación de la biomasa por peso seco (PS) de raíces y tallos. Para esto, se retiraron las raíces de las plantas del medio MS y se lavaron con agua destilada para eliminar residuos del medio de cultivo. Se separaron los tallos y las raíces y se colocaron en charolas de aluminio a peso constante para su secado en una estufa (*Binder*) a 60 °C por 48 h (Audet y Charest, 2007).

6.5.2 Pigmentos fotosintéticos

Se determinó el contenido de carotenoides (Car), clorofila a (Cl a) y clorofila b (Cl b) mediante un método espectrofotométrico (Lichtenthaler y Wellburn, 1983). Primero, se realizó la extracción de

los pigmentos de una muestra de aprox. 50 mg de tejido fresco de hojas, que fue triturado mecánicamente en vórtex con perlas de vidrio de 5 mm de diámetro durante 3 min con 5 mL de acetona (100% v/v); la suspensión se centrifugó (Eppendorf 5810R) a 3000xg (15 min) y se recuperó el sobrenadante. Las concentraciones de Car, Cl a y Cl b fueron leídas en un espectrofotómetro (50 Conc, Varian) a 470 nm, 645 nm y 662 nm, respectivamente. Se calcularon los valores de pigmentos según las ecuaciones propuestas por Lichtenthaler y Wellburn (1983), específicas para este método de extracción utilizando acetona (100% v/v).

6.6 Cuantificación de arsénico total

Para determinar la influencia del cocultivo y de *C. simplex* en la acumulación de arsénico por *A. farnesiana*, se separaron los tallos y las raíces de las plantas obtenidas de cada tratamiento con As(V). Las raíces fueron lavadas con una solución de EDTA (10 mM) para eliminar el arsénico extracelular (Maldonado-Magaña *et al.*, 2011). Luego, las muestras se secaron a 60 °C por 48 h. Una vez secos, los tejidos se trataron para el análisis de As total por espectrometría de absorción atómica (EAA).

6.6.1 Digestión ácida asistida por microondas

Se pesaron aprox. 100 mg de tallos (PS) o aprox. 30 mg de raíces (PS) en un vaso de Teflón (*CEM, MARSXpress*). A cada muestra se le adicionó agua desionizada (4 mL, 18 ΩM/cm) y HNO₃ concentrado (5 mL, 69%; *J.T. Baker, Instra-analyzed*) para su completa digestión a 180 °C (1600 Watts, 20 min) en un digestor de microondas (*CEM, MARSXpress*). Después de enfriarse las muestras, se aforó el volumen de cada vaso a 10 mL con agua desionizada, y se filtraron con una membrana de nitrato de celulosa (0.45 μm, *Whatman*) antes del análisis por EAA (Alcántara-Martínez, 2018).

6.6.2 Análisis por espectrometría de absorción atómica (EAA)

El contenido total de arsénico en los extractos obtenidos por digestión ácida se cuantificó mediante espectrometría de absorción atómica (EAA, Shimadzu, AA-6300). Las muestras se analizaron por el método de flama (EAA-flama), a una longitud de onda de 193.7 nm con una mezcla de aire-acetileno (3.7 L/min) y una abertura del quemador de 0.7 mm. La curva patrón (0 a 60 mg As/L) para cuantificar el contenido de arsénico total se prepararon con agua desionizada y una solución estándar de 1000 μg de As/L (*J.T. Baker, Instra-analyzed*) (Alcántara-Martínez, 2018).

6.6.3 Capacidad de bioacumulación y translocación de arsénico

Se calculó el factor de bioacumulación (FBA) en las plantas cultivadas en presencia de As(V), como la relación entre la concentración de arsénico acumulado en la planta ($[As]_{planta}$) y la concentración inicial en el medio de cultivo ($[As]_{medio}$) (Audet y Charest, 2007).

$$FBA = \frac{[As]_{planta}}{[As]_{medio}}$$

El factor de translocación (FT), que indica la translocación de arsénico de las raíces a los tallos de la planta, se calculó como la relación entre la concentración de arsénico acumulado en los tallos ($[As]_{tallo}$) y la concentración en las raíces ($[As]_{raiz}$) (Vithanage *et al.*, 2012).

$$FT = \frac{[As]_{tallo}}{[As]_{raiz}}$$

6.7 Pruebas bioquímicas

6.7.1 Obtención de extractos crudos

Se pulverizaron los tallos y las raíces de las plantas por separado con N₂ líquido durante 5 min; 100 mg del tejido pulverizado se homogenizó con 1 mL de la solución correspondiente al análisis a realizar (4 °C). Para GSH, se usó ácido metafosfórico (MPA, 5%) con inhibidor de proteasas (5 µL/100 mg); para las actividades POX y CAT, se empleó amortiguador de fosfato de sodio (50 mM, pH 7) con inhibidor de proteasas (5 µL/100 mg). Los homogeneizados se centrifugaron a 10000xg (4 °C, 20 min) para determinar GSH y para el análisis enzimático. Los sobrenadantes obtenidos son los extractos crudos (EC) (Alcántara-Martínez, 2018).

6.7.2 Determinación de glutatión (GSH) total

La cuantificación de GSH se realizó mediante un kit comercial (CS0260, *Sigma*). El contenido de GSH total fue estimado como la producción de ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB), por la reducción del ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), debido a la oxidación del GSH. La reacción fue monitoreada en un lector de microplacas (Spectra Max M5e) a 412 nm (Griffith, 1980). La mezcla de reacción consistió en 150 µL de la mezcla de trabajo (0.17 U/mL de glutatión reductasa [GR] y 43 µg/mL de DTNB, en amortiguador fosfatos 100 mM con EDTA 1 mM a pH 7), 50 µL de NADPH (0.16 mg/mL), 10 µL de MPA 5% y 10 µL de EC. La concentración de GSH se calculó a

partir de una curva estándar de GSH en ácido metafosfórico (MPA) 5% y se expresó en nmol/g de peso fresco (Alcántara-Martínez, 2018).

6.7.3 Actividad peroxidasa (POX)

La actividad POX fue determinada utilizando el método de Maehly (1954), usando guayacol como sustrato donador de hidrogeniones. El método consiste en cuantificar la tasa de utilización de H_2O_2 para la formación de un cromóforo (tetra-guayacol) a 450 nm. Se partió de una mezcla de reacción que contiene 780 μ L de amortiguador fosfato de sodio (50 mM, pH 7), 40 μ L de guayacol (1% en amortiguador fosfatos), 80 μ L de H_2O_2 (10 mM en amortiguador fosfatos) y 100 μ L de EC. La reacción se inició al agregar H_2O_2 (en el blanco se sustituyó por amortiguador fosfatos). La actividad enzimática se cuantificó siguiendo el aumento de la absorbancia a 450 nm espectrofotométricamente (50 Conc, VARIAN) y se calculó con el coeficiente de extinción molar de $26.6 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Una unidad POX se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 mmol del cromóforo por minuto a 26 °C y pH 7.

6.7.4 Actividad catalasa (CAT)

La actividad CAT fue determinada de forma espectrofotométrica (50 Conc, VARIAN) utilizando el método de Potisek *et al.* (2021), mediante la disminución en la absorbancia a 240 nm, resultado de la descomposición del H_2O_2 . La mezcla de reacción consistió en 50 μ L de EC y 950 μ L de amortiguador fosfato de sodio (50 mM, pH 7) con H_2O_2 a una concentración de 20 mM. El coeficiente de extinción molar de $39.4 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para H_2O_2 fue utilizado para determinar la actividad CAT. Una unidad de CAT se definió como la cantidad de enzima necesaria para descomponer 1 mM de H_2O_2 por min (Ullah *et al.*, 2024), a 26 °C y pH 7.

6.8 Análisis estadístico

Se realizó una prueba ANOVA de cada variable de respuesta y una prueba de Duncan, para determinar las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos realizados. Las pruebas se realizaron con el software estadístico NCSS versión 2020.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Escarificación de semillas de *A. farnesiana*

La escarificación es un método que facilita la germinación, al ayudar a debilitar la cutícula de la semilla con el fin de que el embrión pueda abrirse paso entre ella y de esta forma sea más eficiente la germinación (Manotoa-Chicaiza, 2012). Para esto, las semillas de *A. farnesiana* se escarificaron mecánicamente con el uso de una lija de madera (grano 180, *Truper*). Con el fin de determinar la intensidad del lijado sobre la eficiencia de germinación de las semillas, se probaron tres niveles de escarificación: leve, media y alta (**Figuras 2 y 3**).



Figura 2. Niveles de escarificación en semillas de *A. farnesiana*. A. nivel leve, B. nivel medio, C. nivel alto.

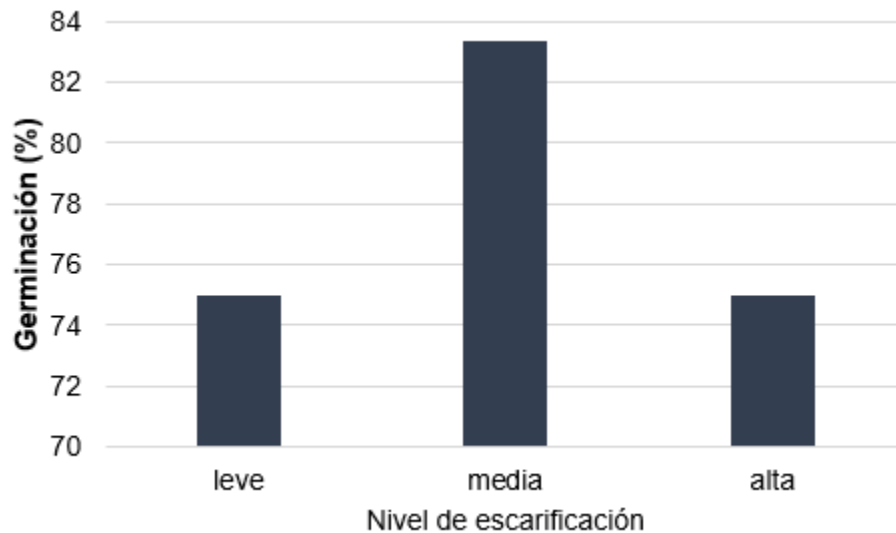


Figura 3. Germinación de semillas de *A. farnesiana* sometidas a diferentes niveles de escarificación mecánica luego de 25 días (n=30).

Se encontraron diferencias entre los niveles de escarificación (**Figura 3**). Obteniéndose un porcentaje de germinación de 75% en el nivel leve y alto, y de 83.33% en el nivel medio, lo que equivale a una semilla de diferencia. Por lo anterior, se decidió lijar las semillas hasta un nivel de escarificación medio, lo suficiente para mejorar el porcentaje de germinación sin correr el riesgo de dañar el embrión.

7.2 Estandarización de las condiciones para el cultivo de *A. farnesiana*

7.2.1 Desinfestación superficial de semillas

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* se utiliza para la obtención de plantas de interés en condiciones controladas. Como se mencionó, la correcta escarificación es de gran importancia, ya que las semillas por lo general se encuentran en estado de dormancia y esto ayuda a acelerar el proceso de germinación. Sin embargo, posterior a la siembra puede aparecer crecimiento microbiano no deseado, debido a la contaminación durante el procedimiento. Por esto es importante establecer un protocolo de desinfestación superficial, que permita disminuir la proporción de semillas contaminadas (Zurita-Valencia *et al.*, 2014).

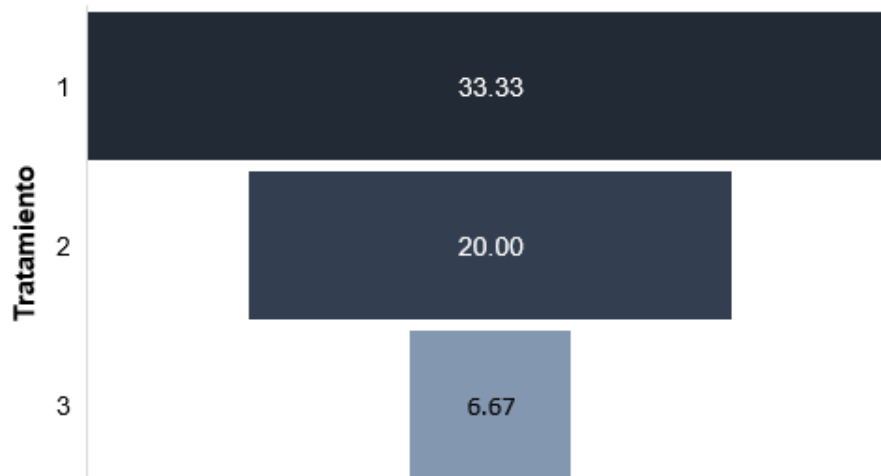


Figura 4. Porcentaje de contaminación de semillas de *A. farnesiana* (n=15) sometidas a diferentes tratamientos de desinfestación superficial luego de 2 semanas de cultivo. Las condiciones de cada tratamiento se muestran en la *Tabla 1* (Sección 2.6.1).

Por lo anterior, se probaron diferentes tratamientos de desinfestación superficial de semillas de *A. farnesiana*, partiendo del protocolo establecido por Alcántara-Martínez *et al.* (2018), el cual fue probado como *tratamiento 1*; a éste se le realizaron modificaciones en el tiempo de contacto de algunas de las soluciones con las semillas, para obtener los *tratamientos 2 y 3* (**Tabla 1, Sección**

2.6.1). Una vez sometidas las semillas a los diferentes tratamientos de desinfestación superficial, se cultivaron en medio MS, y se tuvieron en cultivo por 3 semanas. Se encontró que el tratamiento 3 fue el que obtuvo un menor porcentaje de contaminación (6.7%) al compararse con los tratamientos 1 y 2 (33.3 y 20.0% respectivamente), por lo que este fue el tratamiento seleccionado para el protocolo de desinfestación superficial de semillas de *A. farnesiana* (**Figura 4**).

7.2.2 Condiciones para la obtención de plantas

Todas las plantas tienen condiciones nutricionales y ambientales para crecer de forma eficiente, dentro de éstas, la concentración de sacarosa es una variable importante para el crecimiento en condiciones *in vitro*. En general, la sacarosa cumple un papel importante en el metabolismo energético, organogénesis y embriogénesis, así como en el mantenimiento celular y del potencial osmótico (Yaseen *et al.*, 2013). Anteriormente, para la obtención de plantas de *A. farnesiana* en condiciones *in vitro* se utilizaron concentraciones de sacarosa de 30 g/L (Alcántara-Martínez, 2018). Sin embargo, con el fin de determinar si existían diferencias en la obtención y desarrollo de plantas con las características deseadas (aprox. 3 cm de raíz y 3 hojas verdaderas en 28 días) que luego se utilizarían para los diferentes tratamientos, se sembraron las semillas con diferentes concentraciones de sacarosa: 10 g/L, 20 g/L y 30 g/L (**Figura 5**) y se registraron los cambios a las 4 semanas de crecimiento.

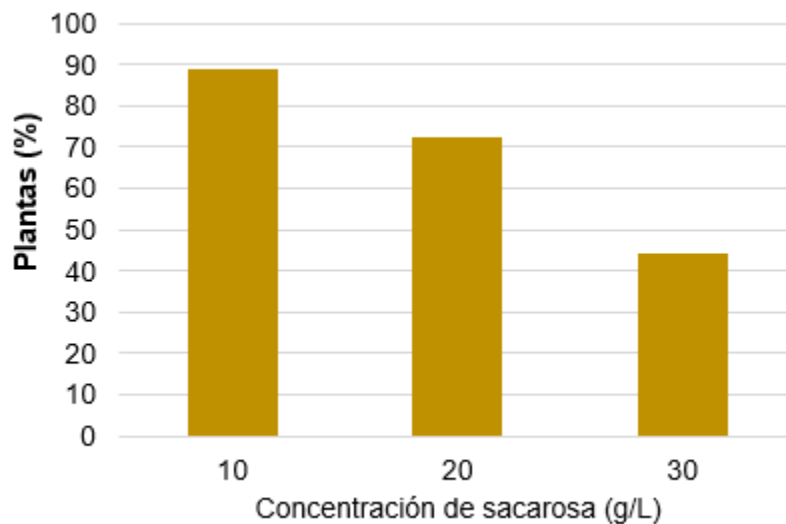


Figura 5. Obtención *in vitro* de plantas de *A. farnesiana* con las características deseadas con diferentes concentraciones de sacarosa (30 días de cultivo, n=36).

Se encontró una mayor obtención de plantas con una concentración de sacarosa de 30 g/L (88.89%), seguida de la concentración de 20 g/L (72.22%) y de la concentración de 10 g/L

(44.44%). Debido a que, normalmente se utilizan 30 g/L de sacarosa para la obtención de más biomasa y promover el crecimiento de la raíz, y a los resultados obtenidos, se utilizó esta concentración de sacarosa para la obtención de plantas de *A. farnesiana* (Villarreal-Garza *et al.*, 2013).

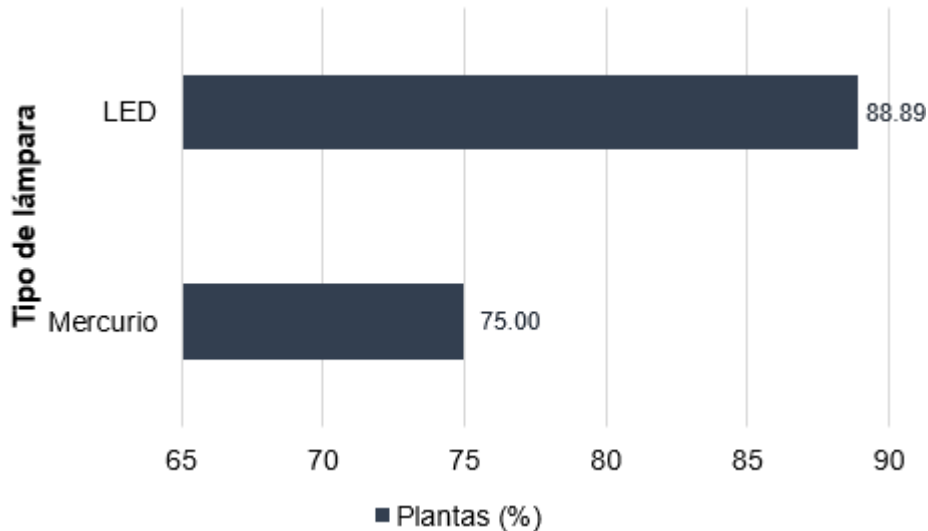


Figura 6. Obtención *in vitro* de plantas (30 días de cultivo) de *A. farnesiana* cultivadas con diferentes tipos de fuentes de luz (n=36).

Por otro lado, se cambió el tipo de lámparas utilizadas para la obtención de plantas. Debido a que las lámparas de mercurio ($60 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) constituyen un peligro por el alto contenido de este elemento tóxico, y a que su manejo inadecuado puede ser dañino para la salud humana y del medio ambiente, por lo que es recomendable utilizar alternativas más amigables, como es el caso de las lámparas LED (Huertas *et al.*, 2019). Para el cultivo de *A. farnesiana*, se utilizaron lámparas tipo LED con una intensidad lumínica de $38 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ y un fotoperiodo de 18 h. Después de 30 días de cultivo con las lámparas de mercurio se obtuvo un 75% de plantas con las características deseadas, y con las lámparas LED un 88.89% (**Figura 6**).

7.3 Condiciones para la colonización microbiana

Algunos autores han sugerido que la colonización por microorganismos endófitos ocurre a través de la raíz, al producir las plantas exudados que atraen a estos organismos. Varios factores pueden afectar la colonización, como el genotipo de la planta, la cepa microbiana, y condiciones ambientales abióticas o bióticas, la composición del medio de cultivo, la edad de la planta, y la densidad del inóculo. Algunos endófitos pueden optar por colonizar los tejidos internos de las plantas para tener menos competencia por nutrientes o verse menos afectados por las

condiciones ambientales (pH, temperatura, humedad), al verse de esta forma más afectados por la salud de la planta y su estado nutricional (Mengistu, 2020; Alves *et al.*, 2022).

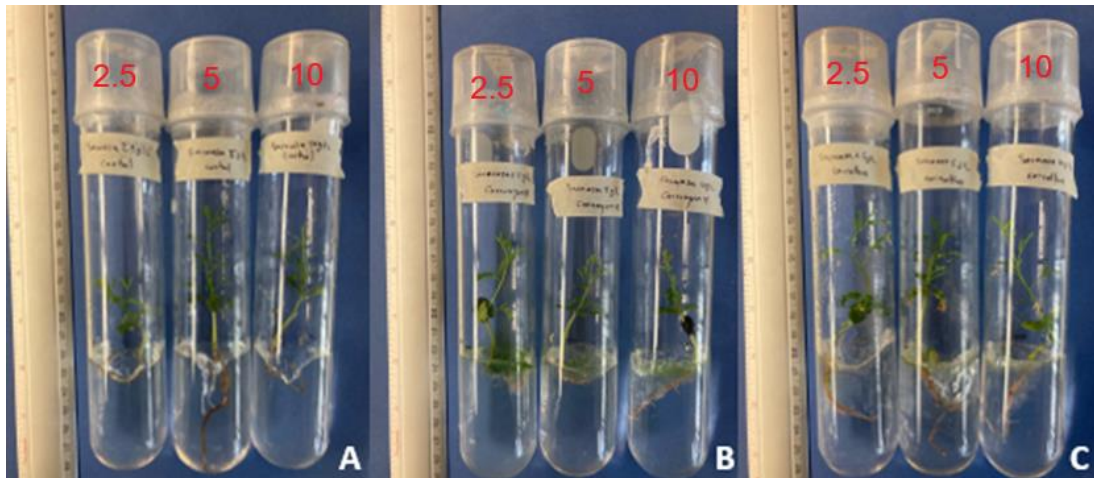


Figura 7. Tratamientos para determinar la concentración de sacarosa (2.5 g/L, 5 g/L, 10 g/L) que pueda estimular la colonización por los endófitos sin afectar la salud de la planta. **A.** control, **B.** *C. simplex*, **C.** cocultivo.

Por lo anterior, se evaluaron diferentes concentraciones de sacarosa (2.5 g/L, 5 g/L y 10 g/L) para analizar el efecto que tiene en la colonización de *A. farnesiana* por *C. simplex* y *M. oryzae*, y en la salud vegetal. Para esto, plantas de aprox. 28 días que cuentan con 3 hojas verdaderas y al menos 3 cm de longitud radicular, fueron trasplantadas a medio MS con diferentes concentraciones de sacarosa (2.5 g/L, 5 g/L, 10 g/L), algunas de estas plantas no fueron inoculadas como control de los tratamientos a evaluar. Por otro lado, otras plantas, luego de un periodo de aclimatación de 3 días fueron inoculadas con una suspensión de *C. simplex* con 1.5×10^6 células/planta, o para los tratamientos del cocultivo con 7.5×10^5 células/planta de *C. simplex* y 7.5×10^5 UFC/planta de *M. oryzae*. Cada tratamiento se evaluó con 5 réplicas y, después de 40 días desde la inoculación de los microorganismos, para establecer la concentración de sacarosa a utilizar en los tratamientos con arsénico se midió el crecimiento, la concentración de pigmentos fotosintéticos y la actividad POX, además se verificó la presencia de los microorganismos en las plantas (**Figura 7**).

7.3.1 Crecimiento

No se encontraron diferencias en la biomasa (PS) de los tallos en plantas inoculadas con el cocultivo o la microalga, con respecto a las plantas sin inocular (**Figura 8**). En general, no hubo un efecto en la biomasa de raíces de plantas control o inoculadas con el cocultivo por la

concentración de sacarosa. En contraste, la biomasa de raíces de plantas inoculadas con la microalga con 5 g/L de sacarosa fue mayor que la de plantas con 10 g/L, y mayor que la de plantas inoculadas con el cocultivo con 10 g/L.

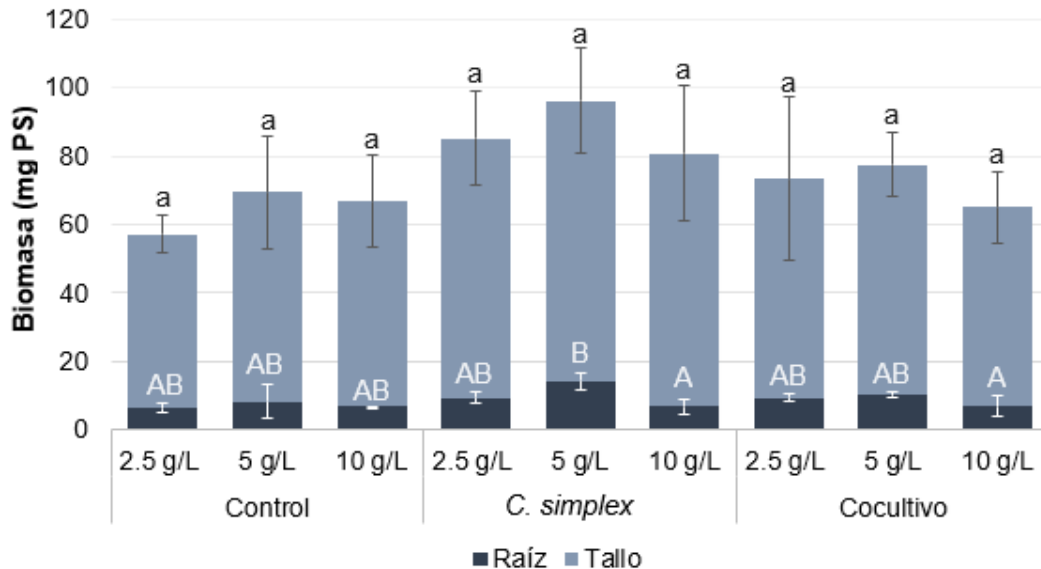


Figura 8. Biomasa de tallos y raíces de plantas de *A. farnesiana* crecidas con diferentes concentraciones de sacarosa durante 40 ± 3 días. Las letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tallos y las letras mayúsculas entre las raíces.

La bacteria *M. oryzae* no tuvo un efecto significativo en la producción de biomasa en las plantas. Otras especies de este género bacteriano tampoco han tenido efecto en el crecimiento vegetal de otras plantas, como cebada, trigo y zanahoria (Abanda-Nkpwatt *et al.*, 2006). A pesar de que se ha reportado que bacterias de este género pueden estimular el crecimiento vegetal al ser productoras de citoquininas, fitohormonas, sideróforos, solubilizar fosfatos y fijar nitrógeno (Jorge *et al.*, 2019; Torres *et al.*, 2022). Por tanto, es importante identificar si las distintas concentraciones de sacarosa mostraron un efecto sobre los pigmentos fotosintéticos, lo cual se relaciona con la salud de las plantas.

7.3.2 Contenido de pigmentos fotosintéticos

La interacción entre la planta huésped y los microorganismos endófitos puede aumentar el metabolismo del carbono en las plantas, ayudando a la planta a coordinar de mejor manera sus recursos, lo cual puede contribuir a mantener una tasa fotosintética alta durante más tiempo. Algunos estudios han concluido que estos microorganismos aumentan la disponibilidad del CO₂ para la fotosíntesis y ayudan a mejorar la eficiencia fotosintética al aliviar el daño causado por

condiciones de estrés (Bangari y Nataraja, 2023). Una mayor producción de clorofilas en los tratamientos de plantas con cocultivo confirma lo mencionado, lo que podría atribuirse a que la bacteria estimula su síntesis al producir fitohormonas como las citoquininas (Shi *et al.*, 2010).

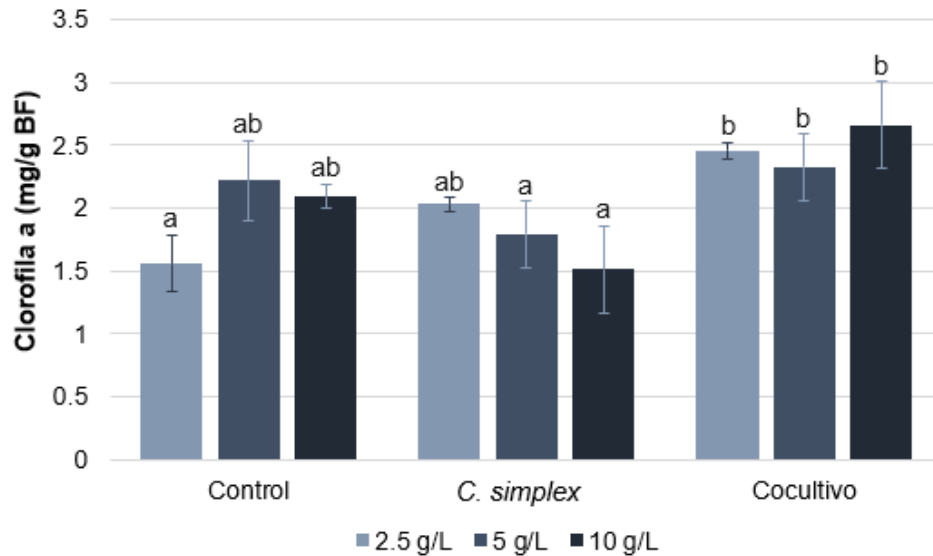


Figura 9. Concentración de clorofila a en hojas de plantas de *A. farnesiana* crecidas durante 40 ± 3 días con diferentes concentraciones de sacarosa. Las letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

En contraste, se observó una disminución en la producción de clorofilas en las plantas inoculadas con la microalga al aumentar la concentración de sacarosa (**Figuras 9 y 10**), posiblemente por un aumento en la densidad celular de este microorganismo en el medio de cultivo, que se ha visto que al aumentar la concentración de sacarosa (1.5 g/L, 5 g/L, 10 g/L) disminuye significativamente su tiempo de duplicación (t_d) en 10 g/L de este carbohidrato, al cultivarse también en condiciones *in vitro* (De la Sancha-Sierra, 2022). Lo anterior es de interés, pues este tratamiento presentó un comportamiento similar al de las plantas control en 2.5 g/L, presentándose tal vez competencia entre la planta y la microalga por la sacarosa. Y es que en condiciones *in vitro* es necesario adicionar sacarosa al medio de cultivo, ya que la fotosíntesis no es suficiente para completar la demanda de carbono por las plantas (Capó *et al.*, 2004), o bien por otros organismos clasificados como fotoautótrofos.

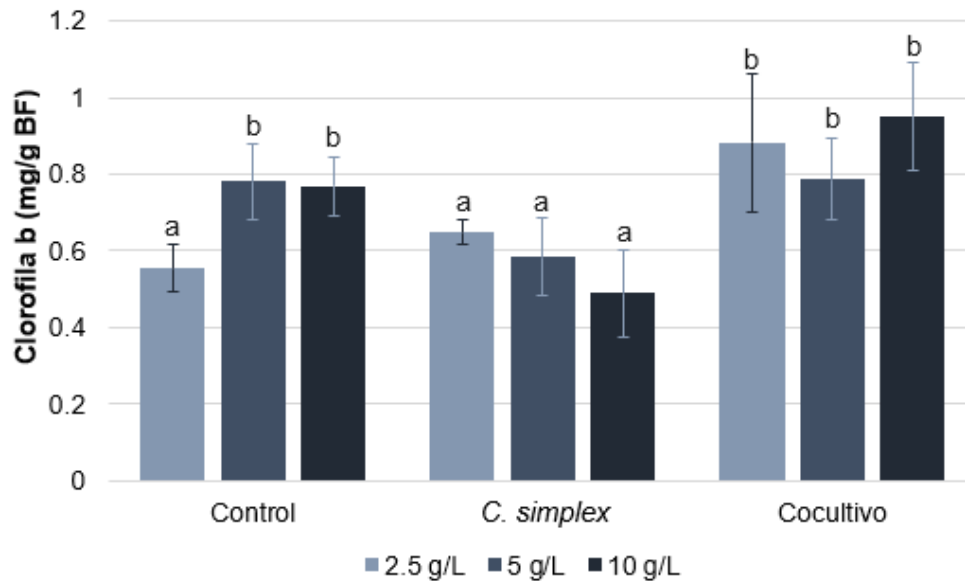


Figura 10. Concentración de clorofila b en hojas de plantas de *A. farnesiana* crecidas durante 40 ± 3 días con diferentes concentraciones de sacarosa. Las letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

La inoculación del cocultivo tuvo un efecto positivo en la producción de carotenoides, esto es de gran interés ya que los carotenoides están involucrados en los mecanismos de defensa de la planta contra el estrés antioxidante (Zuluaga *et al.*, 2017). Sin embargo, las plantas inoculadas solo con la microalga tuvieron una disminución en la concentración de estos pigmentos al aumentar la concentración de sacarosa al igual que ocurrió con las clorofilas. En las plantas control, hubo una mayor producción en la concentración de 5 g/L (**Figura 11**).

En general, la producción de pigmentos fotosintéticos por las plantas control se vio afectada por la reducción de la concentración de sacarosa, disminuyendo significativamente en la concentración de 2.5 g/L. Sin embargo, la inoculación de plantas de *A. farnesiana* con el cocultivo mejoró la producción de pigmentos fotosintéticos independientemente de la concentración de sacarosa. En contraste, el aumento en la concentración de sacarosa parece tener un efecto negativo en la producción de pigmentos en las plantas inoculadas únicamente por la microalga. Por lo que, la concentración de sacarosa que parece mantener la salud de todas las plantas con base en este parámetro es la de 5 g/L.

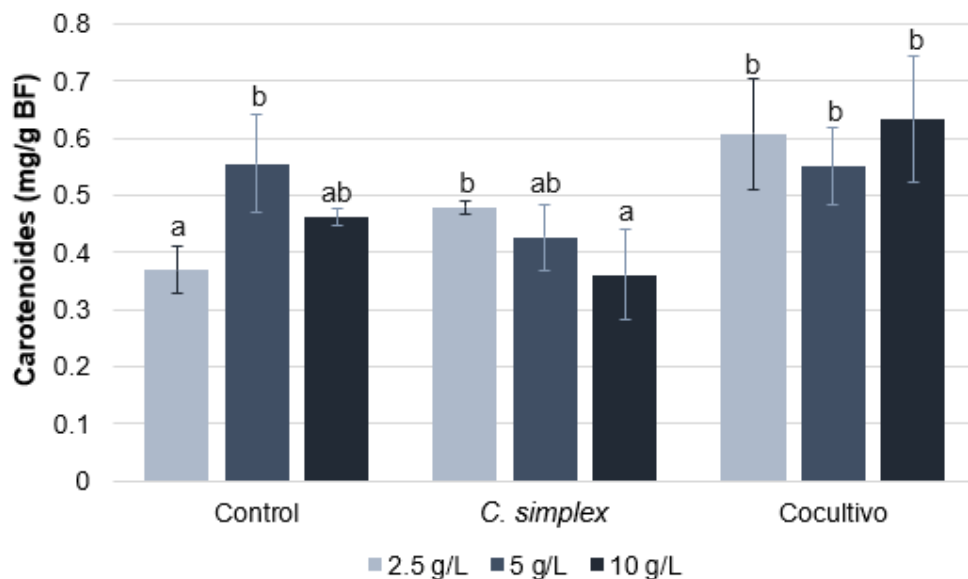


Figura 11. Concentración de carotenoides en hojas de plantas de *A. farnesiana* crecidas durante 40 ± 3 días con diferentes concentraciones de sacarosa. Las letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

7.3.3 Actividad peroxidasa (POX)

Entre los factores que influyen en la actividad POX en las plantas, debido al aumento de ERO, se encuentra la colonización de tejidos por microorganismos endófitos y la concentración de la fuente de carbono presente en el entorno. Las plantas al ser colonizadas por microorganismos endófitos inducen un sistema de defensa, activando genes relacionados con enzimas como las POX, que protegen las células de la planta contra el estrés oxidante, como resultado de la actividad de microorganismos endófitos (Ma *et al.*, 2016). Además, las POX cumplen un papel en la adaptación de plantas a condiciones de estrés (Vogelsang y Dietz, 2022), ya que la deficiencia nutricional puede causar estrés oxidante y sobreproducción de ERO, como se ha observado en *A. thaliana* (Francis *et al.*, 2023).

En este estudio se observó un aumento en la actividad POX en los tallos de las plantas inoculadas en comparación con las plantas control (**Figura 12**), esto se puede deber a que la presencia de los endófitos generalmente incrementa la concentración de ERO (Pedraza *et al.*, 2020). Además, se puede observar que hay una mayor actividad POX en las raíces de las plantas inoculadas con los microorganismos en comparación con los tallos; este resultado puede deberse al hecho de que la raíz es el primer sitio de contacto entre las plantas y los microorganismos y, por tanto, donde se activan primero los mecanismos de defensa antioxidante (Ma *et al.*, 2016).

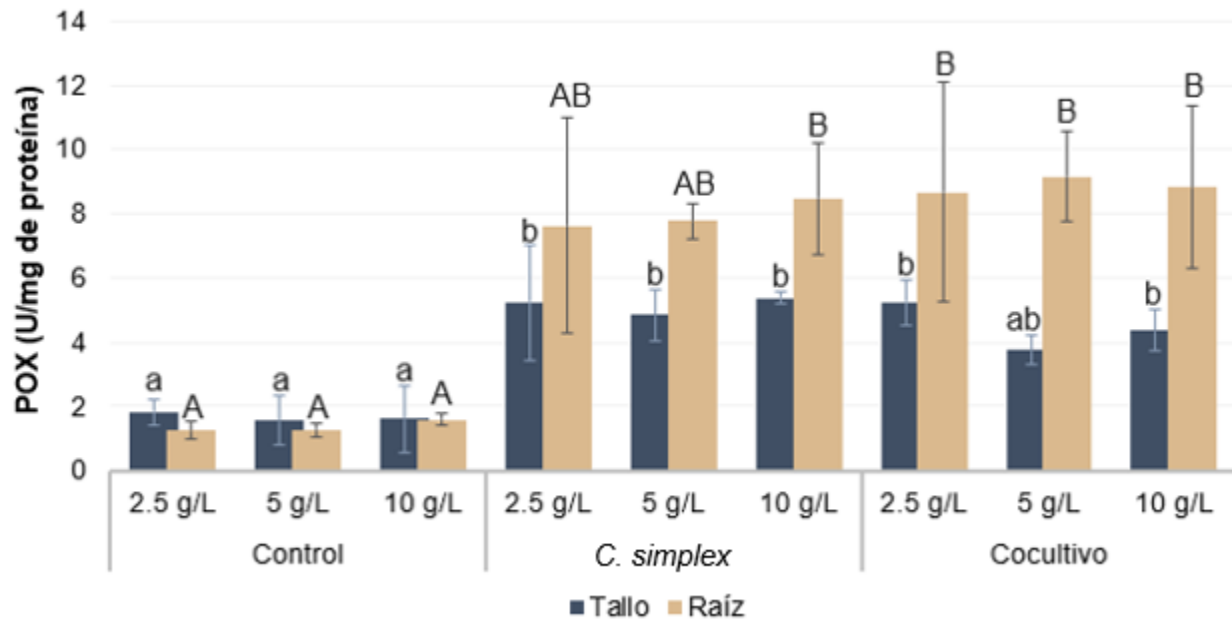


Figura 12. Actividad específica de peroxidasas (POX) en tallos y raíces de plantas de *A. farnesiana* cultivadas durante 50 ± 3 días con diferentes concentraciones de sacarosa. Las letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tallos y las letras mayúsculas entre las raíces.

En general, la inoculación con microorganismos endófitos en monocultivo o cocultivo aumenta la actividad POX en tallos y raíces de *A. farnesiana*, independientemente de la concentración de sacarosa en el medio. Por tanto, con base en los resultados obtenidos de actividad POX es posible seleccionar cualquier concentración de sacarosa, ya que en todas es probable que se esté estimulando la colonización de la planta por el cocultivo y la microalga, de haber obtenido mayor actividad en algunos tratamientos esto hubiera contribuido en mayor medida a la selección, ya que como se ha mencionado una mayor actividad de esta enzima es indicativo de mayor colonización (Ma *et al.*, 2016).

7.3.4 Verificación de presencia de microorganismos

Se han encontrado metilobacterias en superficies de una gran variedad de plantas y, entre ellas, también se han reportado cepas del género *Methylobacterium* colonizando los espacios intracelulares y/o tejidos vasculares como endófitos (Kwak *et al.* 2014). La capacidad de colonizar las raíces y las partes aéreas de la planta se atribuye a que las bacterias metilótrofas pueden utilizar el metanol secretado por los estomas (Idris *et al.*, 2006). En cuanto al género de microalga *Coccomyxa*, hay tres reportes que indican su presencia en tejidos vegetales. Trémouillax-Guiller

et al. (2002) reportaron una microalga de este género como microorganismo endófito de *Ginkgo biloba*; Sciuto *et al.* (2019) encontraron plantas del género *Drosera* asociadas con la microalga *C. cimbrica*; y Alcántara-Martínez *et al.* (2022) observaron la presencia de la microalga en segmentos de raíces de *A. farnesiana*, en el córtex y cerca al xilema, aparentemente dentro de los tejidos de la epidermis.

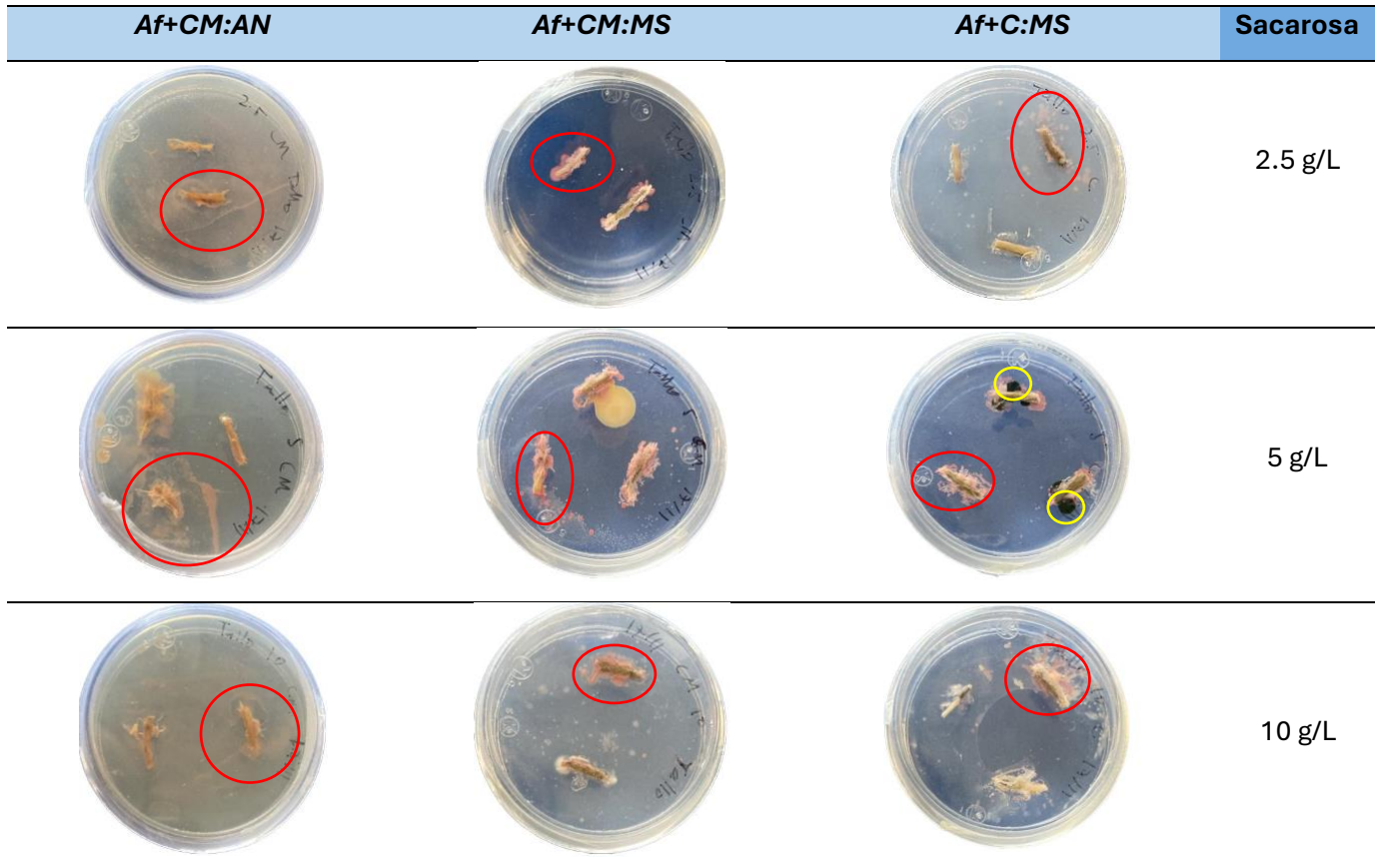


Figura 13. Siembra en placa para determinar la presencia de los microorganismos inoculados en segmentos de tallos de plantas de *A. farnesiana* con diferentes concentraciones de sacarosa (55 días de incubación). Af+CM:AN (*A. farnesiana* inoculada con *Coccomyxa simplex* y *M. oryzae* en Agar Nutritivo), Af+CM:MS (*A. farnesiana* inoculada con *Coccomyxa simplex* y *M. oryzae* en medio MS), Af+C:MS (*A. farnesiana* inoculada con *Coccomyxa simplex* en medio MS). Las circunferencias rojas indican la presencia de *M. oryzae* y las amarillas los de *C. simplex*.

Las pruebas de cultivo en placa realizadas con el fin de verificar si *C. simplex* y *M. oryzae* crecen en los tejidos internos de *A. farnesiana*, mostraron la presencia de *M. oryzae* como crecimiento bacteriano alrededor de los segmentos con coloración rosada (**Figuras 13 y 14**), en todos los segmentos de tallos de plantas inoculadas con el cocultivo en todas las concentraciones de sacarosa evaluadas, a 7 días de la siembra. En cuanto a los segmentos de raíces de las plantas inoculadas con el cocultivo, *M. oryzae* se encontró en los tratamientos con 2.5 g/L y 10 g/L de

sacarosa, pero no en los suplementados con 5 g/L. Sin embargo, no se observó la presencia de *C. simplex* en ninguno de los segmentos de las plantas que fueron inoculadas con el cocultivo (**Figuras 13 y 14**). Este resultado podría atribuirse al hecho de que *C. simplex* tiene un t_d mayor al de *M. oryzae* según lo reportado en estudios previos realizados en el laboratorio de Bioingeniería Ambiental y Residuos Sólidos (De la Sancha-Sierra, 2022). Debido a lo anterior, para los ensayos con arsénico se aumentó la concentración de microalga a inocular en los tratamientos con cocultivo, pasando de una relación microalga:bacteria de 1:1 a una relación 2:1.

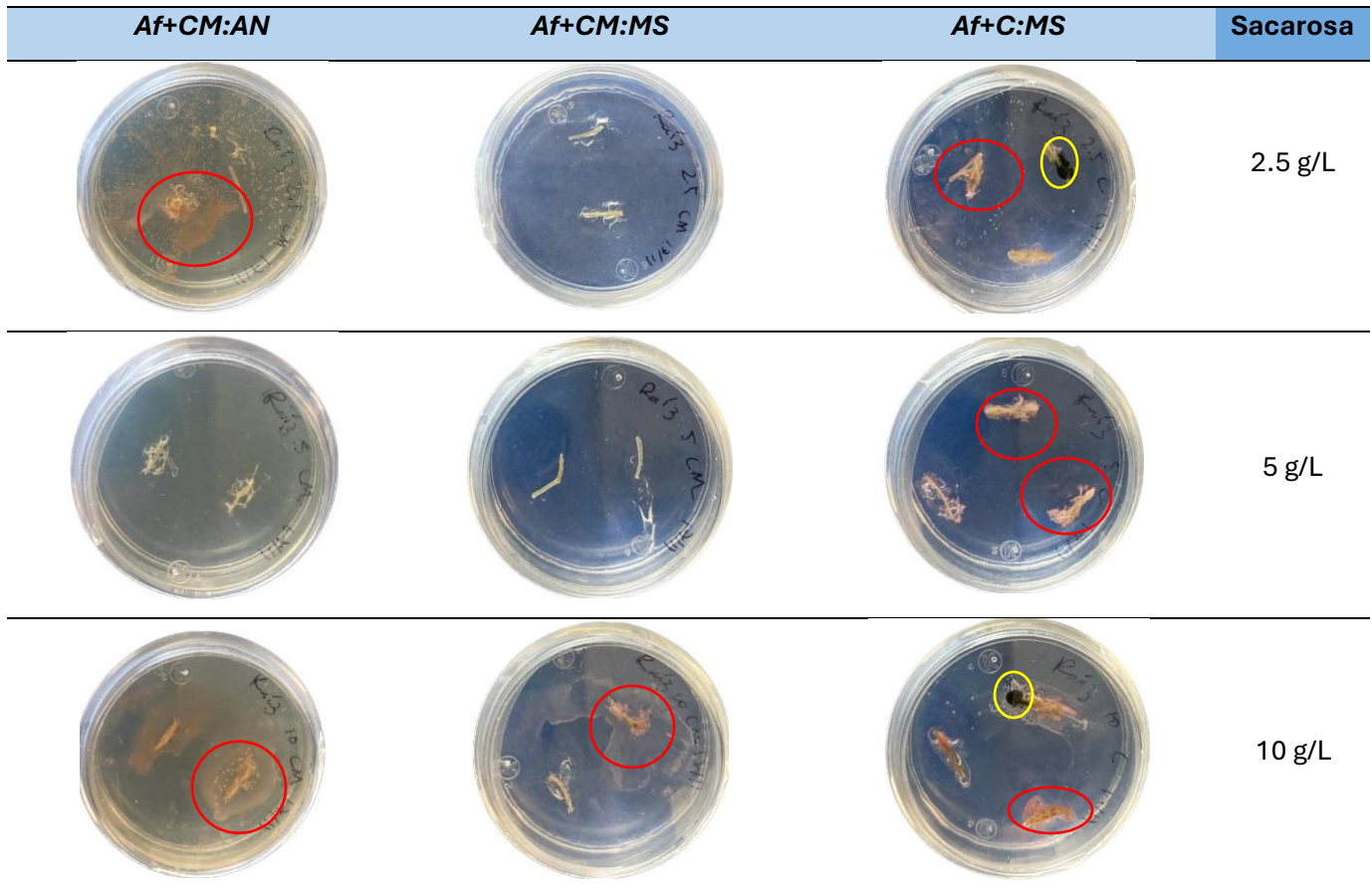


Figura 14. Siembra en placa para determinar la presencia en segmentos de raíz, de los microorganismos inoculados en plantas de *A. farnesiana* a diferentes concentraciones de sacarosa (55 días de incubación). Af+CM:AN (*A. farnesiana* inoculada con *Coccomyxa simplex* y *M. oryzae* en Agar Nutritivo), Af+CM:MS (*A. farnesiana* inoculada con *Coccomyxa simplex* y *M. oryzae* en medio MS), Af+C:MS (*A. farnesiana* inoculada con *Coccomyxa simplex* en medio MS). Las circunferencias rojas indican la presencia de *M. oryzae* y las amarillas los de *C. simplex*.

La presencia de la microalga en *A. farnesiana* se observó 35 días después de la siembra, como crecimiento de biomasa de color verde oscuro (**Figuras 13 y 14**) alrededor de los segmentos de tallos y raíces, en dos de tallo de plantas inoculadas con un cultivo de *C. simplex* en medio MS

con 5 g/L de sacarosa, así como en un segmento de raíz de plantas inoculadas con medio MS con 2.5 y 10 g/L de sacarosa (**Figuras 13 y 14**). Sin embargo, en todos los segmentos de tallos y raíces de estos tratamientos inoculados únicamente con la microalga fue posible observar la presencia de *M. oryzae*; lo anterior se atribuye a que la bacteria es endófito de *A. farnesiana* y, posiblemente se encuentra de forma intracelular en la microalga (**Figura 15**).

Las bacterias pueden encontrarse asociadas a las microalgas de diferentes formas; en las superficies de las microalgas, en los compartimientos citoplasmáticos intracelulares, e incluso en el interior del núcleo de las microalgas (Pathom-Aree *et al.*, 2024). Estas relaciones simbióticas entre microalgas y bacterias pueden ocurrir por la capacidad de la bacteria de producir compuestos como vitaminas, cofactores, y fitohormonas, por ejemplo, el AIA promueve el crecimiento microalgal. Mientras las microalgas podrían estar dándole a las bacterias protección frente a condiciones ambientales, alimento y oxígeno (Palacios *et al.*, 2022). Algunas bacterias que se han reportado están asociadas de esta forma con microalgas son *Gordonia terrae* y *Pseudomonas* sp., asociadas con *Haematococcus pluvialis*, y mejorando la producción de astaxantina por la microalga (Li *et al.*, 2022). Además, se han encontrado bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Shinella*, *Flavobacterium* y *Pseudomonas* asociadas a las microalgas *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp. y *Botryococcus braunii* (Kim *et al.*, 2014).



Figura 15. Presencia de *M. oryzae* en el interior de células de *C. simplex*.

Se lograron observar los microorganismos en tallos o raíces de plantas cultivadas en todas las concentraciones de sacarosa, pero es necesario cambiar la proporción del inóculo microalga:bacteria, pues no fue observada la microalga en segmentos de plantas inoculadas con el cocultivo. Según los resultados de actividad peroxidasa, esta variable no se ve afectada por la concentración de sacarosa, al igual que el crecimiento de las plantas. Sin embargo, con base en los resultados de concentración de pigmentos fotosintéticos, una concentración de sacarosa de 2.5 g/L tiene un efecto negativo en las plantas control, que presentan un comportamiento similar a las plantas inoculadas con la microalga con una concentración de sacarosa de 10 g/L. Teniendo presente que la concentración de sacarosa no será la única fuente de estrés en los tratamientos con arsénico, se seleccionó la concentración de 5 g/L de sacarosa con el fin de estimular la colonización sin afectar en mayor medida la salud de las plantas control.

7.4 Tolerancia a arsénico por los microorganismos

Los microorganismos endófitos utilizados en este estudio, además de colonizar los tejidos internos de las plantas también se pueden encontrar en contacto directo con el contaminante, por lo que fue importante determinar si son capaces de crecer en presencia de arsenato de sodio. Además, la capacidad de estos microorganismos de reducir As(V) a As(III) podría ayudar a la planta a tolerar mayores concentraciones del contaminante, ya que se ha observado que la inoculación de microorganismos endófitos con esta capacidad aumenta la bioacumulación de arsénico en las plantas y su tolerancia (Yang *et al.*, 2012). Por otro lado, se determinó la capacidad de los microorganismos de producir sideróforos debido a que se ha reportado que la inoculación de endófitos productores de estos compuestos aumenta el secuestro, la absorción y la acumulación de arsénico en raíces y tejidos aéreos de plantas (Mesa *et al.*, 2017; Javaid *et al.*, 2021). Y es que algunos sideróforos tienen la capacidad de formar complejos con el arsénico, inmovilizándolos y mejorando la tolerancia a este elemento tóxico (Ferreira *et al.*, 2019). En cuanto a la formación de biopelículas, esto es de gran importancia debido a que estas cumplen un papel importante en la colonización de las raíces de las plantas por los endófitos al ayudar a la adhesión a la superficie radicular (Dourado *et al.*, 2015). Además, su formación mejora la respuesta enzimática y la resistencia de los microorganismos a condiciones de estrés como la presencia de elementos tóxicos (Tripathi *et al.*, 2022).

7.4.1 Capacidad de crecer en presencia de arsenato










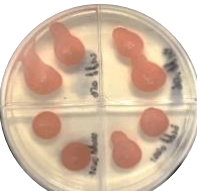

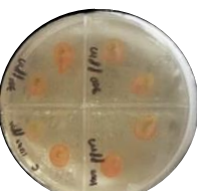
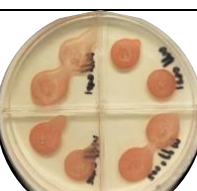

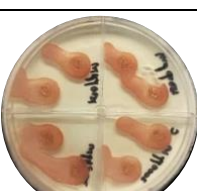
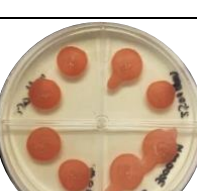

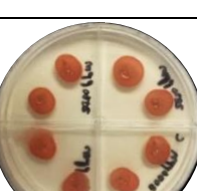
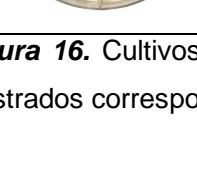
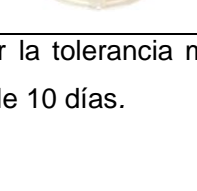
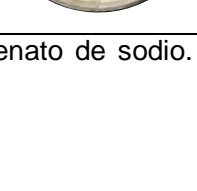



<i>M. oryzae</i>	<i>Coccomyxa simplex</i>	Cocultivo	Na ₃ AsO ₄ (mg/L)
			0
			50
			100
			350
			500
			750
			1000
			1500
			2000
			2500
			3000

Figura 16. Cultivos para determinar la tolerancia microbiana a arsenato de sodio. Los resultados mostrados corresponden a cultivos de 10 días.

Se determinó que *M. oryzae* es capaz de tolerar concentraciones de arsenato de sodio de hasta 3000 mg/L, lo que equivale a una concentración de ~721 mg/L de arsénico (**Figura 16**). Similar a la tolerancia de otras especies de *Methylobacterium*, como *M. extorquens*, que fue capaz de tolerar hasta 750 mg/L (De Marco *et al.*, 2004). Como se observa en la **Figura 16**, parece que la pigmentación rosada de *M. oryzae* aumenta en función de la concentración de arsénico en el medio. Esta respuesta puede atribuirse a una mayor producción de carotenoides que ayudan a contrarrestar el estrés oxidante generado por la presencia del contaminante (Liu *et al.*, 2020), así como posiblemente a una mayor densidad celular, que permitiría una respuesta más rápida a factores de estrés. A concentraciones mayores e iguales a 500 mg/L de As(V), hay un aumento aparente en la producción de carotenoides por parte de la bacteria, por lo que estas concentraciones pueden estar estimulando genes relacionados con el metabolismo relacionado con la producción de pigmentos en *M. oryzae* (Mohanty *et al.*, 2023).

C. simplex toleró hasta 1000 mg/L de As(V). En concentraciones mayores, se observa el crecimiento de *M. oryzae* (**Figura 16**), posiblemente por su presencia intracelular en la microalga (**Figura 15**). Es probable que la alta concentración de iones del metaloide haya ocasionado daño en las células de la microalga, alterando la homeostasis celular y su integridad; ante tales condiciones, la bacteria tiene la capacidad para vivir de forma libre (Arunakumara y Zhang, 2018).

En el cocultivo microalga-bacteria también se estimuló la producción de carotenoides, pero a partir de 350 mg/L de As(V). Lo anterior se pudo deber a las interacciones celulares entre los dos microorganismos presentes en el cocultivo, otorgándoles una mejor adaptación al estrés por arsénico (**Figura 16**). Además, hubo un aumento aparente en su producción hasta una concentración de 3000 mg/L.

En general, la microalga es capaz de tolerar hasta 1000 mg/L de arsenato de sodio, y la bacteria es capaz de tolerar hasta 3000 mg/L. Al igual que la bacteria, el cocultivo es capaz de tolerar hasta 3000 mg/L. Sin embargo, es necesario probar concentraciones más elevadas del contaminante, para determinar la concentración máxima que pueden tolerar.

7.4.2 Capacidad de reducción de arsenato

Debido a que el arsénico se encuentra presente en suelos contaminados principalmente como As(V), se determinó la capacidad de los microorganismos endófitos para reducir diferentes concentraciones de arsenato de sodio mediante la formación de Ag_3AsO_3 , un precipitado de color amarillo (**Figura 17**). Se encontró que *M. oryzae* reduce el As(V) a As(III) cuando se encuentra en un rango de concentraciones de 350 a 2000 mg/L. Con concentraciones de 2500 y 3000 mg/L,

aunque se observó una ligera formación de un precipitado de color amarillo, hay una disminución en comparación con las demás concentraciones evaluadas.

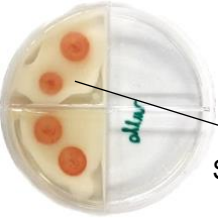
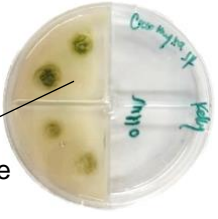
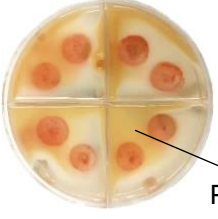

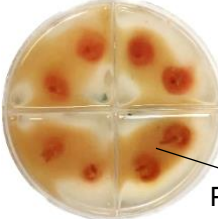
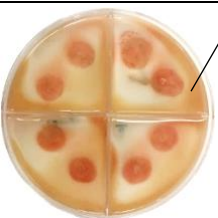

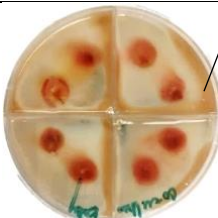




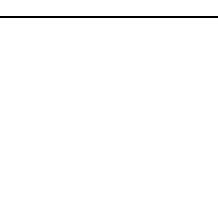

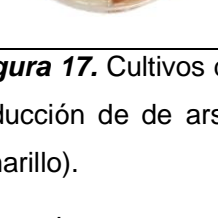
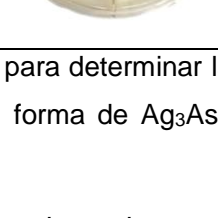
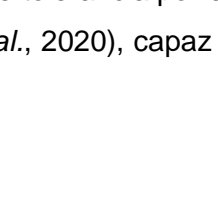

<i>M. oryzae</i>	<i>Coccomyxa simplex</i>	Cocultivo	Na_3AsO_4 (mg/L)
			0
Sin formación de precipitado			
			350
			500
Precipitado			
			750
			1000
			1500
			2000
			2500
			3000

Figura 17. Cultivos de 10 días de *M. oryzae*, *C. simplex* y cocultivo para determinar la capacidad de reducción de de arsenato de sodio (As(V)) a arsenito (As(III)) en forma de Ag_3AsO_3 (precipitado amarillo).

Sin embargo, estos resultados muestran una mayor capacidad de tolerancia por esta bacteria al compararse con la bacteria endófito *Bacillus pacificus* (Sahu *et al.*, 2020), capaz de tolerar sólo

hasta 100 mg/L de arsenato de sodio, y sin la capacidad de formar el precipitado de color amarillo que indica la reducción de arsenato de sodio a arsenito de sodio (Kabiraj *et al.*, 2023), y con la bacteria *Paenibacillus* sp. CIMAP-A4 que fue capaz de formar el precipitado amarillo en una concentración de 10 mg/L de arsénico (Tripathi *et al.*, 2022).

En los cultivos de *C. simplex*, se formó el precipitado de Ag_3AsO_3 en las concentraciones de As(V) en donde hubo crecimiento de la microalga (350 – 1000 mg/L), observándose una disminución del precipitado en 750 y 1000 mg/L (**Figura 17**). Se observó que el cocultivo, aparentemente, tiene una mayor capacidad para formar Ag_3AsO_3 en las concentraciones de 350 y 500 mg/L de As(V), en comparación con los cultivos axénicos, sin embargo, se observa una disminución en la formación del precipitado a medida que aumenta la concentración del contaminante, siendo casi nula en las concentraciones de 2500 y 3000 mg/L.

Esta capacidad de los microorganismos para reducir arsenato de sodio a arsenito de sodio se podría deber a la enzima arsenato reductasa que ya ha sido identificada en algunos microorganismos endófitos resistentes a arsénico, y se ha encontrado en bacterias pertenecientes al género *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Microbacterium*, *Pseudomonas* y *Athrobacter* (Román-Ponce *et al.*, 2018), y microalgas como *Chlorella* sp., *Monoraphidium arcuatum* y *Chlamydomonas reinhardtii* (Levy *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2015; Papry y Hasegawa, 2022)

7.4.3 Formación de biopelículas

Los microorganismos categorizados como beneficiosos para las plantas poseen mecanismos que mejoran la tolerancia a condiciones de estrés como la presencia de elementos tóxicos. Estos mecanismos incluyen la secreción de exopolisacáridos (EPS) y la formación de biopelículas, que ayudan a la colonización de la planta por los microorganismos, aumentan la captación de nutrientes y la retención de agua, además de influir en la captura de metaloides y su adsorción. Lo anterior se puede ver afectado por diversos factores, como el crecimiento celular, tiempo de contacto y la concentración del contaminante. Además, las biopelículas formadas de diversas especies microbianas en conjunto pueden mejorar las interacciones metabólicas entre éstas, siendo incluso más efectivas en la remoción de contaminantes que las formadas por una sola especie microbiana (Wang *et al.*, 2023).

Después de 10 días de contacto con diferentes concentraciones de arsenato de sodio, *M. oryzae* creció y formó biopelícula en concentraciones de hasta 2000 mg/L, equivalentes a 480.7 mg/L de arsénico (**Figura 18a**), la cual se observa como tinción de color morado de los pozos de la microplaca. Varias especies del género *Methylobacterium* se han reportado como formadoras de

biopelículas (Dourado *et al.*, 2015). Por lo general, después del reconocimiento, la colonización de la superficie radicular depende de la producción de adhesinas, pili, y exopolisacáridos, y se ha encontrado que *M. oryzae* tiene hasta diez genes relacionados con la formación de estos compuestos/estructuras. Varias especies del género colonizan a las plantas por medio de una capa mucilaginosa inicial, lo que podría ser un paso crucial en todo el proceso (Dourado *et al.*, 2015).

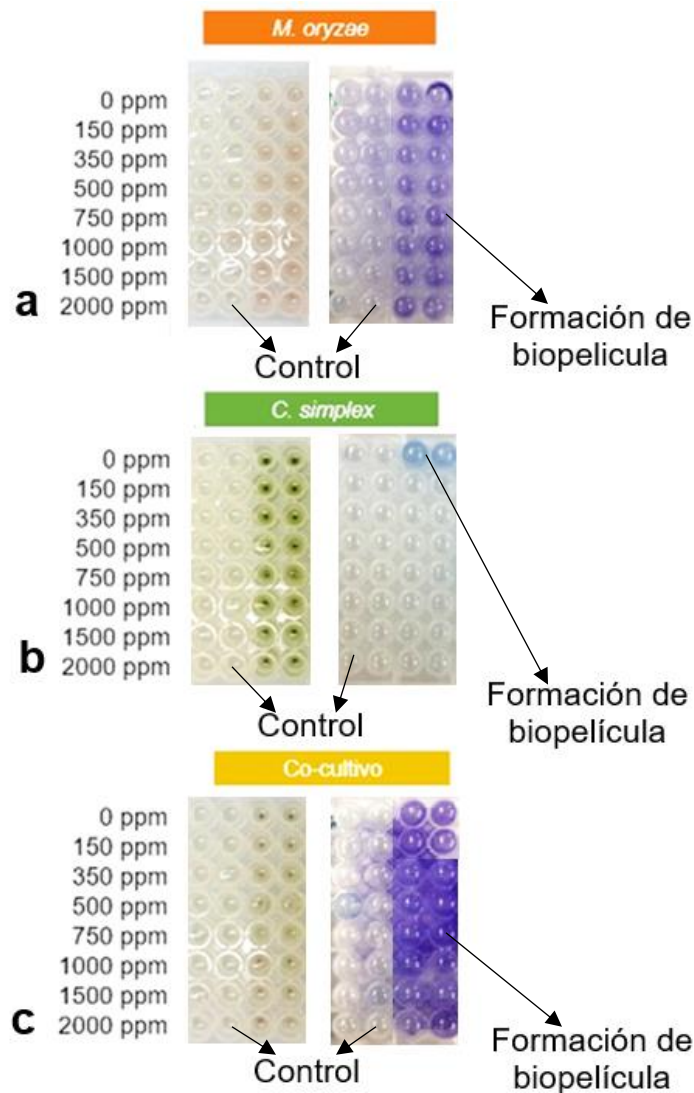


Figura 18. Crecimiento (izquierda) y formación de biopelículas (derecha) de cultivos de *M. oryzae* (a), *C. simplex* (b) y el cocultivo *C. simplex*-*M.oryzae* (c) en diferentes concentraciones de arsenato de sodio. 10 días de incubación.

La microalga por su parte solo fue capaz de formar biopelícula sin la presencia de arsénico (**Figura 18b**), la cual se observó como tinción de color azul de los pozos de la microplaca. Con relación al cocultivo microalga-bacteria, se observó crecimiento y formación de biopelículas en

todas las concentraciones de arsenato de sodio evaluadas, observándose como tinción de color morado de los pozos de la microplaca (**Figura 18c**).

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se cuantificó la formación de biopelículas, en presencia de As(V), en monocultivos de *M. oryzae* y en cocultivos con *C. simplex*, ya que la microalga no formó biopelícula en presencia de As(V). La presencia de As(V) estimuló la formación de biopelícula por *M. oryzae* en concentraciones de 350 y 500 mg/L (~84.1 mg de As/L y ~120.15 mg As/L) (**Figura 19**), probablemente como una estrategia de supervivencia, y es que las bacterias pueden tener respuestas más rápidas y eficientes gracias al *Quorum Sensing* (QS). Lo anterior puede ocurrir por medio de moléculas señalizadoras, como N-acil homoserina lactona, que regula la transcripción de genes relacionados con la formación de biopelículas (Dourado *et al.*, 2015). Sin embargo, estos mecanismos pueden verse afectados en concentraciones de As(V) más altas (≥ 750 mg/L), lo que podría disminuir la densidad celular y la concentración de moléculas señalizadoras y, por consiguiente, la formación de biopelículas (Davis *et al.*, 1998). Este comportamiento es similar al reportado por Tripathi *et al.* (2022), en donde la presencia de 10 mg/L de arsénico estimuló la formación de biopelícula en un monocultivo de *Paenibacillus* sp., bacteria Gramnegativa productora de ACC-desaminasa y ácido indolacético al igual que *M. oryzae*.

En general, hubo una mayor formación de biopelícula en el cocultivo que en el cultivo puro de la bacteria. La presencia de As(V) estimuló su formación y se mantuvo sin diferencias en un rango de 350 a 1000 mg As(V)/L; aunque con 1500 mg As(V)/L disminuyó con respecto al resto de las concentraciones probadas, ésta fue ~1.63 veces mayor que la del control sin As(V) (**Figura 19**). El estímulo en la formación de biopelícula en presencia de As(V) puede atribuirse a que es una estrategia de supervivencia en presencia de contaminantes y a que, al ser un cocultivo, se ven menos afectados los microorganismos (Wang *et al.*, 2023). Como se observó la microalga por sí sola no es capaz de producir biopelícula al estar en contacto con As(V), en este caso parece ser que la bacteria es la que produce los EPS y demás compuestos necesarios para la formación inicial de la biopelícula, incluyendo en esta a la microalga. Así la microalga ayuda a mantener oxígeno en el interior de la biopelícula, y la bacteria le provee CO₂, y gracias al metabolismo sinérgico que existe entre ambos tipos de microorganismos puede haber además intercambio de nutrientes entre ambos, manteniendo así la supervivencia del cocultivo (De Barros, 2015; Tripathi *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022). El uso de un cocultivo multi-especie puede ampliar las posibles interacciones metabólicas entre los microorganismos que lo componen, aumentando su resistencia a altas concentraciones del metaloide. Así, los EPS forman complejos con los cationes

metálicos, logrando inmovilizarlos dentro de la matriz y promoviendo la biorremediación (Tripathi *et al.*, 2022).

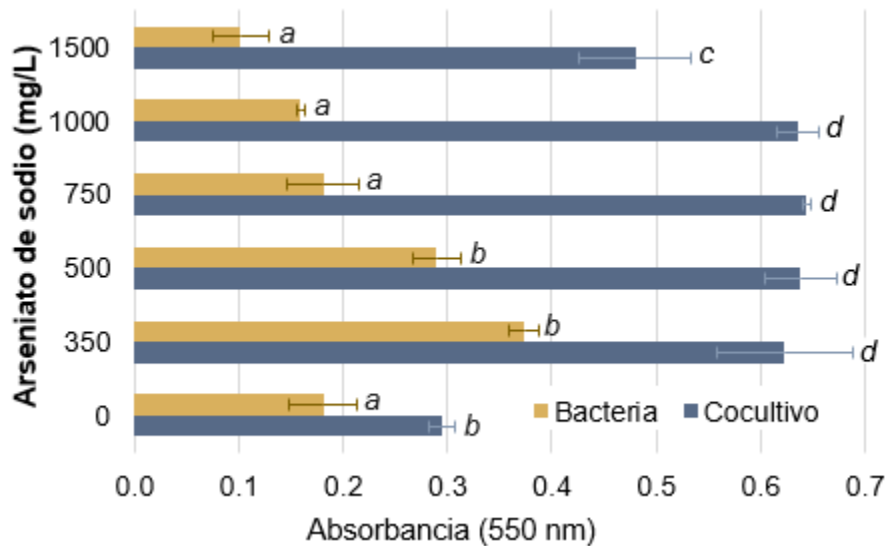


Figura 19. Formación de biopelículas del monocultivo de *M. oryzae* y en cocultivo con *C. simplex*. (Abs. 550 nm), a diferentes concentraciones de arsenato de sodio. Las letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

7.4.4 Producción de sideróforos

En ambientes contaminados con elementos tóxicos, las bacterias pueden desarrollar mecanismos de resistencia, como la producción de sideróforos, que pueden formar complejos solubles con elementos tóxicos llamados metalóforos (Gomes *et al.*, 2024). En el presente estudio se encontró que, en ausencia de As(V), la bacteria en monocultivo y en cocultivo no es capaz de producir estos compuestos (**Figura 20**), lo que indica que la presencia de As(V) estimula su producción. En general, la producción de sideróforos en el cultivo puro y el cocultivo son similares en las diferentes concentraciones de arsenato de sodio evaluadas, excepto en 500 mg/L donde la bacteria por sí sola produce mayor cantidad que en cultivo con la microalga. En 2000 mg As(V)/L el cocultivo con la microalga estimula la producción de sideróforos, siendo alrededor de 1.27 veces mayor que la producción obtenida por la bacteria sola.

Estos resultados son relevantes puesto que estos compuestos pueden mejorar la remoción de elementos tóxicos. Por ejemplo, con el uso de sideróforos producidos por la bacteria *Pseudomonas azotoformans* se logró remover 92.8% de arsénico presente en suelos contaminados (Nair *et al.*, 2007). En otro estudio, se reporta que, de 320 aislados bacterianos resistentes a elementos tóxicos, 170 fueron capaces de producir sideróforos y de estos 60 fueron capaces de producir

metalóforos, mostrando buenos resultados en cuanto a la resistencia a arsénico, zinc y níquel (Maldonado-Hernández *et al.*, 2022).

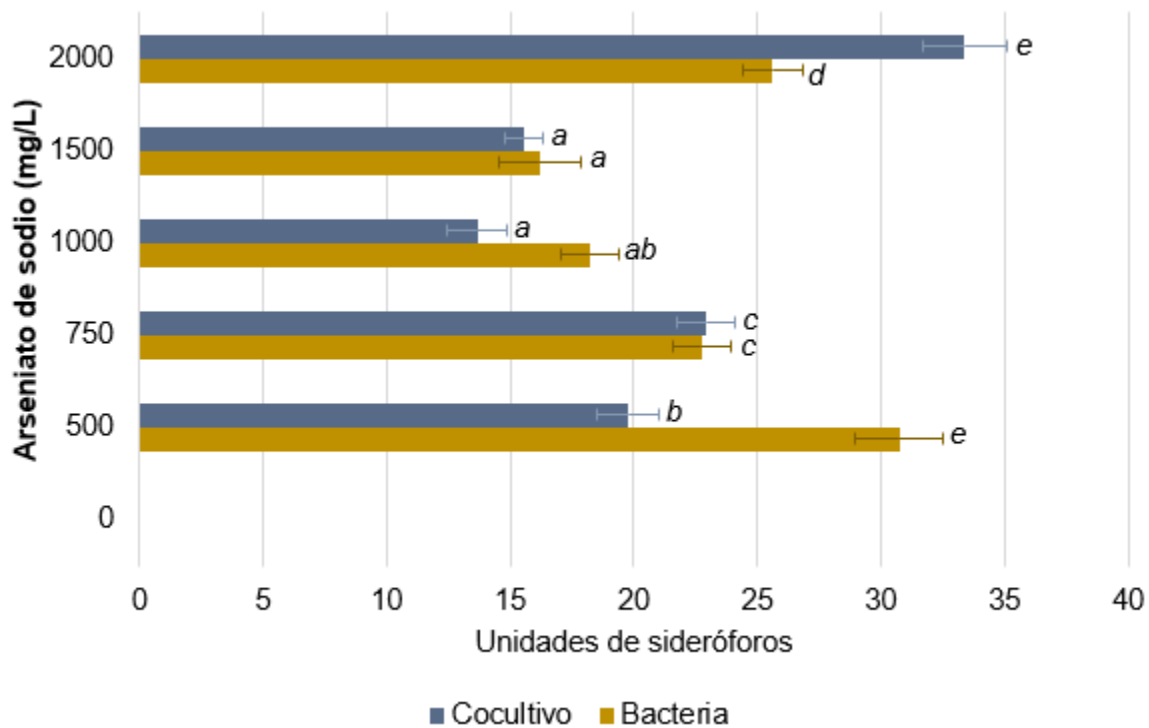


Figura 20. Producción de sideróforos del monocultivo de *M. oryzae* y en cocultivo con *C. simplex* (Abs. 630 nm), a diferentes concentraciones de arsenato de sodio. Las letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

El uso de bacterias productoras de sideróforos puede ayudar a aumentar la tolerancia de las plantas a este elemento tóxico, al inmovilizarlo e incorporarlo como complejo sideróforo-As (Gomes *et al.*, 2024). Además, puede promover el crecimiento vegetal, ya que los sideróforos pueden estimular la producción de clorofila y enzimas fotosintéticas por medio de la suplementación de hierro (Liu *et al.*, 2023). Plantas de *Phragmites communis* y *Ricinus communis* L (Sharma *et al.*, 2021; Tripathi *et al.*, 2021) inoculadas con bacterias productoras de sideróforos ya han mostrado gran tolerancia a elementos tóxicos como As, Cd, Cu, Ni, Pb, Mn y Zn.

En términos generales, la microalga fue capaz de tolerar hasta 1000 mg/L de arsenato de sodio y de reducirlo a arsenito de sodio. Por su parte, la bacteria y el cocultivo fueron capaces de hacerlo hasta 3000 mg/L, y además fueron capaces de formar biopelícula en presencia de hasta 1500 mg/L de esta sal y de producir sideróforos hasta en 2000 mg/L, mejorando su producción en cocultivo. Todas estas características son de gran importancia debido a que como se ha mencionado pueden facilitar la colonización de los tejidos vegetales de *A. farnesiana*, promover

su crecimiento y mejorar su resistencia a altas concentraciones de As(V). Todas estas características son de interés pues podrían ayudar a mejorar la tolerancia de la planta a arsénico, especialmente al estar en cocultivo.

7.5 Efecto de un cocultivo en la tolerancia a arsénico de *A. farnesiana*

Plantas de aprox. 28 días con 3 hojas verdaderas y, por lo menos, 3 cm de longitud radicular fueron trasplantadas a medio MS con 5 g/L de sacarosa y 580 μ M de arsénico (~43.51 mg/L) en forma de arsenato de sodio. Luego de un periodo de aclimatación de 3 días, las plantas se inocularon con $\sim 1.5 \times 10^6$ células/planta de *Coccoomyxa simplex*, o con $\sim 1 \times 10^6$ células/planta de *Coccoomyxa simplex* y $\sim 5 \times 10^5$ UFC/planta de *M. oryzae*. Cada tratamiento se evaluó con 8 réplicas, y después de 50 ± 3 días desde la inoculación de los microorganismos se realizaron las pruebas para determinar la tolerancia y acumulación de As(V). Plantas bajo las mismas condiciones, pero sin inocular, fueron utilizadas como control.

7.5.1 Crecimiento

Por lo general, se ha reportado que el arsénico tiene un efecto negativo en el crecimiento y desarrollo de las plantas al disminuir su capacidad fotosintética e inhibir algunas rutas metabólicas importantes (Ghorbani *et al.*, 2021), esto se ha visto en plantas como *Oryza sativa*, *Helianthus annuus* y *Pongamia pinnata*. En contraste, en este estudio luego de 50 ± 3 días de cultivo, las plantas sometidas a los diferentes tratamientos no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el peso seco de tallos y raíces por el contacto con el metaloide (**Figura 21**). La presencia de 580 μ M de As(V) no disminuyó la producción de biomasa ni mostró efectos negativos visualmente en la morfología, en comparación con las plantas control libres del contaminante (**Figura 22**). Esto se puede deber a que la toxicidad del arsénico para una planta depende de la especie vegetal, así como de la especie reactiva y concentración del contaminante (Upadhyay *et al.*, 2020). Así, diferentes especies de plantas pueden tener diversos mecanismos de defensa contra este metaloide. *A. farnesiana* posee una serie de enzimas que funcionan como respuesta al estrés oxidante generado por arsénico como SOD, POX, GR, GST, arsenato reductasa (AR), y que ayudan a contrarrestar el daño causado por la presencia del metaloide, mejorando la tolerancia de la planta (Alcántara-Martínez, 2018).

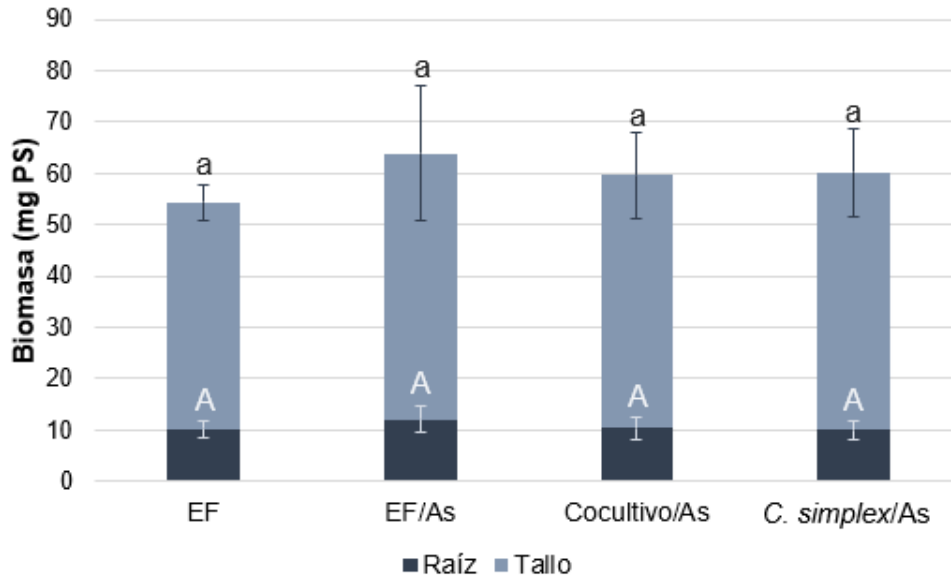


Figura 21. Producción de biomasa de tallos y raíces de plantas de *A. farnesiana* expuestas a As(V) durante 50 ± 3 días. EF (*A. farnesiana* sin endófitos sin As – control), EF/As (*A. farnesiana* sin endófitos con As), Cocultivo/As (*A. farnesiana* inoculada con *M. oryzae* y *C. simplex* con As), *C. simplex*/As (*A. farnesiana* inoculada con *C. simplex* con As). Las letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tallos y las letras mayúsculas entre las raíces.



Figura 22. Plantas de *A. farnesiana* expuestas a $580 \mu\text{M}$ de arsénico durante 50 ± 3 días. **A.** planta control sin arsénico; **B.** planta libre de endófitos con arsénico; **C.** planta inoculada con *M. oryzae* y *C. simplex* con arsénico; **D.** planta inoculada con *C. simplex* con arsénico.

La inoculación con los microorganismos endófitos en cocultivo y monocultivo no tuvo un efecto en la biomasa de las plantas con arsénico, en comparación con las plantas control, y las plantas

libres de endófitos con arsénico (**Figura 21**). A pesar de que los endófitos pueden mejorar el crecimiento de algunas plantas aún en presencia de elementos tóxicos debido a la producción de diversos compuestos promotores del crecimiento vegetal (Dourado *et al.*, 2015; Tripathi *et al.*, 2022), y que este efecto es aún mayor en plantas inoculadas por cocultivos o consorcios de microorganismos de este tipo (Jacoby *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2022).

7.5.2 Acumulación de arsénico en *A. farnesiana*

Se ha propuesto que la acumulación de arsénico por *A. farnesiana* se relaciona con su eficiente mecanismo de detoxificación, a través de la reducción del As(V) a As(III) en las raíces y acumulándolo en las vacuolas al formar un conjugados con GSH (Peralta-Pérez y Volke-Sepúlveda, 2012). La inoculación del cocultivo *M. oryzae*-*C. simplex* aumentó la acumulación de arsénico en raíces (~2.5 veces) y tallos (~9 veces) de plantas de *A. farnesiana*, con respecto a las plantas sin inocular, y aumentó el FBA en las plantas (~2.93 veces). En cuanto a las plantas inoculadas con el monocultivo de la microalga, la acumulación del contaminante en raíces y tallos de plantas aumentó ~2.12 veces y ~14.3 veces respectivamente, y el FBA aumentó ~2.88 veces con respecto a las plantas libres de endófitos (**Figura 23** y **Tabla 5**).

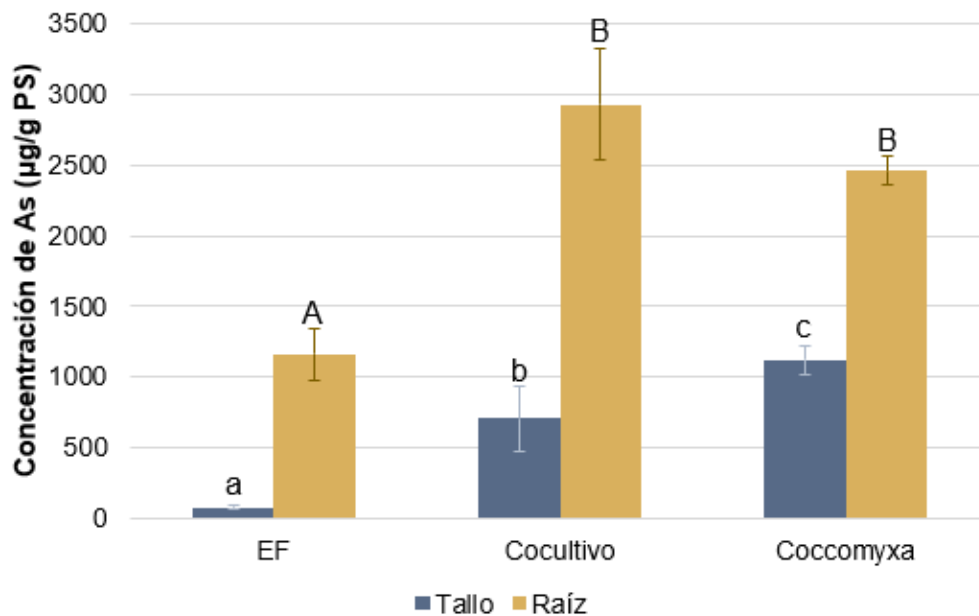


Figura 23. Acumulación de arsénico en tallos y raíces de plantas de *A. farnesiana* cultivadas por 50 ± 3 días en presencia de As(V). EF (*A. farnesiana* libre de endófitos), Cocultivo (*A. farnesiana* inoculada con *M. oryzae* y *C. simplex*), *C. simplex* (*A. farnesiana* inoculada con *C. simplex*). Las letras

minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tallos y las letras mayúsculas entre las raíces.

Esto se debe a que la relación simbiótica de plantas tolerantes a elementos tóxicos con microorganismos endófitos puede aumentar la remoción o acumulación, al aumentar la tolerancia de las plantas a factores ambientales (Jacoby *et al.*, 2017), y además a que estos microorganismos en cocultivo son capaces de producir sideróforos y biopelículas, así como a otros posibles mecanismos de defensa. En otras plantas hiperacumuladoras, como *Robinia pseudoacacia* L., se reportó el aumento en la acumulación de arsénico en ~1.7 veces al ser inoculadas con la bacteria endófito *Enterobacter* sp. YG-14 (Chen *et al.*, 2024). En plantas de maíz, la inoculación de un consorcio microbiano aumentó la acumulación de arsénico en raíces ~1.28 veces y en tallos ~1.18 veces (Liu *et al.*, 2022).

El factor de translocación (FT) aumentó ~3.56 veces en las plantas inoculadas con el cocultivo con relación a las no inoculadas, y en las plantas inoculadas únicamente con la microalga ~6.74 veces (**Tabla 5**). Reportes previos indican que cuando el FT es <1, se considera que el elemento se inmoviliza en las raíces de la planta, indicando que, aunque el cocultivo aumenta la translocación, sigue inmovilizando As principalmente en raíces. Este mismo comportamiento se presentó en el estudio mencionado previamente, en donde la cepa *Enterobacter* sp. YG-14 mantuvo el FT de *R. pseudoacacia* L. por debajo de 1 (0.5) (Chen *et al.*, 2024).

Tabla 5. Factor de bioacumulación (FBA) y factor de translocación (FT) de As (580 µM) de plantas de *A. farnesiana* cultivadas por 50 ± 3 días.

Tratamiento	FBA	FT
EF	28.6	0.07
Cocultivo	83.9	0.24
<i>C. simplex</i>	82.3	0.45

*EF: plantas libres de endófitos. Cocultivo: plantas en asociación con *C. simplex* y *M. oryzae*, *C. simplex*: plantas en asociación con *C. simplex*.

En general, la asociación con el monocultivo de la microalga pudo contribuir a un aumento en el FT, aumentando la acumulación de arsénico en tallos (1118.08 µg/g PS) en comparación con las plantas inoculadas con el cocultivo (703.76 µg/g PS) (**Figura 23**). El aumento del FT ya se ha observado en otras plantas como *Bacopa monnieri* L. al inocularse con una bacteria endófito (Tripathi *et al.*, 2022), aunque también se observó una disminución en el FBA de raíces. Sin embargo, no hay diferencias en la acumulación total de arsénico entre los tratamientos con

plantas inoculadas. Teniendo en cuenta el aumento en la bioacumulación por la inoculación de los microorganismos, y el hecho de que no hubo cambios en la biomasa de las plantas, es importante determinar el comportamiento de otra variable relacionada con la salud de la planta, como es la producción de pigmentos fotosintéticos.

7.5.3 Concentración de pigmentos fotosintéticos

El crecimiento, salud y productividad de las plantas se ven directamente afectados por el contenido de los pigmentos fotosintéticos; se ha observado que el arsénico causa inhibición del metabolismo de los tetrapirroles, que puede ser responsable de la disminución del contenido de pigmentos en plantas expuestas a este metaloide. Además, este contaminante puede causar disrupción del fotosistema II, afectando directamente la eficiencia fotosintética (Shukla *et al.*, 2023). Algunas especies de plantas en las que se ha observado este comportamiento son: *Solanum lycopersicum* L., que al exponerse a 10 mg/L de As disminuyeron su contenido de clorofila a y b en un 61.2% y 60.2% respectivamente (Ghorbani *et al.*, 2021), en *Vigna mungo* la exposición a As también disminuyó el contenido de clorofila a y b al exponerse a concentraciones de 100 μ M y 200 μ M (Srivastava *et al.*, 2017), en *B. monnieri* la exposición a 20 mg/L de As disminuyó el contenido de clorofila a en 51%, clorofila b en 37% y carotenoides en 49% (Tripathi *et al.*, 2022).

En este estudio, la presencia del metaloide aumentó la concentración (~1.5 a ~1.7 veces con respecto a plantas sin As(V)) de los tres pigmentos fotosintéticos evaluados en plantas no inoculadas (**Figura 24**). De manera similar a nuestros resultados, la exposición a 80 μ M de arsénico incrementó la concentración de pigmentos en *Nicotiana benthamiana*, la clorofila a en 58%, la clorofila b en 20% y los carotenoides en 17%, sugiriendo un rol de este pigmento en la respuesta antioxidante contra el estrés en las plantas y la protección de las clorofilas, ya que en tratamientos donde no hay cambios significativos en carotenoides hay una disminución en el contenido de clorofilas (Lukacova *et al.*, 2021).

Al comparar las plantas inoculadas solamente con la microalga y las plantas sin inocular en presencia de As(V), la concentración de pigmentos fotosintéticos fue menor en las primeras, posiblemente debido a una mayor acumulación (Kumari *et al.*, 2018) y un aumento en el FT. Aunque es importante destacar que la presencia de *C. simplex* podría haber ayudado a la planta a no disminuir significativamente la producción de pigmentos fotosintéticos por la acumulación de arsénico, incrementando la producción de carotenoides y manteniendo concentraciones de

clorofilas similares a las plantas control sin As(V), ya que como se ha mencionado este pigmento puede tener un rol en la protección de las clorofilas frente a arsénico (**Figura 24**).

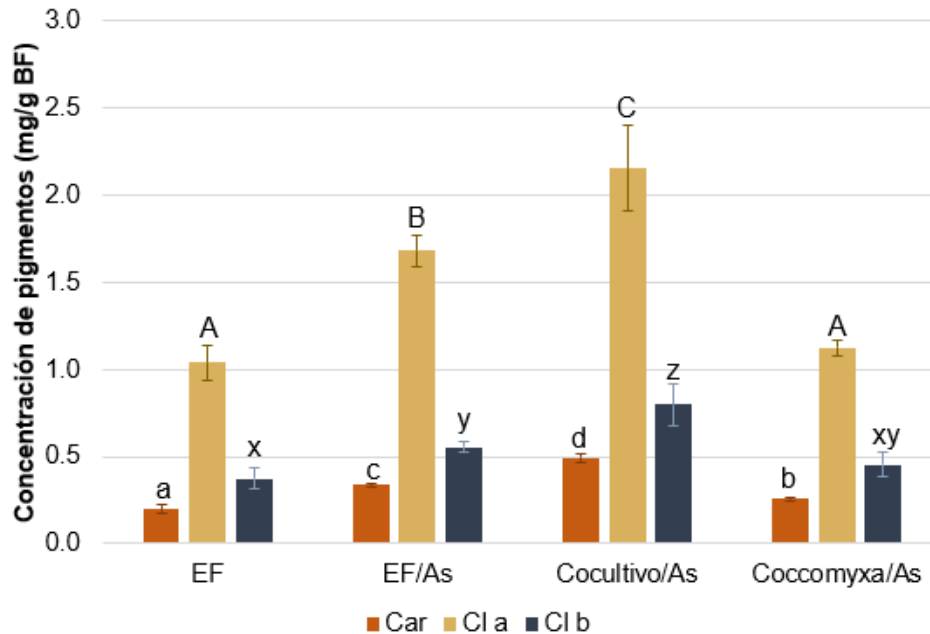


Figura 24. Concentración de pigmentos fotosintéticos en plantas de *A. farnesiana* crecidas con 580 μ M de arsénico por 50 ± 3 días. EF (*A. farnesiana* libre de endófitos sin As – control), EF/As (*A. farnesiana* libre de endófitos), Cocultivo/As (*A. farnesiana* inoculada con *M. oryzae* y *C. simplex*), Coccomyxa/As (*A. farnesiana* inoculada con *C. simplex*). Car (carotenoides), Cl a (clorofila a), Cl b (clorofila b). Las letras minúsculas a, b, c, d indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con relación a la producción de carotenoides. Las letras mayúsculas A, B, C las indican con relación a la producción de clorofila a. Las letras minúsculas x, y, z las indican con relación a la producción de clorofila b.

En cuanto a las plantas que estuvieron en contacto con arsénico, inoculadas con el cocultivo microalga-bacteria, hubo una producción aún mayor de pigmentos fotosintéticos con relación a las plantas control. Aumentando la producción de clorofila a ~2.5 veces, de clorofila b ~2.1 veces y de carotenoides ~2.16 veces (**Figura 24**), a pesar de aumentar el FBA y el FT. En *Pteris vittata*, la inoculación con una bacteria endófito (*Enterobacter* sp.) también aumentó la concentración de clorofilas hasta ~1.12 veces (Li *et al.*, 2023). Esto puede ser consecuencia de un aumento significativo en la producción de carotenoides, así como puede ser por la producción de fitohormonas como ácido indol acético (AIA) que puede aumentar la síntesis de pigmentos fotosintéticos (Glick, 2012).

En general, la producción de pigmentos fotosintéticos en plantas de *A. farnesiana* crecidas en presencia de As(V) fue más eficiente por efecto del cocultivo microalga-bacteria que en plantas inoculadas con el monocultivo de la microalga. El contacto con arsénico y la inoculación de microorganismos endófitos afectan la concentración de pigmentos fotosintéticos en las plantas, pero también podrían afectar significativamente su defensa antioxidante, por lo que se midieron además la actividad de enzimas y compuestos involucrados en ésta.

7.5.4 Defensa antioxidante

En condiciones libres de estrés hay un balance entre varios procesos metabólicos y celulares en las plantas, pero la presencia de elementos tóxicos como el arsénico afectan este balance, aumentando la concentración de ERO. El balance redox en las células, es mantenido por la acción de una serie de moléculas – como ascorbato y glutatión – y enzimas antioxidantes como SOD, POX y CAT (Nabi *et al.*, 2021)

7.5.4.1 Actividad peroxidasa (POX)

Las POX tienen un papel fundamental en múltiples procesos durante la vida de una planta, pero el principal se relaciona con el control de la disponibilidad de H₂O₂, cuya producción intracelular aumenta debido a la presencia de arsénico (Lukacova *et al.*, 2021). Por lo que, un aumento en la concentración de ERO como H₂O₂, comúnmente causa un aumento en la actividad POX en las plantas expuestas a arsénico en comparación con plantas control, como se observa en la **Figura 25**. Se observa que, en plantas expuestas a As(V), la actividad POX fue mayor en las raíces que en los tallos. Otra planta que ha mostrado este comportamiento es *Vigna mungo* (Srivastava y Sharma, 2013).

La mayor actividad POX se observó en las plantas expuestas a arsénico e inoculadas, esto puede deberse a que, cuando las raíces de las plantas son colonizadas por microorganismos endófitos, aumenta la producción de ERO y se activa el sistema de defensa antioxidante, lo que incluye algunos genes que modulan enzimas como las POX (Ma *et al.*, 2016). Este comportamiento se ha observado en *R. pseudoacacia* L., en donde plantas expuestas a arsénico inoculadas con la bacteria endófito *Enterobacter* sp. YG-14 tuvieron mayor actividad POX con relación a plantas expuestas no inoculadas; esta respuesta fue atribuida al aumento del contenido principalmente de H₂O₂ por un posible aumento de la colonización de las raíces como consecuencia del estrés producido por el contaminante, la disminución de nutrientes y una mayor acumulación (Chen *et al.*, 2024). Esta respuesta contribuye a una mayor actividad antioxidante, y se ha reportado que

cuando las condiciones ambientales se vuelven más adversas, los microorganismos endófitos aumentan su abundancia en las raíces de las plantas huésped y se estimula la relación simbiótica entre ambos organismos con el fin de mejorar su resistencia (Chen *et al.*, 2024).

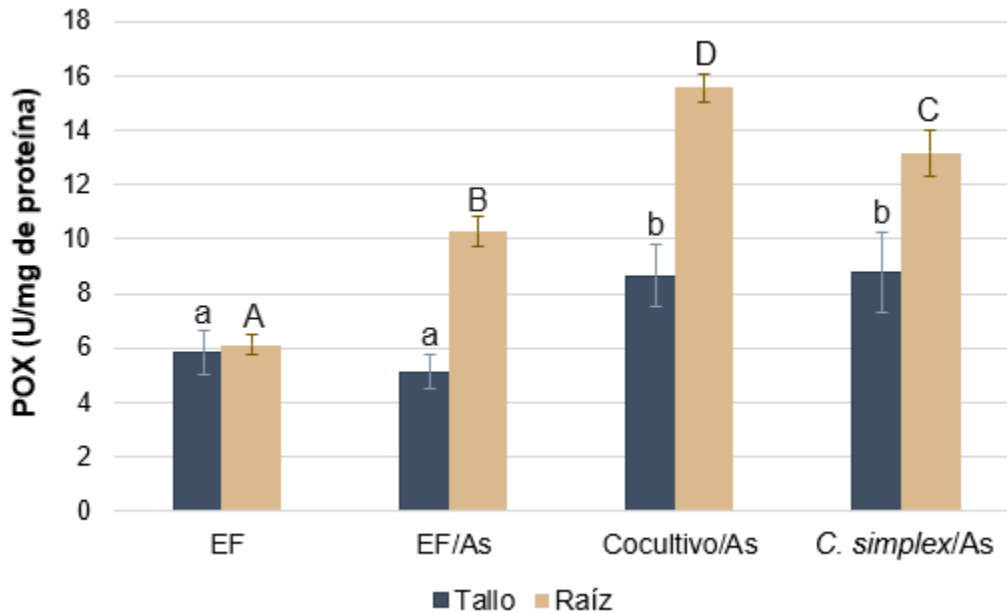


Figura 25. Actividad POX específica en tallos y raíces de plantas de *A. farnesiana* expuestas a 580 μM de arsénico por 50 ± 3 días. EF (*A. farnesiana* libre de endófitos sin As – control), EF/As (*A. farnesiana* libre de endófitos), Cocultivo/As (*A. farnesiana* inoculada con *M. oryzae* y *C. simplex*), *C. simplex*/As (*A. farnesiana* inoculada con *C. simplex*). Las letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tallos y las letras mayúsculas entre las raíces.

El aumento de la actividad POX en los tallos de las plantas inoculadas se puede deber al aumento del FT en comparación con las plantas sin endófitos. Por lo que, además de la exposición a As(V), la colonización por estos microorganismos endófitos, aumentan la actividad POX en *A. farnesiana*, incrementando en mayor proporción en plantas inoculadas con el cocultivo. Además de las POX, otras enzimas de gran importancia en la defensa antioxidante por plantas son las CAT.

7.5.4.2 Actividad catalasa (CAT)

Las CAT también son parte del sistema de defensa en plantas, para reducir el daño causado por la sobreproducción de ERO debido a la presencia de contaminantes como el arsénico. Se ha reportado que la exposición al arsénico puede estimular la actividad CAT para contrarrestar el estrés en plantas como *Vetiveria zizanoides* y *Artemisia annua* (Singh *et al.*, 2017; Naeem *et al.*,

2020). Esta respuesta también se observó en este estudio en plantas no inoculadas de *A. farnesiana* expuestas a 580 μM de As(V) (**Figura 26**). En este tratamiento, la presencia de As(V) aumentó de manera significativa la actividad CAT en las raíces – que están en contacto directo y acumularon más arsénico que los tallos– y disminuyó su actividad en los tallos.

La colonización por microorganismos endófitos y estrés por arsénico puede aumentar la actividad POX y la actividad CAT debido al aumento en la concentración de H_2O_2 , como se observó en plantas de *R. pseudoacacia* inoculadas con *Enterobacter* sp. (Chen *et al.*, 2024). En este estudio, aunque la inoculación con microorganismos endófitos en cocultivo o monocultivo aumentó el FBA y el FT (**Tabla 5**), solamente estimuló la actividad POX -tanto en tallos como en raíces- (**Figura 24**). Sin embargo, la asociación disminuyó la actividad CAT en raíces y la aumentó en tallos al compararse con las plantas expuestas a arsénico que no fueron inoculadas (**Figura 25**). Ullah *et al.* (2024) también observaron que la presencia de arsénico aumentó la actividad CAT en plantas no inoculadas por endófitos, y que la inoculación de plantas de *Oryza sativa* expuestas a arsénico con el endófito *Bacillus subtilis* IU31 mantuvo la actividad similar a la de plantas crecidas sin el contaminante.

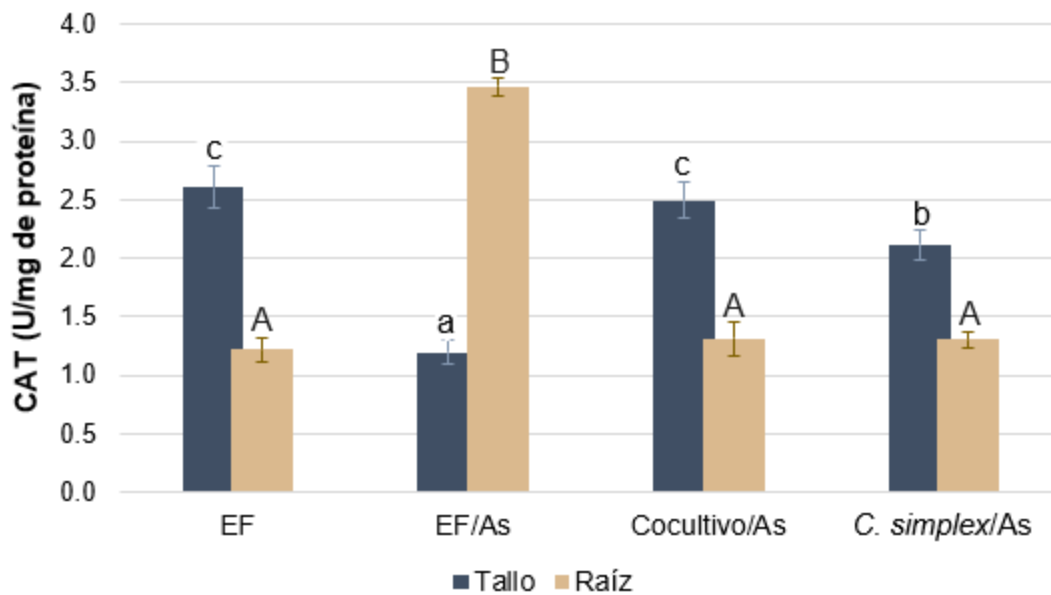


Figura 26. Actividad CAT específica en tallos y raíces de plantas de *A. farnesiana* expuestas a 580 μM de arsénico por 50 ± 3 días. EF (*A. farnesiana* libre de endófitos sin As – control), EF/As (*A. farnesiana* libre de endófitos), Cocultivo/As (*A. farnesiana* inoculada con *M. oryzae* y *C. simplex*), *C. simplex*/As (*A. farnesiana* inoculada con *C. simplex*). Las letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tallos y las letras mayúsculas entre las raíces.

En este estudio, la respuesta obtenida en la actividad CAT puede deberse precisamente al aumento significativo observado en la actividad POX de raíces, nivelando la actividad CAT al actuar ambos tipos de enzimas sobre el H₂O₂. Otra posible explicación es el aumento en la producción de AIA y de giberelinas (GAs) por parte de los microorganismos, que pueden incrementar la actividad GST y disminuir la actividad CAT de plantas en presencia de arsénico (Khan *et al.*, 2014). Lo anterior, debido a que la asociación con una bacteria productora de AIA, como *M. oryzae*, podría tener este efecto en las plantas de *A. farnesiana* (Kwak *et al.*, 2014), mismo efecto que podría deberse a la inoculación de una microalga del género *Coccomyxa*, género que se ha reportado como productor de múltiples tipos de giberelinas (Stirk *et al.*, 2013).

Otros estudios que han reportado resultados diferentes son el realizado por Babu *et al.* (2015), quienes observaron que la inoculación de la bacteria endófito *Pseudomonas koereensis* AGB-1 en plantas de *Miscanthus sinensis* aumentó la acumulación de elementos tóxicos provenientes de minas, pero disminuyó la actividad CAT. En el estudio de Li *et al.* (2023), la inoculación del endófito *Enterobacter* sp. E1 aunque aumentó la acumulación de arsénico por *P. vittata*, no cambió de manera significativa la actividad CAT en comparación a las plantas control no inoculadas que fueron expuestas a arsénico. En el caso de *A. farnesiana*, la asociación con *C. simplex* y *M. oryzae*-*C. simplex* afectó la actividad de CAT, haciendo que los niveles de actividad enzimática en las plantas inoculadas expuestas a As(V) fueran similares a los de las plantas control sin As(V).

Además de las POX y de las CAT, que hacen parte de la defensa antioxidante de la planta, está la síntesis de tripéptidos como el glutatión (GSH), que cumple un rol en el proceso de eliminación de ERO (Rastogi *et al.*, 2019), por lo que es importante analizar posibles cambios en su concentración en las plantas de *A. farnesiana* expuestas a As(V) e inoculadas por *C. simplex* y *C. simplex*-*M. oryzae*.

7.5.4.3 Glutatión (GSH) total

El GSH es una molécula de detoxificación de arsénico de gran importancia en plantas por lo que es ampliamente utilizado como indicador de la tolerancia vegetal al estrés producido por este contaminante (Ullah *et al.*, 2024). Este tripéptido, además de sintetizarse como respuesta a la sobreproducción de ERO, las plantas lo utilizan para el secuestro de este metaloide y su acumulación en las vacuolas en forma de conjugados GSH-As(III) (Bertin *et al.*, 2021). Por lo que un aumento en este tripéptido en tallos y raíces podría estar relacionado con cambios en la fitoacumulación de arsénico en los diferentes tratamientos evaluados.

Como se observa en la **Figura 23**, hubo mayor acumulación de As en las raíces y los tallos de las plantas inoculadas con el cocultivo o el monocultivo de la microalga en comparación a las plantas no inoculadas, además de un mayor FT en las plantas inoculadas con *C. simplex*. El contenido de GSH (**Figura 27**) fue mayor en las raíces que en los tallos en todos los tratamientos con As(V) y, particularmente, en las plantas inoculadas con los microorganismos endófitos. Por otro lado, la presencia de microorganismos endófitos aumentó la actividad POX principalmente en raíces, al ser el sitio de colonización (**Figuras 12 y 27**). Lo anterior es de interés para este estudio debido a que la actividad de la familia de enzimas G-POX se relaciona directamente con la concentración de GSH, siendo necesario para algunas reacciones de oxidorreducción que involucran H₂O₂ (Pei *et al.*, 2023). En este sentido, es importante considerar que la concentración de H₂O₂ aumenta no solamente con la presencia de As(V), sino también con la colonización de los tejidos vegetales internos por parte de los microorganismos endófitos (Pedraza *et al.*, 2020).

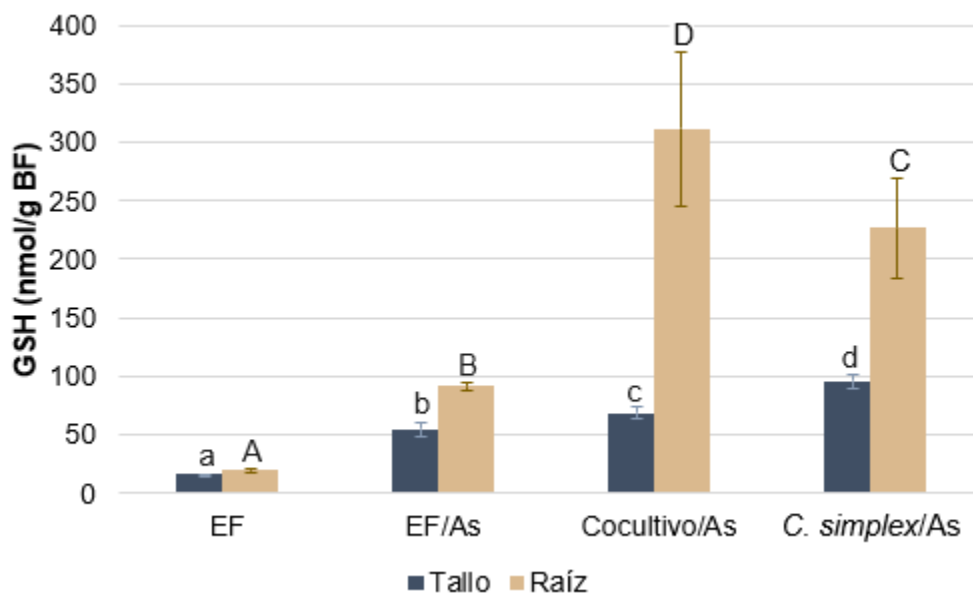


Figura 27. Contenido de glutatión total en tallos y raíces de plantas de *A. farnesiana* expuestas a 580 μ M de arsénico por 50 \pm 3 días. EF (*A. farnesiana* libre de endófitos sin As – control), EF/As (*A. farnesiana* libre de endófitos), Cocultivo/As (*A. farnesiana* inoculada con *M. oryzae* y *C. simplex*), *C. simplex*/As (*A. farnesiana* inoculada con *C. simplex*). Las letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tallos y las letras mayúsculas entre las raíces.

En las plantas expuestas a As(V) que no fueron inoculadas hubo un aumento de ~3.45 veces del GSH total en los tallos y de ~4.67 veces en raíces con relación a las plantas control. Por otra

parte, el contenido total de GSH aumentó hasta ~5.9 y ~4.3 veces en tallos y hasta ~11.6 y ~15.9 veces en raíces de plantas inoculadas con la microalga o el cocultivo, respectivamente. Similar a estos resultados, Chen *et al.* (2024) también reportaron un aumento en la concentración de GSH en plantas con microorganismos endófitos utilizadas para la fitorremediación de As, lo que se atribuyó a la inoculación de *Enterobacter* sp. YG-14 en las plantas de *R. pseudoacacia* L.

Estos resultados son relevantes, pues tanto *Enterobacter* sp. como *M. oryzae* se han reportado como productoras de AIA (Kwak *et al.*, 2014; Bao *et al.*, 2022). Esta auxina además de activar enzimas que actúan sobre sustancias tóxicas generadas por la presencia de As(V) (Islam *et al.*, 2015), puede aumentar la concentración de GSH en las plantas (Khan *et al.*, 2014). En general, es importante resaltar que no solamente la acumulación de As, sino que también la colonización de los tejidos vegetales por los endófitos y su efecto en la actividad POX, pueden afectar la concentración de GSH en *A. farnesiana*, siendo mayor la concentración en las plantas inoculadas con el cocultivo, aumentando en mayor medida la defensa antioxidante. Para verificar la colonización de los microorganismos endófitos se realizó siembra de segmentos de tallos y raíces en placa.

7.5.5 Verificación de presencia de microorganismos

Debido a que el arsénico puede ocasionar disrupción de la homeostasis de auxinas y, con esto, afectar de forma negativa la organogénesis de las raíces, ya que son más vulnerables que la parte aérea de la planta al ser la primera región de contacto con el contaminante presente en el suelo o medio de cultivo, la inoculación con microorganismos endófitos facultativos que puedan crecer tanto en el interior de los tejidos vegetales como en la zona de la raíz podría ayudar a contrarrestar el estrés oxidante al promover la adsorción de este metaloide (Tripathi *et al.*, 2022).

Con el fin de determinar si *M. oryzae* y *C. simplex* crecen de forma endosimbiótica en los tejidos de plantas de *A. farnesiana* expuestas a estrés por As(V), plantas de ~28 días fueron inoculadas con monocultivos de la microalga *C. simplex* y con cocultivos *C. simplex*-*M. oryzae*. Para verificar la presencia de los microorganismos como endófitos de *A. farnesiana*, se tomaron segmentos de tallos y raíces de plantas sometidas a los diferentes tratamientos evaluados en presencia de arsénico, y se sembraron en placas Petri con medio de cultivo.

Luego de 7 días de cultivo, se observó la presencia de la bacteria en tallos y raíces de plantas inoculadas con el cocultivo -como crecimiento de color rosado- observándose aparentemente una mayor producción de carotenoides en los tallos, el paso de *M. oryzae* a los tallos se puede deber

a que bacterias de este género pueden utilizar el metanol emitido por los estomas de la planta, colonizando de forma sistemática a la planta por medio del apoplasto o sistema vascular (Idris *et al.*, 2006; Rodríguez, 2018). Sin embargo, la bacteria también se observó en segmentos de plantas que fueron inoculadas por el monocultivo de la microalga, lo que puede deberse a que la bacteria es endófito de esta planta.



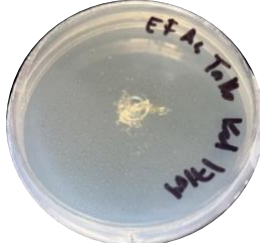

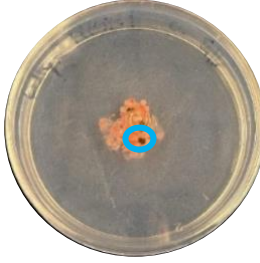



Tratamiento	Tallo	Raíz
EF		
EF As		
Cocultivo As		
C. simplex As		

Figura 28. Siembra en placa de segmentos de tallos y raíces de plantas de *A. farnesiana* crecidas con As(V), para determinar la presencia de los microorganismos inoculados (50 días de incubación). EF (*A. farnesiana* libre de endófitos sin As – control), EF As (*A. farnesiana* libre de endófitos), Cocultivo As (*A. farnesiana* inoculada con *M. oryzae* y *C. simplex*), *C. simplex* As (*A. farnesiana* inoculada con *C. simplex*). Las circunferencias negras indican la presencia de *M. oryzae*. Las circunferencias azul cian indican la presencia de *C. simplex*.

Después de 33 días, se observó la presencia de la microalga -como crecimiento de color verde oscuro- en segmentos de tallo de plantas inoculadas con el monocultivo de *C. simplex*, y luego de 38 días, en segmentos de tallo de plantas inoculadas con el cocultivo microbiano (**Figura 28**). La diferencia entre los tiempos de observación de ambos microorganismos se debe probablemente a su ubicación dentro de los tejidos vegetales, a que el t_d de la bacteria es menor que el de la microalga (De la Sancha-Sierra, 2022), y a diferencias en la resistencia al tratamiento de desinfestación superficial de los segmentos. El tratamiento utilizado en este estudio pudo ser más agresivo con la microalga al estar en contacto durante dos minutos con etanol (70% v/v).

8 CONCLUSIONES

- El aumento en la concentración de sacarosa tuvo un efecto negativo sobre la producción de pigmentos fotosintéticos por plantas asociadas a la microalga, en contraste con las plantas control, donde la concentración más baja de sacarosa disminuyó la concentración de pigmentos.
- Los microorganismos mostraron tolerancia a arsenato y la capacidad de reducirlo a arsenito, y, en presencia de este elemento tóxico la bacteria y el cocultivo fueron capaces de producir sideróforos y biopelículas.
- La endosimbiosis con el cocultivo *C. simplex-M. oryzae* y con *C. simplex* incrementó la bioacumulación de As por *A. farnesiana*.
- La asociación de *A. farnesiana* con el cocultivo aumentó el contenido de pigmentos fotosintéticos en las plantas, a pesar de haber aumentado el factor de bioacumulación.
- La actividad conjunta de la defensa antioxidante, particularmente las peroxidasas y catalasas, y la molécula glutatión, fue un factor clave en la protección contra el estrés oxidante en *A. farnesiana*, permitiéndole tolerar la presencia de As(V).

9 PERSPECTIVAS

Aunque se midió la acumulación de As en las plantas, sería de gran interés cuantificar las diferentes especies de este elemento, ya que esto podría proporcionar información importante en cuanto a los mecanismos de defensa vegetal, al ser algunas especies metiladas menos tóxicas en comparación al As(V) y el As(III), como el ácido dimetilarsínico (DMA) y el ácido monometilarsínico (MMA).

Cuantificar la producción de H₂O₂, malondialdehído (MDA), prolina, y la actividad GST en las plantas expuestas a los diferentes tratamientos. Y cuantificar el glutatión oxidado (GSSG), ya que su formación se relaciona con la actividad GST y la formación de conjugados con el arsenito, que son acumulados en las vacuolas.

Al estar los carotenoides involucrados en la respuesta antioxidante, sería importante cuantificar su producción por *M. oryzae* y por el cocultivo microalga-bacteria, ya que la concentración del contaminante parece tener un efecto sobre esta variable. Así como, relacionar el contenido de estos compuestos con un método colorimétrico que permita una cuantificación más rápida.

Cuantificar la producción de citoquininas, IAA y GAs por el monocultivo y el cocultivo de los microorganismos evaluados en presencia de arsénico ya que, como se ha mencionado, la producción de estas fitohormonas puede tener un efecto en la actividad de diferentes enzimas antioxidantes como CAT y POX, así como en el contenido de GSH y producción de pigmentos fotosintéticos.

Se deberían probar concentraciones mayores de arsénico para la remediación por *A. farnesiana*, con el fin de determinar si el cocultivo tiene un efecto positivo cuando estas concentraciones empiezan a ser dañinas para la salud vegetal.

10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, G., Murtaza, B., Bibi, I., Shahid, M., Niazi, N. K., Khan, M. I., & Hussain, M. (2018). Arsenic uptake, toxicity, detoxification, and speciation in plants: physiological, biochemical, and molecular aspects. *International journal of environmental research and public health*, 15(1), 59.
- Aburai, N., Kunishima, R., Iijima, F., & Fujii, K. (2020). Effects of light-emitting diodes (LEDs) on lipid production of the aerial microalga *Coccomyxa simplex* KGU-D001 under liquid-and aerial-phase conditions. *Journal of Biotechnology*, 323, 274-282.
- Akansha, J., Nidheesh, P. V., Gopinath, A., Anupama, K. V., & Kumar, M. S. (2020). Treatment of dairy industry wastewater by combined aerated electrocoagulation and phytoremediation process. *Chemosphere*, 253, 126652.
- Alarcón-Herrera, M. T., Martín-Alarcon, D. A., Gutiérrez, M., Reynoso-Cuevas, L., Martín-Domínguez, A., Olmos-Márquez, M. A., & Bundschuh, J. (2020). Co-occurrence, possible origin, and health-risk assessment of arsenic and fluoride in drinking water sources in Mexico: Geographical data visualization. *Science of the Total Environment*, 698, 134168.
- Alcántara-Martínez, N., Guizar, S., Rivera-Cabrera, F., Anicacio-Acevedo, B. E., Buendía-González, L., & Volke-Sepúlveda, T. (2016). Tolerance, arsenic uptake, and oxidative stress in *Acacia farnesiana* under arsenate-stress. *International journal of phytoremediation*, 18(7), 671-678.
- Alcántara-Martínez, N., Figueroa-Martínez, F., Rivera-Cabrera, F., & Volke-Sepúlveda, T. (2022). An unexpected guest: a green microalga associated with the arsenic-tolerant shrub *Acacia farnesiana*. *FEMS Microbiology Ecology*, 98(4), fiac041.
- Alcántara-Martínez, N. (2018). INFLUENCIA DE LA ASOCIACIÓN ENDÓFITA ENTRE *Acacia farnesiana* Y *Methylobacterium oryzae* EN LA TOLERANCIA Y BIOACUMULACIÓN DE ARSÉNICO [Tesis de Doctorado] Universidad Autónoma Metropolitana.
- Almeida, C. M. R., Oliveira, T., Reis, I., Gomes, C. R., & Mucha, A. P. (2017). Bacterial community dynamic associated with autochthonous bioaugmentation for enhanced Cu phytoremediation of salt-marsh sediments. *Marine environmental research*, 132, 68-78.
- Alotaibi, B. S., Khan, M., & Shamim, S. (2021). Unraveling the underlying heavy metal detoxification mechanisms of *Bacillus* species. *Microorganisms*, 9(8), 1628.
- Alvarez, S., & Jerez, C. A. (2004). Copper ions stimulate polyphosphate degradation and phosphate efflux in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Applied and environmental microbiology*, 70(9), 5177-5182.

- Alves, A. R., Yin, Q., Oliveira, R. S., Silva, E. F., & Novo, L. A. (2022). Plant growth-promoting bacteria in phytoremediation of metal-polluted soils: current knowledge and future directions. *Science of the Total Environment*, 838, 156435.
- Anastopoulos, I., & Kyzas, G. Z. (2015). Progress in batch biosorption of heavy metals onto algae. *Journal of Molecular Liquids*, 209, 77-86.
- Anwar, M. S., Paliwal, A., Firdous, N., Verma, A., Kumar, A., & Pande, V. (2019). Co-culture development and bioformulation efficacy of psychrotrophic PGPRs to promote growth and development of pea (*Pisum sativum*) plant. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 65(2), 88-95.
- Arunakumara, K. K. I. U., & Zhang, X. (2008). Heavy metal bioaccumulation and toxicity with special reference to microalgae. *Journal of ocean university of china*, 7, 60-64.
- Audet, P., & Charest, C. (2007). Heavy metal phytoremediation from a meta-analytical perspective. *Environmental Pollution*, 147(1), 231-237.
- Awa, S. H., & Hadibarata, T. (2020). Removal of heavy metals in contaminated soil by phytoremediation mechanism: a review. *Water, Air, & Soil Pollution*, 231(2), 47.
- Awasthi, S., Chauhan, R., Indoliya, Y., Chauhan, A. S., Mishra, S., Agrawal, L., & Tripathi, R. D. (2021). Microbial consortium mediated growth promotion and arsenic reduction in rice: an integrated transcriptome and proteome profiling. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 228, 113004.
- Babu, A. G., Shea, P. J., Sudhakar, D., Jung, I. B., & Oh, B. T. (2015). Potential use of *Pseudomonas koreensis* AGB-1 in association with *Miscanthus sinensis* to remediate heavy metal (loid)-contaminated mining site soil. *Journal of environmental management*, 151, 160-166.
- Banerjee, M., Banerjee, N., Bhattacharjee, P., Mondal, D., Lythgoe, P. R., Martínez, M., & Giri, A. K. (2013). High arsenic in rice is associated with elevated genotoxic effects in humans. *Scientific reports*, 3(1), 2195.
- Bangari, M. P. S., & Nataraja, K. N. (2023). Can endophytes minimize photosynthetic limitation?. *Trends in Plant Science*.
- Bao, W., Li, X., Liu, J., Zheng, R., Liu, L., & Zhang, H. (2022). The characterization of an efficient phenylpyruvate decarboxylase KDC4427, involved in 2-Phenylethanol and IAA production from bacterial *Enterobacter* sp. CGMCC 5087. *Microbiology Spectrum*, 10(2), e02660-21.
- Barcytė, D., & Nedbalová, L. (2017). *Coccomyxa*: a dominant planktic alga in two acid lakes of different origin. *Extremophiles*, 21, 245-257.

- Bertin, P. N., Crognale, S., Plewniak, F., Battaglia-Brunet, F., Rossetti, S., & Mench, M. (2021). Water and soil contaminated by arsenic: the use of microorganisms and plants in bioremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-28.
- Brown, N. L., Barrett, S. R., Camakaris, J., Lee, B. T., & Rouch, D. A. (1995). Molecular genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (pco) from *Escherichia coli* plasmid pRJ1004. *Molecular microbiology*, 17(6), 1153-1166.
- Camacho, F., González, V., & Olivera, A. (1992). Germinación y manejo en vivero del Chapulixtle (*Dodonea viscosa* (L.) Jacq.). *Memorias de la Reunión Científica Forestal y Agropecuaria*, 1-6.
- Camacho, L. M., Gutiérrez, M., Alarcón-Herrera, M. T., de Lourdes Villalba, M., & Deng, S. (2011). Occurrence and treatment of arsenic in groundwater and soil in northern Mexico and southwestern USA. *Chemosphere*, 83(3), 211-225.
- Capó, Y. A., Martín, M. C., González, N. P., Suárez, M. A., & Mora, M. L. (2004). Influencia de las concentraciones de sales MS y sacarosa del medio de cultivo para las plantas *in vitro* sobre el crecimiento de contaminantes bacterianos de la micropropagación de la caña de azúcar. *Bioteología Vegetal*, 4(3).
- Chandrakar, V., Yadu, B., Meena, R. K., Dubey, A., & Keshavkant, S. (2017). Arsenic-induced genotoxic responses and their amelioration by diphenylene iodonium, 24-epibrassinolide and proline in *Glycine max* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, 112, 74-86.
- Chen, J., Zhang, X., Kuang, M., Cui, K., Xu, T., Liu, X., & Zhu, Y. (2024). Endophytic *Enterobacter* sp. YG-14 mediated arsenic mobilization through siderophore and its role in enhancing phytostabilization. *Journal of Hazardous Materials*, 465, 133206.
- Cooper, M. B., & Smith, A. G. (2015). Exploring mutualistic interactions between microalgae and bacteria in the omics age. *Current opinion in plant biology*, 26, 147-153.
- Croft, M. T., Lawrence, A. D., Raux-Deery, E., Warren, M. J., & Smith, A. G. (2005). Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature*, 438(7064), 90-93.
- Cullen, W. R. (2014). Chemical mechanism of arsenic biomethylation. *Chemical research in toxicology*, 27(4), 457-461.
- Cutler, W. G., Brewer, R. C., El-Kadi, A., Hue, N. V., Niemeyer, P. G., Peard, J., & Ray, C. (2013). Bioaccessible arsenic in soils of former sugar cane plantations, Island of Hawaii. *Science of the Total Environment*, 442, 177-188.

- Danouche, M., El Ghachtouli, N., El Baouchi, A., & El Arroussi, H. (2020). Heavy metals phycoremediation using tolerant green microalgae: Enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems for the management of oxidative stress. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(5), 104460.
- Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W., & Greenberg, E. P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 280(5361), 295-298.
- De la Sancha-Sierra, I. (2022). Producción de Compuestos Promotores del Crecimiento Vegetal por un Cocultivo Alga-Bacteria Bajo Condiciones de Estrés [Tesis de Maestría] Universidad Autónoma Metropolitana.
- Delgadillo-Puga, C., Cuchillo-Hilario, M., Espinosa-Mendoza, J. G., Medina-Campos, O., Molina-Jijón, E., Díaz-Martínez, M., & Pedraza-Chaverri, J. (2015). Antioxidant activity and protection against oxidative-induced damage of *Acacia shaffneri* and *Acacia farnesiana* pods extracts: in vitro and in vivo assays. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15, 1-8.
- Delgado-Altamirano, R., Monzote, L., Piñón-Tápanes, A., Vibrans, H., Rivero-Cruz, J. F., Ibarra-Alvarado, C., & Rojas-Molina, A. (2017). *In vitro* antileishmanial activity of Mexican medicinal plants. *Heliyon*, 3(9), e00394.
- De Barros, A. C. M. (2015). Microalgal biofilm formation and nutrient removal.
- De Marco, P., Pacheco, C. C., Figueiredo, A. R., & Moradas-Ferreira, P. (2004). Novel pollutant-resistant methylotrophic bacteria for use in bioremediation. *FEMS Microbiology Letters*, 234(1), 75-80.
- Dourado, M. N., Ferreira, A., Araujo, W. L., Azevedo, J. L., & Lacava, P. T. (2012). The diversity of endophytic methylotrophic bacteria in an oil-contaminated and an oil-free mangrove ecosystem and their tolerance to heavy metals. *Biotechnology research international*, 2012.
- Dourado, M. N., Aparecida Camargo Neves, A., Santos, D. S., & Araújo, W. L. (2015). Biotechnological and agronomic potential of endophytic pink-pigmented methylotrophic *Methylobacterium* spp. *BioMed Research International*, 2015.
- Echegoyen Vila, N. (2015). Caracterización de bacterias endófitas asociadas a variedades de arroz (*Oryza sativa*) y su comportamiento frente a BPCV.
- Ferreira, C. M., Vilas-Boas, Â., Sousa, C. A., Soares, H. M., & Soares, E. V. (2019). Comparison of five bacterial strains producing siderophores with ability to chelate iron under alkaline conditions. *AMB Express*, 9(1), 78.
- Flores Hernández A. (2004). Introducción a la Tecnología de las Semillas. 1era Edición. Universidad Autónoma Chapingo, México. pp. 61-78.

- Francis, B., Aravindakumar, C. T., Brewer, P. B., & Simon, S. (2023). Plant nutrient stress adaptation: A prospect for fertilizer limited agriculture. *Environmental and Experimental Botany*, 105431.
- Garcidueñas-Piña, C., Arellano-Martínez, E. J., Morales-Garcidueñas, L. H., Rangel, M. D. C. G., Rubio-Franchini, I., & Morales-Domínguez, J. F. (2022). *Prosopis laevigata* and *Acacia farnesiana* in association with *Rhizobium* sp. remove copper from soil. *South African Journal of Botany*, 151, 417-424.
- Ghorbani, A., Pishkar, L., Roodbari, N., Pehlivan, N., & Wu, C. (2021). Nitric oxide could allay arsenic phytotoxicity in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) by modulating photosynthetic pigments, phytochelatin metabolism, molecular redox status and arsenic sequestration. *Plant Physiology and Biochemistry*, 167, 337-348.
- Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012(1), 963401.
- Gomes, A. F., Almeida, M. C., Sousa, E., & Resende, D. I. (2024). Siderophores and metallophores: Metal complexation weapons to fight environmental pollution. *Science of The Total Environment*, 173044.
- Grajales, E., Castro, D., & Sánchez, S. LA CAROTENOGÉNESIS COMO ESTRATEGIA DE DEFENSA CONTRA EL ESTRÉS OXIDANTE PROVOCADO POR ÓXIDO NÍTRICO EN *Phaffia rhodozyma*.
- Griffith, O. W. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical biochemistry*, 106(1), 207-212.
- Gupta, A., Joia, J., Sood, A., Sood, R., Sidhu, C., & Kaur, G. (2016). Microbes as potential tool for remediation of heavy metals: a review. *J Microb Biochem Technol*, 8(4), 364-372.
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., & van Elsas, J. D. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in microbiology*, 16(10), 463-471.
- Hong, Y. S., Song, K. H., & Chung, J. Y. (2014). Health effects of chronic arsenic exposure. *Journal of preventive medicine and public health*, 47(5), 245.
- Hue, N. V. (2013). Arsenic chemistry and remediation in Hawaiian soils. *International Journal of Phytoremediation*, 15(2), 105-116.
- Hue, N. V. (2015). Bioremediation of arsenic toxicity. *Arsenic Toxicity: Prevention and Treatment*; Chakrabarty, N., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA.

- Huertas, I. A. A., Basualdo, R. C., Rafael, R. D. G., Paredes, S. L. M., Miranda, N. M., Chale, V. Y. R., & Cruz, A. H. (2019). Riesgos a la salud y ambiente por el uso de lámparas que contienen mercurio. *Revista Kawsaypacha: sociedad y medio ambiente*, (4), 93-119.
- Idris, R., Kuffner, M., Bodrossy, L., Puschenreiter, M., Monchy, S., Wenzel, W. W., & Sessitsch, A. (2006). Characterization of Ni-tolerant methylobacteria associated with the hyperaccumulating plant *Thlaspi goesingense* and description of *Methylobacterium goesingense* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(8), 634-644.
- Igiri, B. E., Okoduwa, S. I., Idoko, G. O., Akabuogu, E. P., Adeyi, A. O., & Ejiogu, I. K. (2018). Toxicity and bioremediation of heavy metals contaminated ecosystem from tannery wastewater: a review. *Journal of toxicology*, 2018(1), 2568038.
- Irshad, S., Xie, Z., Mehmood, S., Nawaz, A., Ditta, A., & Mahmood, Q. (2021). Insights into conventional and recent technologies for arsenic bioremediation: A systematic review. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 18870-18892.
- Islam, E., Khan, M. T., & Irem, S. (2015). Biochemical mechanisms of signaling: perspectives in plants under arsenic stress. *Ecotoxicology and environmental safety*, 114, 126-133.
- Javaid, A., Latif, S., Imran, M., Hussain, N., Rajoka, M. S. R., Iqbal, H. M., & Bilal, M. (2022). Nanohybrids-assisted photocatalytic removal of pharmaceutical pollutants to abate their toxicological effects—A review. *Chemosphere*, 291, 133056.
- Jacoby, R., Peukert, M., Succurro, A., Koprivova, A., & Kopriva, S. (2017). The role of soil microorganisms in plant mineral nutrition—current knowledge and future directions. *Frontiers in plant science*, 8, 1617.
- Jeyasundar, P. G. S. A., Ali, A., Azeem, M., Li, Y., Guo, D., Sikdar, A., & Zhang, Z. (2021). Green remediation of toxic metals contaminated mining soil using bacterial consortium and Brassica juncea. *Environmental Pollution*, 277, 116789.
- Jorge, G. L., Kisiala, A., Morrison, E., Aoki, M., Nogueira, A. P. O., & Emery, R. N. (2019). Endosymbiotic *Methylobacterium oryzae* mitigates the impact of limited water availability in lentil (*Lens culinaris* Medik.) by increasing plant cytokinin levels. *Environmental and Experimental Botany*, 162, 525-540.
- Juncos, R., Arcagni, M., Rizzo, A., Campbell, L., Arribére, M., & Guevara, S. R. (2016). Natural origin arsenic in aquatic organisms from a deep oligotrophic lake under the influence of volcanic eruptions. *Chemosphere*, 144, 2277-2289.

- Kandasamy, G. D., & Kathirvel, P. (2022). Insights into bacterial endophytic diversity and isolation with a focus on their potential applications—A review. *Microbiological Research*, 127256.
- Kang, C. H., Kwon, Y. J., & So, J. S. (2016). Bioremediation of heavy metals by using bacterial mixtures. *Ecological engineering*, 89, 64-69.
- Khan, A. L., Waqas, M., Kang, S. M., Al-Harrasi, A., Hussain, J., Al-Rawahi, A., & Lee, I. J. (2014). Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. *Journal of Microbiology*, 52, 689-695.
- Kim, B. H., Ramanan, R., Cho, D. H., Oh, H. M., & Kim, H. S. (2014). Role of Rhizobium, a plant growth promoting bacterium, in enhancing algal biomass through mutualistic interaction. *Biomass and Bioenergy*, 69, 95-105.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 16, 111-120.
- Kong, Z., & Glick, B. R. (2017). The role of plant growth-promoting bacteria in metal phytoremediation. *Advances in microbial physiology*, 71, 97-132.
- Kumari, A., Pandey, N., & Pandey-Rai, S. (2018). Exogenous salicylic acid-mediated modulation of arsenic stress tolerance with enhanced accumulation of secondary metabolites and improved size of glandular trichomes in *Artemisia annua* L. *Protoplasma*, 255, 139-152.
- Kwak, M. J., Jeong, H., Madhaiyan, M., Lee, Y., Sa, T. M., Oh, T. K., & Kim, J. F. (2014). Genome information of *Methylobacterium oryzae*, a plant-probiotic methylotroph in the phyllosphere. *PloS one*, 9(9), e106704.
- Leão, G. A., Oliveira, J. A. D., Felipe, R. T. A., & Farnese, F. S. (2017). Phytoremediation of arsenic-contaminated water: the role of antioxidant metabolism of *Azolla caroliniana* Willd.(Salviniales). *Acta Botanica Brasilica*, 31(2), 161-168.
- Levinson, H. S., & Mahler, I. (1998). Phosphatase activity and lead resistance in *Citrobacter freundii* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS microbiology letters*, 161(1), 135-138.
- Li, A., Lu, Y., Zhen, D., Guo, Z., Wang, G., Shi, K., & Liao, S. (2023). *Enterobacter* sp. E1 increased arsenic uptake in *Pteris vittata* by promoting plant growth and dissolving Fe-bound arsenic. *Chemosphere*, 329, 138663.
- Li, X., Feng, C., Lei, M., Luo, K., Wang, L., Liu, R., & Hu, Y. (2022). Bioremediation of organic/heavy metal contaminants by mixed cultures of microorganisms: A review. *Open Chemistry*, 20(1), 793-807.

- Li, Y., Chen, X., Wang, Q., Liu, Y., Li, J., Gong, Q., & Gao, X. (2022). Diversity and dynamics of bacterial communities associated with *Haematococcus pluvialis* at different life stages. *Journal of Applied Phycology*, *34*(3), 1353-1361.
- Li, D., Liu, R., Cui, X., He, M., Zheng, S., Du, W., & Wang, C. (2021). Co-culture of bacteria and microalgae for treatment of high concentration biogas slurry. *Journal of Water Process Engineering*, *41*, 102014.
- Liu, Y., Zhang, B., Yao, Y., Wang, B., Cao, Y., Shen, Y., & Guo, P. (2023). Insight into the plant-associated bacterial interactions: Role for plant arsenic extraction and carbon fixation. *Science of The Total Environment*, *894*, 164960.
- Liu, Y., Zhang, B., Han, Y. H., Yao, Y., & Guo, P. (2023). Involvement of exogenous arsenic-reducing bacteria in root surface biofilm formation promoted phytoextraction of arsenic. *Science of The Total Environment*, *858*, 160158.
- Lichtenthaler, H. K., & Wellburn, A. R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents.
- Lodewyckx, C., Taghavi, S., Mergeay, M., Vangronsveld, J., Clijsters, H., & Lelie, D. V. D. (2001). The effect of recombinant heavy metal-resistant endophytic bacteria on heavy metal uptake by their host plant. *International Journal of Phytoremediation*, *3*(2), 173-187.
- Lukacova, Z., Bokor, B., Vavrova, S., Soltys, K., & Vaculik, M. (2021). Divergence of reactions to arsenic (As) toxicity in tobacco (*Nicotiana benthamiana*) plants: A lesson from peroxidase involvement. *Journal of Hazardous Materials*, *417*, 126049.
- Ly, B. C. K., Dyer, E. B., Feig, J. L., Chien, A. L., & Del Bino, S. (2020). Research techniques made simple: cutaneous colorimetry: a reliable technique for objective skin color measurement. *Journal of Investigative Dermatology*, *140*(1), 3-12.
- Ma, Y., Prasad, M. N. V., Rajkumar, M., & Freitas, H. J. B. A. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnology advances*, *29*(2), 248-258.
- Ma, Y., Rajkumar, M., Zhang, C., & Freitas, H. (2016). Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *Journal of environmental management*, *174*, 14-25.
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., & Sa, T. (2007). Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Chemosphere*, *69*(2), 220-228.

- Maehly, A. C. (1954). The assay of catalases and peroxidases. *Methods of biochemical analysis*, 357-424.
- Maldonado-Magaña, A., Favela-Torres, E., Rivera-Cabrera, F., & Volke-Sepulveda, T. L. (2011). Lead bioaccumulation in *Acacia farnesiana* and its effect on lipid peroxidation and glutathione production. *Plant and soil*, 339, 377-389.
- Maldonado-Hernández, J., Román-Ponce, B., Arroyo-Herrera, I., Guevara-Luna, J., Ramos-Garza, J., Embarcadero-Jiménez, S., & Vásquez-Murrieta, M. S. (2022). Metallophores production by bacteria isolated from heavy metal-contaminated soil and sediment at Lerma–Chapala Basin. *Archives of Microbiology*, 204(3), 180.
- Malik, A., Batool, S., & Farooqi, A. (2022). Advances in biodegradation and bioremediation of arsenic contamination in the environment. In *Biological approaches to controlling pollutants* (pp. 107-120). Woodhead Publishing.
- Manotoa Chicaiza, S. P. (2012). *Escarificación mecánica y química como tratamientos pregerminativos en semillas de olivo (Olea europea)* (Bachelor's thesis).
- Maqsood, Q., Hussain, N., Mumtaz, M., Bilal, M., & Iqbal, H. M. (2022). Novel strategies and advancement in reducing heavy metals from the contaminated environment. *Archives of Microbiology*, 204(8), 478.
- Mascher, R., Lippmann, B., Holzinger, S., & Bergmann, H. (2002). Arsenate toxicity: effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. *Plant Science*, 163(5), 961-969.
- Mateos, L. M., Ordóñez, E., Letek, M., & Gil, J. A. (2006). *Corynebacterium glutamicum* as a model bacterium for the bioremediation of arsenic. *International microbiology*, 9(3), 207-215.
- Medina-Pizzali, M., Robles, P., Mendoza, M., & Torres, C. (2018). Ingesta de arsénico: el impacto en la alimentación y la salud humana. *Revista Peruana de medicina experimental y salud pública*, 35, 93-102.
- Mench, M., Schwitzguébel, J. P., Schroeder, P., Bert, V., Gawronski, S., & Gupta, S. (2009). Assessment of successful experiments and limitations of phytotechnologies: contaminant uptake, detoxification and sequestration, and consequences for food safety. *Environmental Science and Pollution Research*, 16, 876-900.
- Mendarte-Alquisira, C., Gutiérrez-Rojas, M., & Volke-Sepúlveda, T. (2020). The fungus *Lewia* sp. alleviates the oxidative stress in *F. arundinacea* during the endophyte-assisted phytoremediation of hydrocarbons. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 19(Sup. 1), 69-80.

- Mengistu, A. A. (2020). Endophytes: colonization, behaviour, and their role in defense mechanism. *International Journal of Microbiology*, 2020(1), 6927219.
- Mesa, V., Navazas, A., Gonzalez-Gil, R., Gonzalez, A., Weyens, N., Lauga, B., & Peláez, A. I. (2017). Use of endophytic and rhizosphere bacteria to improve phytoremediation of arsenic-contaminated industrial soils by autochthonous *Betula celtiberica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(8), e03411-16.
- Mishra, J., Singh, R., & Arora, N. K. (2017). Alleviation of heavy metal stress in plants and remediation of soil by rhizosphere microorganisms. *Frontiers in microbiology*, 8, 1706.
- Mishra, V. K., & Shukla, R. (2018). Metal uptake potential of four methylotrophic bacterial strains from coal mine spoil, exploring a new possible agent for bioremediation. *Environmental Technology & Innovation*, 11, 174-186.
- Mohanty, S. R., Mahawar, H., Bajpai, A., Dubey, G., Parmar, R., Atoliya, N., & Kollah, B. (2023). Methylotroph bacteria and cellular metabolite carotenoid alleviate ultraviolet radiation-driven abiotic stress in plants. *Frontiers in Microbiology*, 13, 899268.
- Mohsenpour, S. F., Hennige, S., Willoughby, N., Adeloye, A., & Gutierrez, T. (2021). Integrating microalgae into wastewater treatment: A review. *Science of the Total Environment*, 752, 142168.
- Morales-Domínguez, J. F., de León, D. S. D., Garcidueñas-Piña, C., & Pérez-Molphe-Balch, E. (2019). Germination, in vitro propagation and soil acclimatization of *Acacia farnesiana* and *Prosopis laevigata*. *South African Journal of Botany*, 124, 345-349.
- Mubashar, M., Naveed, M., Mustafa, A., Ashraf, S., Shehzad Baig, K., Alamri, S., & Kalaji, H. M. (2020). Experimental investigation of *Chlorella vulgaris* and *Enterobacter* sp. MN17 for decolorization and removal of heavy metals from textile wastewater. *Water*, 12(11), 3034.
- Mukherjee, G., Saha, C., Naskar, N., Mukherjee, A., Mukherjee, A., Lahiri, S., & Seal, A. (2018). An endophytic bacterial consortium modulates multiple strategies to improve arsenic phytoremediation efficacy in *Solanum nigrum*. *Scientific reports*, 8(1), 6979.
- Muthusarayanan, S., Sivarajasekar, N., Vivek, J. S., Paramasivan, T., Naushad, M., Prakashmaran, J., & Al-Duaij, O. K. (2018). Phytoremediation of heavy metals: mechanisms, methods and enhancements. *Environmental chemistry letters*, 16, 1339-1359.
- Nabi, A., Naeem, M., Aftab, T., Khan, M. M. A., & Ahmad, P. (2021). A comprehensive review of adaptations in plants under arsenic toxicity: Physiological, metabolic and molecular interventions. *Environmental Pollution*, 290, 118029.

Naeem, M., Sadiq, Y., Jahan, A., Nabi, A., Aftab, T., & Khan, M. M. A. (2020). Salicylic acid restrains arsenic induced oxidative burst in two varieties of *Artemisia annua* L. by modulating antioxidant defence system and artemisinin production. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 202, 110851.

Nahar, K., Ali, M. M., Khanom, A., Alam, M. K., Azad, M. A. K., & Rahman, M. M. (2020). Levels of heavy metal concentrations and their effect on net nitrification rates and nitrifying archaea/bacteria in paddy soils of Bangladesh. *Applied Soil Ecology*, 156, 103697.

Nair, A., Juwarkar, A. A., & Singh, S. K. (2007). Production and characterization of siderophores and its application in arsenic removal from contaminated soil. *Water, Air, and Soil Pollution*, 180, 199-212.

Nava-Reyna, E., & Medrano-Macías, J. (2022). Arsenic occurrence in the environment: Current situation of the Comarca Lagunera in northern Mexico and bioremediation approaches. *Journal of Agriculture and Food Research*, 10, 100379.

Nedjimi, B. (2021). Phytoremediation: a sustainable environmental technology for heavy metals decontamination. *SN Applied Sciences*, 3(3), 286.

Niazi, N. K., Bibi, I., Fatimah, A., Shahid, M., Javed, M. T., Wang, H., & Shakoor, M. B. (2017). Phosphate-assisted phytoremediation of arsenic by *Brassica napus* and *Brassica juncea*: morphological and physiological response. *International Journal of Phytoremediation*, 19(7), 670-678.

Ochoa Carreño, D. C., & Montoya Restrepo, A. (2010). Consorcios microbianos: una metáfora biológica aplicada a la asociatividad empresarial en cadenas productivas agropecuarias. *Revista Facultad de Ciencias Económicas: Investigación y Reflexión*, 18(2), 55-74.

Ojha, A., Jaiswal, S., Thakur, P., & Mishra, S. K. (2022). Bioremediation techniques for heavy metal and metalloid removal from polluted lands: a review. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 1-22.

Olmedo-Juárez, A., Zarza-Albarran, M. A., Rojo-Rubio, R., Zamilpa, A., González-Cortazar, M., Mondragón-Ancelmo, J., & Mendoza-de Gives, P. (2020). *Acacia farnesiana* pods (plant: Fabaceae) possesses anti-parasitic compounds against *Haemonchus contortus* in female lambs. *Experimental Parasitology*, 218, 107980.

Osuna-Martínez, C. C., Armienta, M. A., Bergés-Tiznado, M. E., & Páez-Osuna, F. (2021). Arsenic in waters, soils, sediments, and biota from Mexico: An environmental review. *Science of The Total Environment*, 752, 142062.

O'Toole, G. A. (2011). Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (47).

- Oubane, M., Khadra, A., Ezzariai, A., Kouisni, L., & Hafidi, M. (2021). Heavy metal accumulation and genotoxic effect of long-term wastewater irrigated peri-urban agricultural soils in semiarid climate. *Science of the Total Environment*, 794, 148611.
- Palacios, O. A., López, B. R., & de-Bashan, L. E. (2022). Microalga Growth-Promoting Bacteria (MGPB): A formal term proposed for beneficial bacteria involved in microalgal–bacterial interactions. *Algal Research*, 61, 102585.
- Pathom-Aree, W., Sattayawat, P., Inwongwan, S., Cheirsilp, B., Liewtrakula, N., Maneechote, W., & Srinuanpan, S. (2024). Microalgae growth-promoting bacteria for cultivation strategies: Recent updates and progress. *Microbiological Research*, 286, 127813.
- Pedraza, L. A., López, C. E., & Uribe-Vélez, D. (2020). Mecanismos de acción de *Bacillus* spp.(Bacillaceae) contra microorganismos fitopatógenos durante su interacción con plantas. *Acta biológica colombiana*, 25(1), 112-125.
- Pei, J., Pan, X., Wei, G., & Hua, Y. (2023). Research progress of glutathione peroxidase family (GPX) in redoxidation. *Frontiers in pharmacology*, 14, 1147414.
- Peralta-Pérez, M. D. R., & Volke-Sepúlveda, T. L. (2012). La defensa antioxidante en las plantas: una herramienta clave para la fitorremediación. *Revista mexicana de ingeniería química*, 11(1), 75-88.
- Pérez-Molina, J. P., Lara, R. C., Brenes, I. P., Trejos, V. A., & Traña, A. Q. (2020). Chlorophyll fluorescence and biomass partitioning within light and nitrogen deficiency: An example of the use of the R programming language for teaching. *UNED Research Journal*, 12(1), e2629-e2629.
- Piotrowska-Seget, Z., Cycoń, M., & Kozdroj, J. (2005). Metal-tolerant bacteria occurring in heavily polluted soil and mine spoil. *Applied Soil Ecology*, 28(3), 237-246.
- Pizarro, I., Gómez-Gómez, M., León, J., Román, D., & Palacios, M. A. (2016). Bioaccessibility and arsenic speciation in carrots, beets and quinoa from a contaminated area of Chile. *Science of the Total Environment*, 565, 557-563.
- Potisek, M., Likar, M., Vogel-Mikuš, K., Arčon, I., Grdadolnik, J., & Regvar, M. (2021). 1, 8-dihydroxy naphthalene (DHN)-melanin confers tolerance to cadmium in isolates of melanised dark septate endophytes. *Ecotoxicology and environmental safety*, 222, 112493.
- Prabhakaran, R., Rajkumar, S. N., Ramprasath, T., & Selvam, G. S. (2018). Identification of promoter P cadR, in silico characterization of cadmium resistant gene cadR and molecular cloning of promoter P cadR from *Pseudomonas aeruginosa* BC15. *Toxicology and Industrial Health*, 34(12), 819-833.

- Prathiba, S., Muninathan, N., Ponnulakshmi, R., & Nalini, D. (2020). Phycoremediation of heavy metal removal from pharmaceutical industrial effluents, Kandigai, Kanchipuram District, Tamil Nadu. *Medico-Legal Update*, 20(4), 2328-2331.
- Preetha, J. S. Y., Arun, M., Vidya, N., Kowsalya, K., Halka, J., & Ondrasek, G. (2023). Biotechnology advances in bioremediation of arsenic: a review. *Molecules*, 28(3), 1474.
- Priya, M., Gurung, N., Mukherjee, K., & Bose, S. (2014). Microalgae in removal of heavy metal and organic pollutants from soil. In *Microbial biodegradation and bioremediation* (pp. 519-537). Elsevier.
- Priya, A. K., Jalil, A. A., Vadivel, S., Dutta, K., Rajendran, S., Fujii, M., & Soto-Moscoso, M. (2022). Heavy metal remediation from wastewater using microalgae: Recent advances and future trends. *Chemosphere*, 305, 135375.
- Rahman, M. A., Hasegawa, H., Ueda, K., Maki, T., Okumura, C., & Rahman, M. M. (2007). Arsenic accumulation in duckweed (*Spirodela polyrrhiza* L.): a good option for phytoremediation. *Chemosphere*, 69(3), 493-499.
- Rajkumar, M., & Freitas, H. (2008). Influence of metal resistant-plant growth-promoting bacteria on the growth of *Ricinus communis* in soil contaminated with heavy metals. *Chemosphere*, 71(5), 834-842.
- Rajkumar, M., Ae, N., & Freitas, H. (2009). Endophytic bacteria and their potential to enhance heavy metal phytoextraction. *Chemosphere*, 77(2), 153-160.
- Rajkumar, M., Sandhya, S., Prasad, M. N. V., & Freitas, H. (2012). Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnology advances*, 30(6), 1562-1574.
- Rangel Montoya, E. A., Montañez Hernández, L. E., Luévanos Escareño, M. P., & Balagurusamy, N. (2015). Impacto del arsénico en el ambiente y su transformación por microorganismos. *Terra Latinoamericana*, 33(2), 103-118.
- Rastogi, S., Shah, S., Kumar, R., Vashisth, D., Akhtar, M. Q., Kumar, A., & Shasany, A. K. (2019). *Ocimum* metabolomics in response to abiotic stresses: Cold, flood, drought and salinity. *PloS one*, 14(2), e0210903.
- Rastgoo, L., & Alemzadeh, A. (2011). Biochemical responses of Gouan (*Aeluropus littoralis*) to heavy metals stress. *Australian journal of crop science*, 5(4), 375-383.
- Řezanka, T., Nedbalová, L., Barcytė, D., Vítová, M., & Sigler, K. (2019). Arsenolipids in the green alga *Coccomyxa* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Phytochemistry*, 164, 243-251.
- Rodríguez, L. C. D. (2018). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales y de bacterias endófitas aisladas de *Melia azedarach* contra *Colletotrichum gloeosporioides*. [Tesis de Maestría] Universidad de Sucre.

- Rosen, B. P. (2002). Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS letters*, 529(1), 86-92.
- Satyapal, G. K., Mishra, S. K., Srivastava, A., Ranjan, R. K., Prakash, K., Haque, R., & Kumar, N. (2018). Possible bioremediation of arsenic toxicity by isolating indigenous bacteria from the middle Gangetic plain of Bihar, India. *Biotechnology reports*, 17, 117-125.
- Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry*, 160(1), 47-56.
- Sharma, P. (2021). Efficiency of bacteria and bacterial assisted phytoremediation of heavy metals: an update. *Bioresource Technology*, 328, 124835.
- Sharma, P., & Kumar, S. (2021). Bioremediation of heavy metals from industrial effluents by endophytes and their metabolic activity: Recent advances. *Bioresource Technology*, 339, 125589
- Sharma, P., Tripathi, S., Chaturvedi, P., Chaurasia, D., & Chandra, R. (2021). Newly isolated *Bacillus* sp. PS-6 assisted phytoremediation of heavy metals using *Phragmites communis*: Potential application in wastewater treatment. *Bioresource technology*, 320, 124353.
- Shi, Y., Lou, K., & Li, C. (2010). Growth and photosynthetic efficiency promotion of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by endophytic bacteria. *Photosynthesis Research*, 105, 5-13.
- Shukla, J., Narayan, S., Mishra, A., Shirke, P. A., & Kumar, M. (2023). Reduction of arsenic accumulation in rice grain by endophytic fungus *Serendipita indica*. *Rhizosphere*, 26, 100680.
- Singh, P. K., Indoliya, Y., Chauhan, A. S., Singh, S. P., Singh, A. P., Dwivedi, S., & Chakrabarty, D. (2017). Nitric oxide mediated transcriptional modulation enhances plant adaptive responses to arsenic stress. *Scientific Reports*, 7(1), 3592.
- Spadaro, D., & Gullino, M. L. (2005). Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. *Crop protection*, 24(7), 601-613.
- Srivastava, S., & Sharma, Y. K. (2013). Arsenic occurrence and accumulation in soil and water of eastern districts of Uttar Pradesh, India. *Environmental monitoring and assessment*, 185, 4995-5002.
- Srivastava, S., Sinha, P., & Sharma, Y. K. (2017). Status of photosynthetic pigments, lipid peroxidation and anti-oxidative enzymes in *Vigna mungo* in presence of arsenic. *Journal of Plant Nutrition*, 40(3), 298-306.
- Stirk, W. A., Bálint, P., Tarkowská, D., Novák, O., Strnad, M., Ördög, V., & Van Staden, J. (2013). Hormone profiles in microalgae: gibberellins and brassinosteroids. *Plant Physiology and Biochemistry*, 70, 348-353.

- Talukdar, D. (2013). Arsenic-induced changes in growth and antioxidant metabolism of fenugreek. *Russian Journal of Plant Physiology*, 60, 652-660
- Tangahu, B. V., Berlianto, M., & Kartika, A. A. G. (2020). Deconcentration of chromium contained in wastewater using a bacteria and microalgae consortia with a high rate algal reactor system. *Journal of Ecological Engineering*, 21(8).
- Thijs, S., Langill, T., & Vangronsveld, J. (2017). The bacterial and fungal microbiota of hyperaccumulator plants: small organisms, large influence. In *Advances in botanical research* (Vol. 83, pp. 43-86). Academic Press.
- Torres, M. J., Gonzalez-Ballester, D., Gómez-Osuna, A., Galván, A., Fernandez, E., & Dubini, A. (2022). *Chlamydomonas-Methylobacterium oryzae* cooperation leads to increased biomass, nitrogen removal and hydrogen production. *Bioresource Technology*, 352, 127088.
- Trejo, J. A. V., & de la Rosa Pérez, D. A. (2005). *Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación*. Instituto Nacional de Ecología.
- Tripathi, S., Sharma, P., Purchase, D., & Chandra, R. (2021). Distillery wastewater detoxification and management through phytoremediation employing *Ricinus communis* L. *Bioresource Technology*, 333, 125192.
- Tripathi, P., Tripathi, A., Singh, A., Yadav, V., Shanker, K., Khare, P., & Kalra, A. (2022). Differential response of two endophytic bacterial strains inoculation on biochemical and physiological parameters of *Bacopa monnieri* L. under arsenic stress conditions. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 6, 100055.
- Ullah, I., Anwar, Y., Siddiqui, M. F., Alsulami, N., & Ullah, R. (2024). Phytoremediation of Arsenic (As) in rice plants, mediated by *Bacillus subtilis* strain IU31 through antioxidant responses and phytohormones synthesis. *Environmental Pollution*, 355, 124207.
- Upadhyay, M. K., Majumdar, A., Suresh Kumar, J., & Srivastava, S. (2020). Arsenic in rice agro-ecosystem: solutions for safe and sustainable rice production. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4, 53.
- Villarreal Garza, J. A., Rocha Estrada, A., Cárdenas-Ávila, M. L., Moreno Limón, S., González Álvarez, M., & Vargas López, V. (2013). Caracterización morfológica, viabilidad y germinación de semillas de mezquite y huizache en el noreste de México. *Phyton (Buenos Aires)*, 82(2), 169-174.
- Vithanage, M., Dabrowska, B. B., Mukherjee, A. B., Sandhi, A., & Bhattacharya, P. (2012). Arsenic uptake by plants and possible phytoremediation applications: a brief overview. *Environmental chemistry letters*, 10, 217-224.

- Vogelsang, L., & Dietz, K. J. (2022). Plant thiol peroxidases as redox sensors and signal transducers in abiotic stress acclimation. *Free Radical Biology and Medicine*.
- Vozzo, J. A. (2002). *Tropical tree seed manual* (No. 721). US Department of Agriculture, Forest Service.
- Wang, C., Tan, Y., Zhu, L., Zhou, C., Yan, X., Xu, Q., & Cheng, P. (2022). The intrinsic characteristics of microalgae biofilm and their potential applications in pollutants removal—A review. *Algal Research*, 102849.
- Wang, N., Wang, X., Chen, L., Liu, H., Wu, Y., Huang, M., & Fang, L. (2023). Biological roles of soil microbial consortium on promoting safe crop production in heavy metal (loid) contaminated soil: A systematic review. *Science of The Total Environment*, 168994.
- Wang, Y., Ning, W., Han, M., Gao, C., Guo, W., Chang, J. S., & Ho, S. H. (2023). Algae-mediated bioremediation of ciprofloxacin through a symbiotic microalgae-bacteria consortium. *Algal Research*, 71, 103062.
- Wei, X., Zhou, Y., Tsang, D. C., Song, L., Zhang, C., Yin, M., & Wang, J. (2020). Hyperaccumulation and transport mechanism of thallium and arsenic in brake ferns (*Pteris vittata* L.): A case study from mining area. *Journal of hazardous materials*, 388, 121756.
- Willsky, G. R., & Malamy, M. H. (1980). Effect of arsenate on inorganic phosphate transport in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 144(1), 366-374.
- Yang, Q., Tu, S., Wang, G., Liao, X., & Yan, X. (2012). Effectiveness of applying arsenate reducing bacteria to enhance arsenic removal from polluted soils by *Pteris vittata* L. *International journal of phytoremediation*, 14(1), 89-99.
- Yaseen, M., Ahmad, T., Sablok, G., Standardi, A., & Hafiz, I. A. (2013). Role of carbon sources for in vitro plant growth and development. *Molecular biology reports*, 40, 2837-2849.
- Yin, S., Zhang, X., Yin, H., & Zhang, X. (2022). Current knowledge on molecular mechanisms of microorganism-mediated bioremediation for arsenic contamination: A review. *Microbiological Research*, 258, 126990.
- Yosim, A., Bailey, K., & Fry, R. C. (2015). Arsenic, the "King of Poisons," in food and water: levels of this poisonous element can far exceed the US Environmental Protection Agency's water standards in common foods such as rice. *American Scientist*, 103(1), 34-42.
- Zemanová, V., Pavlíková, D., Hnilička, F., Pavlík, M., Zámečníková, H., & Hlavsa, T. (2021). A comparison of the photosynthesis response to arsenic stress in two *Pteris cretica* ferns. *Photosynthetica*, 59(1), 228-236.

Zhao, Y., Zhen, Z., Wang, Z., Zeng, L., & Yan, C. (2020). Influence of environmental factors on arsenic accumulation and biotransformation using the aquatic plant species *Hydrilla verticillata*. *Journal of environmental sciences*, 90, 244-252.

Zhao, D., Cheah, W. Y., Lai, S. H., Ng, E. P., Khoo, K. S., Show, P. L., & Ling, T. C. (2023). Symbiosis of microalgae and bacteria consortium for heavy metal remediation in wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 109943.

Zhu, L. J., Guan, D. X., Luo, J., Rathinasabapathi, B., & Ma, L. Q. (2014). Characterization of arsenic-resistant endophytic bacteria from hyperaccumulators *Pteris vittata* and *Pteris multifida*. *Chemosphere*, 113, 9-16.

Zuluaga, M., Gueguen, V., Pavon-Djavid, G., & Letourneur, D. (2017). Carotenoids from microalgae to block oxidative stress. *BioImpacts: BI*, 7(1), 1.

Zurita-Valencia, W., Gómez-Cruz, J. E., Atrián-Mendoza, E., Hernández-García, A., Granados-García, M. E., García-Magaña, J. J., & Sánchez-Vargas, N. M. (2014). Establecimiento de un método eficiente de germinación in vitro y micropropagación del cirimo (*Tilia mexicana* Schlecht.)(Tiliaceae). *Polibotánica*, (38), 129-144.



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00318
Matrícula: 2223803738

INFLUENCIA DE UN COCULTIVO
MICROALGA-BACTERIA SOBRE LA
BIORREMEDIACIÓN DE ARSÉNICO
POR *Acacia farnesiana*.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 15:00 horas del día 12 del mes de noviembre del año 2024 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. NANCY VELASCO ALVAREZ
DR. CALIOPE MENDARTE ALQUISIRA
DRA. ILHUICE NEMI ALCANTARA MARTINEZ
DR. FRANCISCO JAVIER FIGUEROA MARTINEZ

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

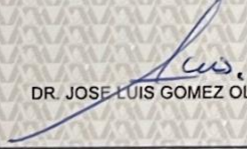
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA
DE: KELLY JOHANA SANTOS MANCILLA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS


DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES


PRESIDENTA


DRA. NANCY VELASCO ALVAREZ


VOCAL


DR. CALIOPE MENDARTE ALQUISIRA

VOCAL


DRA. ILHUICE NEMI ALCANTARA MARTINEZ

SECRETARIO


DR. FRANCISCO JAVIER FIGUEROA MARTINEZ