



Universidad  
Rey Juan Carlos

**GRADO EN BIOLOGÍA**  
**Curso Académico 2022/23**  
**Trabajo de Fin de Grado**

**LA MICROBIOTA DE LAS SEMILLAS PUEDEN MODIFICAR EL  
FENOTIPO PLANTA FRENTE AL ESTRÉS AMBIENTAL:  
CASO DE ESTUDIO CON *Acinetobacter radioresistens***

**Autor: WEIKANG HUANG**

**Directores: MARÍA CARMEN MOLINA COBOS**  
**MERCEDES USCOLA FERNÁNDEZ**  
**NATALIA GONZÁLEZ-BENÍTEZ**

## Índice

1. Resumen.....	2
2. Introducción .....	3
3. Materiales y métodos .....	5
3.1. Inoculación de bacteria y condiciones de crecimiento de la planta.....	5
3.2. Recolección de datos .....	6
3.3. Visualización de colonización de bacteria en microscopio .....	6
3.4. Análisis de datos .....	7
4. Resultados .....	8
4.1. Longitud de la raíz y peso fresco .....	8
4.2. Parámetros de fluorescencia .....	11
4.3. Visualización de bacterias .....	13
5. Discusión.....	14
6. Conclusión .....	17
7. Agradecimientos .....	18
8. Bibliografía .....	19

## 1. Resumen

El arsenito, As (III), es una forma principal de arsénico que se encuentra en suelos contaminados por este metaloide. Su presencia tiene un impacto negativo significativo en numerosas poblaciones vegetales, animales y humanas en todo el mundo. Por tanto, es necesario minimizar los efectos negativos de este contaminante. Algunos microorganismos endofíticos de plantas como *Jasione montana* han mostrado propiedades promotoras del crecimiento incluso bajo condiciones de estrés por arsenato As(V). Estos experimentos bajo condiciones de estrés por As (III) son apenas estudiados dada la ausencia de bacterias resistentes a la alta toxicidad de este metaloide. En este trabajo se presenta la inoculación de *Acinetobacter radioresistens*, un endófito aislado de semillas de *J. montana* resistente a altas concentraciones de las formas inorgánicas de arsénico con potencial simbionte que confiere a las plantas resistencia al As (III). El objetivo de este trabajo consiste en determinar el efecto de la inoculación de *A. radioresistens* sobre *Arabidopsis thaliana* en presencia y ausencia del estrés por As (III). Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones del inoculo, así como las respuestas fisiológicas a diferentes concentraciones de As (III). La bacteria fue detectada en la superficie de la raíz y en el apoplasto de las plantas inoculadas. El peso fresco y la longitud total de raíces disminuyeron drásticamente a 10 $\mu$ M de As (III) independientemente del inóculo. Sin embargo, a bajas concentraciones de As (III) la inoculación de bacteria mitigó la reducción de longitudes radical de la planta respecto a las plantas no inoculadas, pero fueron dependientes de los niveles de concentración y de las intensidades de estrés. Los valores de los parámetros de fluorescencia indicaron que el As (III) a bajas concentraciones no dañó la maquinaria fotosintética. En general, la bacteria presentó la capacidad de recuperación de las raíces en condiciones de estrés por As (III) probablemente mediante la síntesis de productos beneficiosos. Estos resultados indican la posible aplicación de *A. radioresistens* para fomentar la fitorremediación.

**Palabras clave:** *Acinetobacter radioresistens*, Arsenito (As (III)), biomasa vegetal, fluorescencia de la maquinaria fotosintética, longitud radical.

## 2. Introducción

El arsénico (As) es un metaloide, elemento no esencial para los seres vivos, que se encuentra en los medios naturales como el suelo y el agua. La acumulación de este elemento en el ambiente puede ser causada por actividades antropogénicas o procesos geológicos naturales. La preocupación sobre la contaminación de As es creciente debido a la toxicidad para la salud humana y los ecosistemas terrestres y acuáticos. Actualmente se estima que más de 140 millones de personas del mundo están afectadas por la contaminación de As en el agua donde las concentraciones exceden el límite establecido por la Organización Mundial de Salud (Babar y Tariq, 2018). Las poblaciones humanas se ven afectadas por la exposición aguda o crónica a través de la ingesta (fundamentalmente de agua y vegetales contaminados) o la inhalación, afectando a casi todos los procesos celulares (Colangelo y Guerinet, 2006). En particular, inducen la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) relacionadas con el daño celular. Además, provoca modificaciones epigenéticas implicadas en el desarrollo de cánceres (Mohammed Abdul et al., 2015).

Las plantas se enfrentan predominantemente al arsenito, As (III) y arseniato, As (V) que son las dos formas inorgánicas de As. El As (III) se considera más tóxico que el As(V) debido a su movilidad hidrológica y su gran afinidad a los grupos sulfhídricos de muchas enzimas que regulan el metabolismo de las células (Zhao et al., 2009). Por otro lado, la interpretación de las poblaciones como unidades funcionales, adaptativas y evolutivas ha cambiado de paradigma. Hoy se sabe que las respuestas de los organismos en general y, de las plantas en particular, dependen no solo de la interacción del genoma de las poblaciones y su interacción con el medioambiente, sino también del microbioma asociado a las plantas. Desde el punto de vista genético y ecofisiológico se comienza a hablar de metaorganismos como la asociación del genoma de la planta, de su microbiota y la interacción entre ellos (Bosch & McFall-Ngai, 2011). Incluso hay autores que han detectado cierto grado de coevolución (Abdullaeva et al., 2021). Las plantas, por sí mismas, pueden aliviar el daño oxidativo secuestrando metales pesados o metaloides en vacuolas (Kashyap y Garg, 2018). Sin embargo, micorrizas arbusculares y bacterias asociadas a la planta intervienen también en la metabolización del As, promoviendo el crecimiento vegetal y aumentando la resistencia frente al estrés (Li et al., 2021; Molina et al., 2020). Se conocen diferentes procesos metabólicos con los que las bacterias pueden intervenir en la metabolización del As en el metaorganismo. Los mecanismos principales destacan la conversión de la forma de As en forma menos tóxicas como la oxidación de As (III), la expulsión de As mediante la reducción de As(V) a formas más solubles o generar formas orgánicas de As, algunas de ellas volátiles (Li et al., 2021; Zheng et al., 2013). Además, participan en la producción de sideróforos que aumentan la formación de complejos con el hierro para fomentar el crecimiento de las plantas (Ali et al., 2022; Molina et al., 2019). Esta propiedad sirve como herramientas para inducir la tolerancia de estrés para las plantas de cultivo y mejorar la fitorremediación (Mukherjee et al., 2018; Wevar Oller et al., 2020).

En este contexto, *Jasione montana* se ha destacado como una especie de planta altamente tolerante al arsénico con un microbioma asociado también tolerante (Benson et al., 1981; Molina et al., 2019). Así gnotobiontes de *J. montana* (plantas sin microbioma) inoculadas con bacterias endófitas resistentes a arsénico, presentan mejor desarrollo en crecimiento de plantas bajo condiciones de estrés de As (V) (Molina et al., 2020). Adicionalmente, las bacterias endófitas como *Rhodococcus rhodochrous* aisladas de esta planta permite aumentar la

tolerancia al estrés de As de *Jasione sessiliflora*, una especie no resistente (González-Benítez et al., 2021). Estos estudios se centran en los efectos que aportan las bacterias endófitas bajo estrés de As (V), pero el conocimiento de bajo condiciones de As (III) que es mucho más tóxico, aún es desconocido.

*Acinetobacter radioresistens* MC-14, ha sido aislada de semillas de *J. montana*, (Molina et al., 2019), y se ha descrito como bacteria potencialmente promotora de crecimiento, al producir auxinas e inhibir el crecimiento de hongos potencialmente patógenos. Su concentración mínima inhibitoria (MIC) para As(V) es de 200 mM y de 30 mM de As (III) (Molina et al., 2019) lo que la convierte en una bacteria asociada al microbioma de *J. montana* altamente resistente a este metaloide. *A. radioresistens* pertenece al género *Acinetobacter*, uno del grupo de gamma-proteobacteria que ha sido descrito como bacterias resistentes a As. Una de la especie de este género, *A. lwoffii*, se considera una bacteria promotora de crecimiento para la planta bajo estrés de As (Das y Sarkar, 2018; Qamar et al., 2017). Por otro lado, es una bacteria bastante ubicua, ya que se ha descubierto también en otras semillas como en los cultivos de cereales (*Triticum aestivum*, *Triticum monococcum*, *Triticum durum*, y *Hordeum vulgare*) y sus cultivares silvestres (Abdullaeva et al., 2021). Sin embargo, se desconoce si esta bacteria ofrece alguna ventaja funcional a la planta (y a ella misma) que permita al metaorganismo desarrollarse en ambientes contaminados.

Este trabajo se enmarca en un proyecto de investigación entorno a *A. radioresistens*. El proyecto busca potencial uso de una nueva bacteria como una estrategia de bioestimulación para mejorar la resiliencia de las plantas al estrés por arsénico, y si fuera posible, establecer protocolos para conseguir la reducción el arsénico del suelo. Están relacionado con objetivos y metas de desarrollo sostenible (ODS) 12, producción y consumo responsable. Las metas incluyen la gestión sostenible y el uso eficiente de los recursos naturales (meta 12.2), lograr la gestión ecológicamente racional de los productos químicos para minimizar sus efectos adversos en la salud humana y el medio ambiente (meta 12.4). En resumen, la finalidad es contribuir a la meta del ODS 12 de lograr una gestión sostenible de los recursos naturales y una gestión responsable de los productos químicos, al tiempo que aborda problemas específicos relacionados con la contaminación del suelo y busca soluciones para reducir el arsénico y mejorar la calidad ambiental y la salud humana.

El presente TFG se centra en determinar si *A. radioresistens* MC-14 establece asociación con *Arabidopsis thaliana* como planta modelo y promueve el desarrollo de las plantas sometidas a estrés por As. Los objetivos específicos de este TFG son: 1) Determinar las posibles ventajas en el desarrollo vegetal como consecuencia de la asociación planta-*A. radioresistens* bajo concentraciones de estrés por As (III), 2) establecer cuál puede ser el efecto (si lo hubiera) de la concentración del inóculo bacteriano en la respuesta de la planta y 3) aproximarnos a la localización (apoplástica o simplástica) de *A. radioresistens* en la raíz de la planta.

### 3. Materiales y métodos

El experimento se inició 5 de mayo de 2023. El arsenito de sodio ( $\text{NaAsO}_2$ ) fue utilizado para preparar la solución de stock a 50mM de As (III). Las semillas de *Arabidopsis thaliana* de fenotipo salvaje Columbia-0 (Col-0) provinieron del Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP). *Acinetobacter radioresistens* MC-14 fue aislada de semillas de plantas de *J. montana*, una especie altamente tolerante a arsénico (Benson et al., 1981), procedentes del entorno de la mina Mónica (Bustarviejo, Madrid) en suelos altamente contaminados con arsénico (García-Salgado et al., 2012). Las características fisiológicas de esta cepa se han descrito en estudios previos (Molina et al., 2019).

#### 3.1. Inoculación de bacteria y condiciones de crecimiento de la planta

El diseño experimental fue factorial completa con cuatro tratamientos de arsénico (0, 3, 5 y 10  $\mu\text{M}$  de As (III)) y cuatro niveles de inoculación de *A. radioresistens* con densidad óptica a 600nm ( $\text{OD}_{600\text{nm}}$ ) de 0(control); 0,07; 0,21; 0,63.

La bacteria fue aislada y almacenada en glicerol a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su uso. De este stock fue recuperada en medio Luria-Bertani (LB) sólido y crecida en oscuridad a  $28^\circ\text{C}$  para el desarrollo experimental.

Para la inoculación *A. radioresistens*, se sembraron las bacterias en tubos de ensayos estériles con 5mL de medio LB líquido que se incubó junto con un control de LB líquido sin bacteria a  $28^\circ\text{C}$  en agitación durante una noche. El medio de crecimiento que se utilizó para sembrar y cultivar las plantas fue medio Murashige y Skoog (MS) con los componentes descritos en la tabla 1. La combinación de  $\frac{1}{2}$  MS basal, MES monohidrato y  $\text{H}_2\text{O}$  se realizó con un agitador magnético y se ajustó el pH a 5,8 añadiendo KOH con un pH-metro (GLP 21, CRISON, EEUU). Finalmente se añadió el agar bacteriológico (0,9% p/v) y se esterilizó en autoclave. En placa cuadrada con 50mL del medio  $\frac{1}{2}$ Murashige y Skoog basal ( $\frac{1}{2}$ MS basal) suficientemente enfriado después de la esterilización por autoclave se añadieron 0,1mL de suspensión bacteriana. Se prepararon tres densidades ópticas diferentes a 600nm ( $\text{OD}_{600\text{nm}}$ ) de la bacteria en suspensión: 0,07; 0,21 y 0,63 en un espectrofotómetro (Spectronic Genesys-8, Spectronic Instruments Inc.). En placa control se añadieron 0,1mL de medio LB líquido sin bacteria (Saad et al., 2018).

Tabla 1. Medio MS.

Componentes	Cantidad para preparar 1L
$\frac{1}{2}$ MS basal sin sacarosa y sin vitamina	2,2g
MES monohidrato	0,5g
Agar bacteriológico	9g
$\text{H}_2\text{O}$ destilada	1L

Las semillas se esterilizaron en agitación durante 2 minutos con etanol al 70% y durante 12 minutos con una solución de esterilización que contenía 1% de dodecilsulfato de sodio y 0,05% de hipoclorito de sodio en agua destilada estéril. Posteriormente, se lavaron 5 veces con agua MilliQ estéril. Las semillas se sembraron con micropipeta en medio  $\frac{1}{2}$ MS basal con la  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  de bacterias correspondientes (De Zélicourt et al., 2018). Las semillas sembradas se guardaron

con placas volcadas en oscuridad a 4°C durante dos días. Posteriormente las placas se trasladaron a una cámara de crecimiento a 22°C con un ciclo de 16h de luz y 8h de oscuridad durante 5 días y se colocaron verticalmente. El flujo fotónico fue  $160\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ocurrió Después de cinco días las plántulas de tamaños similares se transfirieron a nuevas placas con 0, 3, 5 y 10  $\mu\text{M}$  de As (III) en medio  $\frac{1}{2}$  MS basal. Se transfirieron 6 plántulas por placa (tres placas por experimento). Las placas con plantas transferidas a medio con o sin As (III) se volvieron a colocar de forma vertical en cámara de crecimiento bajo las mismas condiciones descritas previamente (Saad et al., 2018).

De cada tratamiento se prepararon 3 placas, con 6 plántulas por placa, formando un total de 48 placas y un total de 288 plantas.

### 3.2. Recolección de datos

Tras 10 días creciendo en los tratamientos de As, las placas con plantas se analizaron utilizando un escáner (Epson Scan GT15000, Epson, Japón). Las imágenes se configuraron en formato TIFF y en color de 24bits con una resolución de 400dpi. Finalmente, las imágenes se procesaron en un programa de análisis de imágenes (WinRhizo Pro 2009c, Régent Instrument Inc., Canadá) para medir las longitudes de raíz. Se descartaron con filtro del programa aquellas raíces cuyo radio longitud/grosor fuera menor de 4, para eliminar posibles ruidos.

Los parámetros fisiológicos y el peso fresco de las plantas se midieron en el mismo día en dos plantas por placa (6 plantas por tratamiento, y un total de 96 plantas). Antes de medir los parámetros fisiológicos, las plantas se mantuvieron al menos 30 min en oscuridad. Los parámetros fisiológicos de uso de la luz (fluorescencia) se midieron con un medidor de gases por infrarrojos (LI-6800 Portable Photosynthesis System, LICOR, EEUU). En concreto, se midió: 1) eficiencia potencial del fotosistema II (Fv/Fm), 2) eficiencia real del fotosistema II ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ), 3) *quenching* fotoquímico que indica la energía lumínica transformada en energía química (qP) y 4) *quenching* no fotoquímico que mide la energía lumínica no transformada en energía química y por tanto disipada (NPQ). Se introdujo primero la parte aérea en la cámara de medición sin luz donde las condiciones se aproximaron a las condiciones de crecimiento de las plantas (temperatura=22°C, concentración de  $\text{CO}_2 = 400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y VPD-déficit de presión de vapor 1,5 KPa). La medición de Fv/Fm se realizó con un pulso de luz saturante a  $10000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  después de que la estabilización de los valores en oscuridad. Después se encendió la luz a  $600\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y tras la estabilización se midieron los parámetros de fluorescencia tras aclimatación a la luz ( $\Phi_{\text{PSII}}$ , qP y NPQ).

Tras la medición de los parámetros de fluorescencia se cosechó la planta y se determinó el peso fresco total utilizando una microbalanza (Comparador XPR6U/M, METTLER TOLEDO, España).

### 3.3. Visualización de colonización de bacteria en microscopio

Para visualizar y localizar las bacterias en la raíz se utilizaron cepas de *A. radioresistens* transformadas con el plásmido pBAV1k-t5-*gfp* Gonn (Bryksin & Matsumura, 2010) que le confirió la capacidad de producir una proteína verde fluorescente (GFP) y la resistencia a la kanamicina. En este caso, se utilizaron plantas de *A. thaliana* Col-0 transformada por *Agrobacterium tumefaciens* con el gen de resistencia a la kanamicina (NPTII). De esta forma se protegía la pérdida del plásmido de fluorescencia en *A. radioresistens* (Clough & Bent, 1998). El cultivo de plantas y la inoculación de las bacterias transformadas se realizaron con el mismo

protocolo descrito anteriormente. En este caso, los medios de LB para la bacteria transformada y el control se los añadieron 50 $\mu$ g/mL de kanamicina.

Se seleccionaron de forma aleatoria al menos cinco plantas de los tres tratamientos de inoculación de plántulas, el quinto día, en el estadio de postgerminación antes de transferirlos a condiciones de estrés por As (III). Las plántulas se colocaron en portaobjetos y se pipetearon unas gotas de agua MilliQ antes de cubrirlas con un cubreobjetos.

La visualización se llevó a cabo mediante el microscopio láser confocal Zeiss LSM 880 equipado con un objetivo de 63x. Las longitudes de onda del láser de excitación fue 488nm para detectar GFP. Se aplicó contraste diferencial de interferencia y se utilizó la técnica de máxima proyección para la observación.

### **3.4. Análisis de datos**

Los datos se guardaron en Microsoft Excel. La respuesta de los parámetros morfológicos (masa fresca total, longitud de raíces) y fisiológicos ( $F_v/F_m$ ,  $\Phi_{PSII}$ ,  $qP$  y  $NPQ$ ) se analizaron considerando como variables independientes nivel de As (III) y nivel de inóculo de *A. radioresistens*, así como su interacción. Todos los análisis estadísticos de los datos se realizaron en el software RStudio Versión 1.3.1093 (RStudio Team, 2020). El análisis de la varianza (ANOVA) bifactorial se utilizó con el paquete *car* (Fox et al., 2011) para determinar la diferencia significativa (F y p-valor) entre los tratamientos de estrés de As (III) y de la inoculación de bacterias y el efecto de la interacción de estas dos variables. Cuando los análisis previos mostraron efectos significativos se realizó el test *post-hoc* de Tukey para evaluar las diferencias por pares. En todos los análisis se establecieron el nivel de significación  $\alpha = 0,05$ . Las gráficas se crearon en el mismo RStudio utilizando el paquete *ggplot2* (Wickham, 2016).



## 4. Resultados

### 4.1. Longitud de la raíz y peso fresco

Después de 10 días de desarrollo no se observaron diferencias fenotípicas entre plantas sin inóculo y con presencia de inóculo en condiciones sin As (III). Se vio afectado por el estrés de As (III) sobre todo a 10  $\mu\text{M}$  donde las plantas mostraron peores morfologías como en el tamaño de rosetas y la elongación de raíces. Sin embargo, la plantas con inóculo presentaron mejores aspectos a 3 y 5  $\mu\text{M}$  de As (III) en comparación con las plantas sin inóculo (Figura 1).

Las plantas que crecieron en condición no estresante de As (III) no se observaron diferencias significativas ni en el peso fresco de la planta ni en la longitud total de las raíces entre plantas inoculadas con distintas concentraciones de *A. radioresistens* ( $\text{OD}_{600\text{nm}}$  de 0,07; 0,21 y 0,63) y el control (Figura 2, tabla 2). La concentración de As (III) tuvo un efecto significativo en el peso fresco de las plantas. También se observaron diferencias significativas por la interacción de concentración de As (III) y la concentración del inóculo (Tabla 2). Los valores del peso fresco de las plantas que crecieron bajo concentración de 10  $\mu\text{M}$  presentaron una reducción drástica no sólo respecto a las plantas que crecieron en condición normal, sino que también respecto a las plantas que se sometieron en 3 y 5  $\mu\text{M}$  de As (III). En las de 3  $\mu\text{M}$  de As (III) sólo las plantas controles y plantas inoculadas con OD de 0,07 mostraron una reducción significativa respecto a las plantas sin tratamiento de As (III). Interesantemente, no se notaron diferencias significativas entre las plantas en condición normal y las plantas en tratamiento de 5  $\mu\text{M}$  (Figura 2A).

La longitud de las raíces difirió en función del nivel de estrés por As (III) y de la inoculación de *A. radioresistens* y que también tuvo efecto de interacción según los niveles de inoculación y As (III) (Tabla 2). Los resultados de la longitud de las raíces se exhibieron en la figura 2B. En general un aumento del nivel de estrés por As (III) redujo la longitud de raíces. Sin embargo, la inoculación con *A. radioresistens* redujo los efectos negativos del As, siendo el efecto dependiente de la dosis de As y del nivel de inoculación. Así a 3  $\mu\text{M}$  las plantas tratadas con inóculos aumentaron la longitud de las raíces respecto a las plantas controles A 5  $\mu\text{M}$  los niveles de inoculación a 0,07 y a 0,21 presentaron mayor longitud radical en comparación con las plantas controles, entre ellos el nivel de la inoculación a 0,21 fue la que produjo la mayor longitud de raíces. Los aumentos en la longitud de raíces en aquellas plantas inoculadas sometidas al estrés de As (III) permitieron alcanzar a los valores similares de las plantas que crecieron en medio sin As (III), excepto en el caso de las plantas inoculadas con 0,07 a 5  $\mu\text{M}$  de As (III) Por el contrario, a 10  $\mu\text{M}$  no se detectó efecto positivo de la inoculación con *A. radioresistens*.

Tabla 2. F y p-valores ( $p < 0,05$  en negrita) del ANOVA de las variables de crecimiento.

Variables	Efecto de As (III)		Efecto de inoculación		Efecto de interacción entre As (III) e inoculación	
	F	p-valor	F	p-valor	F	p-valor
Longitud de raíces	127,475	<b>&lt; 0,001</b>	9,322	<b>&lt; 0,001</b>	4,782	<b>&lt; 0,001</b>
Peso fresco	185,744	<b>&lt; 0,001</b>	1,463	0,228	2,686	<b>0,006</b>

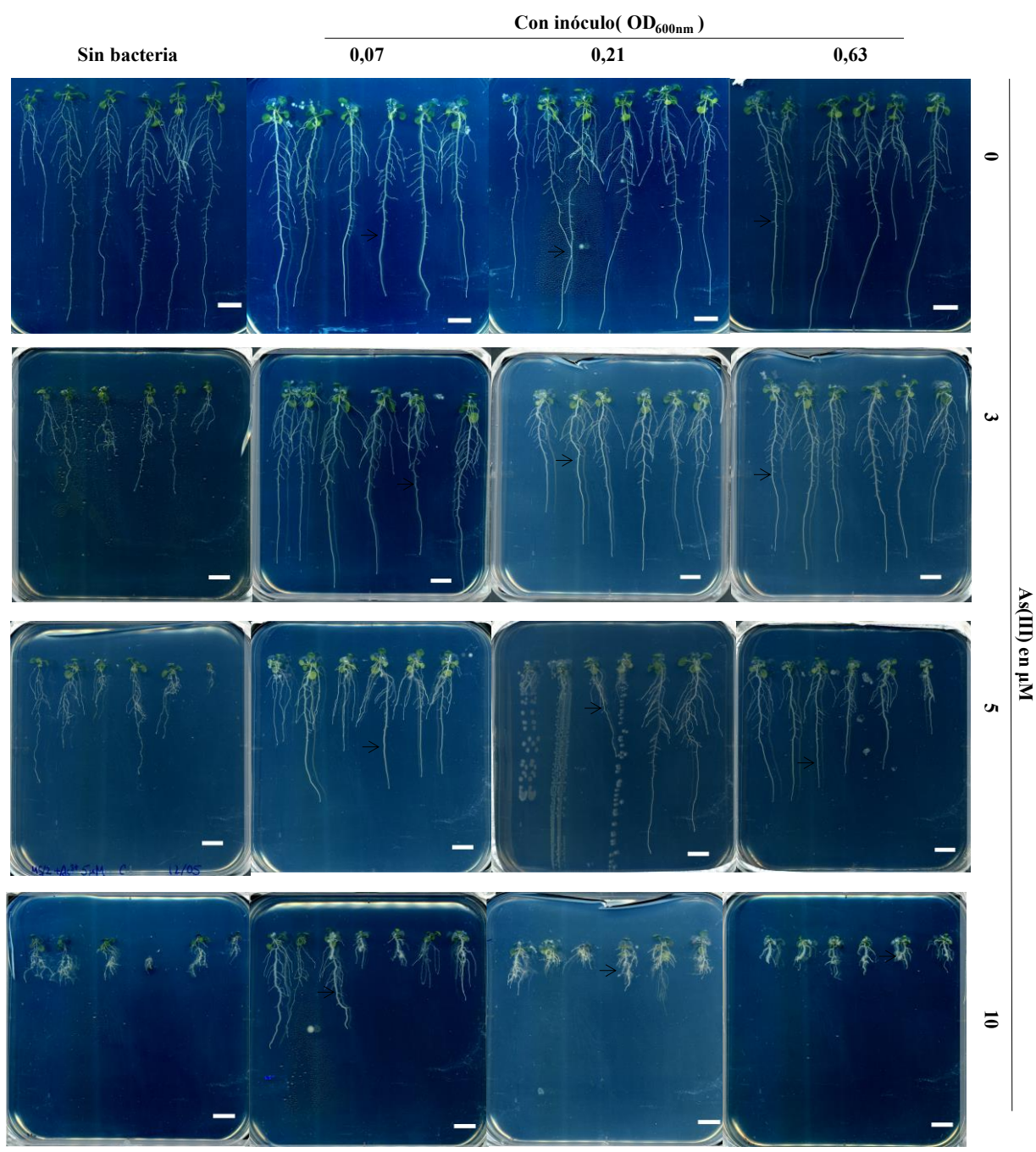


Figura 1. Fenotipos de *A. thaliana* bajo diferentes concentraciones de estrés de As (III) y diferentes concentraciones de inóculo después de 10 días en cultivo. Las flechas indican biopelícula formado por bacteria alrededor de la raíz de planta.

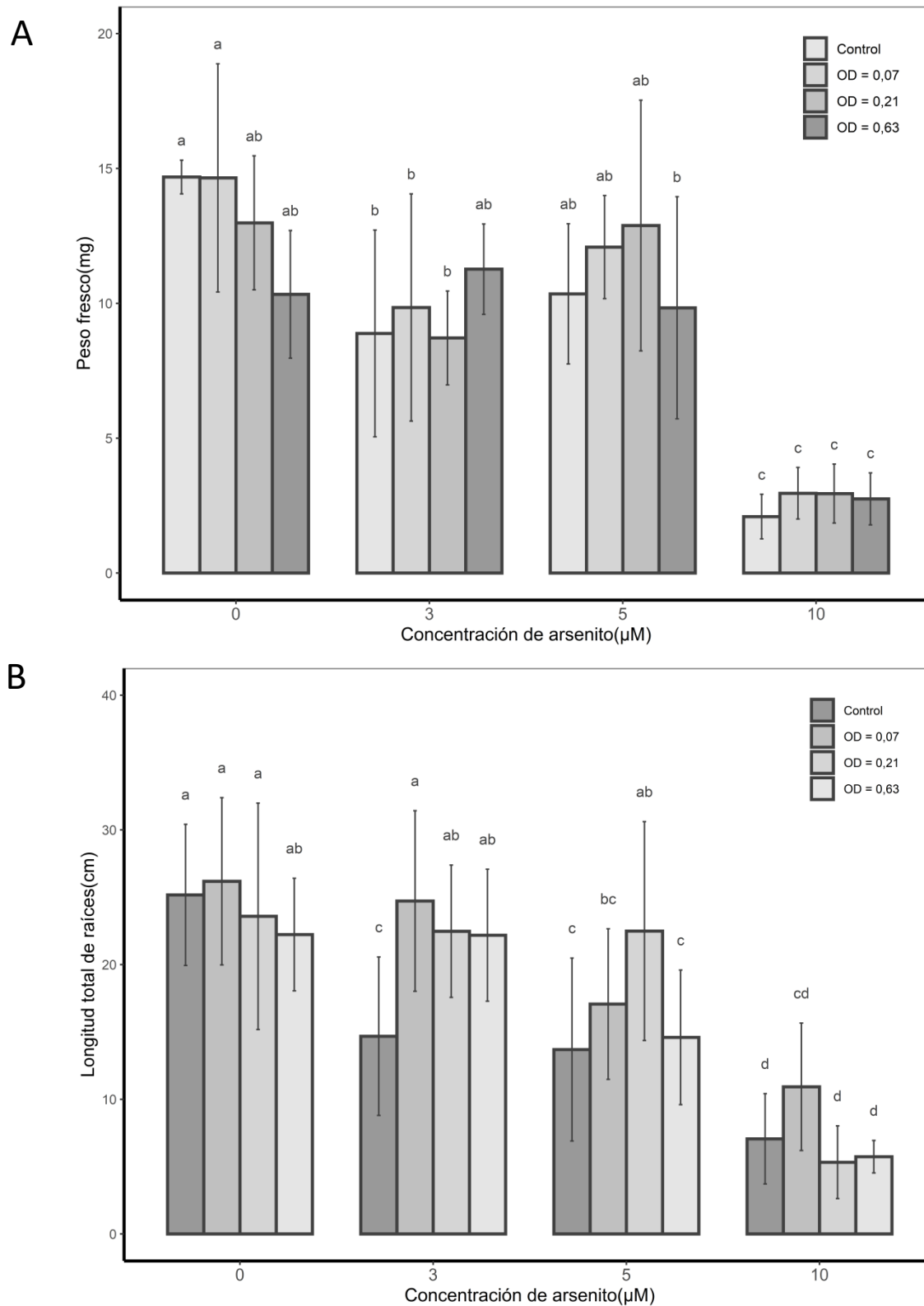


Figura 2. Peso fresco (A) y longitud total de raíz (B) de *A. thaliana* con diferentes concentraciones de inóculos y control. Las plantas crecieron bajo diferentes concentraciones de estrés de As (III) durante 10 días. Las barras de error son las desviaciones estándares. Las letras diferentes sobre las barras de error indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) según el test *post-hoc* de Tukey.

## 4.2. Parámetros de fluorescencia

El escaso desarrollo de las plántulas a 10  $\mu\text{M}$  no permitió valorar los parámetros fisiológicos. Los valores de los parámetros de fluorescencia según las concentraciones de los tratamientos (As (III) e inóculo) se presentaron en la tabla 3. El Fv/Fm de las plantas bajo estrés de 3 y 5  $\mu\text{M}$  de As (III) no difirió significativamente de las plantas en condiciones normales, tampoco hubo efecto de simbiosis ni de su interacción (Tabla 4). Igualmente, los valores de  $\phi_{\text{PSII}}$  no presentaron diferencias significativas entre niveles estrés de As (III) ni entre la inoculación ni de su interacción.

El qP y NPQ sólo mostraron diferencias estadísticas entre diferentes concentraciones de estrés de As (III) (Tabla 4). Las plantas que desarrollaron en medio sin As (III) presentaron los valores más altos de qP. Los valores de qP fueron mínimos en plantas creciendo a 3  $\mu\text{M}$  de As (III), e intermedio en aquellas creciendo a 5  $\mu\text{M}$  de As (III) (Figura 3A). Las plantas que crecieron en 3  $\mu\text{M}$  de As (III) tuvieron los valores más altos de NPQ. Los valores de NPQ en 5  $\mu\text{M}$  de As (III) fueron los más bajos de todos los tratamientos (Figura 3B).

Tabla 3. Parámetros de fluorescencia de *A. thaliana* con diferentes niveles de *A. radioresistens* bajo diferentes concentraciones de estrés de As (III) a 10 días. Media  $\pm$  desviación estándar.

Concentración de As (III)	DO <sub>600nm</sub>	Variables			
		Fv/Fm	$\phi_{\text{PSII}}$	qP	NPQ
0 $\mu\text{M}$	control	0.809 $\pm$ 0.018	0.112 $\pm$ 0.040	0.156 $\pm$ 0.045	0.491 $\pm$ 0.148
	0,07	0.804 $\pm$ 0.013	0.105 $\pm$ 0.024	0.145 $\pm$ 0.029	0.563 $\pm$ 0.152
	0,21	0.774 $\pm$ 0.074	0.104 $\pm$ 0.024	0.155 $\pm$ 0.042	0.676 $\pm$ 0.290
	0,63	0.796 $\pm$ 0.024	0.083 $\pm$ 0.026	0.115 $\pm$ 0.034	0.543 $\pm$ 0.216
3 $\mu\text{M}$	control	0.828 $\pm$ 0.051	0.060 $\pm$ 0.020	0.087 $\pm$ 0.029	0.979 $\pm$ 0.650
	0,07	0.791 $\pm$ 0.054	0.085 $\pm$ 0.049	0.118 $\pm$ 0.059	0.626 $\pm$ 0.273
	0,21	0.802 $\pm$ 0.020	0.091 $\pm$ 0.036	0.126 $\pm$ 0.046	0.640 $\pm$ 0.209
	0,63	0.788 $\pm$ 0.018	0.082 $\pm$ 0.011	0.119 $\pm$ 0.015	0.744 $\pm$ 0.236
5 $\mu\text{M}$	control	0.807 $\pm$ 0.009	0.091 $\pm$ 0.021	0.119 $\pm$ 0.027	0.330 $\pm$ 0.065
	0,07	0.815 $\pm$ 0.007	0.097 $\pm$ 0.029	0.126 $\pm$ 0.036	0.307 $\pm$ 0.115
	0,21	0.817 $\pm$ 0.010	0.109 $\pm$ 0.026	0.142 $\pm$ 0.034	0.405 $\pm$ 0.118
	0,63	0.808 $\pm$ 0.016	0.074 $\pm$ 0.040	0.097 $\pm$ 0.053	0.378 $\pm$ 0.184

Tabla 4. F y p-valores ( $p < 0,05$  en negrita) del ANOVA de los parámetros de fluorescencia.

Variables	Efecto de As (III)		Efecto de inoculación		Efecto de interacción entre As (III) e inoculación	
	F	p-valor	F	p-valor	F	p-valor
Fv/Fm	1,532	0,225	1,022	0,389	1,05	0,403
$\phi_{\text{PSII}}$	2,887	0,064	1,745	0,1674	0,915	0,4907
qP	3,734	<b>0,029</b>	2,011	0,1219	1,013	0,425
NPQ	13,253	<b>&lt; 0,001</b>	0,474	0,701	1,252	0,293

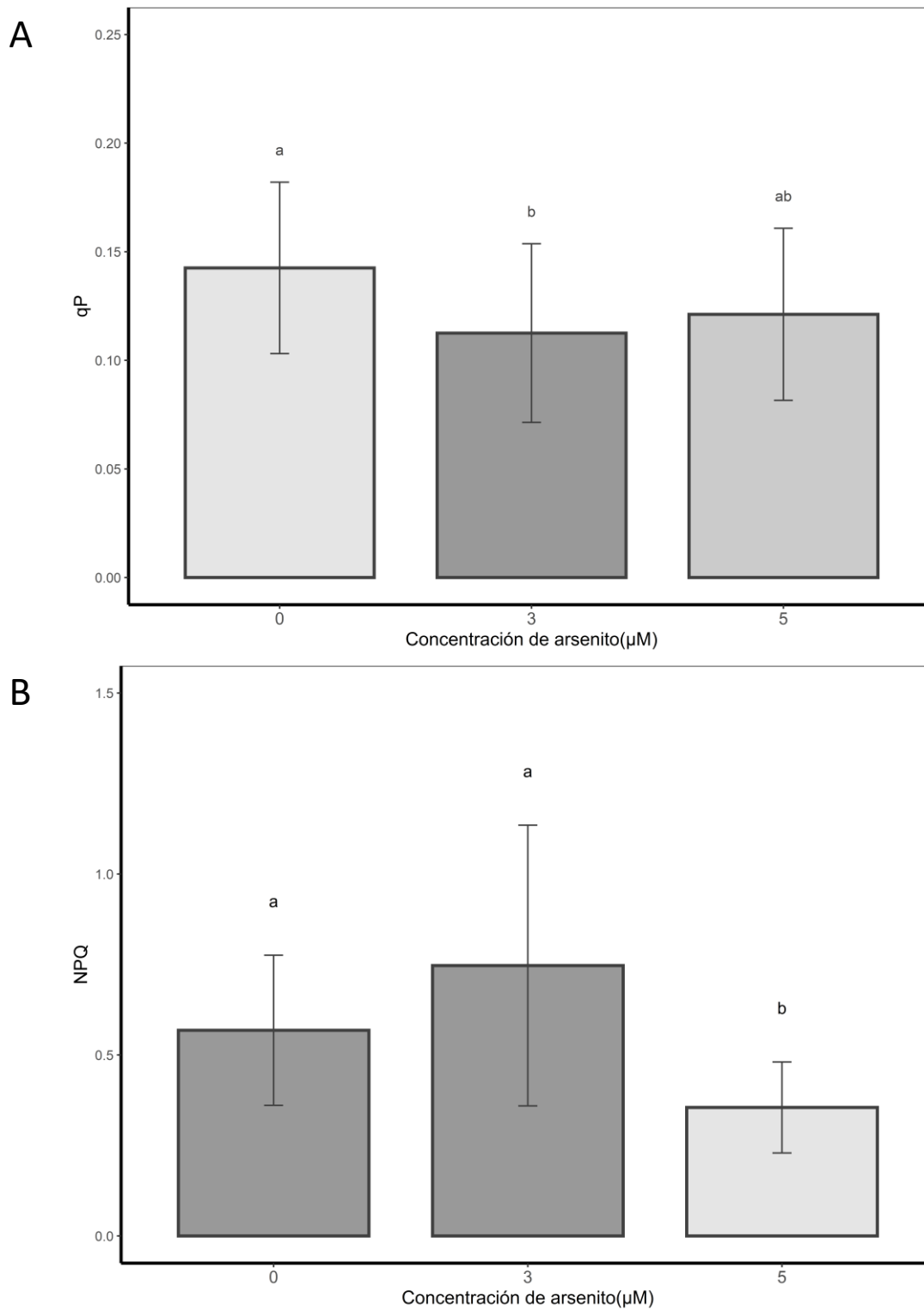


Figura 3. Parámetros de fluorescencia independientemente del inóculo: A) qP y B) NPQ. Las plantas crecieron bajo diferentes concentraciones de estrés de As (III) a 10 días. Las barras de error son las desviaciones estándares. Las letras diferentes sobre las barras de error indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) según el test *post-hoc* de Tukey.

### 4.3. Visualización de bacterias

En las plantas inoculadas se observó una capa de biopelícula alrededor de raíces (Figura 1). Esta capa de biopelícula no se observaba en las plantas controles. No se detectó colonización en plantas controles con el microscopio láser confocal (Figura 4A). En los tratamientos inoculados se verificó la presencia de bacterias con fluorescencia verde en el apoplasto de las raíces, pero no en el interior de las mismas. Las bacterias se mostraron aisladas sin generar en ningún caso colonias asociadas (Figura 4B y 4C).

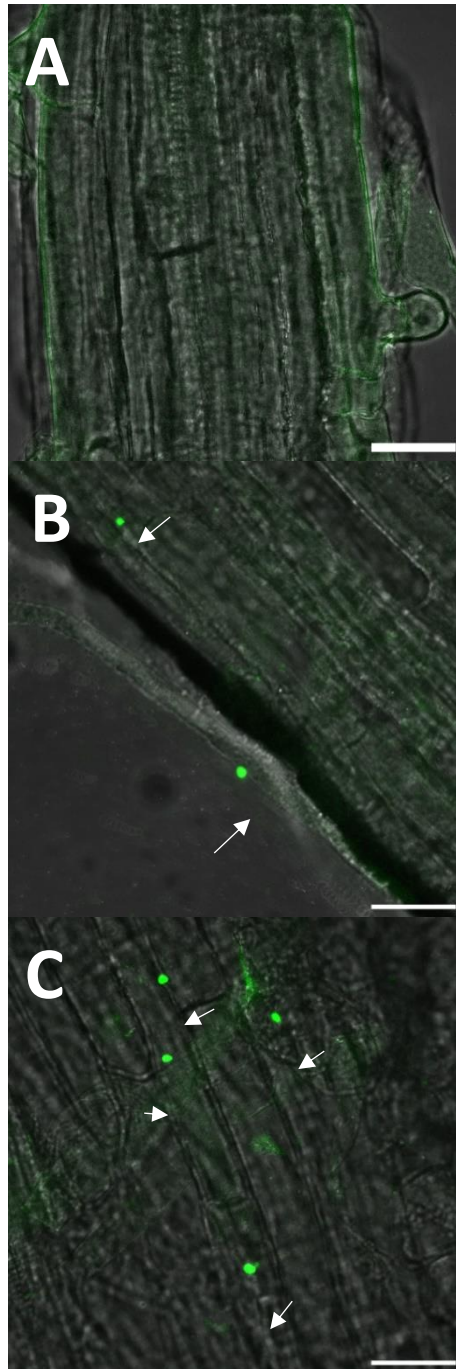


Figura 4. Observación de las raíces de *A. thaliana* en microscopio láser confocal después de cinco días germinadas e inoculadas. A) Apéndice de raíz de planta control. B) y C) Raíz colonizada por *A. radioresistens* transformada con el plásmido pBAV1k-t5-*gfp* Gonn. La barra de escala = 25 $\mu$ m. Las flechas indican fluorescencia emitida por bacterias.

## 5. Discusión

*A. radioresistens* tiene cierta capacidad para sintetizar auxinas y potencialmente protege frente a hongos patógenos (Molina et al., 2019) no ha sido descrita como una bacteria promotora del crecimiento en condiciones no estresantes, ajustándose sus funciones beneficiosas, fundamentalmente, a su capacidad de sobrevivir en sustratos altamente contaminados con arsénico y también con metales pesados o compuestos aromáticos. De hecho, en nuestros ensayos, dicha bacteria no muestra ninguna ventaja en el desarrollo de *A. thaliana* en condiciones no estresantes, para ninguna concentración de inóculo. En este sentido, cepas de esta bacteria han sido utilizadas en fitorremediación frente a metales pesados, metaloides y degradación de compuestos aromáticos, en simbiosis o como bacteria de vida libre en suelos (Mazzoli et al., 2007; Ram Talib et al., 2019).

*A. radioresistens* aislada de semillas es capaz de infectar la radícula en los primeros estadios de desarrollo tras la germinación. El hecho de que las semillas porten esta bacteria, y otras potencialmente beneficiosas, aseguran un reclutamiento temprano con lo que eso supone de beneficio cuando las situaciones de estrés acompañan a la planta desde los primeros procesos de desarrollo. Tras la infección, las bacterias asociadas a raíz pueden ocupar el interior de las células radiculares tras la pérdida de la pared celular bacteriana o agruparse en colonias entorno a las células (Synek et al., 2021). Sin embargo, *A. radioresistens* se localiza de forma aislada y dispersa a lo largo del apoplasto sin invasión celular. Estos resultados concuerdan con lo esperado puesto que la secuenciación completa del genoma de esta bacteria no muestra genes asociados con la degradación de pared celular o la vida endocelular (datos de nuestro equipo de investigación no publicados). Tras los primeros diez días de desarrollo se parece generar una biopelícula entorno a las raíces que se ha observado también en *A. lwoffii*, una bacteria que también confiere resistencia al arsénico y parece detener la absorción de este metaloide a nivel radicular (Das & Sarkar, 2018).

Durante los primeros días de desarrollo postgerminal las concentraciones 3 y 5  $\mu\text{M}$  no parecen tener efectos negativos en la biomasa de la planta ni en su aparato fotosintético. El As (III) no generó daño en la maquinaria fotosintética ya que las plantas presentaron los valores de Fv/Fm muy cerca de 0,8. Además, los valores de  $\phi_{\text{PSII}}$  no mostraron una reducción significativa en presencia de estrés, lo que sugiere que la capacidad de las plantas para adquirir carbono no se vio afectada. Estos resultados son contrarios con el estudio de Farnese et al., 2014. Esto sugiere que *A. thaliana* tiene mecanismos de defensa propios contra el estrés de As (III), independientemente de la presencia de bacterias como *A. radioresistens*, en los primeros días y a estas concentraciones. En los estudios previos se demostraron de hecho, *A. thaliana* producen glutatiónas y fitoquelatinas que sirven para aliviar el daño provocado por las especies reactivas de oxígeno y secuestrar los metales en la vacuola (Kashyap & Garg, 2018). Por otro lado, los resultados de qP y NPQ señalaron que las plantas tratadas con 5  $\mu\text{M}$  de As (III) presentaron mejor eficiencia que plantas tratadas con 3  $\mu\text{M}$  (III) en las energías que derivaron a la fotosíntesis. Sin embargo, esta mejora de eficiencia no se manifestó en la biomasa. Esto indica que tiene un mayor gasto energético en reparación o tolerancia.

Resulta interesante resaltar que, aunque la biomasa y el aparato fotosintético no parecen verse afectados en estos primeros días de desarrollo no ocurrió así con el sistema radicular. La trama y longitud de las raíces se redujo significativamente al incrementar la concentración de As (III)

lo que ha sido previamente descrito como consecuencia del estrés oxidativo (ROS), como efecto asociado al arsénico en raíces (Singh et al., 2007). La disminución en la longitud de la raíz con el aumento de la concentración de As (III) es consistente también con estudio anterior donde se describió un efecto inhibitorio en el crecimiento radicular (Li et al., 2007) o el deterioro celular y la formación de tumores radiculares (Molina et al., 2019). Además, las raíces establecen contacto con el As (III) presente en el medio (hipertónico) y genera inhibición de la extensión de la raíz y la proliferación debido a la plasmólisis (Lang et al., 2014). El hecho de que las plantas redujeran las longitudes de raíz supone una reducción de la superficie en contacto con el medio y, por tanto, una reducción en la capacidad de absorber el agua y nutrientes del suelo (Garg & Kashyap, 2017), lo que puede traducirse en desventajas en medios con nutrientes limitantes o en condiciones de sequía. Sin embargo, los resultados indican que la biomasa de las plantas tratadas con As (III) no presentaron diferencias significativas respecto a las plantas sin tratamiento de As (III). El daño radicular puede no tener efecto durante los primeros días del desarrollo en la plántula, especialmente si se desarrollan mecanismos defensivos por parte de la planta (Kashyap & Garg, 2018), especialmente en condiciones de cultivo óptimas, pero no es descartable que estos efectos puedan apreciarse en el desarrollo posterior (Das & Sarkar, 2018). La presencia de la biopelícula bacteriana entorno a la raíz favorece el desarrollo de la misma, especialmente a 3 y 5  $\mu\text{M}$ . En el caso plantas creciendo a 5  $\mu\text{M}$  de As (III) la concentración óptica de inóculo fue la intermedia (0.21  $\text{DO}_{600}$ ). No observamos mejoras significativas en el aparato radicular a 10  $\mu\text{M}$  As (III), sin embargo, esto no significa que no pueda observarse en un desarrollo ulterior, sino más bien que el periodo de adaptación a las condiciones estresantes es mayor debido probablemente a que los daños son mayores (Tashan et al., 2021). Determinar si 10  $\mu\text{M}$  es la concentración mínima letal de *A. thaliana* para As (III) y si la presencia de *A. radioresistens* puede aliviar el estrés requiere realizar un estudio secuencial a lo largo del tiempo.

La síntesis de auxinas por parte de *A. radioresistens*, aunque no tiene efecto en el desarrollo de la parte aérea de la planta, puede tener un papel relevante dado que las auxinas modifican la arquitectura del sistema radicular en respuesta a diversas señales bióticas y abióticas de la rizosfera, como los micronutrientes, el estrés hídrico y por frío, acidez del suelo, presencia de microorganismos patógenos y beneficiosos, nematodos o el efecto vecinal de las plantas (Overvoorde et al., 2010). Esto podría estar relacionado con la mejora del eje radicular en presencia de plantas inoculadas con *A. radioresistens*, no obstante, esta explicación es preliminar y requiere el desarrollo de un diseño experimental adecuado para su confirmación.

### **Líneas de investigación futura**

Después de medir los pesos frescos de las plantas, se congelaron inmediatamente de forma separada la parte aérea y la raíz en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el aislamiento del ARN y la evaluación del contenido de As (III) en cada parte. Se realizará análisis de transcriptómica para conocer la expresión de genes microbianos y plantas y conocer el mecanismo molecular como consecuencia del tratamiento de As (III) y de la inoculación. Por otra parte, también estamos interesados en estimar el contenido de As (III) y sus formas orgánicas e inorgánicas permite determinar los efectos de inoculación y de concentración de arsénico en la absorción de As (III) y la tasa de translocación y extrusión de As de la planta. Además, también hemos tomado medidas de todos los parámetros analizados en este TFG



después de 30 días con objeto de evaluar los efectos de los tratamientos a largo plazo. Aunque aún no se han analizado completamente los resultados parecen prometedores.

En este trabajo sólo se utilizó una especie de microbiota para la inoculación. Sin embargo, en los años recientes cada vez hay más estudios que utilizan combinaciones de bacterias endófitas (Mukherjee et al., 2018). Como deficiencia del trabajo, los valores de los parámetros de fluorescencia bajo concentración de  $10\mu\text{M}$  no se han incluido debido al escaso desarrollo de las plantas. Para completar esta información, sería recomendable evaluar de forma separada dejando las plantas tratadas con alta concentración de As (III) más tiempo en crecer, algo que como indicábamos anteriormente, tenemos previsto

Otra línea de investigación a explorar es el estudio *in vivo*, en condiciones controladas de invernadero. Trabajar en suelo (*in vivo*) y no en medios (*in vitro*) permitirá estimar la capacidad de *A. radioresistens* en la mitigación de los efectos negativos en condiciones de estrés de As de forma más precisa. La disponibilidad y el transporte del As en las plantas depende de las propiedades del suelo. El suelo puede contener otros elementos y compuestos que pueden influir en su absorción por las plantas.

Otra línea abierta es estudiar el efecto de la bacteria en plantas de cultivos. Finalmente, y a largo plazo, estudiar la eficacia en la aplicación de la bacteria en las plantas como una herramienta para la recuperación de los suelos contaminados o para la agricultura sostenible.

## 6. Conclusión

La concentración de As (III) tuvo un efecto significativo en el peso fresco y en la longitud total de las raíces con una reducción a concentraciones más alta. A bajas concentraciones de As (III) no hubo daño en la maquinaria fotosintética (Fv/Fm) ni en la eficiencia real del fotosistema II. Esto surgiere el papel del mecanismo de defensa de la planta en la tolerancia de As (III).

Durante los primeros diez días de tratamiento la inoculación de bacteria no generó ningún perjuicio en ausencia de As (III) según los resultados de los análisis fisiológicos y fenotípicos. El efecto de *A. radioresistens* dependió del nivel de inoculación y la concentración de As (III) en el peso fresco y la longitud total de raíces. La inoculación con *A. radioresistens* ayudó a mitigar la reducción en la longitud de las raíces debida al As (III). Sugerimos que la capacidad de la bacteria para sintetizar auxinas podría estar implicada en este proceso. Por otro lado, las plantas sometidas a mayores concentraciones de As (III) aumentaron su eficiencia en el uso de la luz aumentando la energía derivada a la fotosíntesis y reduciendo la energía disipada.

*A. radioresistens* no se comporta como una bacteria endocelular y se localiza en el apoplasto y en la superficie de la raíz, al menos en los primeros estadios del desarrollo. Un seguimiento en el tiempo permitirá dilucidar su localización final a lo largo del cuerpo de la planta.

## 7. Agradecimientos

En primer lugar, quisiera agradecer las enseñanzas y orientaciones de mis tutoras del trabajo María Carmen Molina y Natalia González, que han hecho posible la realización del trabajo. A la profesora Mercedes Uscola, cotutora también, por su paciencia y dedicación a lo largo de la elaboración del trabajo. Sus comentarios y aportes críticos han sido de gran ayuda para mejorar la calidad del TFG.

La participación de María José que realizó sus prácticas externas conmigo en el CBGP ha sido esencial durante todo desarrollo del experimento.

Gracias al Dr. Jesús Vicente y el Dr. Stephan Pollmann que me acogieron para realizar el experimento en el CBGP y me han permitido obtener resultados significativos. Gracias también a las investigadoras Raquel Iglesias y Paula Alonso y a la técnica de laboratorio Mar Aylón, por todas las experiencias profesionales y las habilidades adquiridas a través de sus enseñanzas.

Quisiera reconocer a Gonzalo Durante investigador del Centro de Investigaciones Biológicas por cederme *A. radioresistens* transformada con *gfp*.

A todos los compañeros del laboratorio, gracias por estar siempre dispuestos a echarme una mano.

## 8. Bibliografía

- Abdullaeva, Y., Ambika Manirajan, B., Honermeier, B., Schnell, S., & Cardinale, M. (2021). Domestication affects the composition, diversity, and co-occurrence of the cereal seed microbiota. *Journal of Advanced Research*, *31*, 75-86. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.12.008>
- Ali, S., Tyagi, A., Mushtaq, M., Al-Mahmoudi, H., & Bae, H. (2022). Harnessing plant microbiome for mitigating arsenic toxicity in sustainable agriculture. *Environmental Pollution*, *300*, 118940. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.118940>
- Babar, M. M., & Tariq, A. (2018). Status of Arsenic Toxicity in the World. En M. Hasanuzzaman, K. Nahar, & M. Fujita (Eds.), *Mechanisms of Arsenic Toxicity and Tolerance in Plants* (pp. 457-481). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-1292-2\\_18](https://doi.org/10.1007/978-981-13-1292-2_18)
- Benson, L. M., Porter, E. K., & Peterson, P. J. (1981). Arsenic accumulation, tolerance and genotypic variation in plants on arsenical mine wastes in S.W. England. *Journal of Plant Nutrition*, *3*(1-4), 655-666. <https://doi.org/10.1080/01904168109362868>
- Bosch, T. C. G., & McFall-Ngai, M. J. (2011). Metaorganisms as the new frontier. *Zoology*, *114*(4), 185-190. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2011.04.001>
- Bryksin, A. V., & Matsumura, I. (2010). Rational Design of a Plasmid Origin That Replicates Efficiently in Both Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *PLoS ONE*, *5*(10), e13244. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013244>
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: A simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana: Floral dip transformation of Arabidopsis. *The Plant Journal*, *16*(6), 735-743. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x>
- Colangelo, E. P., & Gueriot, M. L. (2006). Put the metal to the petal: Metal uptake and transport throughout plants. *Current Opinion in Plant Biology*, *9*(3), 322-330. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.03.015>
- Das, J., & Sarkar, P. (2018). Remediation of arsenic in mung bean (*Vigna radiata*) with growth enhancement by unique arsenic-resistant bacterium *Acinetobacter lwoffii*. *Science of The Total Environment*, *624*, 1106-1118. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.157>
- De Zélicourt, A., Synek, L., Saad, M. M., Alzubaidy, H., Jalal, R., Xie, Y., Andrés-Barrao, C., Rolli, E., Guerard, F., Mariappan, K. G., Daur, I., Colcombet, J., Benhamed, M., Depaepe, T., Van Der Straeten, D., & Hirt, H. (2018). Ethylene induced plant stress tolerance by *Enterobacter* sp. SA187 is mediated by 2-keto-4-methylthiobutyric acid production. *PLOS Genetics*, *14*(3), e1007273. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007273>
- Farnese, F. S., Oliveira, J. A., Gusman, G. S., Leão, G. A., Silveira, N. M., Silva, P. M., Ribeiro, C., & Cambraia, J. (2014). Effects of Adding Nitroprusside on Arsenic Stressed Response of *Pistia stratiotes* L. Under Hydroponic Conditions. *International Journal of Phytoremediation*, *16*(2), 123-137. <https://doi.org/10.1080/15226514.2012.759532>
- Fox, J., Weisberg, S., & Fox, J. (2011). *An R companion to applied regression* (2nd ed). SAGE Publications.

García-Salgado, S., García-Casillas, D., Quijano-Nieto, Ma. A., & Bonilla-Simón, Ma. M. (2012). Arsenic and Heavy Metal Uptake and Accumulation in Native Plant Species from Soils Polluted by Mining Activities. *Water, Air, & Soil Pollution*, 223(2), 559-572. <https://doi.org/10.1007/s11270-011-0882-x>

Garg, N., & Kashyap, L. (2017). Silicon and Rhizophagus irregularis: Potential candidates for ameliorating negative impacts of arsenate and arsenite stress on growth, nutrient acquisition and productivity in Cajanus cajan (L.) Millsp. genotypes. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(22), 18520-18535. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9463-x>

González-Benítez, N., Martín-Rodríguez, I., Cuesta, I., Arrayás, M., White, J. F., & Molina, M. C. (2021). Endophytic Microbes Are Tools to Increase Tolerance in Jasion Plants Against Arsenic Stress. *Frontiers in Microbiology*, 12, 664271. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.664271>

Kashyap, L., & Garg, N. (2018). Arsenic Toxicity in Crop Plants: Responses and Remediation Strategies. En M. Hasanuzzaman, K. Nahar, & M. Fujita (Eds.), *Mechanisms of Arsenic Toxicity and Tolerance in Plants* (pp. 129-169). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-1292-2\\_6](https://doi.org/10.1007/978-981-13-1292-2_6)

Lang, I., Sassmann, S., Schmidt, B., & Komis, G. (2014). Plasmolysis: Loss of Turgor and Beyond. *Plants*, 3(4), 583-593. <https://doi.org/10.3390/plants3040583>

Li, C., Feng, S., Shao, Y., Jiang, L., Lu, X., & Hou, X. (2007). Effects of arsenic on seed germination and physiological activities of wheat seedlings. *Journal of Environmental Sciences*, 19(6), 725-732. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(07\)60121-1](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(07)60121-1)

Li, J., Chen, B., Zhang, X., Hao, Z., Zhang, X., & Zhu, Y. (2021). Arsenic transformation and volatilization by arbuscular mycorrhizal symbiosis under axenic conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 413, 125390. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125390>

Mazzoli, R., Pessione, E., Giuffrida, M. G., Fattori, P., Barello, C., Giunta, C., & Lindley, N. D. (2007). Degradation of aromatic compounds by Acinetobacter radioresistens S13: Growth characteristics on single substrates and mixtures. *Archives of Microbiology*, 188(1), 55-68. <https://doi.org/10.1007/s00203-007-0223-z>

Mohammed Abdul, K. S., Jayasinghe, S. S., Chandana, E. P. S., Jayasumana, C., & De Silva, P. M. C. S. (2015). Arsenic and human health effects: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40(3), 828-846. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.09.016>

Molina, M. C., White, J. F., García-Salgado, S., Quijano, M. Á., & González-Benítez, N. (2020). A Gnotobiotic Model to Examine Plant and Microbiome Contributions to Survival under Arsenic Stress. *Microorganisms*, 9(1), 45. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010045>

Molina, M. C., White, J. F., Kingsley, K. L., & González-Benítez, N. (2019). Seed Endophytes of Jasion montana: Arsenic Detoxification Workers in an Eco-friendly Factory. En S. K. Verma & J. F. White, Jr (Eds.), *Seed Endophytes* (pp. 365-384). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-10504-4\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-030-10504-4_17)

- Mukherjee, G., Saha, C., Naskar, N., Mukherjee, A., Mukherjee, A., Lahiri, S., Majumder, A. L., & Seal, A. (2018). An Endophytic Bacterial Consortium modulates multiple strategies to improve Arsenic Phytoremediation Efficacy in *Solanum nigrum*. *Scientific Reports*, 8(1), 6979. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25306-x>
- Overvoorde, P., Fukaki, H., & Beeckman, T. (2010). Auxin Control of Root Development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(6), a001537-a001537. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001537>
- Qamar, N., Rehman, Y., & Hasnain, S. (2017). Arsenic-resistant and plant growth-promoting *Firmicutes* and  $\gamma$ -*Proteobacteria* species from industrially polluted irrigation water and corresponding cropland. *Journal of Applied Microbiology*, 123(3), 748-758. <https://doi.org/10.1111/jam.13535>
- Ram Talib, N. S., Halmi, M. I. E., Abd Ghani, S. S., Zaidan, U. H., & Shukor, M. Y. A. (2019). Artificial Neural Networks (ANNs) and Response Surface Methodology (RSM) Approach for Modelling the Optimization of Chromium (VI) Reduction by Newly Isolated *Acinetobacter radioresistens* Strain NS-MIE from Agricultural Soil. *BioMed Research International*, 2019, 1-14. <https://doi.org/10.1155/2019/5785387>
- RStudio Team. (2020). *RStudio: Integrated Development Environment for R* (1.3.1093). RStudio, PBC. <http://www.rstudio.com/>
- Saad, M., De Zelicourt, A., Rolli, E., Synek, L., & Hirt, H. (2018). Quantification of Root Colonizing Bacteria. *BIO-PROTOCOL*, 8(14). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2927>
- Singh, H. P., Batish, D. R., Kohli, R. K., & Arora, K. (2007). Arsenic-induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation. *Plant Growth Regulation*, 53(1), 65-73. <https://doi.org/10.1007/s10725-007-9205-z>
- Synek, L., Rawat, A., L'Haridon, F., Weisskopf, L., Saad, M. M., & Hirt, H. (2021). Multiple strategies of plant colonization by beneficial endophytic *ENTEROBACTER* sp. SA187. *Environmental Microbiology*, 23(10), 6223-6240. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15747>
- Tashan, H., Harighi, B., Rostamzadeh, J., & Azizi, A. (2021). Characterization of Arsenic-Resistant Endophytic Bacteria From Alfalfa and Chickpea Plants. *Frontiers in Plant Science*, 12, 696750. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.696750>
- Wevar Oller, A. L., Regis, S., Armendariz, A. L., Talano, M. A., & Agostini, E. (2020). Improving soybean growth under arsenic stress by inoculation with native arsenic-resistant bacteria. *Plant Physiology and Biochemistry*, 155, 85-92. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.07.015>
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis* (2nd ed. 2016). Springer International Publishing : Imprint: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4>
- Zhao, F. J., Ma, J. F., Meharg, A. A., & McGrath, S. P. (2009). Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytologist*, 181(4), 777-794. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02716.x>

Zheng, R., Sun, G., & Zhu, Y. (2013). Effects of microbial processes on the fate of arsenic in paddy soil. *Chinese Science Bulletin*, 58(2), 186-193. <https://doi.org/10.1007/s11434-012-5489-0>

©2023 <Weikang Huang>

Algunos derechos reservados

Este documento se distribuye bajo la licencia "Atribución 4.0 Internacional" de Creative Commons, disponible en: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>

