

Obtención de aislados bacterianos de la rizósfera de *Typha latifolia* (Espadaña) crecida en sitios contaminados con Plomo

Alejandro Hernández, Jocabed Rubio, Candy Carranza, Claudia Álvarez y Juan Pacheco

A. Hernández, J. Rubio, C. Carranza, C. Álvarez y J. Pacheco
Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Ingeniería, Dr. Manuel Nava 8, Zona Universitaria, CP 78290,
San Luis Potosí, S.L.P., México.
Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. Cerro de las Campanas S/N, CU, Col. Las Campanas, CP
76010. Querétaro, Querétaro. México.
alejandro.hernandez@uaslp.mx

M. Ramos., V.Aguilera., (eds.).Ciencias Naturales y Exactas, Handbook -©ECORFAN- Valle de Santiago, Guanajuato,
2014.

Abstract

Typha latifolia is a plant used in phytoremediation due to its ability to remove heavy metals from impacted sites, and accumulating them primarily in the roots. Plant roots are involved in the absorption of water and nutrients, and in the interaction with rhizosphere microorganisms, such as plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). PGPR promotes plant growth in stress conditions caused by heavy metals, drought, salinity and other adverse conditions in the soil. Regarding *T. latifolia* interactions with rhizosphere microorganisms is still poorly understood. So in this study the bacterial isolation from *T. latifolia* rhizosphere was conducted. Isolation of bacteria was performed in Luria Bertani media supplemented with 5 ppm of lead (Pb), resulting in 100 isolates; of which 58 correspond to rhizosphere and 42 endophytic isolates. Biochemical characterization shows that some isolates can solubilize phosphates, degrading pectin and growth at 250 ppm of lead.

22 Introducción

Las actividades llevadas a cabo por el hombre, para satisfacer sus necesidades básicas de alimentación, vestido y vivienda, han originado el aumento de la concentración de elementos tóxicos en el medio ambiente, contaminando los mantos acuíferos y el suelo; siendo amenazas para la salud del hombre y para la biodiversidad de los ecosistemas (Cañizares 2000). Los contaminantes que se consideran prioritarios debido a su alta toxicidad y persistencia en el ambiente son los metales pesados, los cuales no pueden ser degradados química o biológicamente. Por lo tanto, para evitar los efectos adversos que los metales pesados pueden ocasionar a los ecosistemas y la salud, se han desarrollado diversos métodos físico-químicos, entre los que destacan el lavado del suelo, los tratamientos electrocinéticos, la reducción y oxidación química, excavación, ozonización, ósmosis, incineración, recuperación de metales por evaporación, precipitación y filtración (Cañizares 2000, Tejada 2010). Sin embargo, estos métodos pueden resultar ineficientes y costosos, por lo que es necesario desarrollar métodos alternativos y eficaces para la remoción de metales pesados y disminuir los riesgos potenciales para la salud del hombre (Cañizares 2000).

Una medida práctica es el uso de nuevas tecnologías, de bajo costo como la fitorremediación, que consiste en el uso de plantas para eliminar o estabilizar contaminantes dañinos en el medio ambiente. Esta tecnología es una alternativa atractiva debido a que es llevada a cabo in situ, minimizando los costos y la exposición humana a los contaminantes (Leura-Vicencio et al. 2013). Para ello, es importante el empleo de plantas que posean elevadas velocidades de crecimiento, alta producción de biomasa, tolerancia a condiciones adversas como pH, salinidad, composición y contenido de agua (Zhuang et al. 2007). Entre las plantas que cumplen con estas características se encuentra *Typha latifolia*, una macrofita emergente, perenne; perteneciente a la familia Thyphacea, capaz de crecer en arroyos, lagos y lagunas; así como en sitios con cantidades limitadas de agua y en sitios inundados; e incluso puede crecer en presencia de concentraciones elevadas de sales. Por otra parte, se ha demostrado que *T. latifolia* es capaz de crecer en sitios impactados con metales pesados como el Tanque Tenorio, un lago artificial donde se determinaron Pb, Cd, Cr y Fe; en agua y sedimento, a concentraciones superiores a las permitidas por la Norma Oficial Mexicana NOM-CCA-032-ECOL/1993 (Montante-Montelongo, 1998).

Además se demostró que las plantas de *T. latifolia* crecidas en el Tanque Tenorio son capaces de fitoextraer y acumular altas concentraciones de metales pesados Mn, Fe, Cr, Pb y Cd, en raíces, tallos y hojas, siendo una planta hiperacumuladora de metales (Alonso-Castro et al. 2009, Leura-Vicencio et al. 2013). Los análisis de acumulación indican que *T. latifolia* acumula la mayor cantidad de metales en las raíces en comparación con los niveles detectados en tallos y hojas, sugiriendo que las células del tejido radicular pueden tolerar altas concentraciones de metales (Carranza-Álvarez et al. 2008, Alonso-Castro y col. 2009, Leura-Vicencio y col. 2013).

De igual manera, Leura-Vicencio et al. (2013) demostraron que plantas de *T. latifolia* expuestas a soluciones individuales de Pb y Cd; y mezclas de ambos metales, son capaces de fitoextraer y acumular ambos metales en raíces, tallos y hojas, donde la mayor acumulación de metales ocurre en las raíces de la planta (Leura-Vicencio et al. 2013).

Muchas de las plantas hiperacumuladoras de metales pueden llegar a ser lentas en su crecimiento, debido al estrés oxidativo causado por la presencia de altas concentraciones de metales pesados (Zhuang et al. 2007). Sin embargo, una vez adaptadas al ambiente extremo llevan a cabo su desarrollo normal, así como la fitoacumulación y distribución de metales en los diferentes tejidos. Para la adaptación de las plantas al ambiente extremo y para contrarrestar los efectos tóxicos de los metales pesados, se ha demostrado que las plantas establecen interacciones simbióticas con microorganismos presentes en la rizósfera, en la cual pueden encontrarse bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV). Las BPCV se nutren a partir de exudados de la raíz de la planta y llevan a cabo actividades bioquímicas que les permiten solubilizar fosfatos, producir sideróforos y hormonas; transformar sustancias orgánicas e inorgánicas en sustancias inocuas o insolubles; así como modificar las condiciones adversas de la rizósfera (Bashan, 1998). Estas actividades, de manera directa o indirecta, favorecen el crecimiento de las plantas en condiciones de estrés ocasionado por metales pesados, hidrocarburos, sales y sequías; contribuyendo a la adaptación de las plantas a las condiciones presentes en su entorno (Yang-feng et al. 2011, Sarabia-Ochoa et al. 2010).

Se ha demostrado que las bacterias *Azotobacter chroococcum* HKN-5, *Bacillus megaterium* HKP-1 y *B. mucilaginosus* HKK-1 protegen plantas de *Brassica juncea* contra los daños causados por Pb y Zn, mientras que *B. subtilis* SJ-101 facilita la acumulación de Ni, siendo los microorganismos un factor importante para contrarrestar la fitotoxicidad y estimular el crecimiento de la planta. Así mismo cepas de *Kluyvera ascorbata* SUD165 y SUD165/26 estimulan el crecimiento de plantas de Mostaza india, tomate y canola, protegiendo contra los efectos tóxicos causados por el Ni, Pb y Zn. Por otro lado, a nivel molecular se ha demostrado que la bacteria *Mesorhizobium huakuii* favorece la expresión del gen *pcs* de *Astragalus sinicus*, el cual incrementa la capacidad de la planta para captar Cd. Así mismo, bacterias como *Brevundimonas* sp KR013, *Pseudomonas fluorescens* CR3, *Pseudomonas* sp KR017 y *Rhizobium leguminosarum* bv.trifolii NZP561 producen moléculas que son capaces de secuestrar el Cd a partir de una solución del metal. Todas estas características promueven el crecimiento de las plantas y disminuyen los efectos tóxicos de los metales pesados (Sarabia-Ochoa et al. 2010).

En lo que respecta a *T. latifolia*, hasta el momento se desconocen las interacciones que establece con los microorganismos a nivel de rizósfera.

Por lo que es importante estudiar las interacciones que esta planta establece con microorganismos y su posible contribución a la tolerancia de metales pesados. En este trabajo se aislaron bacterias de la rizósfera de *T. latifolia*, capaces de tolerar Pb por ser uno de los principales metales que la planta acumula en sus raíces (Alonso-Castro et al. 2009; Leura-Vicencio et al. 2013). Esto nos ha permitido conocer parte de la diversidad bacteriana de los sitios contaminados con metales, así como bacterias asociadas a la raíz de *T. latifolia*, las cuales posiblemente ejercen efecto protector hacia la planta para llevar a cabo la fitoextracción.

22.1 Método

a) Recolección del material vegetal: El muestreo se realizó en las inmediaciones de la mina ubicada en Camino a la Presa, San Luis Potosí, donde previamente se ha demostrado que existe contaminación con Pb. Se colectaron plantas de *T. latifolia* que incluían las raíces y el suelo adherido, se guardaron en bolsas de plástico y se almacenaron a 4 °C hasta su procesamiento.

b) Obtención de aislados de la rizósfera: Las plantas colectadas fueron seccionadas en parte aérea y zona radicular, a partir de la cual se obtuvo la muestra de suelo (rizósfera) y el suelo adherido a las raíces. 10 gramos de suelo de la rizósfera fueron disueltos en 90 ml de agua destilada estéril y posteriormente se realizaron diluciones seriadas en solución salina estéril. 10 μ l de cada dilución se sembraron en agar Luria Bertani (LB) adicionado con 5 ppm de Pb en forma de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Las placas fueron incubadas a 28 °C durante 72 h. Las colonias obtenidas se resembraron en medios con Pb para garantizar su capacidad de crecimiento y/o tolerancia a los metales.

c) Obtención de aislados bacterianos endófitos de las raíces: Las raíces de *T. latifolia* se lavaron con agua corriente para eliminar el sedimento adherido, posteriormente se desinfectaron mediante lavados sucesivos con cloro comercial y etanol durante tiempo variable. Posterior a la desinfección, las raíces fueron lavadas con agua destilada estéril, una alícuota del último lavado se sembró en agar LB para garantizar el proceso de desinfección. Para el aislamiento de endófitos bacterianos, 1 gr de las raíces desinfectadas se homogenizaron con 10 ml de agua destilada estéril, a partir del cual se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en agar LB (Luria Bertani) suplementado con 5 ppm de Pb en forma de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y se incubaron a 28°C durante 72 h. Las colonias obtenidas se resembraron en medios con Pb para garantizar su capacidad de crecimiento y/o tolerancia a los metales.

d) Asimilación de pectina: Los aislados bacterianos obtenidos se crecieron en medio mínimo de sales el cual contenía por litro 10 g pectina; 5 g $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; 5 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0.25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.2 g KCl; 0.1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 20 g de agar bacteriológico.

e) Identificación de aislados con capacidad para solubilizar fosfatos: Los aislados con capacidad de crecer en LB 5 ppm Pb, se sembraron en medio NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate), el cual contiene por litro: 10 g glucosa; 5 g $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; 5 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0.25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.2 g KCl; 0.1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.01 g de azul de bromotimol y 20 g de agar bacteriológico. Las colonias positivas se observaron con halos amarillos, como indicativo de la solubilización de fosfatos.

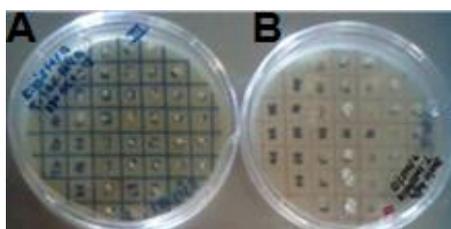
f) Cuantificación de la capacidad solubilizadora de fosfatos de los aislados bacterianos: Se elaboró una curva de calibración utilizando Na_2HPO_4 como estándar, el cual se hizo reaccionar con ácido 1-amino-2 naftol-4 sulfónico al 0.25% y solución molíbdica al 2.5% en H_2SO_4 5 N hasta la aparición de un coloración azul. Se realizó la lectura de las absorbancias a 880 nm utilizando un espectrofotómetro AquaMatePlus (Thermo Scientific). Los datos obtenidos fueron analizados, posteriormente se graficó la curva de calibración para determinar el valor de R^2 y la ecuación de la recta. Para cuantificar la capacidad de solubilización, los aislados bacterianos fueron cultivados en medio líquido NBRIP a 28 °C, 200 rpm durante 120 horas. Transcurrido este período, 100 μ l del medio de cultivo donde crecieron los aislados bacterianos se hicieron reaccionar en las mismas condiciones para la elaboración de la curva de calibración. Los datos de las absorbancias obtenidas de la mezcla de reacción del medio de cultivo de cada aislado bacteriano, se sustituyeron en la ecuación de la recta par obtener los datos de solubilización llevada a cabo por cada aislado.

g) Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de Pb: Los aislados bacterianos fueron cultivados en microplacas de 96 pozos (Cos et al. 1999). Se realizaron diluciones 1:2 en caldo LB partiendo de una solución stock con 500 ppm de Pb. Los pozos con las diferentes concentraciones se inocularon con cada uno de los aislados y se incubaron en agitación durante 72 h. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se estableció como la concentración de Pb donde no se observó crecimiento de los aislados bacterianos.

22.2 Resultados y Discusión

Aislamiento a partir de la rizósfera. Para conocer parte de la diversidad de microorganismos asociados a la raíz de *T. latifolia*, que le confieren la capacidad de tolerar la presencia de plomo, se aislaron bacterias presentes en la rizósfera en medio LB con 5 ppm de Pb, obteniendo aproximadamente 1×10^7 UFC/gr de suelo. Para verificar la tolerancia a Pb, las bacterias fueron resembradas tres veces en Lb 5 ppm Pb (Figura 1). Posterior a las resiembras se obtuvieron 44 aislados de la rizósfera y 14 del suelo adherido, capaces de crecer en medio con Pb. Estos resultados demuestran que en la rizósfera de *T. latifolia* se encuentran bacterias tolerantes a Pb, las cuales podrían estar involucradas en la tolerancia de la planta a los metales pesados.

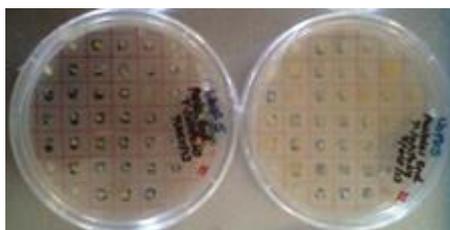
Figura 22 Aislados bacterianos capaces de crecer en medio Lb 5 ppm Pb A) Aislados de la rizósfera, B) Aislados del suelo adherido a las raíces



Aislamiento de endófitos de la raíz

En lo que respecta al aislamiento de endófitos de la raíz de *T. latifolia*, primeramente se evaluaron varios tratamientos con antisépticos para la desinfección de las raíces, resultando más eficiente el tratamiento con etanol al 70% durante 5 minutos y Cloralex® al 2% por 10 min, seguido de tres lavados con agua destilada estéril. Después del proceso de desinfección, se realizó la cuantificación de la carga microbiana de las raíces, encontrándose 3.6×10^6 UFC/gr de raíz que son capaces de crecer en medio LB suplementado con 5 ppm de Pb. Los aislados obtenidos se resembraron en las mismas condiciones para comprobar su tolerancia al Pb, obteniéndose 42 aislados endófitos (Figura 2).

Figura 22.1 Aislados endófitos capaces de crecer en medio Lb 5 ppm Pb



Identificación de aislados con capacidad de utilizar pectina

Los aislados bacterianos endófitos, se inocularon en medio mínimo de sales NBRIP con pectina como única fuente de carbono y como control de crecimiento bacteriano se utilizó el medio NBRIP con glucosa como fuente de carbono. La pectina es una sustancia presente en la pared celular de las células vegetales. Se compone de un complejo de polímeros ramificados del tipo de los carbohidratos. La pectina no solo está presente en la pared celular primaria, sino también en la lámina media entre las células de la planta, donde ayuda a las células a mantenerse juntas.

Los resultados muestran que los 42 aislados son capaces de crecer en medio suplementado con glucosa, mientras que sólo 37 de los aislados son capaces de crecer en el medio suplementado con pectina, indicando que las bacterias son capaces de utilizar pectina como única fuente de carbono. Estos datos sugieren que el 88 % (37/42) de los aislados endófitos producen enzimas tipo pectinasa para la degradación de la pectina. Los microorganismos endófitos, bacterias u hongos, tienen la capacidad de invadir los tejidos de plantas sin causar infección o síntomas de enfermedad. En este sentido deben poseer las enzimas necesarias para penetrar y atravesar la pared celular, formada por celulosa y pectina; y además deben tener las enzimas para utilizar los nutrientes presentes en la raíz (Pérez y Chamorro 2012).

Identificación de aislados con capacidad de solubilizar fosfatos

Los microorganismos están involucrados en procesos que afectan la transformación del fósforo (P) del suelo y son componentes integrales del ciclo del P. Los microorganismos participan en la solubilización del fosfato inorgánico y en la mineralización del fosfato orgánico, así como en su inmovilización (Paredes-Mendoza y Espinoza-Victoria 2010).

Para determinar la capacidad de los aislados endófitos de las raíces para solubilizar fosfatos, se crecieron en medio NBRIP, el cual contiene fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ como fuente insoluble de fósforo y azul de bromofenol como indicador. Los resultados obtenidos muestran que 57% (24/42) de los aislados endófitos son capaces de virar el color del indicador del medio de cultivo NBRIP, formando un halo amarillo alrededor de la colonia, lo cual indica que las bacterias disminuyen el pH. De esta manera la acidificación del medio de cultivo favorece la solubilización del $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, haciendo disponible el fosfato para las bacterias (Figura 3).

Figura 22.2 Aislados endófitos cultivados en medio NBRIP. El halo claro alrededor de la colonia indica que son bacterias con capacidad solubilizadora de fosfatos



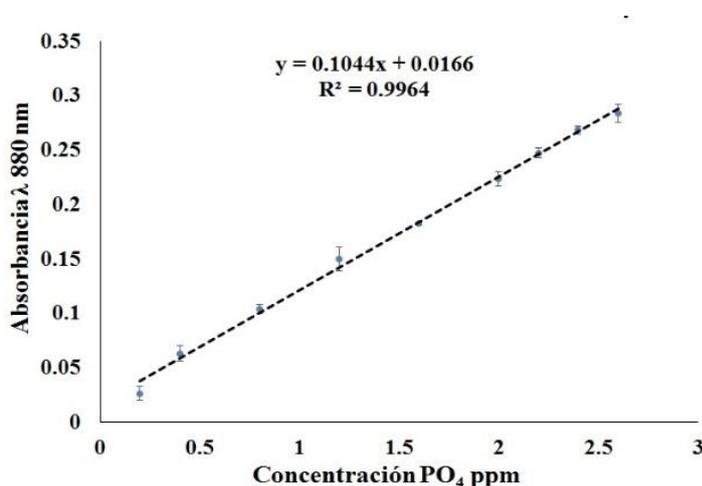
En general, se acepta que el mecanismo más común de solubilización del fosfato mineral es la acción de ácidos orgánicos sintetizados por los microorganismos (Paredes-Mendoza y Espinoza-Victoria 2010). La producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular es uno de los mecanismos utilizados por las bacterias para la solubilización del fosfato del suelo, contribuyendo a la biodisponibilidad del fósforo para la nutrición de las plantas.

Existen evidencias que demuestran la capacidad solubilizadora de fosfatos de los ácidos: oxálico, cítrico, butírico, malónico, láctico, succínico, málico, glucónico, acético, glicónico, fumárico, adípico, indolacético y 2-cetoglucónico; los cuales son producidos por diferentes bacterias. Además se ha sugerido que éstos compuestos participan en el suelo en fenómenos como la quimiotaxis microbiana y la detoxificación de metales. Entre los géneros bacterianos con capacidad para producir ácidos orgánicos que solubilizan fosfato se encuentran: *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Aereobacter*, *Flavobacterium*, *Yarrowia*, *Streptosporangium* y *Erwinia*⁵.

Cuantificación de la capacidad solubilizadora de fosfato

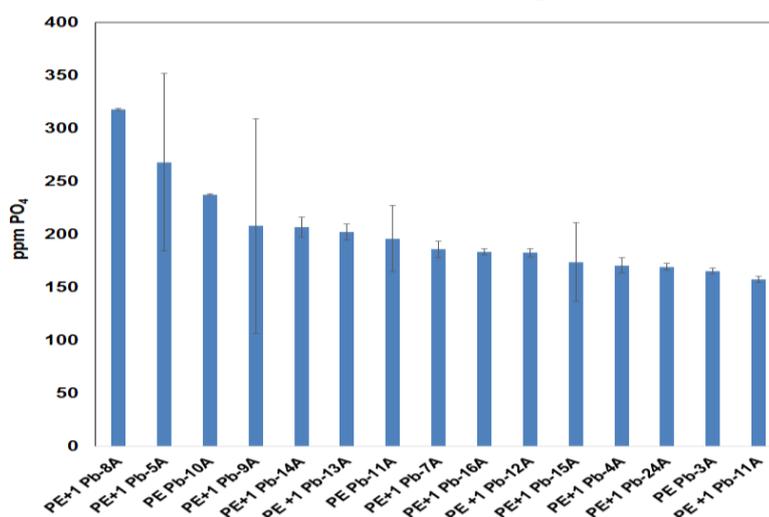
Para determinar los niveles de solubilización de fosfatos, se realizó una curva de calibración de 0 a 2.5 ppm de PO_4 mediante el método espectrofotométrico de fosfomolibdato. Los datos obtenidos se graficaron obteniendo un valor de $R^2 = 0.9964$, mientras que la ecuación de la recta $y = 0.1044x + 0.0166$ (Figura 4).

Grafico 22 Curva de calibración de PO_4 mediante el método de fosfomolibdato



Posteriormente se evaluó la capacidad de solubilización de 15 aislados bacterianos que mostraron mayor diámetro del halo en los análisis cualitativos. Los resultados de los análisis cuantitativos de la solubilización de fosfato indican que los aislados de *T. latifolia* solubilizan fosfatos en un rango de 157 a 317 ppm, a partir $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Tabla 1) (Figura 5). Dicha capacidad es comparable a la obtenida por otras bacterias rizosféricas aisladas de maíz por Alam et al. (2002) y de arroz (*Oryza sativa* L.) por Thakuria et al. (2004).

Grafico 22.1 Aislados bacterianos con capacidad de solubilizar PO_4



Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de Pb

Las bacterias son los organismos más abundantes en la naturaleza, las cuales al estar en contacto con contaminantes tales como los metales pesados, desarrollan mecanismos para contrarrestar los efectos tóxicos. Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de Pb, los aislados bacterianos obtenidos de *T. latifolia*, fueron crecidos en medio medio LB adicionado con 250, 125, 62.5, 31.25, 15.6 y 7.8 ppm de Pb.

Los resultados muestran que el aislado PE+1 Pb-13A es el más sensible a Pb, mientras que los aislados más resistentes PE+1 Pb-8A, PE+1 Pb-5A, PE Pb-10A, PE+1 Pb-9A, PE+1 Pb-14A y PE+1 Pb-16A, los cuales son capaces de crecer a 250 ppm de Pb, sugiriendo que la CMI es superior a esta concentración (Tabla 1). Por lo cual es necesario evaluar concentraciones más elevadas de Pb, ya que en algunos casos se han aislado bacterias con CMI de 800 ppm de Pb (Nath et al. 2012).

Las interacciones entre las bacterias y los metales son conocidas y pueden ocurrir a nivel extracelular, en la superficie bacteriana ó intracelularmente. A nivel extracelular, se ha determinado el papel de los microorganismos en la movilización e inmovilización de metales, así como la secreción de compuestos orgánicos de bajo peso molecular con alta afinidad por estos elementos (sideróforos). Las interacciones con la superficie celular dependen del tipo de bacteria, ya que el metal interactúa con los grupos específicos cargados negativamente en cada uno de ellos. A nivel intracelular, como consecuencia de la acumulación del metal ocurren transformaciones ó la síntesis de proteínas específicas conocidas como metalotioninas. Así mismo se ha sugerido que las bacterias tienen la capacidad para utilizar algunos metales como fuente de energía o aceptores finales de electrones en el metabolismo (Suárez y Reyes 2002).

Tabla 22 Aislados bacterianos de *T. latifolia*, con capacidad de solubilizar fosfatos

Clave aislado bacteriano	Solubilización ppm PO ₄	CMI ppm Pb
PE+1 Pb-8A	317	>250
PE+1 Pb-5A	268	>250
PE Pb-10A	237	>250
PE+1 Pb-9A	207	>250
PE+1 Pb-14A	207	>250
PE +1 Pb-13A	202	125
PE Pb-11A	195	250
PE+1 Pb-7A	185	250
PE+1 Pb-16A	183	>250
PE +1 Pb-12A	182	250
PE+1 Pb-15A	173	250
PE+1 Pb-4A	170	250
PE+1 Pb-24A	169	250
PE Pb-3A	165	250
PE +1 Pb-11A	157	250

22.3 Conclusiones

En la rizósfera de *T. latifolia* se encuentran bacterias tolerantes a Pb, las cuales son capaces de crecer en medio con 250 ppm de Pb, así como utilizar pectina como fuente de carbono y solubilizar fosfatos. Dichas actividades microbianas podrían contribuir a la adaptación de la planta a los sitios impactados por metales.

22.4 Agradecimientos

Al CONACYT Proyecto 000205822 INFR-2013-01; Fondo de Apoyo a la Investigación C14-FAI-04-04.04 de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí por los apoyos otorgados para realizar esta investigación.

22.5 Referencias

Alam S, S Khalil, N Ayub, M Rashid (2002). *In vitro* solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) from maize rhizosphere. *Int J Agric Biol* 4:454-458.

Alonso-Castro AJ, Carranza-Álvarez C, Alfaro-de la Torre MC, Chávez-Guerrero L, García-De la Cruz RF (2009). Removal and accumulation of cadmium and lead by *Typha latifolia* exposed to single and mixed metal solutions. *Arch Environ Contam Toxicol* 57: 688-696.

Bashan Y (1998). Inculcants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol Adv* 16:729-770.

Cañizares, RO (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 42, 131-143.

Carranza-Álvarez C, Alonso-Castro AJ, Alfaro-De La Torre MC, García-De La Cruz RF (2008). Accumulation and distribution of heavy metals in *Scirpus americanus* and *Typha latifolia* from an artificial lagoon in San Luis Potosí, México. *Water Air Soil Pollut* 188: 297-309.

Cos P, Vlietinck AJ, Vanden BD, Maes L (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stroger in vitro proof-of-concept. *J Ethnopharmacol* 106:290-302.

Leura-Vicencio A, Alonso-Castro AJ, Carranza-Álvarez C, Loredó-Portales R, Alfaro de la Torre MC (2013). Removal and accumulation of As, Cd and Cr by *Typha latifolia*. *Bull Environ Contam Toxicol* 90(6): 650-653.

Montante-Montelongo AD (1998). Estudio geoquímico de metales traza en una laguna artificial de aguas residuales. Tesis de Maestría UASLP.

Nath S, Deb B, Sharma I (2012). Isolation and characterization of cadmium and lead resistant bacteria. *Global Advanced Research Journal of Microbiol* 1(11):194-198.

Paredes-Mendoza M, Espinoza-Victoria D (2010). Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: Una revisión crítica. *Terra Latinoamericana* 28(1):61-70.

Pérez CA, Chamorro AL (2012). Bacterias endófitas: Una alternativa biológica para el control de *Burkholderia glumae* en el cultivo de arroz en Colombia. *Rev Col Cien Anim* 4(1):172-184.

Sarabia-Ochoa M, Madrigal-Pedraza R, Martínez-Trujillo M, Carreón-Abud Y (2010). Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Biológicas* 12(1):65-71.

Suárez P, Reyes R (2002). La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia para el ambiente. *Interciencia* 27(4):160-164.

Tejada, G J (2000). Diseño de un humedal para la remoción de Cd, As y Cr con plantas de *Typha latifolia* (Espadaña). Tesis de Maestría UASLP.

Thakuria D, N C Talukdar, C Goswani, S Hazarika, R C Boro, M R Khan (2004) Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. *Curr Sci* 86:978-985

Yang-feng Z, Lin-yan H, Zhao-jin Ch, Qing-ya W, Meng Q, Xia-fang S (2011). Characterization of ACC deaminase-producing endophytic bacteria isolated from copper-tolerant plants and their potential in promoting the growth and copper accumulation of *Brassica napus*. *Chemosphere* 83: 57-62.

Zhuang X, Chen J, Shim H, Bai Z (2007). New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environ Int* 33:406-413.