



Fitoestabilización de metales pesados en sedimentos costeros asistida por bacterias rizosféricas

Tesis Doctoral

Karina Inés Paredes Páliz

Sevilla, 2017

Introducción

1. Contaminación mundial: panorama pasado y actual.

Las actividades humanas siempre han generado residuos. Esto no fue un inconveniente importante cuando la población era relativamente pequeña y nómada, pero se convirtió en un problema serio con la urbanización y el crecimiento de las grandes aglomeraciones urbanas. La mala gestión de los residuos condujo a la contaminación del agua, el suelo y la atmósfera y a un importante impacto en la salud pública. En la Edad Media, las epidemias asociadas con el agua contaminada con patógenos diezmaron la población de Europa y aún más recientemente (siglo XIX), el cólera era una ocurrencia común. Algunos de los impactos directos de la mala gestión de los residuos sobre la salud son bien conocidos y se pueden observar sobre todo en los países en vías de desarrollo (Giusti, 2009).

Las características de los contaminantes evolucionaron en línea con los cambios en el estilo de vida, y el número de nuevas sustancias químicas presentes en los diversos flujos de residuos se incrementaron dramáticamente. Es por esto que a medida que la ciencia y la tecnología han ido desarrollándose, también se ha incrementado la necesidad de buscar herramientas que permitan manejar los desechos y buscar alternativas para la remoción de contaminantes; procesos que resultan complejos debido a que deben envolver actividades organizadas, especializadas y respetuosas con el medio ambiente.

El incremento en la conciencia pública y la preocupación acerca de estado del medio ambiente mundial y local que ha ocurrido en las últimas décadas se ha visto acompañado, y en parte impulsado, por un número cada vez mayor de pruebas que evidencian la severa degradación ambiental a causa de la contaminación. Se ha visto que la introducción de sustancias nocivas en el medio ambiente tiene varios efectos adversos sobre la salud humana, producción agrícola y ecosistemas naturales (Alloway y Ayres, 1997; Benach et al., 2004; Nagajyoti et al., 2010; Wuana y Okieimen, 2011).

Para la vida de todas las especies es indispensable un equilibrio ecológico que se establece en base a la relación existente entre los individuos y el medio ambiente. La actividad dinámica del ecosistema viene determinada por una combinación de factores físicos, químicos y biológicos. Si estos factores se modifican, se producirá una alteración de las

condiciones ambientales y, en consecuencia, se llegará a una situación adversa para la vida ya establecida que incidirá también sobre el ser humano.

2. Contaminación Ambiental

La acumulación en el medio ambiente de sustancias tóxicas afecta a la salud de millones de personas en todo el mundo (EPA, 1998). Con frecuencia, la estructura química de estos contaminantes no se corresponde con la de ningún compuesto existente anteriormente, por lo que se denominan xenobióticos, como, por ejemplo, policlorobifenilos, policlorodioxinas y colorantes azoicos. En otros casos, los contaminantes son productos naturales que han sido movilizados y/o acumulados en formas tóxicas, como los hidrocarburos presentes en los combustibles fósiles o los metales pesados que forman parte de los minerales.

Los tóxicos orgánicos, cuyo número crece en consonancia con el desarrollo industrial y técnico, se encuentran entre los productos químicos que más contaminan el medio ambiente. Gran parte de estos productos pueden ser metabolizados a sustancias de menor toxicidad por algunos organismos del medio. Sin embargo, debido a su intensiva utilización en la industria, a actividades antropogénicas y a la existencia de productos cuya toxicidad aconseja su rápida eliminación del medio, se trata de un grupo de contaminantes de importancia relevante (Lohmann et al, 2007).

A diferencia de la biodegradación de tóxicos orgánicos, los elementos básicos que contaminan suelos, aguas y aire, como metales pesados (mercurio, zinc, cadmio, cobre, etc.), metaloides (arsénico) y radioisótopos, no pueden degradarse debido a su naturaleza elemental (Meagher y Heaton, 2005; Wuana y Okieimen, 2011). Se inicia entonces un proceso acumulativo, que llevará a la persistencia de los tóxicos en el ambiente, convirtiéndolos en especialmente dañinos (Penget al., 2009).

Los costos de estos efectos en la depreciación de los recursos, pérdida de productividad y limpieza o mejoramiento de medio ambientes contaminados son altos y continúan incrementándose, ocupando la atención de gobiernos y políticos a nivel mundial, especialmente en países con un elevado avance tecnológico (Kalia et al., 2008; Banerjee et al., 2011; Mandal et al., 2012; Pajuelo et al., 2014).

En los Estados Unidos de América, el organismo encargado de declarar como tóxica a una sustancia determinada es la Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (ATSDR), dependiente de la EPA, que se encarga de elaborar la lista de las 500 sustancias más tóxicas para la biósfera, en base a criterios de persistencia, bioacumulación, toxicidad y biodisponibilidad (en el caso de los metales). Los compuestos denominados PBT (persistent bioaccumulative toxic chemicals) están entre los que se consideran más nocivos tanto para la salud humana como para el medio ambiente.

Hablando puntualmente de España, es el Registro Estatal de Emisiones y Fuentes Contaminantes (PRTR-España) el organismo encargado de poner a disposición del público información sobre las emisiones a la atmósfera, al agua y al suelo de las sustancias contaminantes y datos de transferencias de residuos de las principales industrias y otras fuentes puntuales y difusas, de acuerdo a lo establecido en la legislación internacional (Protocolo de Kiev y convenio de Aarhus). Dicho organismo monitorea las emisiones de 91 sustancias consideradas como contaminantes según el reglamento del Parlamento Europeo y el Consejo de la Unión Europea. Estas sustancias contaminantes pueden agruparse en distintas categorías según sus afecciones tanto al medio ambiente como a la salud (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de las sustancias contaminantes según el Registro Estatal de Emisiones y Fuentes Contaminantes de España, 2016.

Gases de efecto invernadero (GEI)	Metales pesados
Compuestos orgánicos persistentes (COP)	Sustancias que agotan la capa de ozono
Sustancias acidificantes / eutrofizantes / precursoras de ozono	Pesticidas
Otras sustancias	

3. Contaminación del suelo

El suelo es una parte fundamental de los ecosistemas terrestres, y por tanto, condiciona todo el desarrollo de los mismos. Por ello, el año 2015 fue declarado como el Año Internacional

de los Suelos por la Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2015). Como consecuencia, es uno de los medios receptores de contaminación más sensibles y vulnerables. Asimismo, al tratarse del sistema donde los seres humanos desarrollan su actividad, es evidente que se trata de uno de los que más contaminación recibe, aumentando el número de zonas contaminadas como consecuencia de la actividad industrial y desastres ecológicos (Neamțu et al., 2012). La contaminación del suelo se define como la acumulación en los suelos de compuestos tóxicos persistentes, productos químicos, sales, material radioactivo y agentes causantes de enfermedades, los cuales pueden tener efectos adversos sobre el crecimiento vegetal y salud animal (Patra y Sharma, 2000; Semple et al., 2001; Bastida et al., 2008; Khan et al., 2008).

La rápida industrialización y urbanización, las emisiones y minería desenfrenada, el vertido de aguas no controlado, la aplicación de aguas residuales para el riego, el uso a largo plazo de plaguicidas en las últimas décadas, están convirtiendo la contaminación del suelo en un problema mundial, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. La acumulación de metales en el suelo debido a un mal manejo de desechos, afecta negativamente al medio natural y agrario, las aguas subterráneas, sedimentos, seguridad alimentaria y desarrollo sustentable (Kirchmann y Thorvaldsson, 2000; Li y Thornton, 2001; Liu y Diamond, 2005).

Los investigadores están haciendo un buen progreso con el desarrollo de nuestra comprensión de muchos temas relacionados con el suelo, tales como el sellado del suelo, la erosión y la contaminación. Sin embargo, existe una falta de información que documente el verdadero impacto a largo plazo de los contaminantes del suelo sobre el medio ambiente y la salud humana.

3.1 Suelos en Europa

Los recursos del suelo en Europa son diversos. Suelos relativamente jóvenes dominan el norte y centro de Europa, y los suelos del norte de Europa tienden a tener un mayor contenido de materia orgánica que los del sur. Los suelos poco desarrollados o con acumulación de carbonato de calcio son característicos de la cuenca mediterránea (Comisión Europea, 2012).

Pese a su importancia para nuestra sociedad, a diferencia del aire y agua, no existe una legislación europea específica que se centre en la protección del suelo. Sin embargo, varias políticas en materia de agua, residuos, productos químicos, contaminación industrial, cuidado de la naturaleza, pesticidas y agricultura, contribuyen en la protección del suelo. Por esta razón, la Comisión Europea ha adoptado la Estrategia Temática del Suelo (Commission Communication COM (2006) 231), que enfatiza la protección del suelo, con particular relevancia el suelo contaminado.

Tras más de 200 años de industrialización, la contaminación del suelo es un problema muy extendido en Europa. Los contaminantes más frecuentes son metales pesados y aceite mineral (Figura 1). De acuerdo con estimaciones de la Agencia Medioambiental Europea (EEA, 2007), el número de sitios donde actividades potencialmente contaminantes se han llevado a cabo en la UE es de aproximadamente tres millones y, de éstos, un estimado de 250.000 sitios pueden necesitar una urgente remediación. Las principales causas de la contaminación son actividades industriales pasadas y actuales, así como la eliminación y tratamiento de residuos, pero estas categorías varían ampliamente en toda Europa.

La contaminación por metales pesados y contaminantes orgánicos es probablemente el problema más grave debido a que es una situación prácticamente irreversible. La contaminación puede afectar a la salud humana, ya sea por contacto directo o por ingestión a través de la cadena alimenticia. Es por esta razón que, en países desarrollados, la legislación obliga a la recuperación de suelos y aguas contaminados usando métodos para disminuir su concentración en la biósfera.

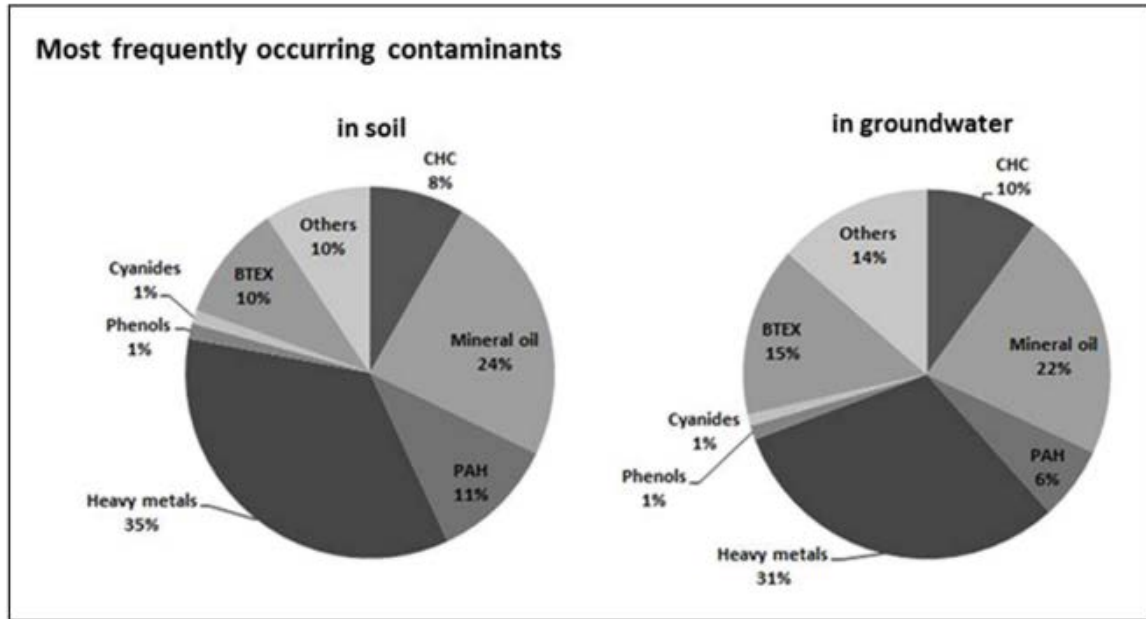


Figura 1. Contaminantes más frecuentes en los países Europeos (Huber y Prokop, 2012).

4. Contaminación por metales pesados

Los metales pesados se definen como elementos metálicos que tienen una densidad superior a 5 g / cm^3 (Nies y Silver, 2007). Debido a que se cree que el peso y la toxicidad de los metales pesados están interrelacionados, con frecuencia se consideran conjuntamente también metaloides tales como el arsénico, que son capaces de inducir toxicidad aún en niveles bajos de exposición (Duffus, 2002).

La contaminación por metales pesados se refiere al depósito excesivo de metales pesados tóxicos en el suelo causado por actividades humanas. En los últimos años, ha habido un incremento en la preocupación a nivel ecológico y de salud humana relacionada con la contaminación ambiental por estos metales debido al ingreso de los mismos en la cadena alimenticia (Bradl, 2002; Raju et al., 2013; Prajapati y Meravi, 2014; Sayadi y Rezaei, 2014; Zojaji et al., 2014). A pesar que los metales pesados son elementos naturales que se encuentran en toda la corteza terrestre, la mayor parte de la contaminación ambiental resulta de actividades antropogénicas como la minería y fundición, producción industrial, usos domésticos y agrícolas de metales y compuestos que contienen metales, entre otros

(Shallari et al., 1998; He et al., 2005). Una vez que el suelo sufre una contaminación ambiental por metales pesados, es muy difícil que sea remediado.

Los metales pesados se pueden dividir en dos grupos: oligoelementos o micronutrientes y metales sin función establecida o conocida. Los primeros son requeridos en pequeñas cantidades por los seres vivos y algunos son necesarios para que los organismos completen su ciclo vital; pasados cierto umbral se vuelven tóxicos. Dentro de este grupo están: zinc (Zn), cobre (Cu), níquel (Ni), boro (B), cobalto (Co), cromo (Cr), molibdeno (Mo), manganeso (Mn), selenio (Se), estaño (Sn) y vanadio (V).

En el segundo grupo se encuentran metales pesados, metales ligeros y metaloides, cuya presencia en determinadas cantidades lleva aparejadas disfunciones en los seres vivos. Aquí tenemos principalmente a: mercurio (Hg), cadmio (Cd), plomo (Pb), arsénico (As), aluminio (Al), antimonio (Sb) y bismuto (Bi) (Cánovas et al., 2003; Nies y Silver, 2007).

Los metales pesados también provocan graves daños en las comunidades microbianas en el suelo, ya que reducen la biomasa microbiana total y el tamaño de las poblaciones de grupos microbianos con funciones específicas (Zhuang et al., 2007). Concentraciones altas de metales pesados (esenciales o no) en el suelo, pueden causar síntomas de toxicidad en los seres vivos, e incluso, inhibir su crecimiento. La aparición de estos problemas se fundamenta en interacciones a nivel celular o molecular, ya que se unen a los grupos sulfhidrilo de las proteínas, provocando inhibición de su actividad o cambio de su estructura, o porque desplazan o sustituyen a otro elemento esencial, particularmente como cofactores de enzimas o proteínas transportadoras (Gadd and Griffiths, 1997). Además, inhiben procesos fundamentales como la transcripción y la traducción, y provocan daños en la membrana y el ADN (Jomova y Valko, 2012). Finalmente, el exceso de metales pesados estimula la formación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno, desembocando en estrés oxidativo (Hossain et al., 2012).

4.1 Toxicidad y mecanismos de metales individuales

4.1.1 Plomo

El plomo es un metal persistente que se utiliza comúnmente en varios procesos industriales. Se utiliza en pinturas y pigmentos, en baterías de coches, en soldaduras, revestimientos, tuberías, municiones, etc. y en medicina, como protección frente a radiaciones. Se encuentra formando, principalmente, complejos con sulfuros, lo que hace que tenga una baja solubilidad haciendo que su disponibilidad en los sistemas vivos sea baja. Es tóxico para los sistemas vivos y puede permanecer en el ambiente durante un período prolongado de tiempo debido a su persistencia. Aparece como un metal libre en diversos compuestos. El plomo es un xenobiótico extendido por todo el medio ambiente y peligroso para los seres humanos y los diversos ecosistemas (Watson et al., 2005). La exposición al plomo ocurre principalmente por fuentes antropogénicas debido a su uso generalizado. Su entrada a los seres humanos se da principalmente por la ingestión a través de la boca y la inhalación de humos y polvo en la atmósfera (El-Nekeety et al., 2009). La forma en la que existe el plomo determina cuán tóxico está en el medio ambiente. Compuestos orgánicos de plomo, que son principalmente de enlaces covalentes, exhiben efectos toxicológicos distintos a las sales de plomo como el acetato.

En la lista de sustancias prioritarias que confecciona la Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades, el plomo ocupa la posición número 2, siendo, por tanto, el elemento más tóxico después del arsénico (ATSDR, 2014). La toxicidad del plomo se debe a su habilidad para competir o sustituir a otros cationes divalentes (calcio, zinc y magnesio) que realizan funciones biológicas. La facilidad con que este metal pesado entra en la célula y se distribuye por el organismo se debe también a la misma habilidad anterior, ya que utiliza los sistemas de transporte de metales necesarios para el organismo (Garza et al., 2006). Varios estudios vinculan compuestos inorgánicos de plomo a una mayor incidencia de enfermedades en diversos organismos. La toxicidad del plomo está relacionada con la incidencia de trastornos neurológicos, hipertensión, deterioro cognitivo, etc. (Patrick, 2006). Chen et al. (2012) informaron que la exposición de dosis bajas de plomo altera el desarrollo normal del pez cebra como resultado de una toxicidad embrionaria, además de alteración del comportamiento, aprendizaje y déficit de memoria. En otro estudio se observó una elevada mortalidad de lombrices con la pérdida de peso significativa y la inhibición de la reproducción en una exposición a > 2000 mg Pb / kg de peso seco (Luo et al., 2014). Estudios hechos por Gargouri et al. (2013), indican que la exposición de células

renales HEK293 al plomo han provocado la disminución de la viabilidad celular, la distorsión celular, la pérdida de la cohesión, la producción de aniones superóxido, y la peroxidación de lípidos. El plomo interrumpe la activación de enzimas, inhibe la absorción de oligoelementos, detiene la síntesis de proteínas estructurales y disminuye las reservas antioxidantes en el cuerpo (Ercal et al., 2001; Patrick, 2006). La homeostasis del calcio se altera en ratones bajo la exposición a Pb (Zhang et al., 2013), mientras que el riñón sirve como el órgano principal de la toxicidad de la exposición a sales de Pb (Agrawal et al., 2014). El epitelio de los túbulos del riñón es el principal órgano de carcinogenicidad, como resultado de la exposición a las sales de Pb en animales (Spector et al., 2011).

Los microorganismos han desarrollado mecanismos de resistencia frente al plomo, que incluyen expulsión fuera de la célula mediada por el operón *pbr* (Borremans et al., 2001), complejación con metalotioneínas, precipitación como sulfuro y adsorción a la superficie celular (Resing y Mitra, 2007).

4.1.2 Mercurio

El mercurio es una sustancia medioambiental ubicua que tiene la capacidad de causar efectos adversos para la salud y la vida humana. Se utiliza en minería (extracción de oro y plata), en la producción de químicos de cloro-álcali, en manómetros y termómetros, en lámparas fluorescentes, y como amalgamas dentales, aleado con otros metales. Usualmente ingresa en los seres humanos a través de la ingestión y la inhalación de alimentos contaminados con Hg, así como por medio del agua y aire. El mercurio está presente en formas orgánicas, inorgánicas y como elemento (Carocci et al., 2014). Perteneció al mismo grupo de tabla periódica junto con el Zn y Cd. Es el único metal líquido a temperatura ambiente y por lo general se recupera como subproducto del procesamiento mineral (Smith y Brauning, 1995).

La liberación de Hg a partir de la combustión del carbón, así como emisiones procedentes de tuberías de gas y petróleo, constituyen fuentes importantes de contaminación. El potencial redox y el pH del sistema determinan las formas estables del Hg. Cuando existe un mínimo de condiciones reductoras, el mercurio orgánico e inorgánico puede reducirse a mercurio elemental, que a su vez puede convertirse en formas alquiladas por procesos

bióticos o abióticos. El mercurio es mayormente tóxico en sus formas alquiladas, las cuales son solubles en agua y volátiles en aire (Smith y Brauning, 1995). Según la Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades, el mercurio ocupa la posición número 3, después del arsénico y plomo (ATSDR, 2014).

El mercurio (II) forma complejos fuertes con una variedad de ligandos tanto orgánicos como inorgánicos, haciéndolo bastante soluble en sistemas acuáticos oxidados (Bodek, 1998).

La adsorción a los suelos, sedimentos y materiales húmicos son mecanismos importantes para la eliminación de Hg de una solución. La adsorción es dependiente del pH y aumenta a medida que el pH aumenta. El mercurio también puede ser eliminado de la solución por la co-precipitación con sulfuros. En condiciones anaeróbicas, también las formas orgánicas como inorgánicas de Hg se pueden convertir a las formas alquiladas gracias a actividades microbiana como es el caso de las bacterias sulforreductoras (Shao et al., 2012). El mercurio elemental puede formarse también en condiciones anaerobias por desmetilación del metilo-mercurio, o por reducción de Hg (II). Condiciones ácidas (pH <4) también favorece la precipitación del HgS (s).

La exposición al mercurio orgánico (MeHg) está vinculado al retraso mental, parálisis cerebral, sordera, ceguera, y disartria, especialmente en los niños expuestos en el útero o *in utero* sin tilde y en cursiva. El mercurio además está asociado con el daño renal (Scragg, 2006; Golding et al., 2013; Boucher et al., 2014).

4.1.3 Arsénico

El arsénico es un metaloide que se produce en una amplia variedad de minerales, principalmente como As₂O₃, y puede ser recuperado del procesamiento de minerales que contienen en su mayoría Cu, Pb, Zn, Ag y Au. También está presente en las cenizas procedentes de la combustión del carbón. Sus usos principales son como preservante de la madera, en aleaciones con otros metales, como material semiconductor, en la construcción de diodos láser y LED, como decolorante en la fabricación del vidrio, como insecticida, herbicidas, etc. Exhibe una química bastante compleja y puede estar presente en varios estados de oxidación (-III, 0, III, V) (Oremland y Stolz, 2003; Bhattacharya et al., 2007).

En ambientes aeróbicos, As (V) es dominante, por lo general en el forma de arseniato (AsO_4^{3-}) en varios estados de protonación: H_3AsO_4 , H_2AsO_4^- , HAsO_4^{2-} , y AsO_4^{3-} . Arseniato y otras formas aniónicas de arsénico se comportan como quelatos y pueden precipitar cuando los cationes metálicos están presentes (Oremland y Stolz, 2003; Bhattacharya et al., 2007). Los complejos metal- arseniato son estables sólo bajo ciertas condiciones.

El arsénico (V) también puede coprecipitar con/o adsorberse en hierro oxihidróxidos bajo condiciones ácidas y reductoras moderadamente. Los coprecipitados son inmóviles en estas condiciones, pero la movilidad del arsénico aumenta a medida que aumenta el pH (Moreno-Jiménez et al., 2012). Bajo condiciones de reducción, el As (III) se presenta como arsenito (AsO_3^{3-}) y sus formas protonadas H_3AsO_3 , H_2AsO_3^- , y HAsO_3^{2-} . El arsenito puede adsorber o coprecipitar con sulfuros metálicos y tiene una alta afinidad por otros compuestos de azufre (Moreno- Jiménez et al., 2012).

El arsénico elemental y arsina (AsH_3), pueden estar presentes bajo condiciones reductoras extremas. La biotransformación (metilación a través) de arsénico crea derivados metilados de arsina, tales como la dimetil arsina $\text{HAs}(\text{CH}_3)_2$ y tri metil arsina $\text{As}(\text{CH}_3)_3$, que son altamente volátiles. A partir de que el arsénico está a menudo presente en forma aniónica, no forma complejos con aniones simples tales como Cl^- y SO_4^{2-} . También incluye formas organometálicas tales como: ácido metilar sénico (CH_3) AsO_2H_2 y dimetilar sénico (CH_3) $_2$ AsO_2H . Muchos de estos compuestos se adsorben fuertemente al suelo y por lo tanto sólo se transportan a través de distancias cortas en las aguas subterráneas y el agua superficial. El arsénico se asocia con daños en la piel, aumento del riesgo de cáncer, y los problemas con el sistema circulatorio (Scragg, 2006).

El As es la sustancia más tóxica (con el número 1) considerada en la lista ASTDR elaborada por la EPA. Los efectos tóxicos del arsénico están relacionados precisamente con su estado de oxidación, siendo el arsenito la forma química más tóxica, seguida por el arseniato y los compuestos metilados de arsénico (Tripathi et al., 2012). El arsénico es letal para la mayoría de los microorganismos, aunque varios poseen mecanismos para el transporte y detoxificación de los compuestos arsenicales (Bhattacharjee y Rosen, 2007b).

Un número importante de bacterias tienen la capacidad de detoxificar el arsénico. Se trata de cepas seleccionadas que poseen determinantes genéticos que confieren la capacidad de tolerar altos niveles de arsénico en el medio ambiente (Rosen, 2002; Mateos et al., 2010; Patel et al., 2007).

4.1.4 Zinc

El zinc es un metal de transición que se produce naturalmente en el suelo (alrededor de 70 mg kg⁻¹ de la corteza terrestre) (Davies y Jones, 1988), pero las concentraciones de Zn están aumentando de forma no natural, debido a influencia antropogénica. La mayoría Zn se añade durante las actividades industriales como la minería, el carbón, y los residuos de combustión y transformación del acero, en la metalurgia de metales preciosos y eliminación de la plata del plomo. Las principales aplicaciones del zinc son el galvanizado del acero, en la industria aeroespacial para misiles y cápsulas espaciales y en baterías zinc-aire para computadoras portátiles, así como en la industria de automoción. Muchos productos alimenticios contienen ciertas concentraciones de Zn. El agua de beber también contiene ciertas cantidades de Zn, que puede ser mayor cuando se almacena en tanques de metal. Las fuentes industriales o sitios de desechos tóxicos pueden causar que las concentraciones de Zn en agua potable lleguen a niveles que pueden causar problemas de salud (Adriano, 2001; Wuana y Okieimen, 2011).

El zinc es un oligoelemento que es esencial para la salud humana. La escasez de zinc puede causar defectos de nacimiento. La producción de Zn en el mundo está todavía en aumento lo que significa que cada vez más Zn termina en el medio ambiente (Resing y Mitra, 2007). El agua está contaminada con Zn debido a la presencia de grandes cantidades presentes en las aguas residuales de plantas industriales. Como consecuencia de esto, el lodo contaminado por Zn continuamente está siendo depositado en los ríos y en sus alrededores. El zinc también puede aumentar la acidez de las aguas. Algunos peces pueden acumular Zn en sus cuerpos cuando viven en los cursos de agua contaminados con Zn. Cuando Zn entra en los cuerpos de estos peces, es capaz de alcanzar una biomagnificación en la cadena alimenticia. El zinc soluble en agua que se encuentra en los suelos puede contaminar las aguas subterráneas.

Las plantas a menudo tienen una absorción de Zn que sus sistemas no pueden manejar debido a la acumulación de Zn en los suelos. Por último, el Zn puede interrumpir la actividad en los suelos, ya que influye de forma negativa en la actividad de los microorganismos y lombrices de tierra, retardando así la descomposición de materia orgánica (Greany, 2005). El Zn ocupa la posición número 75 en la lista de las sustancias más tóxicas de acuerdo con la ASTDR.

4.1.5 Cobre

El cobre es el tercer metal más utilizado en el mundo (VCI, 2011). Se utiliza, entre otros usos, en electricidad y telecomunicaciones, medios de transporte (automóviles, trenes, aviones, barcos e incluso en vehículos espaciales), en construcción, tuberías, ornamentación, fabricación de monedas, como abono y pesticida en agricultura, alguicida en la depuración del agua y como conservante de la madera. Es un micronutriente esencial requerido en el crecimiento de las plantas y los animales. En los seres humanos, ayuda a la producción de hemoglobina en la sangre. En bacterias, el Cu es un cofactor de oxigenasas y proteínas transportadoras de electrones (Yruela, 2005; Festa y Thiele, 2011). En las plantas, el Cu es especialmente importante en la producción de semillas, resistencia a enfermedades y regulación del agua, así como en el proceso fotosintético. En la lista de sustancias prioritarias que confecciona la Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades, el cobre ocupa la posición número 118, por lo que no se considera un elemento extremadamente tóxico como el arsénico o el plomo (ATSDR, 2014). Aunque el cobre es esencial, altas dosis del mismo pueden causar anemia, daño hepático y renal, así como irritación intestinal y de estómago.

El cobre se produce normalmente en el agua potable a partir de tubos de cobre, así como de aditivos diseñados para controlar el crecimiento de algas. Si bien la interacción del Cu con el medio ambiente es compleja, las investigaciones muestran que la mayoría de Cu que se introduce en el medio ambiente es, o se vuelve rápidamente estable o se convierte en una forma que no supone un riesgo para el entorno. De hecho, a diferencia de algunos materiales hechos por el hombre, el cobre no se magnifica en el cuerpo ni es bioacumulado en la cadena alimenticia.

En el suelo, el cobre forma complejos orgánicos y, sólo una pequeña fracción del cobre permanece en una solución como cobre iónico, Cu (II). La solubilidad del Cu aumenta drásticamente a pH 5.5 (Martínez y Motto, 2000), que es más bien cercana al pH ideal para tierras de cultivo con pH de entre 6,0 y 6,5 (Eriksson et al., 1997).

El cobre y el zinc son dos elementos esenciales importantes para plantas, microorganismos, animales, y seres humanos. La conexión entre el suelo y la contaminación del agua y la absorción de metales por las plantas está determinada por factores como la química y física del suelo, así como las propiedades fisiológicas de los cultivos.

Los suelos contaminados con cobre pueden ocasionar amenazas tanto directas como indirectas: directa, a través de los efectos negativos de los metales en el crecimiento y rendimiento del cultivo, e indirecta, mediante la introducción en la cadena alimentaria humana con un impacto potencialmente negativo en la salud. En altas concentraciones es tóxico para las células de todos los organismos, principalmente al generar radicales libres que dañan el ADN y las membranas (Voloudakis et al., 2005). Para contrarrestar estos efectos nocivos, las bacterias han desarrollado sistemas de detoxificación, sin que se deje de cubrir las necesidades de este metal. Los genes involucrados en estos sistemas de detoxificación se encuentran en plásmidos o en cromosomas y se dividen en dos tipos principales: los operones *cop* y *cue* (Magnani y Solioz, 2007).

4.1.6 Cadmio

Junto con el mercurio y el plomo, el cadmio es uno de los tres grandes metales pesados tóxicos y no se conoce ninguna función biológica esencial. Ocupa la posición número 7 según la Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (ATSDR, 2014).

Tiene una similitud química que del Zn, un micronutriente esencial para las plantas y los animales. Esto puede explicar en parte la toxicidad de Cd, porque al ser el Zn un oligoelemento esencial, su sustitución por Cd puede provocar el mal funcionamiento de los procesos metabólicos (Campbell, 2007).

El uso más importante del cadmio se encuentra en las baterías de Ni / Cd, que las convierte en fuentes de energía recargables o secundarias que presentan alto rendimiento, larga vida,

bajo mantenimiento y alta tolerancia al estrés físico y eléctrico. Recubrimientos de cadmio proporcionan buena resistencia a la corrosión de revestimiento a los buques y otros vehículos, sobre todo en ambientes de alto estrés, como la marina y aeroespacial. Otros usos de cadmio son como pigmentos, estabilizantes para cloruro de polivinilo (PVC), en aleaciones y compuestos electrónicos. El cadmio también está presente como impureza en varios productos, incluyendo fertilizantes de fosfato, detergentes y petróleo refinado. Además, la lluvia ácida y la acidificación resultante de los suelos y las aguas superficiales tienen aumento de la movilidad geoquímica de Cd, y como resultado sus concentraciones en aguas superficiales tienden a aumentar a medida que el pH disminuye (Campbell, 2007).

El cadmio se produce como una consecuencia inevitable subproducto de la refinación de zinc y de vez en cuando de plomo. La aplicación de insumos agrícolas, como fertilizantes, pesticidas y biosólidos (lodos de depuración), la eliminación de desechos industriales o la deposición de contaminantes atmosféricos aumenta la concentración total de Cd en los suelos, y la biodisponibilidad de este elemento determina si se produce la absorción de cadmio por las plantas a un grado significativo (Weggler et al., 2004). El cadmio es muy biopersistente pero tiene pocas propiedades toxicológicas y, una vez absorbidas por un organismo, permanece estable durante muchos años.

Se sabe que el cadmio en el cuerpo afecta a varias enzimas. Se cree que el daño renal que resulta en proteinuria es el resultado del efecto negativo sobre las enzimas responsables para la reabsorción de las proteínas en los túbulos renales. El cadmio también reduce la actividad de varias enzimas esenciales para el correcto funcionamiento de los seres vivos. El más espectacular y publicitado envenenamiento por cadmio fue el resultado de la ingesta diaria de cadmio por la gente en el río Jintsu Valle, cerca de Fuchu, Japón. Las víctimas fueron afectadas por la enfermedad Itai, que significa ay, ay en japonés. Los síntomas son el resultado de osteomalacia dolorosa (enfermedad de los huesos) combinado con el mal funcionamiento del riñón. El envenenamiento por cadmio en el valle del río Jintsu se atribuyó al arroz regado con agua contaminada de una mina cercana (Kobayashi et al., 2009). La principal amenaza para la salud humana es la acumulación crónica en los riñones que conduce a la disfunción renal. La ingesta de alimentos y el consumo de tabaco son las principales vías de la entrada de Cd en el cuerpo (USDHHS, 1999).

En plantas, el cadmio es un metal no esencial que tiene un impacto negativo sobre el crecimiento (Andresen y Küpper, 2013). Entra en la planta a través de transportadores de zinc y causa un fuerte estrés nitro-oxidativo que afecta fundamentalmente al sistema radicular (Gill et al., 2013). Se ha descrito que, bajo estas condiciones, provoca un aumento en la producción de óxido nítrico en el ápice de las raíces, específicamente en los peroxisomas, acompañado del incremento de radicales superóxido y peroxinitrito implicados en la generación del estrés nitro-oxidativo (Corpas y Barroso, 2014).

5. Resistencia de las bacterias a metales pesados

Para producir estos efectos tóxicos los metales deben primero atravesar la membrana. Generalmente los microorganismos han resuelto el problema de la toma de los metales esenciales (microelementos) duplicando los sistemas de transporte, uno que se expresa a concentraciones altas del metal y es constitutivo, basado en el gradiente quimiosmótico a través de la membrana y que sirve para varios sustratos, y otro inducible para concentraciones bajas del metal, que utiliza ATP como fuente de energía y es bastante específico (Nies, 2003; Nies y Silver, 2007).

La similitud química entre los diferentes metales divalentes (por ejemplo, Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} entre los esenciales, pero también Cd^{2+} , Pb^{2+} o Hg^{2+}) hace que a veces se transporten metales tóxicos al interior de la célula. También es muy similar la estructura de los oxianiones (por ejemplo el CrO_4^{3-} recuerda al SO_4^{2-} y al NO_3^- , y el AsO_4^{3-} es similar al PO_4^{3-}), por lo que entran en la célula a través de los transportadores de metales esenciales. Como consecuencia de esto, los microorganismos han desarrollado sistemas para mantener la homeostasis de los metales esenciales y mecanismos de detoxificación o resistencia (Nies y Silver, 2007). Los genes microbianos de resistencia a metales pesados están organizados en operones y generalmente localizados en plásmidos aunque también existen en el cromosoma (Hall, 2002; Cánovas et al., 2003). Estos mecanismos se basan, fundamentalmente, en bombear el metal hacia el exterior de la célula (mediante proteínas transportadoras específicas) (Cervantes et al., 2006), o transformaciones enzimáticas del metal a otra forma química menos tóxica o menos disponible (reacciones redox, metilación,

complejación, precipitación, volatilización, etc.) (Nies y Silver, 2007). Ocasionalmente, algunas bacterias pueden bioacumular los metales bien intracelularmente o extracelularmente (en el espacio periplásmico o la superficie de la pared bacteriana) (Tabla 2). Algunos microorganismos pueden utilizar varios de estos mecanismos simultáneamente para optimizar su desarrollo en ambientes altamente contaminados (Nies, 2003; Guo et al., 2010; Kamika y Momba, 2013).

6. Resistencia de las plantas a metales pesados

Por su parte, las plantas también han desarrollado mecanismos de defensa para controlar la absorción, la acumulación y el transporte de estos peligrosos elementos y detoxificarlos, excluyendo del citoplasma las formas iónicas libres. Una de las estrategias más utilizadas es impedir la entrada del metal pesado en las células de la raíz atrapándolo en el apoplasto uniéndolo a exudados (ácidos orgánicos) (Watanabe y Osaki, 2002) o a grupos aniónicos de la pared celular (Dalla Vecchia et al., 2006; Rascioy Navari-Izzo, 2011). La mayoría de los metales pesados que entran en la planta son confinados en las células de la raíz, donde son detoxificados complejándolos con aminoácidos, glutatión, ácidos orgánicos o péptidos y/o acumulándolos en vacuolas (Hall, 2002; Pilon-Smits, 2005). Todo esto hace que se restrinja enormemente el transporte a los órganos aéreos, protegiendo de esta forma los tejidos de las hojas y, en particular, las células fotosintéticas metabólicamente activas del daño provocado por el metal pesado (Cambrollé et al., 2008). Otro mecanismo de defensa es el aumento de sistemas celulares antioxidantes que contrarrestan el estrés oxidativo producido por la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Hossain et al., 2012). Pese a que las ROS son tóxicas, son necesarias para las células debido a su participación en procesos de señalización claves, por lo que necesitan diferentes mecanismos para regular su concentración intracelular. Los principales mecanismos de eliminación de ROS son metaloproteínas que se encargan de convertir distintos tipos de moléculas ROS en otras menos tóxicas. Entre estas enzimas se encuentran la superóxidodismutasa (SOD), ascorbatoperoxidasa (APX) y catalasa (CAT) (Sgherry et al., 2003; Sharma y Dietz, 2009).

Mecanismo	Funcionamiento	Metal/ metaloides	Bacteria/ Gen u Operón	Referencia
Expulsión fuera de la célula	Expulsión mediante ATPasa tipo P, transportadores del tipo RND asociados a proteínas MFP y OMF y transportadores tipo CDF.	As	<i>Escherichiacoli/ arsRABCD</i>	Yang et al., 2010
		Cd	<i>Staphylococcus aureus / cadA</i>	Nucifora et al., 1989
		Cu	<i>Acidithiobacillusferrooxidans /copA</i>	Navarro et al., 2009
		Pb	<i>CupriavidusmetalliduransCH34 / PbrA</i>	Hobman et al., 2012
		Ni y Co	<i>Serratiamarcescens C-1/ncrABC</i>	Marrero et al., 2007
Reducción	Transformación enzimática	As	<i>Staphylococcus aureus / arsC</i>	Ji y Silver, 1992
		Hg	<i>Bacteria / MerA</i>	Boyd y Barkay, 2012
Metilación + Volatilización	Transformación enzimática	Hg	<i>Bacteria / MerB</i>	Boyd y Barkay, 2012
		As	<i>Rhodopseudomonaspalustres / arsM</i>	Meng et al., 2011
Precipitación	Transformación enzimática	Cd	<i>Escherichia coli / phsABC</i>	Bang et al., 2000
Complejación	Quelación de metales por metalotioneínas, ácidos orgánicos, aminoácidos, chaperonas, etc.	Cd	<i>Synechococcus PCC 6301/ smtA</i>	Gupta et al., 1992
Bioadsorción	A paredes celulares (mecanismo pasivo).	Cd	<i>Bacillus circulans</i> <i>Ochrobactrum cytisi</i>	Srinath et al., 2002 Rodríguez-Llorente et al., 2010

Tabla 2. Resumen de los mecanismos de resistencia o detoxificación de metales pesados presentes en organismos procariontes junto con ejemplos que ilustran los genes/operones implicados en la resistencia bacteriana frente a metales pesados y metaloides. (Cervantes et al., 2006). (CDF: Cation diffusion facilitator; RND: resistance, nodulation, cell division; MFP: Membrane fusion protein; OMF: Outer membrane factor).

Es interesante señalar que hay plantas que sobreviven, crecen y se reproducen en suelos metalíferos naturales al igual que en suelos contaminados con metales pesados como resultado de actividades humanas (Racio y Navari-Izzo, 2011). La mayoría de especies que toleran concentraciones de metales pesados que resultan muy tóxicas para otras plantas se comportan como “excluyentes”, dependiendo la tolerancia o incluso la hipertolerancia de útiles estrategias para restringir la entrada del metal. Estas plantas retienen y detoxifican la mayor parte de los metales pesados en los tejidos radiculares, con un mínimo transporte hacia las hojas cuyas células permanecen sensibles a los efectos fitotóxicos (Hall, 2002). Particularmente la fotosíntesis es uno de los procesos más sensibles a los metales pesados (Cambrollé et al., 2008; Peñarrubia et al., 2010).

Por el contrario, ciertas especies hipertolerantes, llamadas “hiperacumuladoras” (Figura 2) presentan un comportamiento opuesto ya que la estrategia que utilizan consiste en la absorción del metal pesado y su distribución por la planta (Krämer, 2010).

La desaparición de los contaminantes del medio ambiente a través de procesos naturales, (físico-químicos o biológicos) se denomina atenuación natural. Es, en general, un proceso muy lento, y desde luego incapaz de contrarrestar la contaminación generada por la actividad humana al ritmo que se produce en la actualidad.

La remediación de suelos contaminados con metales pesados es un proceso técnicamente complejo y costoso (Barceló y Poschenrieder, 2003; Montinaro et al., 2012). Las tecnologías de convencionales de remediación están basados en métodos Físicos, Químicos y Biológicos, los cuales pueden ser usados junto con otros métodos para reducir la contaminación hasta un nivel aceptable y seguro (Jadia y Fulekar, 2009).

7. Eliminación de metales pesados de la Biósfera

7.1 Técnicas físico-químicas para el tratamiento de suelos contaminados con metales pesados

Las soluciones que tradicionalmente se han aportado para la problemática de la contaminación de suelos por metales o radioisótopos frecuentemente conllevan métodos

físicos y/o químicos. Las técnicas de remediación convencionales son excavación y retirada de la capa superficial contaminante seguida de "landfill" (relleno del terreno), o bien lavado del suelo seguido de separación física o química de los contaminantes ("soil washing"), o bien su estabilización.

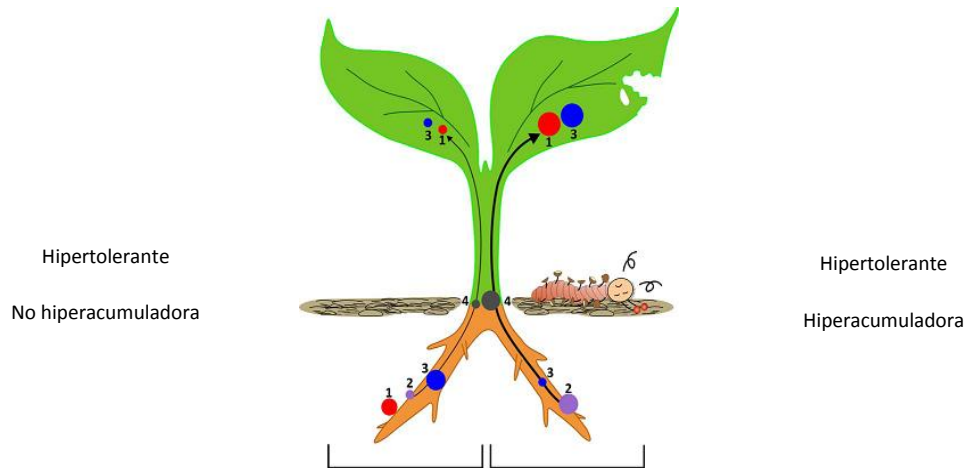


Figura 2. Mecanismos implicados en la hipertolerancia a metales pesados y distribución del metal en una planta excluyente no hiperacumuladora (izquierda) y en una planta hiperacumuladora (derecha). (1) Unión del metal pesado a la pared celular y/o a los exudados de la planta; (2) absorción por la raíz; (3) quelación en el citosol y/o acumulación en vacuolas; (4) transporte desde la raíz hasta la hoja. Los puntos de color indican el órgano de la planta donde ocurren los diferentes mecanismos y el tamaño del punto el nivel de cada uno de ellos. De acuerdo con la hipótesis elemental de defensa, las elevadas concentraciones de metales pesados convierten a las hojas hiperacumuladoras en veneno para los herbívoros (Rascio y Navari-Izzo, 2011).

En los métodos químicos se suelen añadir productos correctores de pH, surfactantes, agentes quelantes, etc., y la reducción/oxidación química con la conversión del contaminante a un estado más estable o menos móvil (Vangronsveld y Cunningham, 1999).

Al igual que para la recuperación de suelos, también se ha adoptado una estrategia de recuperación para remediar los sedimentos contaminados por metales pesados. El primer paso, realizado *in situ*, está destinado a aumentar la estabilización de metales en las

partículas de sedimento (por ejemplo, inmovilización), mientras que el segundo paso, que se realiza *ex situ*, está dirigido a extraer o separar los metales de los sedimentos (por ejemplo, lavado, flotación) (Iskandar y Adriano, 1997).

El primer paso se basa en la mejora de la estabilización del metal mediante adsorción, precipitación y formación de complejos insolubles en el sedimento. Las técnicas que se utilizan son la adición de enmiendas (carbón activado, cenizas, zeolita, etc.) para disminuir la movilidad, cubierta de arena, etc. (Bert et al., 2009). Puesto que estas técnicas de estabilización se llevan a cabo *in situ*, su costo es relativamente bajo, pero tienen la desventaja de que sólo mejoran la inmovilización de metales pesados en los sedimentos, mientras que su contenido global no baja, con el riesgo de que en algunas condiciones puedan ser liberados en el agua otra vez. Por lo tanto, el monitoreo de la zona debe ser continuo.

En el segundo paso (así como para sedimentos con elevados índices de contaminación), las tecnologías de remediación más utilizadas son las tecnologías *ex situ*, que implican dragar los sedimentos, por lo que tienen costos más altos y son muy complejas. Por ello, las tecnologías *ex situ* más aplicadas son el lavado de sedimentos (utilizando ácidos, agentes complejantes o surfactantes), remediación electroquímica, remediación asistida por ultrasonidos, flotación o precipitación (Peng et al., 2009).

El coste de la remediación tradicional es muy elevado, y dependerá en último extremo de los contaminantes, y de las condiciones de la zona contaminada (Pajuelo et al., 2011). Además, estas opciones de remediación son fuertemente criticadas por la destrucción del medio ambiente, los problemas logísticos y un aumento de la insatisfacción pública. Con frecuencia hay zonas de difícil acceso debido a la orografía del terreno, a la presencia de rocas, etc., donde resulta imposible aplicar estos métodos, por lo que siempre se mantiene un nivel de contaminación residual bastante elevado. Para estos casos de eliminación de contaminación se han descrito métodos alternativos que se basan en el empleo de microorganismos y plantas que tienen la capacidad de tolerar y/o destoxificar contaminantes del suelo, y que se pueden usar en sustitución de o junto a los métodos tradicionales.

7.2 Biorremediación

La biorremediación es un proceso que utiliza organismos vivos y /o sus productos para reducir, eliminar o transformar contaminantes presentes en suelos, sedimentos y agua (Leung, 2004; Kumar et al., 2011). Desde el punto de vista medioambiental, es una tecnología amigable, de bajo coste y de gran aceptación pública (Pajuelo et al., 2014; Teng et al., 2015).

Esta tecnología se basa en la promoción del crecimiento de microflora o consorcios bacterianos específicos que son nativos de los sitios contaminados y que son capaces de realizar actividades deseadas (Adams et al., 2015). La estimulación de los microorganismos se puede hacer de varias maneras, por ejemplo, al promover el crecimiento mediante la adición de nutrientes, mediante la adición de un aceptor final de electrones o por control de condiciones de humedad y temperatura, obteniéndose como resultado un incremento en la degradación de contaminantes orgánicos y bio-transformación (Adams et al., 2015; Singh, 2014). En los procesos de biorremediación, los microorganismos utilizan los contaminantes como nutrientes y fuentes de energía (Tang et al., 2007).

Los procesos de biorremediación implican la biotransformación y la biodegradación de los contaminantes a productos químicos no peligrosos o menos peligrosos. A menudo, los microorganismos metabolizan los productos químicos para producir dióxido de carbono o metano, agua y biomasa. Biotransformación es cualquier alteración de la molécula o estructura de un compuesto por los microorganismos. La biodegradación es la rotura de compuestos orgánicos o bioacumulación y biotransformación de compuestos inorgánicos en compuestos amigables con el ambiente (Fulekar et al., 2009).

El control y la optimización de los procesos de biorremediación es un sistema complejo de muchos factores. Estos factores incluyen: la existencia de una población microbiana capaz de degradar los contaminantes; disponibilidad de los contaminantes; los factores del entorno (tipo de suelo, la temperatura, el pH, la presencia de oxígeno u otro receptores de electrones y nutrientes) (Pajuelo et al., 2014; Sharma, 2012).

Los mecanismos de resistencia a metales pesados permiten el uso de microorganismos en la detoxificación de metales en suelos y aguas contaminadas. Así, se han utilizado los géneros

Pseudomonas, *Geobacter*, *Cupriavidus* y *Ochrobactrum* tanto en la bioadsorción como en la movilización e inmovilización de metales pesados (Malik, 2004; Silver y Phung, 2005). El conocimiento, cada vez más extenso, que se tiene acerca de los mecanismos moleculares subyacentes a la capacidad de tolerar o detoxificar metales pesados por parte de los microorganismos, es también un elemento importante a la hora de diseñar microorganismos con capacidad de biorremediación incrementada (Sriprang et al., 2002; Cases y de Lorenzo, 2005; de Lorenzo, 2008).

A diferencia de la resistencia a compuestos orgánicos, en la que la ruta de degradación de los mismos está compuesta por una gran cantidad de etapas enzimáticas, la resistencia a metales pesados está codificada por sólo unos cuantos genes. La mayoría de los operones de resistencia a metales pesados constan de 2 a 6 genes, con lo cual es fácil su transferencia a otros microorganismos (Hall, 2002). Además, en algunos casos los genes están contenidos en un plásmido, por lo que la transferencia a otros organismos es posible (Lee et al., 2006).

7.2.1 Fitorremediación

La fitorremediación es el uso de plantas para el alivio, transferencia, estabilización o la degradación de los contaminantes del suelo, sedimentos, aguas superficiales y aguas subterráneas (USEPA, 2001; Peijnenburg y Jager, 2003; Paz-Ferreiro et al., 2014). Algunas raíces de las plantas pueden absorber e inmovilizar los metales, mientras que otras especies de plantas tienen la capacidad de metabolizar o acumular contaminantes orgánicos y nutrientes. Los procesos de fitorremediación se llevan a cabo gracias a múltiples relaciones e interacciones entre plantas, microbios, los suelos y los contaminantes (Lasat, 2000).

Este concepto fue propuesto por primera vez por Chaney (1983) y luego se desarrolló a través del estudio de la capacidad de las especies de plantas para eliminar contaminantes de los componentes del entorno. Se puede utilizar para una amplia gama de compuestos orgánicos y contaminantes inorgánicos (Vamerali et al., 2010). Los procesos de fitorremediación son más eficaces cuando los contaminantes están presentes en niveles bajos a medios. Los altos niveles de contaminantes pueden inhibir el crecimiento y actividades tanto de las plantas como de los microorganismos. Los mecanismos

involucrados en la absorción, la translocación y el almacenamiento de los micronutrientes son los mismos involucrados en el traslado y almacenamiento de metales pesados (Subhashini y Swamy, 2013).

La fitorremediación, al igual que otras tecnologías de remediación, tiene una serie de ventajas y desventajas. Los aspectos más positivos de la utilización de fitorremediación son: 1) es una técnica más rentable; 2) es amistosa con el medio ambiente; 3) es aplicable a una amplia gama de metales tóxicos y 4) constituye un método estéticamente agradable. Por otra parte, la fitorremediación presenta algunas limitaciones. Es un proceso largo, por lo que puede tardar varios años o más para limpiar un sitio y sólo es aplicable a los suelos superficiales (Mudgal y Mudgal, 2010; Moosavi y Seghatoleslami, 2013; Elekes, 2014; Paz-Ferreiro, 2014).

La fitorremediación es un término general que incluye varios procesos, en función de las interacciones planta-suelo-atmósfera. Para suelos contaminados por metales pesados, se reconocen cuatro procesos de fitorremediación: fitoextracción, fitovolatilización, fitoestabilización y rizofiltración, en el caso de aguas contaminadas éste último (Pilon-Smits, 2005) (Figura 3). Los dos primeros mecanismos son los más fiables. Las distintas formas de fitorremediación requieren diferentes características de la planta para lograr la máxima eficacia.

7.2.2 Fitoextracción

La fitoextracción, también conocida como fitoacumulación, fitoabsorción o fitosequestración, es un proceso que implica la absorción de contaminantes por la raíz seguida de translocación y acumulación en las partes aéreas. Se aplica principalmente a los metales (Cd, Ni, Cu, Zn, Pb), pero también puede ser utilizado para otros elementos (Se, As) y compuestos orgánicos.

Esta técnica preferencialmente utiliza plantas hiperacumuladoras, que tienen la capacidad de almacenar altas concentraciones de metales específicos en sus partes aéreas (0,01% a 1% en peso seco, dependiendo del metal) (Pilon-Smits, 2005; Callahan et al., 2006).

Para que este método de limpieza que sea factible, las plantas deben: (1) extraer grandes concentraciones metales pesados por medio de sus raíces, (2) translocar el metal pesado a la biomasa superficial, y (3) producir una gran cantidad de biomasa vegetal. Adicionalmente, las plantas deben tener mecanismos para desintoxicar y / o tolerar altas concentraciones de metales acumulados en sus tallos (Krämer, 2010; Sarma, 2011).

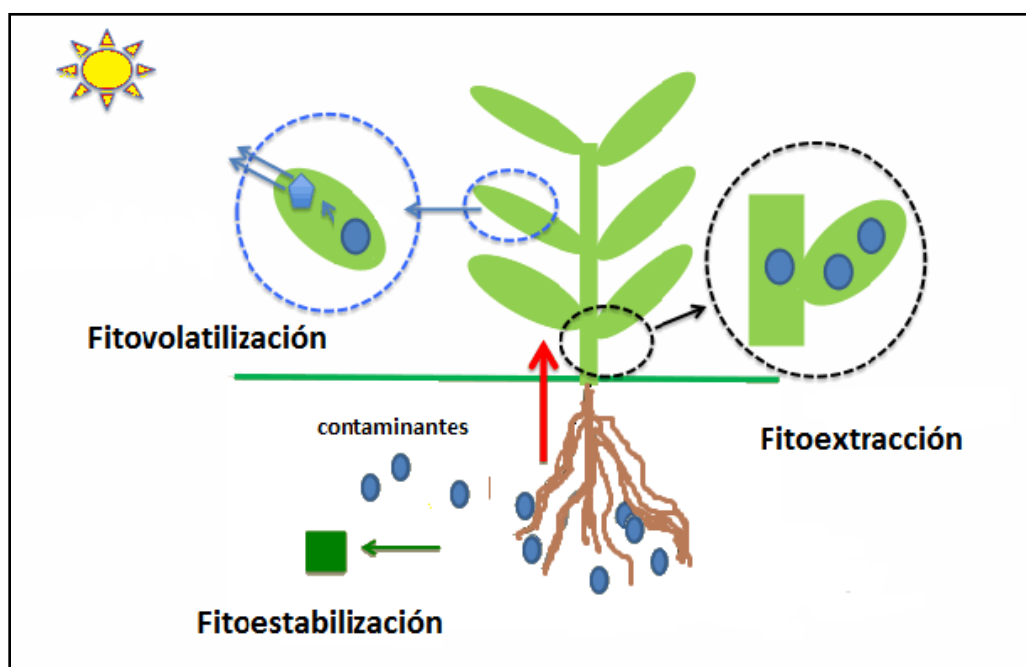


Figura 3. Representación esquemática de diferentes estrategias de Fitorremediación.

El objetivo final de esta técnica es cosechar la parte aérea de la planta y tratarla como un residuo, confinándola en lugares especialmente acondicionados. Alternativamente, en el caso de que resultara económicamente rentable, se podría proceder a la recuperación del metal (Ghosh y Singh, 2005).

Elsholtzia splendens, *Alyssum bertolonii*, *Noccaea caerulescens* y *Pteris vittata* son ejemplos conocidos de plantas hiperacumuladoras para Cu, Ni, Zn / Cd y As, respectivamente (Prasad, 2004; Van der Ent et al., 2013).

7.2.3 Fitovolatilización

Esta técnica se basa en la capacidad de algunas plantas para absorber y volatilizar ciertos metales/metaloideos. Algunos iones de elementos de los grupos IIB, VA y VIA de la tabla

periódica (en concreto Hg, Se y As) son absorbidos por las raíces, y convertidos en formas no tóxicas que después son liberadas a la atmósfera.

La ventaja de este método es que el contaminante, por ejemplo el ion mercuríco, se puede transformar en una sustancia menos tóxica (es decir, mercurio elemental). La desventaja de esto es que el mercurio emitido a la atmósfera es probable que sea reciclado por la precipitación y luego se deposite nuevamente en lagos y océanos, repitiendo la producción de metil-mercurio por bacterias anaerobias (USEPA, 2001).

Como ejemplo de este mecanismo podemos mencionar a plantas de las especies: *Astragalus bisulcatus* y *Stanleya pinnata* para Se o plantas transgénicas (con genes bacterianos) de *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Liriodendron tulipifera* o *Brassica napus* para Hg. Esta técnica también se puede utilizar para compuestos orgánicos (Pilon-Smits y LeDuc, 2009; Ali et al., 2013).

7.2.4 Fitoestabilización

Esta técnica permite el uso de ciertas especies de plantas para inmovilizar contaminantes en el suelo y el agua subterránea a través de la absorción y la acumulación por las raíces, la adsorción sobre las raíces, o la precipitación alrededor de las raíces de las plantas (rizósfera). Este proceso reduce la movilidad del contaminante y evita la migración hacia el agua subterránea, reduciendo así la biodisponibilidad del mismo y evitando su paso a la cadena trófica. Esta técnica también se puede utilizar para restablecer la cubierta vegetal en lugares donde la vegetación natural no puede sobrevivir debido a las altas concentraciones de metales en suelos o debido a trastornos físicos de la superficie (Méndez y Maier, 2008).

La fitoestabilización puede darse través de la adsorción, precipitación, formación de complejos, o la reducción de valencia del metal. Es útil para el tratamiento de plomo (Pb), arsénico (As), cadmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu) y zinc (Zn). La fitoestabilización se aprovecha de los cambios que la planta induce en la química del suelo y en el medio ambiente. Estos cambios en la química del suelo pueden inducir la adsorción de contaminantes en las raíces de las plantas o causar la precipitación de metales en la raíz de la planta. Este mecanismo ha sido un éxito en el tratamiento de metales y otros contaminantes inorgánicos en suelos y sedimentos (EPA, 2000; Peng et al., 2009).

Algunas de las ventajas asociadas con esta tecnología son la eliminación eficaz de residuos peligrosos y materiales/biomasa no necesaria especialmente cuando se necesita la inmovilización rápida y preservar las aguas subterráneas y superficiales (Zhang et al., 2009; Moosavi y Seghatoleslami, 2013).

Especies del género *Haumaniastrum*, *Eragrostis*, *Ascolepis*, *Gladiolus* y *Alyssum* son ejemplos de plantas cultivadas con este propósito (Favas et al., 2014).

7.2.5 Rizofiltración

La rizofiltración es similar a la fitoextracción, sin embargo, las plantas se utilizan principalmente para tratar agua subterránea contaminada en lugar de suelo. Las plantas que se utilizarán para la limpieza son cultivadas en invernaderos con sus raíces en agua en lugar del suelo. Para aclimatar las plantas, una vez que el sistema radicular se ha desarrollado, se toma agua contaminada proveniente de zonas con desechos y se sustituye por su fuente de agua. Después de esto, las plantas se siembran en la zona contaminada, donde las raíces toman el agua y los contaminantes para llevarlos a lo largo de la misma. Una vez que las raíces se saturan de contaminantes, éstas son cosechadas.

Plantas como el girasol, mostaza india, tabaco, centeno, espinaca y maíz han sido estudiadas por su capacidad para eliminar el plomo del agua. Un estudio realizado por Raskin y Ensley en el 2000 muestra que después de únicamente una hora de tratamiento, los girasoles redujeron significativamente las concentraciones de plomo. La lenteja de agua (*Lemna minor*) se ha empleado para la rizofiltración de metales (Saha et al., 2015) o herbicidas (Dosnon-Olette et al., 2011).

7.2.6 Rizorremediación

La rizorremediación se ha definido como la limpieza de suelos contaminados mediante la utilización de plantas y microorganismos colonizadores (Glick, 2003; Kuiper et al., 2004; Srivastava et al., 2012) y es considerada como la forma más avanzada de fitorremediación. En los dos procedimientos es aconsejable el uso de microorganismos y plantas autóctonos (Ali et al., 2013; Ahemad y Kibret, 2014; Teng et al., 2015).

En este proceso, cada miembro de la interacción desempeña una función. Las plantas liberan a la rizósfera exudados radiculares que contienen una gran variedad de compuestos orgánicos (aminoácidos, azúcares, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, metabolitos secundarios y moléculas de elevado peso molecular como celulosa, lignina, mucílagos y proteínas) (Bais et al., 2006; Shukla et al., 2011), que se utilizan como fuente de carbono por la comunidad microbiana rizosférica, incluidos hongos y bacterias. Más del 20% del carbono fijado por la planta puede liberarse a través de sus raíces (Hinsinger et al, 2005). En consecuencia la rizósfera presenta una densidad microbiana mucho más alta en comparación con la masa circundante del suelo. Los exudados radicales también afectan a la disponibilidad de los contaminantes en la rizósfera por la producción de biosurfactantes (Read et al., 2003; Gao et al., 2010).

Por su parte, los microorganismos rizosféricos desempeñan una función crucial en la adaptación de la planta al estrés medio ambiental que provoca la presencia de contaminantes (Khan et al., 2005; 2009).

Las comunidades microbianas pueden influir negativa o positivamente en el crecimiento de las plantas. Aquellas bacterias del suelo de vida libre que benefician, ya sea por mecanismos indirectos o directos, al crecimiento y la salud de las plantas son las ya conocidas como PGPR (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*), o rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR; Lugtemberg y Kamilova, 2009). Estas características de la bacteria que ayudan a la planta son, entre otras: fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de sideróforos, síntesis de auxinas y disminución de estrés por etileno (ACC deaminasa) (Glick, 2010, 2012; Ahemad y Kibret, 2014).

La Ingeniería Genética y Biotecnología proporcionan las herramientas adecuadas para la generación de plantas transgénicas y bacterias modificadas genéticamente con mayor resistencia y/o capacidad de destoxificación de metales (Pilon-Smits, 2005; Van Aken, 2008).

8. La problemática de la contaminación por metales pesados en las zonas costeras

Los metales pesados se acumulan de forma continua en los estuarios y sedimentos costeros (Xia et al., 2011; Soliman et al., 2015) que afecta la calidad del agua, mientras que su bioacumulación en organismos acuáticos causa impacto a largo plazo sobre la salud humana y los ecosistemas (Fernandes et al., 2007; Abdel-Baki et al., 2011; Soliman et al., 2015). A diferencia de los contaminantes orgánicos, los procesos naturales de descomposición no eliminan los metales pesados, sino que por el contrario, éstos se enriquecen en el sedimento debido a la acción de los organismos o de otros compuestos (Theofanis et al., 2001).

En el medio acuático, los metales pesados se distribuyen habitualmente de la siguiente manera: especies solubles en agua, coloides, formas en suspensión y la fase sedimentaria. En algunas condiciones, más del 99% de los metales pesados que entran en los ríos y estuarios pueden ser almacenados en los sedimentos de diversas formas (Salomons y Stigliani, 1995). Sin embargo, hay muchos procesos que afectan a la movilidad de los metales pesados (Theofanis et al., 2001; Peng et al., 2009), siendo los más importantes los siguientes: el pH, la presencia de materia orgánica, el potencial de óxido-reducción, la temperatura, la salinidad, la especie química del metal, su capacidad de intercambio catiónico y el tiempo de retención en la matriz del sedimento, (“*ageing*”). Todos estos afectan la movilidad de los metales, contribuyendo a aumentar su biodisponibilidad y su entrada en la cadena trófica (Peng et al., 2009).

9. Antecedentes de contaminación en las marismas de Huelva

La desembocadura de los ríos Tinto y Odiel constituye un sistema de estuarios que desde el punto de vista fisiográfico, puede definirse como un “estuario barrera” donde las características dinámicas dependen de la fuerte influencia mareal, que controla los procesos de mezcla de agua en el interior del sistema (Figura 4). La onda de marea presenta un rango medio de 2.3 m, variando entre 1.6 m durante los ciclos de marea muerta media y 2.9 m en los de marea viva media. El estuario tiene una extensión de 15 km y, en función de su dinámica sedimentaria, puede dividirse en sectores (Amils et al., 2013).

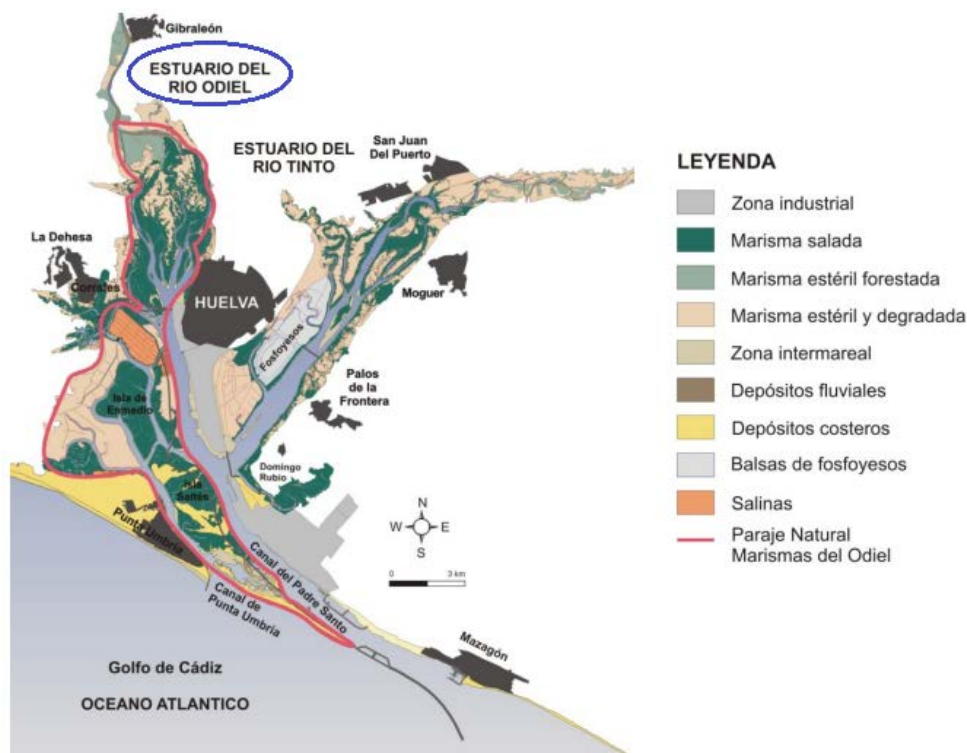


Figura 4. Mapa de localización de las marismas del Odiel en Sur de España (Huelva)

El estuario del río Odiel es el sector que recibe las descargas directas del río Odiel y en el que se sitúa la zona de mezcla fluvio-marina de dicho río (Bermejo et al., 2003). En su parte más interna se desarrollan amplias marismas situadas sobre un complejo sistema de islas separadas por canales mareales distribuidores que forman parte del Paraje Natural Marismas del Odiel. Cerca de la confluencia de este sector con el Canal del Padre Santo están situados el resto de las instalaciones portuarias y un segundo polígono industrial.

Aún siendo altas las concentraciones de metales en todos los sectores del estuario, se han podido definir zonas de acumulación preferente para algunos de ellos. Así, mientras que el Cr o el Fe se acumulan preferentemente en las zonas afectadas directamente por las descargas fluviales, el Zn y el Ba lo hacen en zonas sin influencia fluvial directa (Sáinz y Ruiz, 2006; Morillo et al., 2008). Estas concentraciones de metales afectan no sólo a los materiales más superficiales, sino a una capa de sedimentos que en algunos puntos se extienden hasta una profundidad de 70 cm, pudiendo afectar a todo el horizonte de colonización de la infauna. Además, las altas concentraciones de nutrientes presentes en el

agua originan una alta productividad que se refleja en unos niveles anormalmente altos de clorofila.

Parte de la contaminación se debe a los aportes de aguas ácidas (con pH inferiores a 3) y metales pesados, procedentes de actividades de explotación minera en exceso desarrolladas en las cuencas de drenaje del río (Nelson y Lamothe, 1993; Leblanc et al., 2000). La actividad minera, hoy abandonada, se remonta a la prehistoria, aunque todavía se genera un intenso drenaje ácido de minas (Galán et al., 2003; Sainz y Ruiz, 2006).

El pH ácido (2-4) proporciona el entorno para las comunidades microbianas excepcionales (Amils et al., 2013). El cinturón Ibérico de piritas, cuya sigla en inglés es IPB, es considerado como el más grande y más importante proveedor de sulfuro metalogénico en el mundo, forma un cinturón alrededor de 250 km de largo y hasta 60 km de ancho y se extiende desde Sevilla, en el suroeste de España, hasta el sur de Portugal (Fernández-Caliani et al., 1997; Nieto et al., 2007).

Este hecho, unido a la instalación de un importante complejo industrial en el estuario durante los años 60, produjo un aumento considerable de la degradación del medio. Como consecuencia de esta contaminación se produjo la desaparición casi completa de la epifauna, infauna y microfauna bentónica en el estuario. Durante los años 80 la Junta de Andalucía, a través de la Consejería de Medio Ambiente, puso en marcha un plan general de corrección de vertidos que finalizó en el año 1997. A partir de este momento se produce una mejora de la calidad ambiental del agua y se produce una recuperación parcial de la infauna y epifauna en el estuario (López-González et al., 2008).

Por otra parte, la ciudad de Huelva está rodeada por uno de los más grandes complejos industriales de España, que es situada entre los estuarios Tinto y Odiel (Figura 5). La proximidad de los centros urbanos a estas fuentes de contaminación, junto con el presencia de zonas agrícolas y de recolección de fauna (peces, mariscos y crustáceos) en las zonas adyacentes, representa un riesgo potencial a la población, así como para el ecosistema de protegido áreas naturales cercanas (Iriarte et al., 2007).

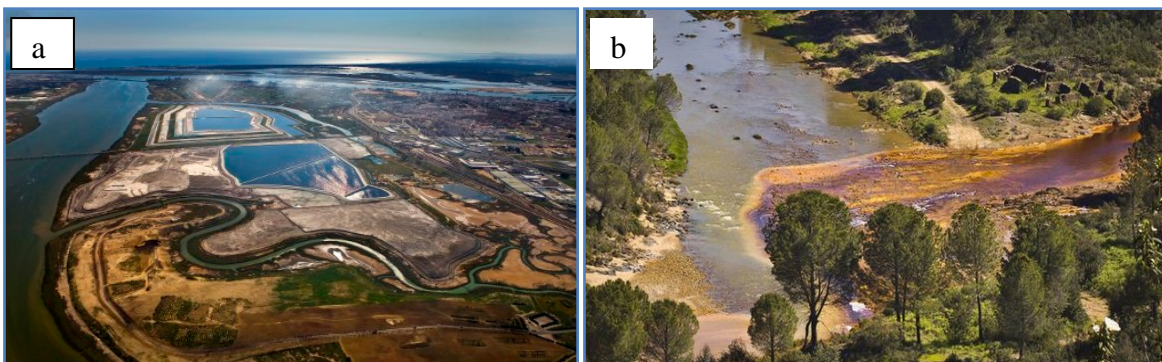


Figura 5. Estuarios contaminados, provincia de Huelva. a) Vista panorámica de las Marismas Odiel. Fotografía tomada de Greenpeace, 2011. b) Río Odiel contaminado. Fotografía tomada del periódico El diario, 2014.

El Paraje Natural de las Marismas del Odiel, situado en la provincia de Huelva, es un espacio marismeño de 7.185 hectáreas declarado Reserva de la Biosfera por la UNESCO. Es una de las zonas más contaminadas del mundo, con una alta concentración de metales pesados (As: 37–697 ppm; Cu: 300–3000 ppm; Pb: 150–3570 ppm; y Zn: 100–4800 ppm) en los sedimentos del suelo (Nelson y Lamothe, 1993; Ruiz, 2001; Sáinz y Ruíz, 2006). Estudios previos mostraron que en el río Odiel, las concentraciones de metales pesados están muy por encima del umbral de parques naturales, de acuerdo con la normativa regional (Junta de Andalucía 1999).

9.1 Estudios previos de fitorremediación del estuario Odiel

A la hora de diseñar un proyecto de fitoestabilización de estuarios contaminados, hay que tener en cuenta las características particulares de estos ecosistemas. Las Marismas del Odiel poseen carácter fluctuante (sequía, encharcamiento) donde el agua salada inunda la marisma, por tanto, proporciona un medio donde predominan especies vegetales resistentes a las altas concentraciones de sal, conocidas como plantas halófitas, y resistentes a alta concentraciones de metales pesados, como es el caso de *Spartina maritima* y *Spartina densiflora* (Cambrollé et al., 2008; Reboreda et al., 2008). En condiciones naturales de crecimiento y desarrollo, las plantas están inevitablemente expuestas a diferentes tipos de estrés, como la salinidad, altas y bajas temperaturas, sequía/inundaciones y la alta radiación (Gómez-Mercado et al., 2012).

Varios grupos de investigación han estudiado durante más de 30 años la ecología de esta zona (Figueroa et al., 2003). Se ha propuesto la utilización de varias plantas halófitas autóctonas con elevada capacidad para tolerar y acumular metales pesados, principalmente en las raíces y el rizosedimento, entre ellas las gramíneas *S. maritima* (autóctona) (Cambrollé et al., 2011; Redondo-Gómez, 2013) y *S. densiflora* (origen sudamericano, naturalizada en las marismas andaluzas) (Bortolus, 2009) o las halófitas *Artrocnemus*, *Sarcocornia fruticosa*, *Halimione portulacoides* o *Atriplex portulacoides*, etc. (Figueroa et al., 2003; Cambrollé et al., 2012; Redondo-Gómez, 2013).

9.2 Método de Remediación *In situ* utilizando *Spartina densiflora*

La fitoestabilización se puede mejorar a través del conjunto de bacterias autóctonas de la zona de la raíz que se concentran en la zona rizosférica gracias a los exudados de raíces de la planta (Lugtenberg y Kamilova, 2009). El ambiente microbiano puede convertir los metales solubles a un estado de oxidación insoluble, también puede ocurrir a través de la absorción, adsorción, precipitación, complejación o reducción de la valencia del metal evitando su biodisponibilidad (Nies y Silver, 2007). Por otra parte, la denominada rizerremediación es considerada una interacción planta-microorganismo beneficiosa (Kuiperet al., 2004; Glick, 2010).

Spartina Schreber (Schreber, 1789) es uno de los géneros más estudiados de plantas de estuarios salinos de todo el mundo y que posee una considerable importancia ecológica como hábitat y como fuente de alimento. La mayoría de las especies de este género son tolerantes a la sal y de uso frecuente en el control de la erosión debido a su capacidad para conservar los suelos, así como en procesos de fitorremediación, con especial atención en su uso potencial como planta hiperacumuladora. La mayoría de los estudios acerca de este género están enfocados en el mecanismo de acumulación y tolerancia a metales (Eid, 2011).

Las condiciones alrededor del sistema radicular dependen directamente de una amplia gama de factores que incluyen: potencial redox, pH, tipo de especie y factores estacionales, intercambio catiónico etc. Estos factores son la clave para la biodisponibilidad de los

metales y que puedan ser absorbidos por las plantas. Se ha demostrado en halófilas que la salinidad es un factor crucial para la translocación del metal de las raíces a los brotes. En entornos caracterizados por un exceso de iones tóxicos como cloruro y sodio, *Spartina* sp. muestra un crecimiento natural (Santos et al., 2010; Redondo Gómez, 2013).

Spartina densiflora Brong es una planta herbácea C4 perteneciente a la familia *Poaceae* proveniente de América del Sur que invadió las marismas de América del Norte, África del Norte y Europa del Sur (Figura 6). El primer reporte de esta especie fue realizado en España (Golfo de Cádiz en la Península Ibérica SW) y su introducción se considera probablemente accidental (Nieva et al., 2001). En comparación con otras especies de *Spartina* invasivas tales *S. anglica* y *S. alternifolia*, esta planta exhibe un curioso espectro de la colonización en diferentes condiciones ambientales. Sin embargo, poco se sabe acerca de las interacciones ecológicas con otras especies (Bortolus, 2005).



Figura 6. *Spartina densiflora* creciendo en la Marisma del Odiel (Huelva).

Con respecto a su producción y reproducción, *S. densiflora* muestra diferentes estrategias de crecimiento que le permiten tolerar mejor las variables y condiciones de microhábitats locales; parece que esta especie mejora su reproducción sexual y asexual a través de la integración clonal. Como resultado del estrés por salinidad, predominante en las zonas costeras marinas, la tasa de expansión y colonización en agua dulce y pantanos salobres es considerablemente más rápida (Bortolus et al., 2004; Nieva et al., 2005). *S. densiflora* es una especie halófila facultativa que ha demostrado una gran capacidad de adaptación morfológica y fisiológica, que le permite tolerar ciclos de inundación mareales, salinidad de

contaminantes antropogénicos y drenaje (Mateos-Naranjo et al., 2008a, 2009). Su área de distribución incluye diferentes condiciones ambientales y climáticas, como los estuarios contaminados del Odiel que muestran altas concentraciones de metales pesados (Redondo-Gómez, 2013; Curado et al., 2014). Parte de esta capacidad de adaptación a diferentes condiciones físico-químicas de los suelos se debe a su interacción con bacterias autóctonas (Mesa et al., 2015a).

Varios han sido los estudios que sitúan a *S. densiflora* como una especie con gran potencial de fitorremediación, en los que se resalta su alta capacidad de acumulación de metales pesados en sus tejidos, especialmente en sus raíces (Mateos-Naranjo et al., 2008b, 2008c, 2015a), así como en la fitoestabilización de los mismos en la rizósfera (Cambrollé et al., 2008; Redondo-Gómez et al., 2011; Redondo-Gómez, 2013). Adicionalmente, varios científicos han comenzado a explorar la posibilidad de utilizar las bacterias del suelo junto con las plantas, con el fin de aliviar el estrés de la planta ante la presencia de contaminantes (Glick, 2010; De-Bashan et al., 2012; Phieleret al., 2013; Pajuelo et al., 2014; Nadeem et al., 2015). Estudios recientes han encontrado que la bioaumentación de plantas adultas de *S. densiflora* con un consorcio bacteriano formado por cepas previamente aisladas de su propia rizósfera y seleccionadas por sus características PGP, mejoran considerablemente el crecimiento de las plantas y la tolerancia de éstas a las propiedades físico-químicas de los suelos pantanosos (Andrades-Moreno et al., 2014; Mateos-Naranjo et al., 2015b). Sin embargo, poco se conoce acerca de la respuesta de la interacción bacteria-planta en términos de germinación, efectos sobre el crecimiento y acumulación de metales pesados, o los mecanismos de estrés oxidativo implicados en la adaptación y resistencia de estas plantas a medios ambientes con este tipo de contaminación.

Por tal motivo, con este trabajo se pretende avanzar en el conocimiento de la respuesta de *S. densiflora* a situaciones de estrés ambiental debidas a contaminantes procedentes de la industrialización excesiva de la zona y los cambios fluctuantes de mareas (sequías, encharcamientos). En particular, se centrará la atención en el efecto diferencial de la inoculación con bacterias gram positivas o gram negativas, así como con el consorcio de ambas.

Objetivos

Objetivo General

Uso de *Spartina densiflora* y sus bacterias rizosféricas con fines de Fitorremediación de marismas contaminadas con metales pesados.

Objetivos Específicos

1. Aislamiento e identificación de bacterias rizosféricas con propiedades promotoras del crecimiento (PGP).
2. Caracterización de bacterias PGP con resistencia a metales pesados y propiedades de bioadsorción.
3. Diseño de un inoculante bacteriano que mejore la fitoestabilización de metales pesados en las marismas del Odiel.
4. Comparación de los efectos de la inoculación de *Spartina densiflora* con bacterias Gram positivas y Gram negativas en términos de germinación, crecimiento de la planta, acumulación, fisiología y respuesta al estrés oxidativo.

Publicaciones

Screening beneficial rhizobacteria from Spartina maritima for phytoremediation of metal polluted salt marshes: comparison of gram-positive and gram-negative strains

Karina I. Paredes-Páliz, Miguel A. Caviedes, Bouchra Doukkali, Enrique Mateos-Naranjo, Ignacio D. Rodríguez-Llorente, et al.

Environmental Science and Pollution Research

ISSN 0944-1344

Environ Sci Pollut Res
DOI 10.1007/s11356-016-7184-1



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag Berlin Heidelberg. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Environmental Science and Pollution Research

Screening beneficial rhizobacteria from *Spartina maritima* for phytoremediation of metal polluted salt marshes: Comparison of gram positive and gram negative strains --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	ESPR-D-16-01478R1	
Full Title:	Screening beneficial rhizobacteria from <i>Spartina maritima</i> for phytoremediation of metal polluted salt marshes: Comparison of gram positive and gram negative strains	
Article Type:	Research Article	
Corresponding Author:	Eloisa Pajuelo, Ph.D. University of Seville Seville, Seville SPAIN	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	University of Seville	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Karina I. Paredes-Páliz, MsC. in Biology	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Karina I. Paredes-Páliz, MsC. in Biology	
	Miguel A. Caviedes, PhD. in Biology	
	Bouchra Doukkali, MsC. in Biology	
	Enrique Mateos-Naranjo, PhD. in Biology	
	Ignacio D. Rodríguez-Llorente, PhD. in Pharmacy	
	Eloisa Pajuelo, Ph.D.	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo, Junta de Andalucía (Proyecto de excelencia P11-RNM-7472)	Prof Eloisa Pajuelo
	SENESCYT (Ecuador) (Predoctoral grant (convocatoria abierta 2013))	MsC. Karina I. Paredes-Páliz
Abstract:	<p>The aim of our work was the isolation and characterization of bacteria from the rhizosphere of <i>Spartina maritima</i> in the metal contaminated Odiel estuary (Huelva, SW Spain). From twenty-five strains, 84% were identified as Gram-positive, particularly <i>Staphylococcus</i> and <i>Bacillus</i>. Gram-negative bacteria were represented by <i>Pantoea</i> and <i>Salmonella</i>. Salt and heavy metals tolerance, metal bioabsorption, plant growth promoting (PGP) properties and biofilm formation, were investigated in the bacterial collection. Despite the higher abundance of Gram-positive bacteria, Gram-negative isolates displayed higher tolerance towards metal(loid)s (As, Cu, Zn and Pb) and greater metal biosorption, as deduced from ICP-OES and SEM-EDX analyses. Besides, they exhibited better PGP properties, which were retained in the presence of metals, and the ability to form biofilms. Gram-negative strains <i>Pantoea</i> agglomerans RSO6 and RSO7, together with Gram-positive <i>Bacillus aryabhatai</i> RSO25, were selected for a bacterial consortium aimed to inoculate <i>S. maritima</i> plants in metal polluted estuaries for phytoremediation purposes.</p>	
Response to Reviewers:	<p>Responses to Reviewers' comments:</p> <p>Reviewer #4: This study "Screening beneficial rhizobacteria from <i>Spartina maritima</i> for phytoremediation of metal polluted salt marshes: Comparison of gram positive and gram negative strains"(Ms. No. ESPR-D-16-01478) carried out a series of studies. The <i>Spartina maritima</i> plants were important to heavy metals contaminated soil</p>	

remediation study. In this study, twenty-five strains were isolated from rhizosphere of *Spartina maritima* in the metal contaminated sediments. The study on gram positive and gram negative strains with plant growth promoting properties under heavy metal stress is interesting. However, for this manuscript to be suitable for publication in *Environmental Science and Pollution Research*, major changes are required. Please ask a native English speaker to correct sentences in the manuscript. The instruction and the aims of the this study should be concise.

Major comments:

1. Line 28 "plant growth promoting properties (PGPR)" may be "plant growth promoting (PGP) properties".

Thank you very much for the correction.

2. Line 119-125 in this study, inoculant isolates to improve metal phytostabilization was not carried out. So, the objects of the present study should be accuracy. Since the plant-bacteria phytoremediation experiments were not done in this work, the last part of the introduction has been shortened accordingly (lines 118-121 of the revised version).

3. Line 129 samples should be Sediment samples
Corrected.

4. Line 144 please give reference and necessary description.

The roots of *S. densiflora* plants were shaken vigorously in order to separate the bulk soil (not directly adhered to the roots). In order to collect the rhizosphere soil, pieces of roots were incubated in 25 ml of sterile saline solution for 15 minutes in a sterile Falcon tube under continuous shaking and allowed to stand for 3 minutes, according to Barillot et al., 2013. The reference has been included in the literature (page 22, lines 593- 595) of the revised version.

5. Line 152 please give reference of TSA medium or list the components of the medium

Reference of TSA medium (Thompson et al., 1993) is provided, line 149 of the revised version. Cite is included in the literature accordingly (lines 855-858).

6. Line 154 halophylic should be halophilic
Corrected.

7. Line 161 pure strain?

Yes. Gram staining of single colonies was performed (line 157). Only one morphology was observed. Furthermore, data of 16S rDNA form RSO6 and RSO7 showed over 99.9% identity with *Pantoea agglomerans* and that of RSO25 displayed 100% identity with *Bacillus aryabhatai*, indicating a good sequence and no mix of cultures.

8. Line 191 the blast results of NCBI should be included
Accession numbers are provided for the three strains. Moreover, an additional Figure (Supplementary Information, Figure S3) has been included with the taxonomical position of the strains.

9. Line 198 the controls without EDTA should be set to exclude the inhibit of EDTA on strain growth.

Controls in medium TSA containing only EDTA 2 mM and without Pb were performed simultaneously in order to rule out the inhibitory effect of EDTA on bacterial growth (see Figure Supplementary Information, Figure S2). Since the strains were able to grow on EDTA, the inhibitory effect is due to Pb, not to EDTA.

10. Line 241-245 the changed metals concentration of 150 mL of TSB medium after 5 days at 28° C incubation needed to consider the influence of the isolates growth. The aim of the experiment was to assess the maximum biosorption capacity of the strains, as well as the localization of metal within the cell. Since the amount of sorbed metal is expressed as micrograms of metal per gram of bacterial dry mass, the growth of the different strains is already being considered in a per gram basis. However, the amount of metal in the supernatant (not sorbed metal) has not been determined.

11. Line 253-254 the digestive solutions of cells with different treatments were determined by ICP-OES
Corrected.

12. Line 274 please give more information on Statistical analysis methods used in this study.

The concentration of metals in soils are means \pm standard deviation of 5 independent samples. The biosorption of metals onto the surface of bacteria and the formation of biofilms onto the surface of microtrite plates were determined in three independent experiments. Results given are the means \pm standard deviations of three independent

	<p>replicates. Differences among treatments were assessed by one way analysis of variance followed by LSD test. Significant differences at $p < 0.05$ are indicated by an asterisk (lines 272 to 277 of the revised manuscript).</p> <p>13. Line 334 "...were N2-fixers" should be "...were potential N2-fixers" Done.</p> <p>14. Line 508 in spite of lots of total iron is exist in soils, Fe(II) in is a limited supply to plants growth . The high amount of Fe present in sediments is the consequence of metal lixiviation from the Iberian Pyrite Belt (Morillo et al., 2008; Sainz and Ruiz, 2006). All the sediments in these salt marshes show very high Fe contents. However, metal availability could be low. In spite of that, inoculation with siderophores producing bacteria, such as RSO6 and RSO7, could be also a strategy to mobilize Fe in case of limited availability for plant growth.</p> <p>15. Line 530-531 more information or discussion of biofilms and metals immobilization should be added. A paragraph on the bacterial resistance mechanisms in biofilms has been included (lines 537 to 545 of the revised version).</p> <p>16. Table 1 . According to the results, the Cd concentration in Odiel estuary is 4.02 ± 0.13 mg Kg⁻¹. However, no dates of this heavy metal were shown in strains heavy metal tolerance study. Data of cadmium resistance in the strains have been included (Table 2 revised version).</p> <p>17. In spite of lots of discussion on PGP and heavy metal tolerance were given in the manuscript, the interaction between PGPR and the plant growth and heavy metal accumulation is still unclear. The results of greenhouse experiments are needed to explain the influence of PGPR on phytoremediation. The aim of this study was the isolation of cultivable strains from <i>Spartina maritima</i> and the characterization of their properties, in particular, resistance towards heavy metals, biosorption, PGP properties and biofilms formation. Studies involving plant-bacteria phytoremediation experiments have been done and sent for publication elsewhere. The bacterial isolates have been used in a greenhouse experiments in order to test their influence on plant germination in polluted sediments. We have observed and amelioration of 2.5-fold in the germination rate of <i>Spartina densiflora</i> plants in these contaminated sediments. These results have been already sent for publication in Marine Pollution Bulletin. Moreover, we have also tested the influence of both, gram positive and gram negative strains, on plant growth and physiology and in metal accumulation in plant tissues. Our results have shown the positive effect of inoculation on plant growth, particularly of the gram negative strains. Regarding metal accumulation, no significant differences were obtained upon inoculation with gram negative bacteria, whereas gram positive enhanced metal accumulation only in roots, without further accumulation in shoots. All these results have been already sent for publication in Marine Pollution Bulletin.</p>
Additional Information:	
Question	Response
§Are you submitting to a Special Issue?	No
§Are you submitting to a Special Issue?	No

[Click here to view linked References](#)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 **Title:** Screening beneficial rhizobacteria from *Spartina maritima* for phytoremediation of
2 metal polluted salt marshes: Comparison of gram positive and gram negative strains

3

4 **Authors:** Karina I. Paredes-Páliz; Miguel A. Caviedes (1), Bouchra Doukkali (1), Enrique
5 Mateos-Naranjo (2), Ignacio D. Rodríguez-Llorente (1), Eloísa Pajuelo (1)

6 **Addresses:** (1) Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia,
7 Universidad de Sevilla. c/ Profesor García González, 2, 41012-Sevilla, Spain.

8 (2) Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Facultad de Biología, Universidad de
9 Sevilla. c/ Profesor García González, 4, 41012-Sevilla, Spain.

10

11 **Corresponding autor:**

12 Dr. Eloisa Pajuelo

13 e-mail: epajuelo@us.es

14 Tel.: + 34 – 954556924

15 Fax: + 34 - 954628162

16

17

18

19

20

21

22

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

23 **Abstract**

24 The aim of our work was the isolation and characterization of bacteria from the rhizosphere
25 of *Spartina maritima* in the metal contaminated Odiel estuary (Huelva, SW Spain). From
26 twenty-five strains, 84% were identified as Gram-positive, particularly *Staphylococcus* and
27 *Bacillus*. Gram-negative bacteria were represented by *Pantoea* and *Salmonella*. Salt and
28 heavy metals tolerance, metal bioabsorption, plant growth promoting (PGP) properties and
29 biofilm formation, were investigated in the bacterial collection. Despite the higher
30 abundance of Gram-positive bacteria, Gram-negative isolates displayed higher tolerance
31 towards metal(loid)s (As, Cu, Zn and Pb) and greater metal biosorption, as deduced from
32 ICP-OES and SEM-EDX analyses. Besides, they exhibited better PGP properties, which
33 were retained in the presence of metals, and the ability to form biofilms. Gram-negative
34 strains *Pantoea agglomerans* RSO6 and RSO7, together with Gram-positive *Bacillus*
35 *aryabhatai* RSO25, were selected for a bacterial consortium aimed to inoculate *S.*
36 *maritima* plants in metal polluted estuaries for phytoremediation purposes.

38 **Key words:**

39 Heavy metals, Phytoremediation, Estuaries, Odiel River, *Spartina maritima*, Plant growth
40 promoting rhizobacteria (PGPR), metal biosorption, biofilms

1
2
3
4 **50 1. Introduction**

5
6 51 Heavy metals accumulate continuously in estuaries and coastal sediments (Soliman et al.,
7
8 52 2015; Xia et al., 2011) affecting water quality, while their bioaccumulation in aquatic
9
10 53 organisms causes long-term impact on human health and ecosystems (Abdel-Baki et al.,
11
12 54 2011; Fernandes et al., 2007; Soliman et al., 2015).

13
14
15 55 In the case of the Odiel estuary (Huelva, SW Spain), both natural and anthropogenic causes
16
17 56 determine the high metal accumulation in its sediments (Ruiz et al., 2001). On the one
18
19 57 hand, the Iberian Pyrite Belt (IPB), -considered as the largest and most important
20
21 58 metallogenic sulfide province in the world-, forms a belt about 250 km long and up to 60
22
23 59 km wide, trending westwards from Seville in SW Spain to South Portugal (Fernández-
24
25 60 Caliani et al., 1997; Nieto et al., 2007). Mining activity, today abandoned, dates back to
26
27 61 prehistoric times but still generates intense Acid Mine Drainage (Galán et al., 2003; Sáinz
28
29 62 and Ruiz, 2006) into the Tinto and Odiel rivers. The acid pH (2-4) provides the
30
31 63 environment for exceptional microbial communities (Amils et al., 2013). On the other hand,
32
33 64 the city of Huelva is surrounded by one of the largest chemical and basic industries
34
35 65 complexes in Spain, which is situated between Tinto and Odiel estuaries. The proximity of
36
37 66 urban centers to these pollution sources, together with the presence of agricultural areas and
38
39 67 faunal collection (fish, shellfish and crustaceans) in adjacent areas, poses a potential risk to
40
41 68 the population, as well as, to the ecosystem of protected natural areas nearby (Iriarte et al.,
42
43 69 2007). Previous studies showed that in the Odiel estuary, the concentrations of heavy
44
45 70 metals (As: up to 700 ppm; Cu: up to 3000 ppm; Pb: up to 3570 ppm; and Zn: up to 4800
46
47 71 ppm) (Ruiz, 2001; Sáinz and Ruiz, 2006) are far above the threshold for Natural Parks,
48
49 72 according to regional regulations (Junta de Andalucía, 1999).

50
51 73 Odiel marshes provide an environment dominated by high salt concentrations adequate to
52
53 74 the establishment of resistant plants, known as halophytes (Gómez-Mercado et al., 2012;
54
55 75 Redondo-Gómez et al., 2011; Shabala, 2013). One of this plant species is *Spartina*
56
57 76 *maritima*. Besides being resistant to heavy metals, this plant tolerates other stress
58
59 77 conditions such as, drastic temperatures changes, drought, floods, tidal submergence and
60
61 78 high radiation (Cambrollé et al., 2008; Reboreda et al., 2008; Redondo-Gómez, 2013).
62
63 79 Moreover, being a grass, it tends to limit the translocation of inorganic pollutants to shoots,
64
65

1
2
3
4 80 as much as dicot species, minimizing exposure of wildlife to toxic elements (Reboreda et
5
6 81 al., 2008; Redondo-Gómez, 2013).

7
8
9 82 Phytoremediation is being consolidated as a green technology used in the reclamation of
10
11 83 soil, in which the plants and their associated microbes degrade and/or sequester organic and
12
13 84 inorganic pollutants for environmental cleanup. It is based on strategies including
14
15 85 phytoextraction, rhizorremediation, phytovolatilization and phytostabilization (Laghlimi et
16
17 86 al., 2015; Tangahu et al., 2011; Vamerali et al., 2010). Inorganics cannot be degraded, but
18
19 87 they can be phytoremediated via stabilization (immobilization of metals in the rhizosphere
20
21 88 of plant) (Mendez and Maier, 2008); or sequestration in harvestable plant tissues
22
23 89 (hyperaccumulation of metals in aerial parts of plants) (Kramer, 2010; Verbruggen et al.
24
25 90 2009). These techniques are improved by the interaction of plants and soil bacteria
26
27 91 (Germaine et al., 2013; Pajuelo et al., 2014; Tak et al., 2013), since rhizosphere bacterial
28
29 92 populations are known to play a crucial beneficial role in plant responses to heavy metal
30
31 93 stress (Burd et al., 2000; Gamalero et al., 2009). Plant growth promoting rhizobacteria
32
33 94 (PGPR) are a group of bacteria that colonize the rhizosphere of plants and promote plant
34
35 95 growth through mechanisms that include: solubilization of mineral phosphates and other
36
37 96 nutrients, biological nitrogen fixation, antagonism against phytopathogenic microorganisms
38
39 97 by production of siderophores, antibiotics, enzymes and/or fungicidal compounds, stress
40
41 98 alleviation through production of phytohormones and of 1-aminocyclopropane-carboxylate
42
43 99 (ACC) deaminase, etc. (Ahemad and Khan, 2011; Bhattacharyya and Jha, 2012; de Bashan
44
45 100 et al., 2012; Glick, 2012; Shaharoon et al., 2006). The molecular mechanisms by which
46
47 101 rhizobacteria help plants to tolerate stress are not fully understood, but there is increasing
48
49 102 information on the induction of the plant systemic tolerance to several types of stress
50
51 103 through modulation of gene expression (Sarma et al., 2012; Verhagen et al., 2004;
52
53 104 Vurukonda et al., 2016; Yang et al., 2009). Many of these activities are dependent on the
54
55 105 bacterial population; know as “quorum sensing”. In this particular, formation of biofilms
56
57 106 onto the root surface is a key process in order to achieve a minimal bacterial population and
58
59 107 also in the exchange of bacteria-bacteria and bacteria-plant signals (Badri et al., 2009;
60
61 108 Danhorn and Fuqua, 2007).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

110 Rhizosphere bacteria also play a decisive influence on metal accumulation in plants. In this
111 particular, the isolation and characterization of PGPR from *S. maritima* was previously
112 approached (Mesa et al., 2015a, b; Reboreda and Caçador, 2008). However, plant
113 inoculation assays have shown an increase in plant metal accumulation upon inoculation
114 with PGPR (Mesa et al., 2015b), whereas inoculation with endophytes led to no changes in
115 plant metal accumulation (Mesa et al., 2015c). Conversely, in some other cases, bacteria
116 were able to positively promote plant growth reducing at the same time, either plant metal
117 uptake, or its translocation to the shoot (Dary et al., 2010; El Aafi et al., 2012), and hence
118 preventing the entry of heavy metals into the food chain (Mendez and Maier, 2008).

119 The objective of the present study was prospecting rhizosphere bacteria associated with *S.*
120 *maritima* from the Odiel contaminated estuary. These isolates were selected for high heavy
121 metal resistance, metal biosorption, plant growth promoting properties and the capacity to
122 form biofilms, in order to propose a suitable inoculant for phytoremediation.

123

124 2. Material and Methods

125 2.1 Rhizosphere samples

126 Samples of *Spartina maritima* rhizosphere were collected from the Odiel estuary at a depth
127 of 10 cm in February 2014. The location of the sampling site is depicted in Supplementary
128 Information Figure S1. As for comparison, a sample of the Piedras estuary (situated near
129 the Odiel estuary, but not affected by metal pollution) was taken as a control of non-
130 polluted sediment (Supplementary Information Fig. S1). All sediment samples were stored
131 into individual plastic bags at 4° C with enough aeration until the next morning, when
132 appropriate protocols for the study began (Redondo-Gómez et al., 2007).

133 2.2. Characterization of soil samples

134 Following the methodology used by Cambrollé et al. (2008), physicochemical parameters
135 of sediment such as redox potential, pH and conductivity were measured in the samples of
136 soil. Using a portable meter and electrode system calibrated (Crison pH/mV p-506, Spain),
137 pH and redox potential parameters were determined. After diluting the sediments with
138 distilled water (1:1) in the laboratory, the conductivity of the sediment was determined with

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

139 a conductivity meter (Crison-522, Spain). Homogeneous portions of 5g soil of the Odiel
140 and Piedras estuaries (n=5 samples of each estuary) were dried in an oven for 72 hours at
141 70 °C. The concentration of heavy metals in the samples was determined by inducted
142 coupled plasma optical spectrophotometry (ICP-OES).

143

144 **2.3 Isolation of rhizosphere bacteria**

145

146 The roots of *S. densiflora* plants were shaken vigorously in order to separate the bulk soil
147 (not directly adhered to the roots). In order to collect the rhizosphere soil, pieces of roots
148 were incubated in 25 ml of sterile saline solution for 15 minutes in a sterile Falcon tube
149 under continuous shaking and allowed to stand for 3 minutes (Barillot et al., 2013). 100 µL
150 of supernatant were plated onto tryptic soy agar (TSA) medium (Thompson et al., 1993) in
151 triplicate. Plates were incubated at 28 ° C for 24 h.

152 Furthermore, in order to isolate possible halophilic bacteria, 100 µL of supernatant were
153 inoculated in three Petri dishes containing medium TSA-SW, consisting in TSA medium
154 supplemented with 17% (v/v) of the stock solution SW30 (containing 30% (w/v) of the sea
155 water salt composition): per litre, NaCl 234.0 g, MgCl₂.6H₂O 39.0 g, MgSO₄.7H₂O 61.0 g,
156 NaHCO₃ 0.2 g, NaBr 0.7 g, KCl 6.0 g, CaCl₂ 1.0 g, H₂O e.q. to 1 L (Mesa et al., 2015a).
157 Plates were incubated at 28 ° C for 48 h. Colonies with distinctly different morphologies
158 were isolated. Gram staining of every single colony was made. The collection of
159 rhizosphere bacteria were preserved in 15% sterile glycerol at -80 ° C and recovered
160 whenever necessary on TSA medium or in TSA-SW, depending on their original
161 provenance.

162

163 **2.4 Identification of rhizosphere bacteria**

164 **2.4.1 DNA extraction**

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

165 Bacteria were grown in liquid TSB medium for 24 and 28° C under continuous shaking at
166 200 rpm. Extraction of DNA was performed using the commercial Kit “G-spin™ Total”
167 (iNtRON Biotechnology, Inc) following the manufacturer's instructions.

168

169 **2.4.2 Amplification of 16S rDNA**

170 The primers used for the PCR amplification of the almost full length 16S rDNA sequences
171 were: **16F27** 5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′ and **16R1488** 5′-
172 AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3′ (Weisburg et al., 1991) synthesized by Isogen Life
173 Science™. PCR reactions were carried out using: 17.3 µl of ultrapure water, 2.5 µl of PCR
174 10X tampon (without Mg), 1 µl de MgCl₂ (50 mM), 1 µl dNTPs (10 mM), 0.2 µl ECO-Taq
175 (Ecogen) and 100 ng of genomic DNA. The PCR reaction consisted in an initial
176 denaturation step at 95° C for 10 min followed by 35 cycles (95 °C for 30 s, 58 °C for 30 s,
177 72 °C for 1 min). The thermocycler used was (SENSQUEST labcycler®).

178

179 **2.5 DNA Electrophoresis**

180 PCR samples were electrophoresed on 1% agarose gels in TAE buffer. The conditions were
181 100V for 20-30 min. For visualization of DNA, the reagent RedSafe™ Nucleic Acid
182 Staining Solution [20, 000x] was added to the gels. The transilluminator used was TFX-
183 20M UV (Invitrogen). The electrophoretic bands corresponding to 16S-rDNA PCR
184 products were excised from the gel, and DNA were extracted using “Speedtools Pcr Clean-
185 Up Kit (Biotools B&M Labs)”, according to the instructions of the manufacturer.

186

187 **2.6 Sequencing 16S rDNA PCR products and sequence analysis**

188 The bands extracted were sent for sequencing to Stabvida (Portugal). Sequence analysis
189 was made after comparison with database: EzTaxon (<http://www.Eztaxon.org>) (Chun et al.,
190 2007).

191

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

192 **2.7 Evaluation of tolerance towards heavy metals and NaCl in rhizosphere bacteria**

193 The tolerance of isolated bacteria towards heavy metals was determined on plates
194 containing TSA medium supplemented with increasing concentrations (2-10 mM) of heavy
195 metals of CuSO₄, NaAsO₂, Pb(NO₃)₂ or ZnCl₂ from stock solutions. In the case of
196 Pb(NO₃)₂, addition of the same concentration of EDTA was added in order to avoid Pb
197 precipitation. Controls in medium TSA containing only EDTA 2 mM and without Pb were
198 performed simultaneously in order to rule out the inhibitory effect of EDTA on bacterial
199 growth (Supplementary Information, Figure S2). Similarly, NaCl tolerance was evaluated
200 on TSA medium supplemented with increasing concentrations of NaCl (0 – 4M). The
201 tolerance was expressed as the maximum tolerable concentration (MTC) for each element
202 tested considering the maximum concentration of a metal or metalloid not affecting
203 bacterial growth.

204

205 **2.8 Plant growth promoting (PGP) abilities of resistant rhizobacteria**

206 **2.8.1 Detection of bacteria producing siderophores**

207 To detect bacteria producing siderophores, the culture technique using solid-plate agar
208 medium with chromium-azuroI-S (CAS) indicator was used (Machuca and Milagres, 2003).
209 One hundred microliters of fresh cultures (24h incubation at 28 ° C in TSB) of all strains
210 were added to wells excavated in CAS medium. Siderophores production was detected by
211 the formation of orange halos around the wells after 72 h incubation at 28° C. The halo
212 diameter (in mm) was used as a semiquantitative determination of siderophores production.

213

214 **2.8.2 Detection of phosphate solubilizing bacteria**

215 The detection of phosphate solubilizing bacteria was performed using the NBRiP medium
216 solidified with agar (Pikovskaya et al. 1948). One hundred microliters of fresh cultures
217 (24h incubation at 28° C in TSB) of all strains were added to wells excavated in NBRiP. It
218 was considered that the strain solubilized phosphate when there was a transparent halo

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

219 around the well after 48-72 h incubation at 28° C. The halo diameter (in mm) was used as a
220 semiquantitative determination of phosphate solubilization.

221

222 **2.8.3 Detection of auxin (IAA)-producing bacteria**

223 A colorimetric method was utilized in order to determine the concentration of indole acetic
224 acid (IAA). Test tubes containing 4 ml of TSB supplemented with L-tryptophan (0.5
225 mg/mL) were inoculated with selected strains from fresh TSA plates. The tubes were
226 incubated for 48 h at 28° C under continuous shaking at 200 rpm. After incubation, 1 ml of
227 the bacterial culture was centrifuged for 2 min at 14,000 rpm and the supernatant was
228 transferred to a new test tube. Four milliliters of Salkowsky reagent (Patten and Glick,
229 2002) were added and tubes were incubated for 20 min at room temperature until the
230 development of a pink color in IAA producing strains. Optical density at OD530 was
231 determined using a spectrophotometer (Lambda 25; PerkinElmer, USA) and compared with
232 a standard curve of pure IAA.

233

234 **2.8.4 Detection of nitrogen-fixing bacteria**

235 The ability of bacteria to fix nitrogen was evaluated in plates containing minimal medium
236 (Mesa et al., 2015a) without any nitrogen source. After 72 hours of incubation at 28 ° C,
237 growth in this medium indicated that the bacteria were able to fix nitrogen.

238

239 **2.9 Bioabsorption of heavy metals onto bacterial biomass: Analysis by ICP-OES and** 240 **SEM-EDX**

241 Bioaccumulation of Pb, Cu, Zn, As and Cd was determined in the bacterial strains: RSO6,
242 RSO7 and RSO25 according to Rodríguez-Llorente et al., (2010). Flasks with 150 mL of
243 TSB medium containing 2 mM of $Pb(NO_3)_2$ + 2 mM EDTA (added to prevent precipitation
244 of metal), 2 mM $CuSO_4$ or 2 mM $ZnCl_2$ plus a flask without metal (growth control) were
245 inoculated with 1 mL of an overnight culture of each strain. The flasks were incubated for 5
246 days at 28° C under continuous shaking at 100 rpm. After incubation, cultures were

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

247 centrifuged at 8 000 g for 20 min at room temperature. One sample of bacterial cells of
248 each metal treatment was washed twice for 5 min with water and another sample was
249 washed with 0.2 M EDTA pH 8.0. Between washing steps, cells were centrifuged at 8 000 g
250 for 20 min at room temperature. The water – washed sample corresponds to the total
251 bioaccumulation of heavy metal in the bacterial pellet (bioadsorption + bioabsorption), while
252 the sample washed with EDTA corresponds only to heavy metal accumulation within cells
253 (bioabsorption), since EDTA washes out the metal adsorbed onto the bacterial surface.
254 Finally, the cells were dried in the oven for 72 h at 60° C and metal accumulation in the
255 digestive solutions of cells with different treatments were determined by inductively
256 coupled plasma–optical emission spectrometry (ICP-OES).

257

258 **2.10. Capacity for biofilms formation**

259 The capacity for biofilms formation was evaluated through the adhesion to the surface of
260 wells of 96-well microtitre plates, as described by Del Castillo et al. (2012). Cultures of the
261 strains RSO6, RSO7 and RSO 25 were grown in TSB medium at 28 °C for 48 h. The
262 OD_{600nm} of the cultures was adjusted and normalised to 1.0 by addition of sterile medium.
263 20 µL of the normalised cultures were added to the wells of microtitre plates. For the
264 control, 20 µL of minimal medium was added. The plates were sealed with parafilm and
265 incubated at 28 °C during 4 days under static conditions. After this time, the medium was
266 removed by inverting the plate and the wells were washed 5 times with 200 µL distilled
267 water. For staining the biofilms, 200 µL 0.01% crystal violet were added to the wells and
268 incubated for 20 min. Plates were rinsed three times with 200 µL sterile water. The dye was
269 solubilized in 100 µL of 96% ethanol: glacial acetic acid (65%:35% v/v) and the
270 absorbance at 570 nm was quantified.

271

272 **2.11. Statistical analysis**

273 The concentration of metals in soils are means ± standard deviation of 5 independent
274 samples. The biosorption of metals onto the surface of bacteria and the formation of

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

275 biofilms onto the surface of microtrite plates were determined in three independent
276 experiments. Results given are the means \pm standard deviations of three independent
277 replicates. Differences among treatments were assessed by one way analysis of variance
278 followed by LSD test. Significant differences at $p < 0.05$ are indicated by an asterisk.

279

280

281 **3. Results**

282 **3.1. Characterization of soil samples**

283 Physicochemical properties of soil (texture, pH, conductivity and redox potential) were
284 measured in the Odiel sediments, and also in the non-polluted estuary Piedras (Table 1). pH
285 and redox potential are similar in both soils, but remarkable differences were observed in
286 conductivity (the estuary of Odiel had a higher salt content) and also in soil texture (whilst
287 the Odiel sediment had a higher percentage of silt, sand was more abundant in the Piedras
288 sediment). Concerning heavy metals, the concentration of all the elements studied was
289 much higher in the Odiel estuary than in the Piedras estuary (between 25 and 70 fold,
290 depending on the element). Several metal(loid)s, including As, Cu and Zn were above the
291 threshold established by regional authorities for Natural Parks (Table 1), which means that
292 intervention is compulsory. The concentration of Pb was 25-fold higher than that of the
293 Piedras estuary, but still it was below the threshold. Cadmium pollution was not relevant in
294 this sampling site. It is worth to notice that Odiel salt marshes are a reserve of the
295 Biosphere (Morillo et al., 2008).

296

297 **3.2. Identification of rhizosphere bacteria**

298 A total of 25 colonies with different morphology were isolated and identified by 16SrDNA
299 sequencing (Supplementary Information, Table S1). Gram staining revealed that 88% of the
300 cultivable bacteria, isolated from the rhizosphere of *S. maritima* were Gram-positive, and
301 belonged to the genera *Staphylococcus* (2 species; *S. saprophyticus* and *S. warneri*) and
302 *Bacillus* (3 species; *B. thuringiensis*, *B. cereus* and *B. aryabattai*). One of the Gram

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

303 positive isolates could not be identified due to no-significant homology of the 16SrDNA
304 sequence. Concerning gram negative bacteria, only 12% of the isolates were gram negative,
305 belonging to the *genera Pantoea* (2 isolates) and *Salmonella* (1 isolate).

306

307 **3.3 Evaluation of resistance towards heavy metals and NaCl in rhizosphere bacteria**

308 Using MTC (Minimum Tolerable Concentration) as the pattern of evaluation, resistance
309 towards heavy metals: Cu, Zn, As, and Pb was determined (Supplementary Information
310 Table S2). The most part of the isolates from the rhizosphere of *S. maritima* were resistant
311 to intermediate Cu concentrations (4-6 mM), (Fig. 2.A). The strains RSO6, RSO7 and
312 RSO21 were the most resistant towards Cu, reaching MTC of up to 8 mM and no one was
313 able to grow at the maximal concentration (10 mM). The resistance of the bacterial
314 collection towards As also showed that most of the strains (50%) showed an intermediate
315 level of resistance (towards 4-6 mM); 30% tolerated between 2-4 mM and no strains were
316 able to grow over 6mM As. Conversely, the resistance towards Zn showed a completely
317 different profile; most of the strains (60%) were able to grow at the maximum
318 concentration of 10 mM Zn, being RSO5, RSO16 and RSO17 the most resistant strains;
319 25% of the bacteria showed an intermediate resistance towards Zn (4-6 mM) and only a
320 small percentage (12%) was not able to grow at the minimum concentration tested (2 mM).
321 The analysis of the bacterial collection showed low resistance towards Pb (14 out of 25
322 strains only tolerated ≤ 2 mM), whereas only 12% were resistant towards the highest
323 concentrations 8-10mM, being RSO6, RSO7 and RSO25 the best strains (Fig. 2.A).

324 Finally, the resistance of isolates towards NaCl was determined. It was observed that the
325 collection of bacteria growing on medium TSA-SW also did on TSA medium (tryptone
326 soya agar) without additional salt. These results suggest that the bacteria were halotolerant,
327 not halophyles, since the presence of salt was not a requirement for growth. 46% of the
328 bacteria showed resistance towards NaCl greater than 4 mM; 12% of isolates tolerated 4
329 mM, and 42% displayed resistance towards 3 mM NaCl (Supplementary Information Table
330 S1).

331

3.4 Plant growth promoting (PGP) abilities of resistant rhizobacteria

Since the final aim of this work was proposing an inoculant for plant growth in polluted estuaries, it was interesting to test whether the isolated bacteria displayed plant growth promoting (PGP) properties, including nitrogen fixation, phosphate solubilization, siderophores production and auxins production. The complete information of all PGP properties for all the strains is given in Supplementary Information Table S3. The most extended ability was nitrogen fixation (over 50% of the bacteria were potential N₂-fixers), about one fourth of the isolates (28%) produced siderophores and 24% were able to solubilize phosphate, whereas one fifth of the bacterial collection secreted auxins (Fig. 2B).

3.5. Further characterization of gram negative strains RSO6 and RSO7 and gram positive strain RSO25

On the basis of both, metal resistance and multiple PGP properties, three bacterial strains (RSO6, RSO7 and RSO25) were selected for further characterization. First, the taxonomic identification of these strains was done by sequencing the nearly complete 16S rDNA. The amplicon sequences corresponding to RSO6 and RSO7 had 1399 and 1456 bp, respectively. They have been deposited in GenBank under the accession numbers KU052705 (RSO6) and KU052706 (RSO7). The results indicate that the strains RSO6 and RSO7 belong to the species *Pantoea agglomerans*, with a sequence identity of more than 99% in both cases. The sequence of the 16S rDNA from the strain RSO25 had a length of 1485 bp and it has been deposited in database under the accession number KU052707 (RSO25). The comparison of the sequence with database indicated that it showed 100% identity with *Bacillus aryabattai*. The taxonomic positions of the strains are shown in Supplementary Information, (Fig. S3).

The strains *Pantoea agglomerans* RSO6 and RSO7 showed resistance towards Cu (8 mM), Zn (6 mM) and Pb (more than 10 mM), as well as to the metalloid As (2-4 mM) (Table 2). The difference in arsenic resistance (2 mM vs. 4 mM) in both *Pantoea* isolates was suggestive of different isolates of the same species. The strain *Bacillus aryabattai* RSO25 displayed less resistance towards heavy metals and arsenic as compared to the *Pantoea*

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

361 strains. Regarding the PGP properties, all the three strains were able to fix nitrogen and to
362 solubilize phosphate; whereas only the *Pantoea* strains secreted siderophores. Concerning
363 auxins secretion, the *Bacillus* strain RSO25 only produced a limited amount of IAA,
364 whereas the *Pantoea* strains produced high levels of auxins (Table 2). Again, minor
365 differences were observed in some PGP properties of RSO6 and RSO7, suggesting that
366 they probably correspond to different isolates of the same species. Besides, there were
367 morphological differences among them, being RSO7 much more mucous than RSO6 (not
368 shown).

369

370 **3.6. Plant growth promoting properties in the presence of heavy metals**

371 Because of high concentrations of metals in the collection site, it was necessary to know
372 whether the selected bacteria were able to maintain their PGP properties in the presence of
373 metals (Cu, Zn, As and Pb, -the most relevant elements in the polluted area). Regarding
374 nitrogen fixation, all the strains were able to fix nitrogen in the presence of 1mM As and no
375 one did in the presence of 1mM Cu (Table 3). Only *Pantoea agglomerans* RSO7 did fix
376 nitrogen in the presence of 1 mM Zn. Nitrogen fixation in the presence of Pb could not be
377 evaluated, since PbNO₃ was used as the source of Pb. Other salts of Pb could be neither
378 used due to low solubility.

379 Concerning siderophores production, the highest concentration tested for Cu was 0.5 mM
380 because higher concentrations interfered with Chromium-Azurol-S (data not shown).
381 *Bacillus aryabattai* RSO25 was the most sensitive strain towards the presence of heavy
382 metals, since it displayed no halo in the presence of any metal, indicative that this ability
383 was abolished by the presence of these toxic elements (Table 3). By contrast, *Pantoea*
384 *agglomerans* RSO6 was the only strain maintaining siderophores production in the
385 presence of all four metals, and even it increased the halo diameter in the presence of Cu
386 and As. In its side, *Pantoea agglomerans* RSO7 had an unequal behavior: it lost its ability
387 to secrete siderophores in the presence of Pb, but showed a bigger halo diameter in Cu
388 (Table 3).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

389 With regard to phosphate solubilization, again *Bacillus aryabattai* RSO25 was the strain
390 with the highest sensitivity towards metals (Table 3). It lost the capacity to solubilize
391 phosphate in the presence of As, Pb and Zn, and only maintained 50% of phosphate
392 solubilization ability in Cu. The *Pantoea* strains showed reduced phosphate solubilization
393 (between 40-60% depending on the metal, Table 3), with the exception of RSO7, which lost
394 its phosphate solubilization capacity in contact with Pb.

395 Concerning auxins production, the results showed that Zn had a great deleterious effect on
396 this property, since all strains drastically reduced auxins production (30%) under this
397 condition (Table 3). Conversely, RSO25 and RSO7 were able to produce more auxins in the
398 presence of Cu, Pb and As than without added metal, and RSO6 showed increased auxins
399 production in the presence of Pb. Considering all these data, it could be concluded that the
400 *Pantoea* strains kept the best PGP properties, both in the absence and the presence of heavy
401 metals.

402

403 **3.7. Bioabsorption of heavy metals onto bacterial biomass: Analysis by ICP-OES and** 404 **SEM-EDX**

405 The accumulation of heavy metals Cu, Zn and Pb in dried biomass of RSO6, RSO7 and
406 RSO25 strains was measured. Two treatments were performed: washing with water (in
407 order to detect total metal accumulated inside the cells plus metal adsorbed onto the cells
408 surface), and washing with EDTA (in order to chelate metals adsorbed onto the cell surface
409 and determine only accumulated metals), (Table 4). Clear differences were observed
410 between the behavior of gram negative RSO6 and RSO7, and the gram positive RSO25.
411 The *Pantoea* strains accumulated most of Cu and Zn adsorbed onto the bacterial surface
412 (between 79 and 98 %). By contrast, Pb was equally distributed inside and outside the cell
413 of Gram negative strains. The strain RSO25 accumulated, in general, much less metals than
414 the Gram negative bacteria. Moreover, whilst most of Cu and Pb were adsorbed onto the
415 bacterial surface, most of Zn was accumulated inside the cell.

416 Since the accumulation of Pb reached the highest values in the bacterial pellets of *Pantoea*
417 *agglomerans* RSO7, a more detailed analysis was done by using scanning electron

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

418 microscopy coupled to an X-ray detection probe (SEM-EDX), in order to compare, the
419 cellular morphology of the strain in presence and absence of metal, and also in order to
420 observe the distribution of this element in the bacterial pellet at the microscopy level (Fig.
421 3). Our results showed that there was not an apparent effect on the morphology of the cells
422 by the presence of Pb (Fig. 3. A, B). Moreover, the accumulation of Pb in the pellet was not
423 uniform; by contrast, there were big white zones (corresponding to high electron density) in
424 which the metal was accumulated and others without metal (Fig. 3.C). A semi-quantitative
425 determination of Pb was done by using the EDX probe. The results indicated that, in these
426 white zones, the percentage of Pb could reach up to 37% of dry weight, equivalent to
427 almost 10% of the total number of atoms (Fig. 3.D).

428

429 **3.7. Capacity for biofilms formation**

430 The capacity for biofilms formation was evaluated on microtrite plates (Fig. 4). The strain
431 *B. aryabathai* RSO25 was not able to develop a biofilm on the surface of the wells,
432 whereas the gram negative strains of *Pantoea* did. Significant differences were found
433 between both *Pantoea* strains, being RSO7 the best strain concerning the ability for
434 biofilms formation *in vitro*.

435

436 **4. DISCUSSION**

437 The Odiel salt marshes have an environmental problem of pollution due to the occurrence
438 of several sources of metals, due to both, natural geochemical processes and anthropic origin
439 (Morillo et al., 2008). Our data also confirm the contamination of the Odiel estuary by
440 metals; the concentrations of several of them were found relevant to the threshold
441 established for natural parks by regional regulations. In particular, three elements (As, Cu
442 and Zn) are the main contaminants of this estuary.

443 The genus *Spartina* is composed of C4, perennial grasses in the family *Poaceae*. Most
444 species are salt-tolerant and colonize coastal or inland salt marshes. Special emphasis is
445 placed on some hyperaccumulator species of *Spartina*, such as *S. alterniflora* and *S.*

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

446 *maritima*, envisioning their potential use in phytoremediation, due to their high metal
447 accumulation in aboveground tissues (1000 mg g⁻¹) while yielding a large plant biomass
448 (Caçador et al., 2009; Redondo-Gómez, 2013). By contrast, *S. densiflora* immobilizes a
449 higher concentration of metal in soil, preventing the translocation from rhizosediment to
450 roots (Cambrollé et al., 2008).

451 The use of microbes in phytoremediation approaches might exert a positive
452 influence, by lowering the toxicity of metals to the plant or aiding plant growth; by
453 increasing the bioavailability of metals to achieve better uptake; and by minimizing the risk
454 for ground and surface waters (Phielers et al., 2013). Soil microbes may substitute the
455 effects otherwise provided by the application of chemical amendments to enhance the
456 solubility and availability of metals in the soil (Salt et al., 1995). In the case of *Spartina*,
457 there are reports that show the importance of rhizosphere bacteria for phytoremediation
458 assays, both of organic pollutants and metals (Hong et al., 2015; Reboreda and Caçador,
459 2008; Su et al., 2016). Several works suggest that halophyte–microorganisms interactions
460 could be potentially useful to accelerate phytoremediation of salt marshes by enhancing
461 plant growth and/or increasing plant metal accumulation (Andrades-Moreno et al., 2014;
462 Mesa et al., 2015, a, b, c). The disadvantage of this technique is the enhanced transfer of
463 metals to the aboveground plant tissues, so halophytes could be involved not only in metal
464 cycling in coastal systems (Caçador et al., 2009; Reboreda and Caçador, 2008), but also in
465 being a source of metals in non-polluted estuaries (Couto et al., 2013).

466 In this work, the cultivable bacteria present in the rizosphere of *S. maritima* have been
467 isolated and characterized, particularly focused on Gram-negative bacteria. Our results
468 indicate that Gram-positive bacteria are the predominant microbial community in the
469 rhizosphere of *S. maritima*, specifically the genera *Bacillus* and *Staphylococcus*, well
470 known as salt tolerant (Parfentjev and Catelli, 1964; Sharma et al., 2015). The environment
471 associated to tidal cycles favor the growth of Gram-positive bacteria, which are more
472 resistant towards desiccation (Potts, 1994; Billi and Potts, 2002). Concerning Gram-
473 negative bacteria, only the genera *Pantoea* and *Pseudomonas* were found. All the genera
474 isolated are commonly found in the rhizosphere and as endophytes of plants (Lugtenberg et

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

475 al., 2001; Santoyo et al., 2012; Sergeeva et al., 2007; Del Castillo et al., 2015; Mesa et al.,
476 2015 a, b).

477 Our data show a high level of resistance towards Cu, Zn, As and Pb in the bacterial
478 collection. The overall behavior was different depending on the metals; whilst the overall
479 resistance towards Zn was very high (over 50% of the strains displayed resistance towards
480 10 mM Zn), the overall resistance towards Pb was low (<2 mM), and the overall resistance
481 towards As and Cu was intermediate (4-6 mM). Three strains were selected due to multiple
482 resistances, i.e., the two *Pantoea* strains RSO6 and RSO7 and the gram positive strain
483 *Bacillus aryabattai* RSO25. The strains also displayed a high capacity for metal
484 bioaccumulation. Differences were observed again between Gram-positive and Gram-
485 negative strains. In the latest ones, 70-90% of Zn and Cu were adsorbed onto the cell
486 surface, whereas Pb was equally distributed inside and outside the cell. Moreover, up to
487 26,000 µg Pb per mg dry biomass were accumulated in the strain RSO7, with equal
488 distribution inside and outside the cell, as determined by SEM-EDX. In the Gram-positive
489 RSO25, the percentage of Zn adsorbed onto the cell surface lowered down to 20%, being
490 most part of this metal accumulated inside. Conversely, Pb was mainly accumulated outside
491 the cell. It is known that differences in the cell walls of organisms (Gram-positive and
492 Gram-negative bacteria, algae, fungi, cyanobacteria, actinomycetes, etc.) lead to different
493 biosorption properties (Abbas, 2014).

494 When selecting a bacterial inoculant for plants, it is important to check that the bacteria
495 have plant growth promoting properties (PGPR), and which is more important, that they are
496 retained under stress conditions. The presence of PGP properties in the selected strains was
497 demonstrated. Some of these properties are related to the acquisition of nutrients. Nitrogen
498 and phosphate are the two most important macronutrients in agricultural ecosystems.
499 Bacteria of the *genera Pantoea* and *Bacillus* are reported to fix atmospheric N₂ and make it
500 accessible to plants (Bhattacharyya and Jha, 2012). This property seemed not to be affected
501 by As, but conversely, it seemed to be very sensitive towards Zn, since no one of the strains
502 but RSO7 was able to fix nitrogen in the presence of this element.

503 After nitrogen, phosphorus is an essential plant nutrient. The low levels of this element
504 cause deficiencies that restrict crop yield severely. Phosphate is often found in soil in

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

505 insoluble forms; therefore, the use of microbial inoculants represents a friendly alternative
506 to chemical fertilizers (Burd et al., 2000). In the case of the *genus Pantoea*, there are many
507 species that have the ability to solubilize phosphates, by mechanisms that include, either the
508 ability to produce and excrete gluconic acid or by reducing the pH of the medium upon
509 secretion of large amount of organic acids (Castagno et al., 2011; Park et al., 2011). In our
510 work, in spite of the three strains were able to solubilize phosphate in the absence of metals,
511 only the strain RSO6 retained this ability in presence of all the metals. RSO7 maintained
512 this capacity, -except in Pb-, and the strain RSO25 only in Cu.

513 In general, iron is a scarce element and it is difficult to assimilate by plants and
514 microorganisms. In spite that Fe seems not to be a limiting element in our soil sediments
515 according to total concentration (Morillo et al., 2008; Sáinz and Ruiz, 2006), the
516 bioavailability of this metal could be lower. Many PGPR are able to produce iron chelators
517 with a high Fe³⁺ affinity known as siderophores. This ability helps the plants to acquire
518 enough iron in the presence of staggering amounts of other toxic metals, which has
519 implications not only in plant nutrition, but in the control of phytopathogens (Burd et al.,
520 2000). Another possible functions of siderophores is to act as elicitors of induced systemic
521 resistance (IRI), through molecules as cell wall lipopolysaccharide (LPS), bacterial
522 flagellins, antibiotics or volatile compounds such as 2, 3-butanediol (Bakker et al., 2007).
523 In our case, only the *Pantoea* strains were able to produce siderophores, both in the absence
524 and the presence of metals.

525 The production of phytohormones, especially auxins, is an important and well-studied
526 mechanism that contributes to plant growth by stimulation of root growth; also provides
527 resistance to biotic or abiotic stress and helps seed germination (Lugtenberg et al., 2009).
528 Most auxins in the rhizosphere of a plant come from the conversion of tryptophan secreted
529 by plant roots in IAA by rhizobacteria (Spaepen and Vanderleyden, 2011). Studies by Del
530 Castillo et al. (2015) showed 26 isolated strains of the *genus Pantoea* with high capacity to
531 produce auxins. In our results all the strains showed production of IAA without metals,
532 particularly the *Pantoea* strains. In general terms, PGPR properties in the selected strains
533 were similar to those of bacteria isolated from the rhizosphere of *Spartina densiflora* and
534 *Spartina maritima* of contaminated estuaries (Andrades-Moreno et al., 2014; Mesa et al.,

1
2
3
4 535 2015a). The increase of 10 times of auxin production in the presence of heavy metals is of
5
6 536 outstanding interest. In fact, larger root systems are a condition for efficient
7
8 537 phytoremediation (Gamalero et al., 2009; Sergeeva et al., 2007).
9

10 538 Finally, the ability to form biofilms has been also tested. Biofilm formation is a strategy
11
12 539 used by microorganisms in order to survive toxic metals by the combined action of
13
14 540 chemical, physical and physiological mechanisms linked to cellular diversification within
15
16 541 the biofilm (Harrison et al., 2007; Das et al., 2012). Minimum Inhibitory Concentration
17
18 542 (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) for different metals have been
19
20 543 reported to increase up to 100-fold for biofilms cells with regard to planktonic cells. In this
21
22 544 particular, it hypothesized that biofilms have the capacity to protect the cellular targets of
23
24 545 metal-ion toxicity, shielding cells from oxidative stress involved in planktonic-cell killing
25
26 546 (Harrison et al., 2007). In our case, the strain RSO25 could not form biofilms in our
27
28 547 conditions, whereas a gradation was observed for strains RSO6 and RSO7, being the last
29
30 548 one the best concerning this particular ability. It is worth to notice that this strain was also
31
32 549 the one producing the greatest amount of polysaccharide. This characteristic, together with
33
34 550 the good biosorption properties of *Pantoea* strains could suggest a possible application of
35
36 551 these bacteria in metal immobilization/phytostabilization in the rhizosphere of *S. maritima*
37
38 552 upon inoculation of plants with the abovementioned strains. In fact, an effect of the
39
40 553 bacterial populations in metal cycling and speciation has been reported in the rhizosphere
41
42 554 of *S. maritima* (Duarte et al., 2009; Reboreda and Caçador, 2008).

43 555 Considering the results obtained, we can conclude that, in spite of the greatest number of
44
45 556 isolates belong to the group of Gram-positive bacteria, the two isolates of *Pantoea*
46
47 557 *agglomerans* RSO6 and RSO7 exhibited the best results for resistance to, and
48
49 558 bioaccumulation of heavy metals, for PGPR properties and for the capacity to form
50
51 559 biofilms. These abilities make them very interesting as inoculants for phytoremediation
52
53 560 processes. At present, greenhouse experiments are being developed in order to test their
54
55 561 effect on *Spartina* plants grown in polluted sediments of the Odiel estuary.
56

57 562

58 563 **Acknowledgments**

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

564 This work has been financed by Junta de Andalucía (Proyecto de Excelencia P11-RNM-
565 7274). K. Paredes-Páliz has been supported by a pre-doctoral grant (SENESCYT, Ecuador).
566 The students Rafael Gil-Baena, Yoely Lantigua and Reyes Serrano are acknowledged for
567 their collaboration in the isolation and preliminary characterization of the strains. Thanks
568 are given to the Microscopy Service of the CITIUS (University of Sevilla, Spain), and
569 especially to Cristina Vaquero for her help in the preparation and analysis of samples by
570 SEM-EDX. Authors declare no conflict of interests.

571

572 **REFERENCES**

573 Abbas SH, Ismail IM, Mostafa TM, Sulaymon AH (2014) Biosorption of heavy metals: a
574 review. *J Chem Sci Technol* 3: 74-102.
575 [https://www.researchgate.net/profile/Ibrahim_Ismail6/publication/268022877_Bisor](https://www.researchgate.net/profile/Ibrahim_Ismail6/publication/268022877_Bisorption_of_heavy_metals_A_review/links/545f4a660cf295b56160e87b.pdf)
576 [ption_of_heavy_metals_A_review/links/545f4a660cf295b56160e87b.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Ibrahim_Ismail6/publication/268022877_Bisorption_of_heavy_metals_A_review/links/545f4a660cf295b56160e87b.pdf)

577 Abdel-Baki AS, Dkhil MA, Al-Quraishy S (2011) Bioaccumulation of some heavy metals
578 in tilapia fish relevant to their concentration in water and sediment of Wadi Hanifah,
579 Saudi Arabia. *Afr J Biotechnol* 10: 2541–2547.
580 <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/93185>

581 Ahemad M, Khan MS (2011) Functional aspects of plant growth promoting rhizobacteria:
582 recent advancements. *Insight Microbiol* 1: 39–54. doi: [10.1016/j.jksus.2013.05.001](https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001)

583 Amils R, Fernández-Remolar D, Parro V, Rodríguez-Manfredi JA, Timmis K, Oggerin M,
584 Sanz JL (2013) Iberian Pyrite Belt Subsurface Life (IPBSL), a Drilling Project of
585 Biohydrometallurgical Interest. *Adv Mat Res* 825: 15–18. doi: [10.3390/life4030511](https://doi.org/10.3390/life4030511)

586 Andrades-Moreno L, del Castillo I, Parra R, Doukkali B, Redondo-Gómez S,
587 Pérez-Palacios P, Caviedes MA, Pajuelo E, Rodríguez-Llorente ID (2014)
588 Prospecting metal-resistant plant-growth promoting rhizobacteria for
589 rhizoremediation of metal contaminated estuaries using *Spartina densiflora*.
590 *Environ Sci Pollut Res* 21: 3713–3721. doi: [10.1007/s11356-013-2364-8](https://doi.org/10.1007/s11356-013-2364-8)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

591 Badri DV, Weir TL, Van der Lelie D, Vivanco JM (2009) Rhizosphere chemical dialogues:
592 plant–microbe interactions. *Curr Opin Biotechnol* 20: 642-650. doi:
593 [10.1016/j.copbio.2009.09.014](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.09.014)

594 Bakker PA, Pieterse CM, van Loon LC (2007) Induced Systemic Resistance by Fluorescent
595 *Pseudomonas* spp. *Phytopathol* 97: 239-243. doi: [10.1094/PHYTO-97-2-0239](https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-2-0239)

596 Barillot CDC, Sarde CO, Bert V, Tarnaud E, Cochet N (2013) A standardized method for
597 the sampling of rhizosphere and rhizoplan soil bacteria associated to a herbaceous
598 root system. *Ann Microbiol* 63: 471-476. doi: [10.1007/s13213-012-0491-y](https://doi.org/10.1007/s13213-012-0491-y)

599 Bhattacharyya PN, Jha DK (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR):
600 emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol* 28: 1327–1350. doi:
601 [10.1007/s11274-011-0979-9](https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9)

602 Billi D, Potts M (2002) Life and death of dried prokaryotes. *Res Microbiol* 153: 7-12. doi:
603 [10.1016/S0923-2508\(01\)01279-7](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01279-7)

604 Burd G, Dixon DG, Glick BR (2000) Plant growth-promoting bacteria that
605 decreases heavy metal toxicity in plants. *Can J Microbiol* 46: 237–245.
606 doi: [10.1139/w99-143](https://doi.org/10.1139/w99-143)

607 Caçador I, Caetano M, Duarte B, Vale C (2009) Stock and losses of trace metals from salt
608 marsh plants. *Mar Environ Res* 67: 75-82. doi: [10.1016/j.marenvres.2008.11.004](https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2008.11.004)

609 Cambrollé J, Redondo-Gómez S, Mateos-Naranjo E, Figueroa ME (2008) Comparison of
610 the role of two *Spartina* species in terms of phytostabilization and bioaccumulation
611 of metals in the estuarine sediment. *Mar Poll Bull* 56: 2037-2042. doi:
612 [10.1016/j.marpolbul.2008.08.008](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.08.008)

613 Castagno LM, Estrella MJ, Sannazzaro AI, Grassano AE, Ruiz OA (2011) Phosphate-
614 solubilization mechanism and *in vitro* plant growth promotion activity mediated by
615 *Pantoea eucalypti* isolated from *Lotus tenuis* rhizosphere in the Salado River Basin
616 (Argentina). *J Appl Microbiol* 110: 1151-1165. doi: [10.1111/j.1365-
617 2672.2011.04968.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04968.x)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

618 Chun J, Lee JH, Jung Y, Kim M, Kim S, Kim BK, Lim YW (2007) EzTaxon: a web-based
619 tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene
620 sequences. *Int J System Evol Microbiol* 57: 2259-2261. doi: [10.1099/ijs.0.64915-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.64915-0)

621 Couto T, Duarte B, Barroso D, Caçador I, Marques JC (2013) Halophytes as sources of
622 metals in estuarine systems with low levels of contamination. *Funct Plant Biol* 40:
623 931-939. doi: [10.1071/FP12300](https://doi.org/10.1071/FP12300)

630 Danhorn T, Fuqua C (2007) Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Ann Rev*
631 *Microbiol* 61: 401-422. doi: [10.1146/annurev.micro.61.080706.093316](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093316)

632 Dary M, Chamber-Pérez MA, Palomares A J, Pajuelo E (2010) “In situ” phytostabilisation
633 of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant
634 plant-growth promoting rhizobacteria. *J Haz Mat* 177: 323-330.
635 doi: [10.1016/j.jhazmat.2009.12.035](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.12.035)

636 Das N, Geetanjali Basak LV, Salam JA, Abigail MEA (2012) Application of Biofilms on
637 Remediation of Pollutants – An Overview. *J Microbiol Biotechnol Res* 2: 783-790.
638 doi: [JMB-2012-2-5-783-790](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.12.035)

639 De-Bashan LE, Hernandez JP, Bashan Y (2012) The potential contribution of plant growth
640 promoting bacteria to reduce environmental degradation: A comprehensive
641 evaluation. *Appl Soil Ecol* 61: 171-189. doi: [10.1016/j.apsoil.2011.09.003](https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.09.003)

642 Del Castillo I, Hernández P, Lafuente A, Rodríguez-Llorente ID, Caviedes MA, Pajuelo E
643 (2012) Self-bioremediation of cork-processing wastewaters by (chloro) phenol-
644 degrading bacteria immobilised onto residual cork particles. *Water Res* 46: 1723-
645 1734. doi: [10.1016/j.watres.2011.12.038](https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.12.038)

646 Del Castillo I, Ojeda J, Megías E, Manyani H, López-Baena FJ, Pérez-Montañó F, Bellogín
647 RA, Espuny MR, Cubo MT, Ollero FJ, Megías M (2015) Isolation of endophytic,
648 epiphytic and rhizosphere plant growth-promoting bacteria from cultivated rice
649 paddy soils of the Guadalquivir river marshes. *Global Adv Res J Agric Sci* 4, 127-
650 136. doi: <http://garj.org/garjas/3/2015/4/3/isolation-of-endophytic>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

651 Duarte B, Almeida PR, Caçador I (2009) *Spartina maritima* (cordgrass) rhizosediment
652 extracellular enzymatic activity and its role in organic matter decomposition
653 processes and metal speciation. Mar Ecol 30: 65-73. doi: [10.1111/j.1439-
654 0485.2009.00326.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0485.2009.00326.x)

655 El Aafi N, Brhada F, Dary M, Maltouf AF, Pajuelo E (2012) Rhizostabilization of metals in
656 soils using *Lupinus luteus* inoculated with the metal resistant rhizobacterium
657 *Serratia* sp. MSMC541. Int J Phytorem 14: 261-274. doi:
658 [10.1080/15226514.2011.604693](https://doi.org/10.1080/15226514.2011.604693)

660 Fernandes C, Fontainhas-Fernandes A, Peixoto F, Salgado MA (2007) Bioaccumulation of
661 heavy metals in *Liza saliens* from the Esomriz-Paramos coastal lagoon, Portugal.
662 Ecotoxicol Environ Saf 66: 426–431. doi: [10.1016/j.ecoenv.2006.02.007](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.02.007)

663 Fernández-Caliani JC, Ruiz F, Galán E (1997) Clay mineral and heavy metal distributions
664 in the lower estuary of Huelva and adjacent Atlantic shelf, SW Spain. Sci Total
665 Environ 198: 181–200. doi: [10.1016/S0048-9697\(97\)05450-8](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(97)05450-8)

666 Galán E, Gómez-Ariza JL, González I, Fernández-Caliani JC, Morales E, Giráldez I (2003)
667 Heavy metal partitioning in river sediments severely polluted by acid mine drainage
668 in the Iberian Pyrite Belt. Appl Geochem 18: 409-421. doi: [10.1016/S0883-
669 2927\(02\)00092-6](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(02)00092-6)

670 Gamalero E, Lingua G, Berta G, Glick BR (2009) Beneficial role of plant growth promoting
671 bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on plant responses to heavy metal stress.
672 Can J Microbiol 55: 501–514. doi: [10.1139/W09-010](https://doi.org/10.1139/W09-010)

673 Germaine KJ, McGuinness M, Dowling DN (2013) Improving phytoremediation through
674 plant-associated bacteria. Mol Microb Ecol Rhizos 2: 961-973. doi:
675 [10.1002/9781118297674.ch91](https://doi.org/10.1002/9781118297674.ch91)

676 Glick BR (2012) Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and
677 applications. Scientifica. doi: [10.6064/2012/963401](https://doi.org/10.6064/2012/963401)

678 Gómez-Mercado F, Moral-Torres F, Jiménez-Luque E, de Haro-Lozano S (2012) Salinity
679 tolerance of the hygrophilous plant species in the wetlands of the south of the

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

680 Iberian peninsula. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici* 40: 18-28.
681 <http://www.notulaebotanicae.ro/index.php/nbha/article/view/7784>

682 Harrison JJ, Ceri H, Turner RJ (2007) Multimetal resistance and tolerance in microbial
683 biofilms. *Nature Rev Microbiol* 5: 928–938. doi:[10.1038/nrmicro1774](https://doi.org/10.1038/nrmicro1774)

684 Hong Y, Liao D, Chen J, Khan S, Su J, Li H (2015) A comprehensive study of the impact
685 of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contamination on salt marsh plants
686 *Spartina alterniflora*: implication for plant-microbe interactions in
687 phytoremediation. *Environ Sci Pollut Res* 22: 7071-7081. doi: [10.1071/FP12300](https://doi.org/10.1071/FP12300)

688 Iriarte A, Bouza P, Simón M, Aguilar J, Díez M, Mertín F, Sierra M (2007) Contaminación
689 por metales pesados y arsénico en los suelos de la Ría de Huelva, en: Bellinfante,
690 N., Jordán, A. (Eds.), *Tendencias Actuales de la Ciencia del Suelo*. Universidad de
691 Sevilla, pp. 148-154. [ISBN 978-84-690-4129-1](https://doi.org/10.1007/978-84-690-4129-1)

692 Junta de Andalucía. Consejería de Medioambiente (1999) Los criterios y estándares para
693 declarar un suelo contaminado en Andalucía y la metodología y técnicas de toma de
694 muestra y análisis para su investigación.
695 [http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/web/Bloques Tematicos/Estado Y](http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/web/Bloques_Tematicos/Estado_Y_Calidad_De_Los_Recursos_Naturales/Suelo/Criterios_pdf/Elementos.pdf)
696 [_Calidad_De_Los_Recursos_Naturales/Suelo/Criterios_pdf/Elementos.pdf](http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/web/Bloques_Tematicos/Estado_Y_Calidad_De_Los_Recursos_Naturales/Suelo/Criterios_pdf/Elementos.pdf)

697 Krämer U (2010) Metal hyper-accumulation in plants. *Ann Rev Plant Biol* 61: 517–534.
698 doi: [10.1146/annurev-arplant-042809-112156](https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112156)

699 Laghlimi M, Baghdad B, El Hadi H, Bouabdli A (2015) Phytoremediation Mechanisms of
700 Heavy Metal Contaminated Soils: A Review. *Open J Ecol* 5: 375. doi:
701 [10.4236/oje.2015.58031](https://doi.org/10.4236/oje.2015.58031)

702 Lugtenberg BJ, Dekkers L, Bloemberg GV (2001) Molecular determinants of rhizosphere
703 colonization by *Pseudomonas*. *Ann Rev Phytopathol* 39: 461-90. doi:
704 [10.1146/annurev.phyto.39.1.461](https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.39.1.461)

711 Lugtenberg BJ, Kamilova F (2009) Plant growth-promoting rhizobacteria. *Ann Rev*
712 *Microbiol* 63: 541-556. doi: [10.1146/annurev.micro.62.081307.162918](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

713 Machuca A, Milagres AM (2003) Use of CAS-agar plate modified to study the effect of
714 different variables on the siderophore production by *Aspergillus*. Lett Appl
715 Microbiol 36: 177–181. doi: [10.1016/j.mimet.2007.03.023](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.03.023)

716 Mendez MO, Maier RM (2008) Phytostabilisation of mine tailings in arid and semiarid
717 environments: an emerging remediation technology. Environ Health Perspect 116:
718 278–283. doi: [10.1289/ehp.10608](https://doi.org/10.1289/ehp.10608)

719 Mesa J, Mateos-Naranjo E, Caviedes MA, Redondo-Gómez S, Pajuelo E, Rodríguez-
720 Llorente ID (2015a). Scouting contaminated estuaries: Heavy metal resistant and
721 plant growth promoting rhizobacteria in the native metal rhizoaccumulator *Spartina*
722 *maritima*. Mar Pollut Bull 90: 150-159. doi: [10.1016/j.marpolbul.2014.11.002](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.11.002)

723 Mesa J, Rodríguez-Llorente ID, Pajuelo E, Piedras JMB, Caviedes MA, Redondo-Gómez
724 S, Mateos-Naranjo E (2015b) Moving closer towards restoration of contaminated
725 estuaries: Bioaugmentation with autochthonous rhizobacteria improves metal
726 rhizoaccumulation in native *Spartina maritima*. J Haz Mat 300: 263-271. doi:
727 [10.1016/j.jhazmat.2015.07.006](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.07.006)

728 Mesa J, Mateos-Naranjo E, Caviedes MA, Redondo-Gómez S, Pajuelo E, Rodríguez-
729 Llorente ID (2015c) Endophytic cultivable bacteria of the metal bioaccumulator
730 *Spartina maritima* improve plant growth but not metal uptake in polluted marshes
731 soils. Front Microbiol 6. doi: [10.3389/fmicb.2015.01450](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01450)

732 Morillo J, Usero J, Rojas R (2008) Fractionation of metals and As in sediments from a
733 biosphere reserve (Odiel salt marshes) affected by acidic mine drainage. Environ
734 Monitor Assess 139: 329-337. doi: [10.1007/s10661-007-9839-3](https://doi.org/10.1007/s10661-007-9839-3)

747 Nieto JM, Sarmiento AM, Olías M, Cánovas CR, Riba I, Kalman J, Delvalls TA (2007)
748 Acid mine drainage pollution in the Tinto and Odiel Rivers (Iberian Pyrite Belt, SW
749 Spain) and bioavailability of the transported metals to the Huelva estuary. Environ
750 Int 33: 445–455. doi: [10.1016/j.envint.2006.11.010](https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.11.010)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

762 Pajuelo E, Rodríguez-Llorente ID, Lafuente A, Pérez-Palacios P, Doukkali B, Caviedes MA
763 (2014) Engineering the rhizosphere for the purpose of bioremediation: an
764 overview. CAB Reviews 9: 1. doi: [10.1079/PAVSNNR20149001](https://doi.org/10.1079/PAVSNNR20149001)

765 Parfentjev IA, Catelli AR (1964) Tolerance of *Staphylococcus aureus* to sodium chloride. J
766 Bacteriol 88: 1-3. doi: <http://jb.asm.org/content/88/1/1.full.pdf>

767 Park JH, Bolan N, Megharaj M, Naidu R (2011) Isolation of phosphate solubilizing bacteria
768 and their potential for lead immobilization in soil. J Hazardous Materials 185: 829-
769 836. doi : [10.1016/j.jhazmat.2010.09.095](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.09.095)

770 Patten CL, Glick BR (2002) Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development
771 of the host plant root system. Appl Environ Microbiol 68: 3795-3801. doi:
772 [10.1128/AEM.68.8.3795-3801.2002](https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3795-3801.2002)

773 Phieler R, Voit A, Kothe E (2013) Microbially supported phytoremediation of heavy metal
774 contaminated soils: strategies and applications. Geobiotechnol 1, 211-235. doi:
775 [10.1007/10_2013_200](https://doi.org/10.1007/10_2013_200)

776 Pikovskaya RI (1948) Mobilization of phosphorous in soil connection with the vital activity
777 of some microbial species. Microbiologiya 17, 362-370.

778 Potts M (1994) Desiccation tolerance of prokaryotes. Microbiol Rev 58: 755-805. PMID:
779 [7854254](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7854254/)

780 Reboreda R, Caçador I (2008) Enzymatic activity in the rhizosphere of *Spartina maritima*:
781 potential contribution for phytoremediation of metals. Mar Environ Res 65, 77-84.
782 doi: [10.1016/j.marenvres.2007.09.001](https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2007.09.001)

783 Reboreda R, Caçador I, Pedro S, Almeida P (2008) Mobility of metals in salt marsh
784 sediments colonised by *Spartina maritima* (Tagus estuary, Portugal). Hydrobiologia
785 606: 129–137. doi: [10.1007/s10750-008-9340-1](https://doi.org/10.1007/s10750-008-9340-1)

786 Redondo-Gómez S (2013) Bioaccumulation of heavy metals in *Spartina*. Funct Plant Biol
787 40: 913-921. doi: [10.1071/FP12271](https://doi.org/10.1071/FP12271)

788 Redondo-Gómez S, Mateos-Naranjo E, Davy AJ, Fernández-Muñoz F, Castellanos ME,
789 Luque T, Figueroa ME (2007) Growth and photosynthetic responses to salinity of

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

790 the salt-marsh shrub *Atriplex portulacoides*. Ann Bot 100: 555–563. doi:
791 [10.1093/aob/mcm119](https://doi.org/10.1093/aob/mcm119)

792 Redondo-Gómez S, Andrades-Moreno L, Mateos-Naranjo E, Parra R, Valera-Burgos J,
793 Aroca R (2011) Synergic effect of salinity and zinc stress on growth and
794 photosynthetic responses of the cordgrass *Spartina densiflora*. J Exp Bot 62: 5521-
795 5530. doi: [10.1093/jxb/err234](https://doi.org/10.1093/jxb/err234)

796 Rodríguez-Llorente ID, Dary M, Gamane D, El Hamdaoui A, Doukkali B, Lafuente A,
797 Delgadillo J, Caviedes MA, Pajuelo E (2010) Cadmium biosorption properties of
798 the metal resistant *Ochrobactrum cytisi* Azn6.2. Engineer Life Sci 10: 49–56. doi:
799 [10.1002/elsc.200900060](https://doi.org/10.1002/elsc.200900060)

800 Ruiz F (2001) Trace metals in estuarine sediments of southwestern Spain. Mar Pollut Bull
801 42: 481-489. doi : [10.1016/S0025-326X\(00\)00192-2](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(00)00192-2)

802 Sáinz A, Ruiz F (2006) Influence of the very polluted inputs of the Tinto–Odiel system on
803 the adjacent littoral sediments of south-western Spain: a statistical approach.
804 Chemosphere 62: 1612–1622. doi: [10.1016/j.chemosphere.2005.06.045](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.06.045)

805 Salt DE, Blaylock M, Kumar N, Dushenkov V, Ensley BD, Chet I, Raskin I (1995)
806 Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the
807 environment using plants. Biotechnol 13: 468–474. [PMID: 9634787](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9634787/)

808 Santoyo G, Orozco-Mosqueda MDC, Govindappa M (2012) Mechanisms of biocontrol and
809 plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and
810 *Pseudomonas*: a review. Biocontrol Sci Technol 22: 855-872. doi:
811 [10.1080/09583157.2012.694413](https://doi.org/10.1080/09583157.2012.694413)

812 Sarma BK, Yadav SK, Singh DP, Singh HB (2012) Rhizobacteria mediated induced
813 systemic tolerance in plants: prospects for abiotic stress management, in:
814 Maheshwari, D.K. (Ed.), Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management. Springer
815 Berlin Heidelberg., New York, pp. 225-238. doi: [10.1007/978-3-642-23465-1_11](https://doi.org/10.1007/978-3-642-23465-1_11)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

816 Sergeeva E, Hirkala DL, Nelson LM (2007) Production of indole-3-acetic acid, aromatic
817 amino acid aminotransferase activities and plant growth promotion by *Pantoea*
818 *agglomerans* rhizosphere isolates. Plant Soil 297: 1-13. doi: [10.1007/s11104-007-](https://doi.org/10.1007/s11104-007-9314-5)
819 [9314-5](https://doi.org/10.1007/s11104-007-9314-5)

820 Shabala S (2013) Learning from halophytes: physiological basis and strategies to improve
821 abiotic stress tolerance in crops. Ann Bot 112: 1209–1221. doi:
822 [10.1093/aob/mct205](https://doi.org/10.1093/aob/mct205).

823 Shaharoon B, Arshad M, Zahir ZA, Khalid A (2006) Performance of *Pseudomonas* spp.
824 containing ACC-deaminase for improving growth and yield of maize (*Zea mays* L.)
825 in the presence of nitrogenous fertilizer. Soil Biol Biochem 38: 2971–2975. doi:
826 [10.1016/j.soilbio.2006.03.024](https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.03.024)

827 Sharma A, Singh P, Kumar S, Kashyap PL, Srivastava AK, Chakdar H, Sharma AK (2015)
828 Deciphering diversity of salt-tolerant *bacilli* from saline soils of eastern Indo-
829 gangetic plains of India. Geomicrobiol J 32: 170-180. doi:
830 [10.1080/01490451.2014.938205](https://doi.org/10.1080/01490451.2014.938205)

831 Soliman NF, Nasr SM, Okbah AA (2015) Potential ecological risk of heavy metals in
832 sediments from the Mediterranean coast, Egypt. J Environ Health Sci Engineer
833 13:70. doi: [10.1186/s40201-015-0223-x](https://doi.org/10.1186/s40201-015-0223-x)

834 Spaepen S, Vanderleyden J (2011) Auxin and plant-microbe interactions. Cold Spring
835 Harbor Perspectives in Biology 3, a001438. doi: [10.1101/cshperspect.a001438](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001438)

836 Su J, Ouyang W, Hong Y, Liao D., Khan S, Li H (2016) Responses of endophytic and
837 rhizospheric bacterial communities of salt marsh plant (*Spartina alterniflora*) to
838 polycyclic aromatic hydrocarbons contamination. J Soils Sediments 16: 707-715.
839 doi: [10.1007/s11368-015-1217-0](https://doi.org/10.1007/s11368-015-1217-0)

840 Tak HI, Ahmad F, Babalola OO (2013) Advances in the application of plant growth-
841 promoting rhizobacteria in phytoremediation of heavy metals. Rev Environ
842 Contamin Toxicol 223, 33-52. doi: [10.1007/978-1-4614-5577-6](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5577-6)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

843 Tangahu BV, Sheikh Abdullah SR, Basri H, Idris M, Anuar N, Mukhlisin M (2011) A
844 review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through
845 phytoremediation. Int J Chem Engineer 2011. doi: [10.1155/2011/939161](https://doi.org/10.1155/2011/939161)

852 Thompson IP, Bayley MJ, Fenlon JS, Fermor TR, Lilley AK, Lynch JM, McCormack PJ,
853 Purdy KJ, McQuilken MP, Rainey PB, Whipps JM (1993) Quantitative and
854 qualitative seasonal changes in the microbial community from the phyllosphere of
855 sugar beet (*Beta vulgaris*). Plant Soil 150: 177-191. doi: [10.1007/BF00013015](https://doi.org/10.1007/BF00013015)

856 Vamerali T, Bandiera M, Mosca G. (2010) Field crops for phytoremediation of metal
857 contaminated land. A review. Environ Chem Lett 8: 1–17. doi: [10.1007/s10311-009-](https://doi.org/10.1007/s10311-009-0268-0)
858 [0268-0](https://doi.org/10.1007/s10311-009-0268-0)

859 Verbruggen N, Hermans C, Schat H (2009) Molecular mechanisms of metal
860 hyperaccumulation in plants. New Phytol 181: 759-776. doi: [10.1111/j.1469-](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02748.x)
861 [8137.2008.02748.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02748.x)

862 Verhagen BW, Glazebrook J, Zhu T, Chang HS, Van Loon LC, Pieterse CM (2004) The
863 transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. Mol
864 Plant Microb Interact 17: 895-908. doi: [10.1094/MPMI.2004.17.8.895](https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.8.895)

865 Vurukonda SSKP, Vardharajula S, Shrivastava M, SkZ A (2016) Enhancement of drought
866 stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. Microbiological
867 Research 184, 13-24. doi: [10.1016/j.micres.2015.12.003](https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.003)

868 Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification
869 for phylogenetic study. J Bacteriol 173: 697– 703. doi:
870 <http://jb.asm.org/content/173/2/697.short>

871 Xia P, Meng X, Yin P, Cao Z, Wang X (2011) Eighty-year sedimentary record of heavy
872 metal inputs in the intertidal sediments from the Nanliu River estuary, Beibu Gulf of
873 South China Sea. Environ Pollut 159: 92–99.
874 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749110004197>

1
2
3
4 875 Yang J, Kloepper JW, Ryu CM (2009) Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic
5
6 876 stress. Trends Plant Sci 14: 1-4. doi: [10.1016/j.tplants.2008.10.004](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.10.004)
7
8

9 877

10 878 **LEGENDS FOR FIGURES**

11
12 879

13
14 880 **Figure 1. Analysis of metal resistance and plant growth promoting properties in**
15 **bacteria from the rhizosphere of *S. maritima*.** A. Number of isolates grouped according
16 881 to Cu, Zn, As and Pb resistance range. B. Percentage of isolated strains with different PGP
17 882 properties in the absence of heavy metals.
18
19 883

20
21 884

22
23 885 **Figure 2. Best performing strains based on their PGP properties.** Siderophores in the
24 886 presence and the absence of Zn (A). P-Solubilization in the presence and the absence of As
25 887 (B). N-fixation in the presence and the absence of As (C). IAA production in different
26
27 888 selected strains in the presence of As and Pb (D).
28
29 889

30
31 890

32 891 **Figure 3. Analysis of Pb biosorption in RSO7 by SEM-EDX.** A, B. Scanning electron
33 892 microscopy (SEM), showing the morphological aspect of RSO7 cells in the absence (A) or
34 893 the presence (B) of Pb. C. SEM-EDX of RSO7 corresponding to B showing areas with high
35
36 894 metal content. D. Spectrum data of the white area as shown in C.
37
38 895

39
40 896

41 897 **Figure 4. Evaluation of biofilms formation on a microtitre plate assay.** Bacterial strains
42 898 were grown in the presence of TSB in the wells of a 96-well microtitre plate for 4 days at
43 899 28°C. After this time, the formation of biofilms on the surface of the plate was evaluated by
44 900 a colorimetric determination. Values are means \pm S.E. (n = 3).
45
46 901

47
48 902

49
50 903

51
52 904

53
54 905

55
56 906

57
58 907

59
60 908

61
62 909

63
64 910

65
66 911

1
2
3
4 905
5
6 906
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Dear Editor Professor Robert Duran,

Thank you very much for your mail with the evaluation of our manuscript titled "Screening beneficial rhizobacteria from *Spartina maritima* for phytoremediation of metal polluted salt marshes: Comparison of gram positive and gram negative strains", which we submitted for publication in Environmental Science and Pollution Research.

We have carefully read all the comments and suggestions posed by reviewers, and we have elaborated an itemized response to all of them. We have done the corresponding changes in the text (highlighted in yellow in the revised manuscript). We hope that the new version could satisfy the questions of the reviewers and that the manuscript could be acceptable for publication in ESPR.

Yours sincerely,

Dr. Eloisa Pajuelo

Corresponding author

Responses to Reviewers' comments:

Reviewer #4: This study "Screening beneficial rhizobacteria from *Spartina maritima* for phytoremediation of metal polluted salt marshes: Comparison of gram positive and gram negative strains"(Ms. No. ESPR-D-16-01478) carried out a serious of studies. The *Spartina maritima* plants were important to heavy metals contaminated soil remediation study. In this study, twenty-five strains were isolated from rhizosphere of *Spartina maritima* in the metal contaminated sediments. The study on gram positive and gram negative strains with plant growth promoting properties under heavy metal stress is interesting. However, for this manuscript to be suitable for publication in Environmental Science and Pollution Research, major changes are required. Please ask a native English speaker to correct sentences in the manuscript. The instruction and the aims of the this study should be concise.

Major comments:

1. Line 28 "plant growth promoting properties (PGPR)" may be "plant growth promoting (PGP) properties".

Thank you very much for the correction.

2. Line 119-125 in this study, inoculant isolates to improve metal phytostabilization was not carried out. So, the objects of the present study should be accuracy.

Since the plant-bacteria phytoremediation experiments were not done in this work, the last part of the introduction has been shortened accordingly (lines 118-121 of the revised version).

3. Line 129 samples should be Sediment samples

Corrected.

4. Line 144 please give reference and necessary description.

The roots of *S. densiflora* plants were shaken vigorously in order to separate the bulk soil (not directly adhered to the roots). In order to collect the rhizosphere soil, pieces of roots were incubated in 25 ml of sterile saline solution for 15 minutes in a sterile Falcon tube under continuous shaking and allowed to stand for 3 minutes, according to Barillot et al., 2013. The reference has been included in the literature (page 22, lines 593- 595) of the revised version.

5. Line 152 please give reference of TSA medium or list the components of the medium

Reference of TSA medium (Thompson et al., 1993) is provided, line 149 of the revised version. Cite is included in the literature accordingly (lines 855-858).

6. Line 154 halophylic should be halophilic

Corrected.

7. Line 161 pure strain?

Yes. Gram staining of single colonies was performed (line 157). Only one morphology was observed. Furthermore, data of 16S rDNA from RSO6 and RSO7 showed over 99.9% identity with *Pantoea agglomerans* and that of RSO25 displayed 100% identity with *Bacillus aryabhatai*, indicating a good sequence and no mix of cultures.

8. Line 191 the blast results of NCBI should be included

Accession numbers are provided for the three strains. Moreover, an additional Figure (Supplementary Information, Figure S3) has been included with the taxonomical position of the strains.

9. Line 198 the controls without EDTA should be set to exclude the inhibit of EDTA on strain growth.

Controls in medium TSA containing only EDTA 2 mM and without Pb were performed simultaneously in order to rule out the inhibitory effect of EDTA on bacterial growth (see Figure Supplementary Information, Figure S2). Since the strains were able to grow on EDTA, the inhibitory effect is due to Pb, not to EDTA.

10. Line 241-245 the changed metals concentration of 150 mL of TSB medium after 5 days at 28° C incubation needed to consider the influence of the isolates growth.

The aim of the experiment was to assess the maximum biosorption capacity of the strains, as well as the localization of metal within the cell. Since the amount of sorbed metal is expressed as micrograms of metal per gram of bacterial dry mass, the growth of the different strains is already being considered in a per gram basis. However, the amount of metal in the supernatant (not sorbed metal) has not been determined.

11. Line 253-254 the digestive solutions of cells with different treatments were determined by ICP-OES

Corrected.

12. Line 274 please give more information on Statistical analysis methods used in this study.

The concentration of metals in soils are means \pm standard deviation of 5 independent samples. The biosorption of metals onto the surface of bacteria and the formation of biofilms onto the surface of microtrite plates were determined in three independent experiments. Results given are the means \pm standard deviations of three independent replicates. Differences among treatments were assessed by one way analysis of variance followed by LSD test. Significant differences at $p < 0.05$ are indicated by an asterisk (lines 272 to 277 of the revised manuscript).

13. Line 334 "...were N₂-fixers" should be "...were potential N₂-fixers"

Done.

14. Line 508 in spite of lots of total iron is exist in soils, Fe(II) in is a limited supply to plants growth .

The high amount of Fe present in sediments is the consequence of metal lixiviation from the Iberian Pyrite Belt (Morillo et al., 2008; Sainz and Ruiz, 2006). All the sediments in these salt marshes show very high Fe contents. However, metal availability could be low. In spite of that, inoculation with siderophores producing bacteria, such as RSO6 and RSO7, could be also a strategy to mobilize Fe in case of limited availability for plant growth.

15. Line 530-531 more information or discussion of biofilms and metals immobilization should be added.

A paragraph on the bacterial resistance mechanisms in biofilms has been included (lines 537 to 545 of the revised version).

16. Table 1 . According to the results, the Cd concentration in Odiel estuary is 4.02 ± 0.13 mg Kg⁻¹. However, no dates of this heavy metal were shown in strains heavy metal tolerance study.

Data of cadmium resistance in the strains have been included (Table 2 revised version).

17. In spite of lots of discussion on PGP and heavy metal tolerance were given in the manuscript, the interaction between PGPR and the plant growth and heavy metal accumulation is still unclear. The results of greenhouse experiments are needed to explain the influence of PGPR on phytoremediation.

The aim of this study was the isolation of cultivable strains from *Spartina maritima* and the characterization of their properties, in particular, resistance towards heavy metals, biosorption, PGP properties and biofilms formation. Studies involving plant-bacteria phytoremediation experiments have been done and sent for publication elsewhere.

The bacterial isolates have been used in a greenhouse experiments in order to test their influence on plant germination in polluted sediments. We have observed and amelioration of 2.5-fold in the germination rate of *Spartina densiflora* plants in these contaminated sediments. These results have been already sent for publication in Marine Pollution Bulletin.

Moreover, we have also tested the influence of both, gram positive and gram negative strains, on plant growth and physiology and in metal accumulation in plant tissues. Our results have shown the positive effect of inoculation on plant growth, particularly of the gram negative strains. Regarding metal accumulation, no significant differences were obtained upon inoculation with gram negative bacteria, whereas gram positive enhanced metal accumulation only in roots, without further accumulation in shoots. All these results have been already sent for publication in Marine Pollution Bulletin.

TABLES**Table 1.** Physicochemical properties and total content of relevant metals in soils from the Odiel and Piedras salt marshes at the sampling sites. Values are mean \pm SE of five replicates.

Physico-chemical properties							
Soil	Texture (*) (%)	Redox (mV)	potential	Conductivity (mS cm⁻¹)	pH	Organic matter (%)	Nitrogen (%)
Odiel	60/16/24	262 \pm 10		15.62 \pm 0.5	6.88 \pm 0.1	13.5 \pm 0.2	0.27 \pm 0.1
Piedras	20/14/66	150 \pm 15		1.2 \pm 0.4	7.6 \pm 0.3	11.4 \pm 0.5	0.23 \pm 0.1
Heavy metals concentration in soil (mg/Kg)							
Soil	Fe	As	Pb	Zn	Cu	Cd	
Odiel	71026 \pm 3436	339.8 \pm 12.0	406.7 \pm 29.4	2522.7 \pm 65.3	1318.4 \pm 26.8	4.02 \pm 0.13	
Piedras	12669 \pm 229	6.5 \pm 0.1	16 \pm 0.3	78 \pm 0.2	19 \pm 0.17	0.22 \pm 0.08	
Level for intervention (**)	---	>100	>1000	>1000	>500	>15	

(*) Texture (silt/clay/sand percentage)

(**) Threshold for metal concentration in soils of Natural Parks according to Regional Regulation (Junta de Andalucía, 1999).

TABLES

Table 2. Values of maximal tolerable concentration (MTC) and plant growth promoting PGP properties of RSO6, RSO7 and RSO25 strains. Data are means of three independent determinations. Standard deviations are indicated.

Strain	Metal resistance					PGP properties			
	MTC (mM)					N ₂ Fixation	Auxins mg/L	P-solubilization Halo size (mm)	Siderophores Halo size (mm)
Cd	Cu	Zn	As	Pb					
RSO6	0.3	8	6	2	>10	+	22.02 ± 2.18	35 ± 2	15 ± 2
RSO7	0.3	8	6	4	>10	++	14.07± 1.67	30 ± 2	15 ± 2
RSO25	0.1	6	6	2	8	++	4.81± 0.53	30 ± 2	0

TABLES

Table 3

Percentage of increase of PGP properties in the presence of 1 mM of each of the metals Cu, Zn, As and Pb. For each bacterial strain, 100% corresponds to the level of the PGP property in the absence of any metal. 0.5 mM Cu was used for siderophores production due to interference with the CAS medium. Numbers in bold indicate properties that increase in the presence of stress conditions. (*) Nitrogen fixation in the presence of Pb could not be determined due to the utilization of $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ as the Pb source.

PGP property	Strain	Cu (*)	Zn	As	Pb
N ₂ fixation	RSO6	-	-	+	<i>n.d.</i>
	RSO7	-	+	+	<i>n.d.</i>
	RS25	-	-	++	<i>n.d.</i>
Auxins production	RSO6	90 %	29 %	73 %	119 %
	RSO7	203 %	57 %	168 %	167 %
	RS25	260 %	23 %	166 %	250 %
P-solubilization	RSO6	67 %	43 %	67 %	50 %
	RSO7	60 %	40 %	53 %	0 %
	RS25	50 %	0 %	0 %	0 %
Siderophores	RSO6	200 %	87 %	133 %	100%
	RSO7	180 %	80 %	100 %	0 %
	RS25	0 %	0 %	0 %	0 %

TABLES

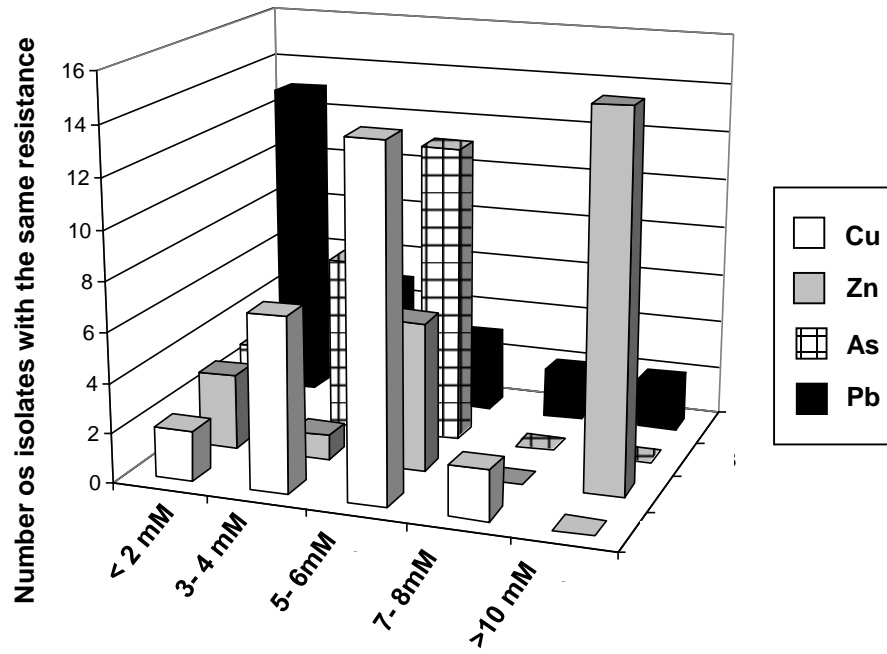
Table 4. Accumulation of metals in bacterial pellets. Biosorption of Cu, Zn, As and Pb in cells of RSO6, RSO7 and RSO25 strains incubated in the presence of 2 mM Cu, 2 mM Zn or 2 mM Pb, and washed either with water or with 0.2 M EDTA. Data are means \pm SD of three independent determinations.

Strain	Metal	Biosorption ($\mu\text{g/g}$)		
		Wash with Water	Wash with EDTA	% of metal adsorbed onto the cell surface
RSO6	Cu	3 478.43 \pm 219.27	179.38 \pm 38.05	94.8%
	Zn	11 256.76 \pm 625.29	149.58 \pm 33.02	98.7%
	Pb	6 252.14 \pm 424.56	2 636.77 \pm 186.48	57.8%
RSO7	Cu	1 754.40 \pm 152.82	364.37 \pm 76.29	79.2%
	Zn	9 533.55 \pm 751.72	148.26 \pm 29.44	98.4%
	Pb	26 154.59 \pm 1707.71	13 636.63 \pm 814.07	47.9%
RSO25	Cu	2 921.85 \pm 149.57	745.33 \pm 55.59	74.5%
	Zn	663.49 \pm 72.24	544.68 \pm 69.01	19.7%
	Pb	5 094.47 \pm 405.68	460.16 \pm 53.88	90.9%

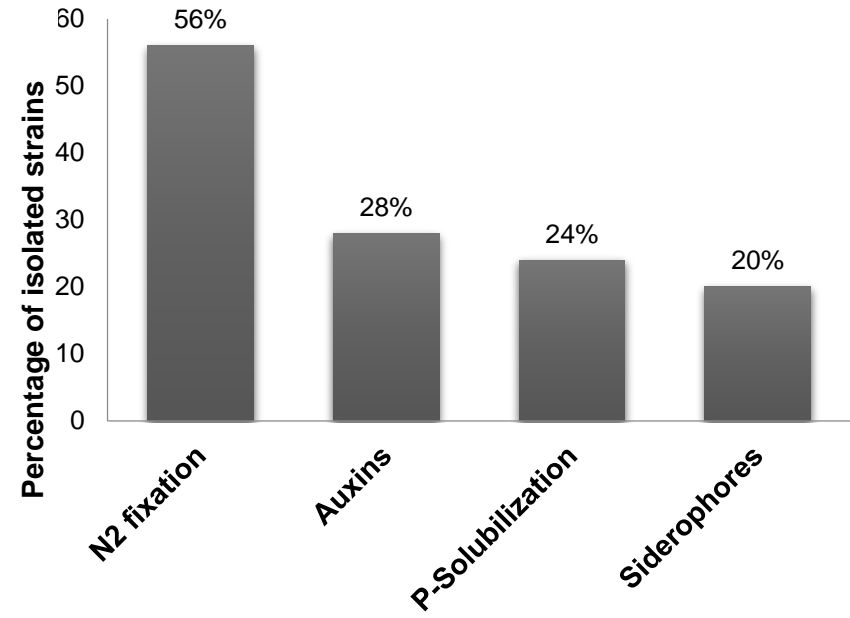
Figure 1

Paredes-Páliz et al., Figure 1

A



B



Paredes-Páliz et al., Figure 2

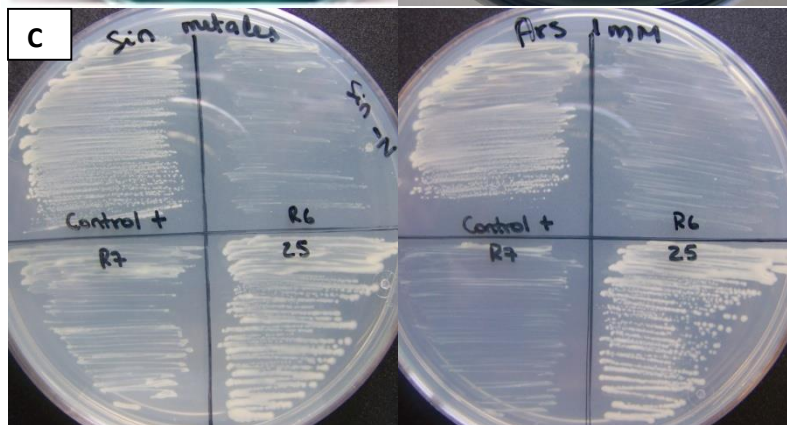
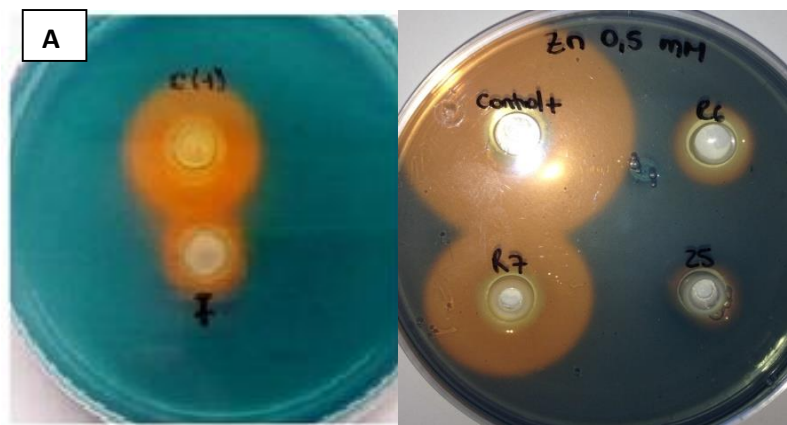
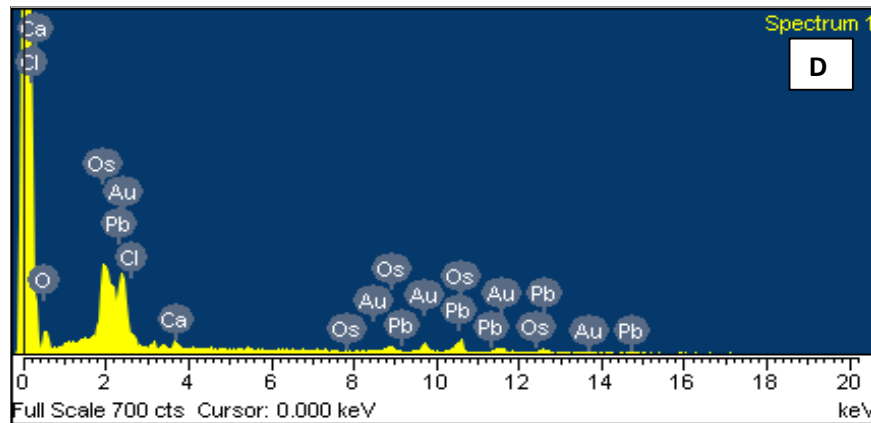
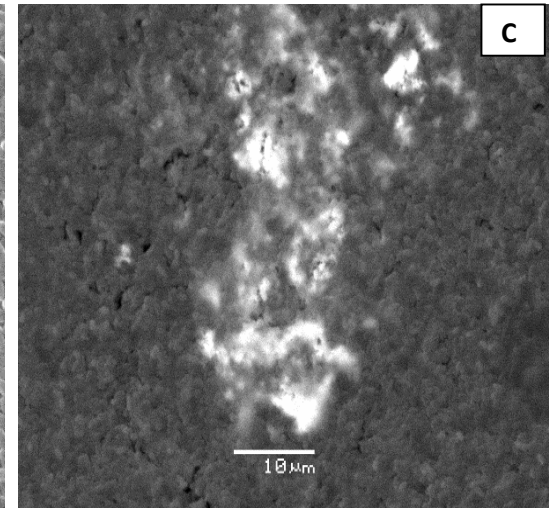
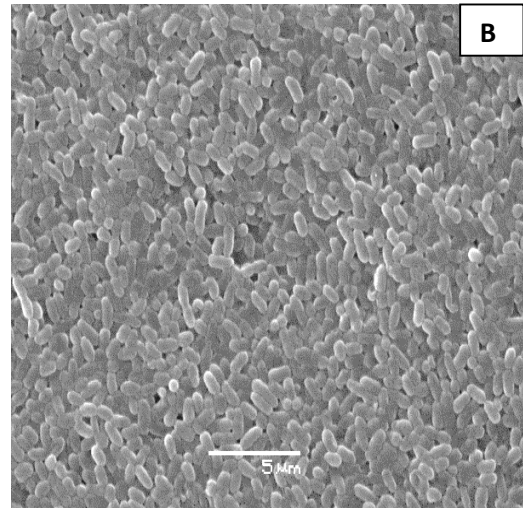
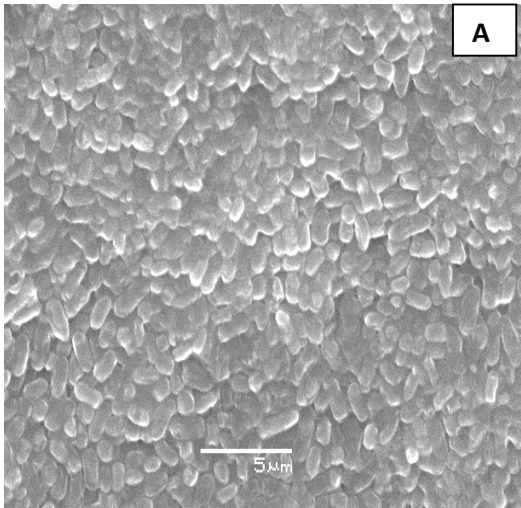


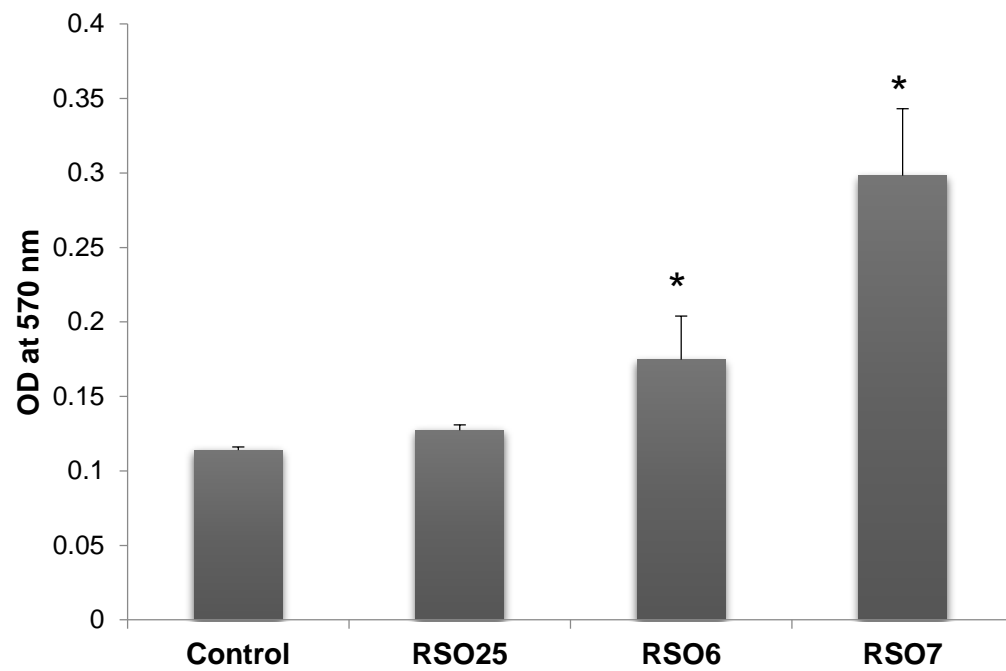
Figure 3

Paredes-Páliz et al., Figure 3



Elements	% of weight	% atoms
O	23,70	75,02
Cl	3,30	4,71
Ca	1,77	2,24
Os	20,65	5,50
Au	13,45	3,46
Pb	37,13	9,07
Totals	100,00	

Paredes-Páliz et al., Figure 4





Click here to access/download
Supplementary Material
Supplementary Information Table S1.docx





Click here to access/download
Supplementary Material
Supplementary information Table S2.doc

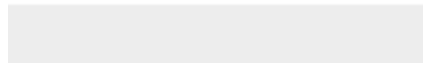




[Click here to access/download](#)

Supplementary Material

Supplementary information Table S3.doc





[Click here to access/download](#)

Supplementary Material

Supplementary Information Figure S1.ppt





Click here to access/download

Supplementary Material

Supplementary Information Figure S2.ppt

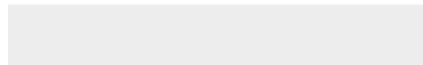




[Click here to access/download](#)

Supplementary Material

Supplementary Information Figure S3.ppt





Bacterial inoculants for enhanced seed germination capacity of *Spartina densiflora*: Implications for restoration of metal polluted areas

Karina I. Paredes-Páliz,^a Eloísa Pajuelo,^a Bouchra Doukkali,^a Miguel Ángel Caviedes,^a
Ignacio D. Rodríguez-Llorente,^a Enrique Mateos-Naranjo^{b,*}

^a Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, c/Profesor García González, 2, 41012 Sevilla, Spain

^b Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, 1095, 41012 Sevilla, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 May 2016

Accepted 8 June 2016

Available online xxx

Keywords:

Metal pollution

Odiel estuary

Spartina densiflora

Seed germination

PGPR

Bioaugmentation

ABSTRACT

The design of effective phytoremediation programs is severely hindered by poor seed germination on metal polluted soils. The possibility that inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) could help overcoming this problem is hypothesized. Our aim was investigating the role of PGPR in *Spartina densiflora* seed germination on sediments with different physicochemical characteristics and metal pollution degrees. Gram negative *Pantoea agglomerans* RSO6 and RSO7, and gram positive *Bacillus aryabhattai* RSO25, together with the consortium of the three strains, were used for independent inoculation experiments. The presence of metals (As, Cu, Pb and Zn) in sediments reduced seed germination by 80%. Inoculation with *Bacillus aryabhattai* RSO25 or *Pantoea agglomerans* RSO6 and RSO7 enhanced up to 2.5 fold the germination rate of *S. densiflora* in polluted sediments regarding non-inoculated controls. Moreover, the germination process was accelerated and the germination period was extended. The consortium did not achieve further improvements in seed germination.

© 2016 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Environmental pollution by heavy metals and trace elements is one of the most serious problems worldwide, increasing in parallel with human technology development (Wuana and Okiemen, 2011). Deleterious effects of metal pollution are especially significant in estuaries systems, such as salt marshes, since the widespread and diverse usage from industry activity has elevated metal concentrations in sediments and water above permitted levels in many estuaries and marine environments worldwide (Xia et al., 2011; Gao et al., 2015; Soliman et al., 2015).

Literature is full of strategies designed to counterbalance the harmful effects of heavy metals, including physical, chemical and biological methods that immobilize or remove metals from the environment (Bentley et al., 2005; Peng et al., 2009). But recently phytoremediation, the use of plants to act upon the pollutants, by extracting, degrading or immobilizing them, is gaining momentum, due to its cost-effectiveness, long-term applicability and ecological compatibility (Tangahu et al., 2011; Laghlimi et al., 2015). Among plants species with phytoremediation potential, the halophyte cordgrass *Spartina densiflora* possesses a high capacity for accumulating heavy metals in its tissues, particularly in roots (Mateos-Naranjo et al., 2008a, 2008b, 2015a), as well as for phytostabilizing them in its rhizosphere (Cambrollé et al., 2008; Redondo-Gómez et al., 2011; Redondo-Gómez, 2013).

As an adjunct to make phytoremediation more efficacious, a number of scientists have begun to explore the possibility of using soil

bacteria together with plants, in order to alleviate plant stress in the presence of pollutants (Glick, 2010; De-Bashan et al., 2012; Phielor et al., 2013; Pajuelo et al., 2014; Nadeem et al., 2015). It has recently been found that the bioaugmentation of *S. densiflora* adult plants with a selected bacterial consortium isolated from its rhizosphere can be claimed to enhance plant growth response and tolerance to the physicochemical properties of marshes soils (Andrades-Moreno et al., 2014; Mateos-Naranjo et al., 2015b). However, little is known about the response of bacteria-plant interactions in terms of seed germination (Andrades-Moreno et al., 2014; Faisal, 2013; Ndeddy and Babalola, 2016), despite that *S. densiflora* is characterized with its prolific seed production (Mateos-Naranjo et al., 2008c).

Seed germination is strongly inhibited by the presence of excess metals in soils (Sethy and Ghosh, 2013). Several processes are involved, with differences depending on the metal, including, inhibition of enzyme activities (Sfaki-Bousbih et al., 2010; Singh et al., 2011), disruption of metabolism (Zhang et al., 2009), increased ROS production and activation of antioxidant system (Sharma and Dietz, 2009; Hossain et al., 2012), damage to DNA (Lin et al., 2008), DNA methylation (Rancelis et al., 2012), damage to membranes and electrolyte leakage (Rahoui et al., 2010), etc. In this particular, the negative effect of heavy metals on seed germination is a handicap for phytoremediation projects, since the germination and initial establishment of the plants on metal polluted soils are severely hindered (Singh et al., 2007; Mateos-Naranjo et al., 2011; Ndeddy and Babalola, 2016). Thus we hypothesize that inoculation with PGPR could facilitate the germination of *S. densiflora* in sediments with different physicochemical properties, being this information essential in order to improve the designing of restoration programs. The aim of this study was to investigate the role of bacteria isolated from the rhizosphere of *Spartina maritima* in the germination of *S. densiflora*

* Corresponding author.

Email address: emana@us.es (E. Mateos-Naranjo)

seeds on sediments with contrasting physicochemical properties and different degrees of metal pollution. Comparison between inoculants based on gram positive and gram negative bacteria is also approached.

2. Materials and methods

2.1. Seed and sediment source

Ripe spikes of *S. densiflora* were collected in December 2014 in the Odiel marshes (37°15'N, 6°58'W; SW Spain) from 30 different clumps chosen randomly located in a well-drained gently sloping intertidal lagoon (mean sea level + 1.85 m relative to SHZ). Caryopses were stripped from the spikes and those with seeds were selected and stored in the dark for 4 months at 4 °C until the beginning of the experiment.

In addition, samples of the first 10 cm of sediment were collected from two different natural areas at Odiel and Piedras marshes (Gulf of Cadiz, SW Spain), and subsequently transported to the laboratory for their physico-chemical characterization. Measurements of sediment texture, conductivity, pH, redox potential, sediment metal concentrations (n = 5) were determined by using the method employed by Mateos-Naranjo et al. (2011). The physicochemical properties of the sediments are given in Table 1. Moreover, in order to eliminate any bacteria present, sediments were sterilized three times at 121 °C for 30 min, separated by 24 h, and stored in sterile plastic bags until the beginning of the germination experiment.

2.2. Bacterial inoculum and seed germination experiment

Bacteria used in this work were isolated from the rhizosphere of *S. maritima* grown in the Odiel marshes and identified as the gram negative *Pantoea agglomerans* strains RSO6 and RSO7 and the gram positive *Bacillus aryabhatai* strain RSO25 (Paredes-Páliz et al., in

Table 1
Physicochemical properties and concentration of arsenic (As), cadmium (Cd), copper (Cu), lead (Pb), zinc (Zn) and iron (Fe) of sediments from Piedras and Odiel marshes.

Sediment	Physico-chemical properties		Metal (mg Kg ⁻¹)	
Piedras	Texture (%)	20/14/66	As	6.5 ± 0.1
	pH	7.6 ± 0.3	Cd	0.2 ± 0.1
	Redox potential (mV)	150 ± 15	Cu	19.0 ± 0.2
	Conductivity (mS cm ⁻¹)	1.2 ± 0.4	Pb	16.0 ± 0.3
	Organic matter (%)	11.4 ± 0.5	Zn	78.0 ± 0.2
	Nitrogen (%)	0.2 ± 0.1	Fe	12,669 ± 229
Odiel	Texture (%)	60/16/24	As	339.8 ± 12.0
	pH	6.9 ± 0.1	Cd	4.0 ± 0.13
	Redox potential (mV)	262 ± 10	Cu	1318.4 ± 26.8
	Conductivity (mS cm ⁻¹)	15.6 ± 0.5	Pb	406.7 ± 29.4
	Organic matter (%)	13.5 ± 0.2	Zn	2522.7 ± 65.3
	Nitrogen (%)	0.3 ± 0.1	Fe	71026 ± 343

Data are means ± SE of five replicates. Texture (silt/clay/sand percentage).

revision). They were selected due to their high resistance to several metals and metal biosorption, together with plant growth promoting (PGP) properties and the capacity for biofilms' formation (Paredes-Páliz et al., in revision).

In May 2015 a glasshouse experiment was performed to assess the effect of individual bacterial and a bacterial *consortium* on seed germination of *S. densiflora*. The three bacterial strains were cultivated separately in 100 ml of Tryptic Soy Broth (TSB) medium at 28 °C and continuous shaking (200 rpm) for 24–48 h depending on the bacterium. Cultures were centrifuged at 8,000 × g and pellets were suspended in sterile distilled water for the inoculation process. The absorbance of the cultures at 600 nm was determined and adjusted to 1.5 for all of them with sterile distilled water. Moreover, in order to guarantee that there were not antagonistic effects between the strains in the *consortium*, an antagonist test were done as follow: cultures of the three strains with equal absorbance at 600 nm were mixed. The mix was diluted up to 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ and 10⁻⁸. One hundred microliters of the diluted samples was plated on TSA medium and plates were incubated at 28 °C for 24 h (n = 3). Our results indicated that there were not antagonistic effects between the components of the *consortium* (data not shown).

Seeds used for experiment were previously surface-sterilized by vigorous shaking in sodium hypochlorite solution (5%, v/v) for 5 min and then washed with sterilized water. Five 10-seed replicates were sown 1 cm deep in individual plastic pots of 100 ml filled with sterile homogenates of either, previously collected sediments (Odiel and Piedras) mixed with perlite in order to increase the hydraulic conductivity (proportion 3:1).

Pots were kept at controlled temperature between 21 and 25 °C, 40–60% relative humidity, natural daylight of 250 as minimum and 1000 μmol m⁻² s⁻¹ as maximum light flux and were randomly assigned to four inoculation treatments (without inoculation, inoculation with strain RSO25, with strains RSO6 and RSO7 together and with the *consortium* integrated by the strains RSO6, RSO7 and RSO25) in combination with the two collected sediments (n = 50, one seed per pot and 50 pots per sediment and inoculation treatment). Inoculation process was done at the beginning of the experiment and was repeated once a week during the experiment period. Also at the beginning of the experiment 1 l of tap water was placed in each of the trays down to a depth of 1 cm, and water levels were monitored and controlled during the experiment.

Pots were daily inspected for 50 days and seed germination considered after cotyledon appearance. Seven germination characteristic parameters were determined at the end of the experiment: final germination percentage, number of days to first germination (FGD), number of days to final germination (LGD), mean time to germination (MTG), coefficient of velocity of germination (CVG) and mean daily germination (MDG) (Curado et al., 2010; Mateos-Naranjo et al., 2011; Jahanian et al., 2012).

2.3. Statistical analysis

Statistical analyses were done using 'Statistica' v. 6.0 (Statsoft Inc.). Comparisons between means of germination parameters in relation with the different sediments and inoculation treatments were tested using two-way ANOVA (F-test) analyses. Data were first tested for normality with the Kolmogorov–Smirnov test and for homogeneity of variance with the Brown–Forsythe test. Significant test results were followed by Tukey tests for identification of important contrasts.

3. Results and discussion

There are increasing reports indicating that PGP bacteria can diminish the stress of plants when grown on sediments with different physicochemical properties and/or with high metal pollution levels (Yang et al., 2008; Rajkumar et al., 2012; Mateos-Naranjo et al., 2015a, 2015b; Ullah et al., 2015; Choudhary et al., 2016) although not so much information is available on the effect at the stage of seed germination (Miransari and Smith, 2014). Thus, it has been reported that the phase of germination is more sensitive to environmental factors and/or metal contamination than other phases of plants life cycle by the absence of some defense mechanisms to cope with this stressful conditions (Liu et al., 2005; Xiong and Wang, 2005; Mateos-Naranjo et al., 2008c). However, there is not a clear pattern of germination response to these conditions, since it has been described species in which there was a clear inhibition (Kjær et al., 1998; Ahsan et al., 2007), while in others the germination was not affected in response to environmental factors or to the presence of metals (Mahmood et al., 2005; Street et al., 2007; Mateos-Naranjo et al., 2008c, 2011).

The capacity of *S. densiflora* to germinate in polluted sediments had been previously reported by Curado et al. (2010) and Mateos-Naranjo et al. (2011), which found that high metal bioavailability, may inhibit or alter the germination response of *S. densiflora*. Thus our results indicated that the kinetic of germination, final percentage of germination and germination characteristics of *S. densiflora* were highly influenced by the sediment characteristics, according to previous results. But this is the first study that demonstrated that this capacity could be also influenced by the bacterial from its rhizosphere. Thus in Piedras sediments, the seed germination started quickly between the days 7th and 14th (FGD and LGD, respectively), with a MTG of 10.0 ± 0.8 , CVG of 0.1 ± 0.01 and MDG of 1.8 ± 0.2 (Table 2), and also the final germination percentage reached up to 90% in non-inoculated treatment (Figs. 1A and 2). By contrast, in the Odiel sediments the germination of *S. densiflora* was impaired, as indicated the mean delay in germination period between the days 24th and 30th, (FGD and LGD, respectively), with a MTG 26.9 ± 4.7 , CVG of 0.05 ± 0.03 and MDG of 0.35 ± 0.2 (Table 2), and also the final germination percentage decreased to 18% (Fig. 2). These differences could be ascribed to the different physicochemical characteristics between both contrasting sediments, and particularly to metal content, as it have been previously indicated by Sethy and Ghosh

Table 2

Effect of different bacterial inoculation treatment (without inoculation, inoculation with gram positive *Bacillus aryabhatai* RSO25, with gram negative *Pantoea agglomerans* RSO6, RSO7 and with the consortium integrated by RSO6, RSO7, RSO25) on days to first germination (FGD), days to last germination (LGD), mean time to germinate (MTG), coefficient of velocity of germination (CVG) and mean daily germination (MDG) of *Spartina densiflora* in non-polluted (Piedras) and polluted (Odiel) sediment for 50 days.

Inoculation treatment		Germination characteristics				
		FGD (days)	LGD (days)	MTG	CVG	MDG
Piedras	Non-inoculated	6.4 ± 1.9	13.8 ± 2.1	10.0 ± 0.8	0.1 ± 0.01	$1.8 \pm 0.$
	RSO25	5.6 ± 1.9	24.0 ± 6.8	11.8 ± 1.9	0.09 ± 0.01	$1.5 \pm 0.$
	RSO6, RSO7	6.8 ± 1.3	22.8 ± 8.8	11.6 ± 1.7	0.1 ± 0.01	$1.8 \pm 0.$
	RSO25, RSO6, RSO7	7.4 ± 1.5	17.8 ± 4.5	11.5 ± 1.9	0.09 ± 0.01	$1.3 \pm 0.$
Odiel	Non-inoculated	23.6 ± 13.1	29.6 ± 12.2	26.9 ± 10.1	0.05 ± 0.03	$0.35 \pm 0.$
	RSO25	13.4 ± 3.6	23.6 ± 7.7	19.6 ± 5.6	0.05 ± 0.01	$0.9 \pm 0.$
	RSO6, RSO7	9.7 ± 2.2	38.2 ± 9.9	25.8 ± 11.6	0.05 ± 0.02	$0.8 \pm 0.$
	RSO25, RSO6, RSO7	13.6 ± 5.9	29.0 ± 7.7	20.5 ± 3.4	0.05 ± 0.01	$0.7 \pm 0.$

Values are means \pm ES of five replicates, with 10 seeds each (total = 50 seeds per treatment).

(2013). Thus the physicochemical analysis of the sediments (Table 1) showed that metal/metalloid concentrations were lower in Piedras sediments, whereas in Odiel metal levels were over the toxicity threshold for plants, and also metal bioavailability would be greater due to the lower pH values (Table 1), which could reduce the germination capacity of *S. densiflora*. However bacterial inoculation contributed to counterbalance the negative impact of metal excess on *S. densiflora* germination capacity. Thus our results showed that inoculation with the gram positive strain *Bacillus aryabhatai* RSO25, and with gram negative bacterial strains RSO6 and RSO7 together, increased the percentage of germination from 18% to 46% and 42%, respectively in polluted sediments (Fig. 2). Furthermore, the germination kinetics was also affected; for instance the FGD was advanced

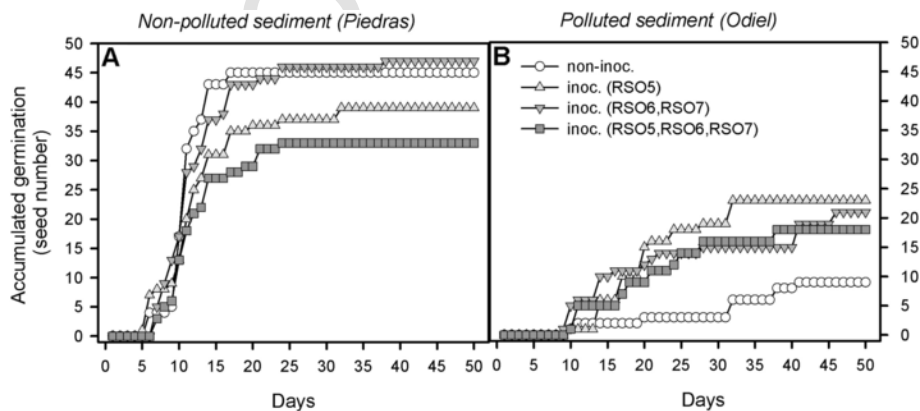


Fig. 1. Effect of different bacterial inoculation treatment (without inoculation, inoculation with gram positive *Bacillus aryabhatai* RSO25, with gram negative *Pantoea agglomerans* RSO6, RSO7 and with the consortium integrated by RSO6, RSO7, RSO25) on the kinetics of germination of *Spartina densiflora* seeds in non-polluted (Piedras) A, and polluted (Odiel) B sediments.

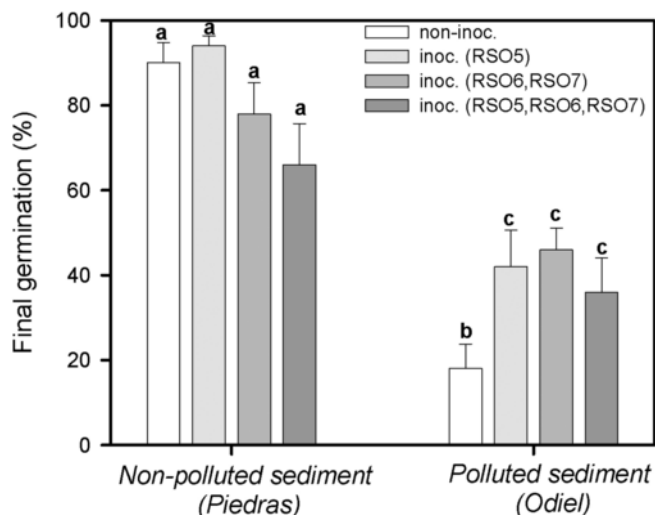


Fig. 2. Effect of different bacterial inoculation treatment (without inoculation, inoculation with gram positive *Bacillus aryabhatai* RSO25, with gram negative *Pantoea agglomerans* RSO6, RSO7 and with the consortium integrated by RSO6, RSO7, RSO25) on the final germination percentage of *Spartina densiflora* seeds in non-polluted (Piedras), and polluted (Odíel) sediments. Values are mean \pm SE of five replicates with 10 seeds each one. Different letters indicate means that are significantly different from each other ($p < 0.05$).

from day 24th to days 13th and 10th, and MDG increased from 0.35 to 0.9 and 0.8 seeds per day for the inoculations with the strains RSO25, and with the strains RSO6 and RSO7, respectively (Fig. 2). Contrarily, in non-polluted sediment, the inoculation with the strain RSO25 or with the strains RSO6 and RSO7 together did not significantly affect the germination response of *S. densiflora* respect to non-inoculation treatment, except in LGD, which was extended from the day 14th until the day 24th (Figs. 1 and 2, Table 2).

The amelioration effect of individual bacterial strains inoculation under metal excess could be explained by its biological characteristics. Thus *Bacillus aryabhatai* RSO25 and *Pantoea agglomerans* RSO6 and RSO7 showed elevated tolerance to metal excess and a great biosorption capacity; i.e. RSO7 is able to bind up to 26,000 $\mu\text{g Pb g}^{-1}$ dry weight (Paredes-Páliz et al., in revision). Furthermore, the bacterial strains, in particular the gram negative had the ability to form biofilms (Paredes-Páliz et al., in revision). So it is possible that these characteristics could contribute to seed germination, by adsorbing metal onto the bacterial surface and decrease metal availability in the seed vicinity. There is abundant literature showing that metal resistant bacteria with high biosorption capacity enhance plant growth (Rodríguez-Llorente et al., 2010; Dary et al., 2010) but the information is scarce on the stage of germination. In this regard, genetic engineering of the bacterial cell surface has been carried out in order to enhance metal biosorption and increase plant protection against metals (Valls et al., 2000; Biondo et al., 2012). Furthermore, it is well known that different types of microorganisms (gram positive and gram negative bacteria, yeast, mycorrhizal fungi, algae, cyanobacteria, etc.) with cell walls of different chemical nature can display distinct metal biosorption capacities depending on the chemical groups onto the surface (Wang and Chen, 2009; Das, 2010). Furthermore microbial populations can affect heavy metal mobility and availability to the plant through release of chelating agents, acidification, phosphate solubilization and redox changes (Gadd, 2004; Ullah et al., 2015), so it is possible the these mechanisms could contribute to enhance germination capacity of *S. densiflora* under metal excess. On the other hand, the three selected strains showed good PGP properties (such as nitrogen fixation, phosphate solubilization and

siderophores and auxin production), even in the presence of As, Cu, Zn and Pb in vitro (Paredes-Páliz et al., in revision). These properties could help seed germination. For instance, auxins are clearly involved in maintaining seed dormancy (Miransari and Smith, 2014; Shu et al., 2016). But, although auxins seem not to be directly related to seed germination, they become crucial once the radicle has emerged (Kucera et al., 2005; Miransari and Smith, 2014). These plant phytohormones can be either produced by rhizosphere microorganisms or plant-produced upon alteration of plant gene expression by the bacteria. In both cases, the role of rhizosphere populations in seed germination is envisioned as a very effective tool for improving seed germination, particularly under stress conditions (Miransari and Smith, 2014).

Finally in relation with the inoculation with the bacterial consortium integrated by all individual strains, although we could expect a greater positive effect on germination capacity of *S. densiflora*, since antagonistic effects between the bacterial strains in vitro were not found, we did not record additional improvements in the germination response of *S. densiflora*, neither in contaminated or non-contaminated sediments, respect to the inoculations with individual strains (Figs. 1 and 2, Table 2). Several studies have shown that bacterial communication between the members of a specific bacterial population in the rhizosphere could be intercepted by other microbes, particularly *Bacillus* strains, in natural systems, which could affect PGP properties depending upon quorum sensing (Boyer and Wisniewski-Dyé, 2009). Thus it is possible that this behaviour between the components of our consortium could explain the absence of a higher positive effect on germination response of *S. densiflora*.

4. Conclusions

We can conclude that the inoculation with appropriate selected bacterial isolates from the rhizosphere of *S. densiflora* could contribute to improve its seed germination rate and extend the germination period, which could be crucial in the design of restoration projects of metal polluted areas. In particular, in our study, the gram positive strain *Bacillus aryabhatai* RSO25, as well as the gram negative bacterial strains *Pantoea agglomerans* RSO6 and RSO7 have proved to be efficient in protecting seed germination against metal excess, increasing seed germination up to 2.5 fold with regard to non-inoculated seeds, while the inoculation with the consortium of the three strains did not achieve additional improvements. Several factors could contribute to explain the positive effect of bacterial inoculation, such as, their high metal resistance, metal biosorption and biofilms forming ability, which could decrease metal availability in the seed vicinity, together with PGP properties, which are maintained in the presence of metals.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interests.

Acknowledgments

This work has been financed by project P11-RNM-7274 (Proyecto de Excelencia Junta de Andalucía). K.I. Paredes-Páliz acknowledges a pre-doctoral grant by SENESCYT (Ecuador).

References

- Ahsan, N., Lee, D., Lee, S., Kang, K.Y., Lee, J.J., Kim, P.J., Yoon, H., Kim, J., Lee, B., 2007. Excess copper induced physiological and proteomic changes in germination rice seeds. *Chemosphere* 67, 1182–1193.

- Andrades-Moreno, L., del Castillo, I., Parra, R., Doukkali, B., Redondo-Gómez, S., Pérez-Palacios, P., Caviedes, M.A., Pajuelo, E., Rodríguez-Llorente, I.D., 2014. Prospecting metal-resistant plant-growth promoting rhizobacteria for rhizoremediation of metal contaminated estuaries using *Spartina densiflora*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 3713–3721.
- Bentley, S., Thibodeaux, L., Adriaens, P., Li, M.Y., Romero-González, M., Banwart, S.A., Filip, Z., Demnerova, K., Reible, D., 2005. Physicochemical and biological assessment and characterization of contaminated sediments. In: Reible, D., Lanczos, T. (Eds.), *Assessment and Remediation of Contaminated Sediments*. Springer, Netherlands, pp. 83–136.
- Biondo, R., Almeida da Silva, F., Vicente, E.J., Souza, J.E., Guerrini-Schenberg, A.C., 2012. Synthetic phytochelatin surface display in *Cupriavidus metallidurans* CH34 for enhanced metals bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* 46, 8325–8332.
- Boyer, M., Wisniewski-Dyé, F., 2009. Cell–cell signaling in bacteria: not simply a matter of quorum. *FEMS Microbiol. Ecol.* 70, 1–19.
- Cambrollé, J., Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Figueroa, M.E., 2008. Comparison of the role of two *Spartina* species in terms of phytostabilization and bioaccumulation of metals in the estuarine sediment. *Mar. Pollut. Bull.* 56, 2037–2042.
- Choudhary, D.K., Kasotia, A., Jain, S., Vaishnav, A., Kumari, S., Sharma, K.P., Varma, A., 2016. Bacterial-mediated tolerance and resistance to plants under abiotic and biotic stresses. *J. Plant Growth Regul.* 55, 276–300.
- Curado, G., Rubio-Casal, A.E., Figueroa, E., Castillo, J.M., 2010. Germination and establishment of the invasive cordgrass *Spartina densiflora* in acidic and metal polluted sediments of the Tinto River. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 1842–1848.
- Dary, M., Chamber-Pérez, M.A., Palomares, A.J., Pajuelo, E., 2010. "In situ" phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. *J. Hazard. Mater.* 177, 323–330.
- Das, N., 2010. Recovery of precious metals through biosorption—a review. *Hydrometallurgy* 103, 180–189.
- De-Bashan, L.E., Hernandez, J.P., Bashan, Y., 2012. The potential contribution of plant growth promoting bacteria to reduce environmental degradation: a comprehensive evaluation. *Appl. Soil Ecol.* 61, 171–189.
- Faisal, M., 2013. Inoculation of plant growth promoting bacteria *Ochrobactrum intermedium*, *Brevibacterium* sp. and *Bacillus cereus* induce plant growth parameters. *J. Appl. Biotechnol.* 1, 45–53.
- Gadd, G.M., 2004. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma* 122, 109–119.
- Gao, W., Du, Y., Gao, S., Ingels, J., Wang, D., 2015. Heavy metal accumulation reflecting natural sedimentary processes and anthropogenic activities in two contrasting coastal wetland ecosystems, eastern China. *J. Soils Sediments* 16, 1093–1108.
- Glick, B.R., 2010. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnol. Adv.* 28, 367–374.
- Hossain, M.A., Piyatida, P., Teixeira da Silva, J., Fujita, M., 2012. Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *J. Bot.* 1–37.
- Jahani, A., Chaichi, M.R., Rezaei, K., Rezayazdi, K., Khavazi, K., 2012. The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination and primary growth of artichoke (*Cynara scolymus*). *Int. J. Agric. Crop Sci.* 4, 923–929.
- Kjær, C., Pedersen, M.B., Elmegård, N., 1998. Effects of soil copper on black bindweed (*Fallopia convolvulus*) in the laboratory and in the field. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 14–19.
- Kucera, B., Cohn, M.A., Leubner-Metzger, G., 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Sci. Res.* 15, 281–307.
- Laghlimi, M., Baghdad, B., Hadi, H., Bouabdli, A., 2015. Phytoremediation mechanisms of heavy metal contaminated soils: a review. *Open J. Ecol.* 5, 375–388.
- Lin, A., Zhang, X., Zhu, Y.G., Zhao, F.J., 2008. Arsenate-induced toxicity: effects on antioxidative enzymes and DNA damage in *Vicia faba*. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 413–419.
- Liu, D.Y., Li, Y., Chu, L., 2005. Study of the tolerance of *Hippochaete ramosissimum* to Cu stress. *Sci. China Ser. C Life Sci.* 48, 150–155.
- Mahmood, S., Hussain, A., Saeed, Z., Athar, M., 2005. Germination and seedling growth of corn (*Zea mays* L.) under varying levels of copper and zinc. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 2, 269–274.
- Mateos-Naranjo, E., Redondo-Gómez, S., Cambrollé, J., Figueroa, M.E., 2008. Growth and photosynthetic responses to copper stress of an invasive cordgrass, *Spartina densiflora*. *Mar. Environ. Res.* 66, 459–465.
- Mateos-Naranjo, E., Redondo-Gómez, S., Cambrollé, J., Luque, T., Figueroa, M.E., 2008. Growth and photosynthetic responses to zinc stress of an invasive cordgrass, *Spartina densiflora*. *Plant Biol.* 10, 754–762.
- Mateos-Naranjo, E., Redondo-Gómez, S., Luque, C.J., Castellanos, E.M., Davy, A.J., Figueroa, M.E., 2008. Environmental limitations recruitment from seed in invasive *Spartina densiflora* on a southern European salt marsh. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 79, 727–732.
- Mateos-Naranjo, E., Andrades-Moreno, L., Redondo-Gómez, S., 2011. Comparison of germination, growth, photosynthetic responses and metal uptake between three populations of *Spartina densiflora* under different soil pollution conditions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 2040–2049.
- Mateos-Naranjo, E., Gallé, A., Flórez-Sarasa, I., Perdomo, J.A., Galmés, J., Ribas-Carbó, M., Flexas, J., 2015. Assessment of the role of silicon in the Cu-tolerance of the C4 grass *Spartina densiflora*. *J. Plant Physiol.* 178, 74–83.
- Mateos-Naranjo, E., Mesa, J., Pajuelo, E., Pérez-Martín, A., Caviedes, M.A., Rodríguez-Llorente, 2015. Deciphering the role of plant growth-promoting rhizobacteria in the tolerance of the invasive cordgrass *Spartina densiflora* to physicochemical properties of salt-marsh soils. *Plant Soil* 394, 45–55.
- Miransari, M., Smith, D.L., 2014. Plant hormones and seed germination. *Environ. Exp. Bot.* 99, 110–121.
- Nadeem, S.M., Naveed, M., Ahmad, M., Zahir, Z.A., 2015. Rhizosphere bacteria for crop production and improvement of stress tolerance: mechanisms of action, applications, and future prospects. In: Arora, N.K. (Ed.), *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets*. Springer, India, pp. 1–36.
- Ndeddy, R.J., Babalola, O.O., 2016. Effect of bacterial inoculation of strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes faecalis* and *Bacillus subtilis* on germination, growth and heavy metal (Cd, Cr, and Ni) uptake of *Brassica juncea*. *Int. J. Phytoremediation* 18, 200–209.
- Pajuelo, E., Rodríguez-Llorente, I.D., Lafuente, A., Pérez-Palacios, P., Doukkali, B., Caviedes, M.A., 2014. Engineering the rhizosphere for the purpose of bioremediation: an overview. *CAB Rev.* 9, 1.
- Paredes-Páiz, K.I., Caviedes, M.A., Doukkali, B., Mateos-Naranjo, E., Rodríguez-Llorente, I.D., Pajuelo, E., 2016. Screening beneficial rhizobacteria from *Spartina maritima* for phytoremediation of metal polluted salt marshes: comparison of gram positive and gram negative strains. *Environ. Sci. Pollut. Res.* (in revision).
- Peng, J.F., Song, Y.H., Yuan, P., Cui, X.Y., Qiu, G.L., 2009. The remediation of heavy metals contaminated sediment. *J. Hazard. Mater.* 161, 633–640.
- Phielor, R., Voit, A., Kothe, E., 2013. Microbially supported phytoremediation of heavy metal contaminated soils: strategies and applications. *Geobioengineering* 1, 211–235.
- Rahoui, S., Chaoui, A., El Ferjani, E., 2010. Membrane damage and solute leakage from germinating pea seed under cadmium stress. *J. Hazard. Mater.* 178, 1128–1131.
- Rajkumar, M., Sandhya, S., Prasad, M.N.V., Freitas, H., 2012. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnol. Adv.* 30, 1562–1574.
- Rancelis, V., Cesniene, T., Kleizaite, V., Zvingila, D., Balciuniene, L., 2012. Influence of cobalt uptake by *Vicia faba* seeds on chlorophyll morphosis induction, SOD polymorphism, and DNA methylation. *Environ. Toxicol.* 27, 32–41.
- Redondo-Gómez, S., 2013. Bioaccumulation of heavy metals in *Spartina*. *Funct. Plant Biol.* 40, 913–921.
- Redondo-Gómez, S., Andrades-Moreno, L., Mateos-Naranjo, E., Parra, R., Valera-Burgos, J., Arco, R., 2011. Synergic effect of salinity and zinc stress on growth and photosynthetic responses of the cordgrass *Spartina densiflora*. *J. Exp. Bot.* 62, 5521–5530.
- Rodríguez-Llorente, I.D., Dary, M., Gamane, D., El Hamdaoui, A., Doukkali, B., Lafuente, A., Delgado, J., Caviedes, M.A., Pajuelo, E., 2010. Cadmium biosorption properties of the metal resistant *Ochrobactrum cytisi* Azn6.2. *Eng. Life Sci.* 10, 49–56.
- Sethy, S.K., Ghosh, S., 2013. Effect of heavy metals on germination of seeds. *J. Nat. Biol. Med.* 4, 272–275.
- Sfaxi-Bousbih, A., Chaoui, A., El Ferjani, E., 2010. Copper affects the cotyledonary carbohydrate status during the germination of bean seed. *Biol. Trace Elem. Res.* 137, 110–116.
- Sharma, S., Dietz, K.J., 2009. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends Plant Sci.* 14, 43–50.
- Shu, K., Liu, X.D., Xie, Q., He, Z.H., 2016. Two faces of one seed: hormonal regulation of dormancy and germination. *Mol. Plant* 9, 34–45.
- Singh, D., Nath, K., Sharma, Y.K., 2007. Response of wheat seed germination and seedling growth under copper stress. *J. Environ. Biol.* 28, 409–414.
- Singh, H.P., Kaur, G., Batish, D.R., Kohli, R.K., 2011. Lead (Pb)-inhibited radicle emergence in *Brassica campestris* involves alterations in starch-metabolizing enzymes. *Biol. Trace Elem. Res.* 144, 1295–1301.
- Soliman, N.F., Nasr, S.M., Okbah, A.A., 2015. Potential ecological risk of heavy metals in sediments from the Mediterranean coast. *Egypt. J. Env. Health Sci. Eng.* 13, 70.
- Street, R.A., Kulkarni, M.G., Stirk, W.A., Southway, C., Van Staden, J., 2007. Toxicity of metal elements on germination and seedling growth of widely used medicinal plants belonging to Hyacinthaceae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 79, 371–376.
- Tangah, B.V., Abdullah, S.R.S., Basri, H., Idris, M., Anuar, N., Mukhlis, M., 2011. A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *Int. J. Chem. Eng.* 1–33.
- Ullah, A., Heng, S., Munis, M.F.H., Fahad, S., Yang, X., 2015. Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: a review. *Environ. Exp. Bot.* 117, 28–40.
- Valls, M., Atrian, S., Lorenzo, V., Fernández, L.A., 2000. Engineering a mouse metallothionein on the cell surface of *Ralstonia eutropha* CH34 for immobilization of heavy metals in soil. *Nat. Biotechnol.* 18, 661–665.

- Wang, J., Chen, C., 2009. Biosorbents for heavy metal removal and their future. *Biotechnol. Adv.* 27, 195–226.
- Wuana, R.A., Okieimen, F.E., 2011. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *ISRN Ecol.* 1, 20.
- Xia, P., Meng, X., Yin, P., Cao, Z., Wang, X., 2011. Eighty-year sedimentary record of heavy metal inputs in the intertidal sediments from the Nanliu River estuary, Beibu Gulf of South China Sea. *Environ. Pollut.* 159, 92–99.
- Xiong, Z.T., Wang, H., 2005. Copper toxicity and bioaccumulation in Chinese cabbage (*Brassica pekinensis* Rupr.). *Environ. Toxicol.* 20, 188–194.
- Yang, J., Kloepper, J.W., Ryu, C., 2008. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci.* 14, 1–4.
- Zhang, H., Lian, C., Shen, Z., 2009. Proteomic identification of small, copper-responsive proteins in germinating embryos of *Oryza sativa*. *Ann. Bot.* 103, 923–930.

UNCORRECTED PROOF

Resumen de Resultados

Selección de rizobacterias beneficiosas de *Spartina marítima* para la fitorremediación de estuarios contaminadas con metales: comparación de cepas gram-positivas y gram-negativas.

Un total de 25 cepas fueron aisladas de la rizósfera de *Spartina marítima*, de las cuales el 84% fueron identificadas como bacterias gram-positivas, particularmente cepas del género *Staphylococcus* y *Bacillus*. Las bacterias gram-negativas estuvieron representadas por los géneros *Pantoea* y *Salmonella*. La colección bacteriana fue caracterizada en base a los siguientes parámetros: tolerancia a metales pesados y sal, capacidad de bioabsorción de metales, propiedades promotoras del crecimiento de plantas (PGP) y formación de biofilms.

Pese a que la mayoría de las cepas aisladas pertenecieron al grupo de las bacterias gram-positivas, fueron los aislados gram-negativos los que mostraron una mayor tolerancia frente a los metales/metaloideos As, Cu, Zn y Pb, así como una mayor biosorción de metales, tal como se puede ver en los análisis ICP-OES y SEM-EDX. Además, estas cepas presentaron mejores propiedades PGP, que incluso se mantuvieron bajo la presencia de metales, así como una buena capacidad para la formación de biofilms. En términos generales, fueron las cepas gram-negativas *Pantoea agglomerans* RSO6 y RSO7 junto con la cepa gram-positiva *Bacillus aryabhatai* RSO25 las que mostraron los mejores resultados en todos los parámetros probados tal y como se puede apreciar en la Tabla 2 de Paredes-Páliz et al 2016a. Por tal motivo estas cepas fueron seleccionadas para formar un consorcio bacteriano con la finalidad de inocular plantas de *S. densiflora* en estuarios contaminados con metales pesados con propósitos de fitorremediación.

Inoculantes bacterianos para mejorar la germinación de las semillas de *Spartina densiflora*: implicaciones para la restauración de áreas contaminadas con metal.

Semillas de *S. densiflora* fueron inoculadas con diferentes tratamientos bacterianos. Los tratamientos estuvieron conformados por: cepas gram-negativas *Pantoea agglomerans* RSO6 y RSO7, cepa gram-positiva *Bacillus aryabhatai* RSO25 y un consorcio con las tres cepas bacterianas juntas.

La presencia de los metales As, Cu, Pb y Zn en sedimentos contaminados del Río Odiel redujo la germinación de *S. densiflora* en un 80% comparado con semillas cultivadas en

sedimentos no contaminados del Río Piedras. La inoculación por separado con la cepa *Bacillus aryabhattai* RSO25, así como con las cepas *Pantoea agglomerans* RSO6 and RSO7, mejoró 2,5 veces la tasa de germinación de *S. densiflora* en sedimentos contaminados en comparación con el control sin inoculación. Además, el proceso de germinación se aceleró y las características generales de germinación mejoraron considerablemente en las semillas inoculadas con los tratamientos bacterianos de cepas independientes frente al tratamiento control (sin inoculación), tal y como se puede apreciar en la Tabla 2 de Paredes-Páliz et al., 2016b. El consorcio formado por todas las cepas seleccionadas no mostró una mejora en la germinación de *S. densiflora*.

Modulación del crecimiento y acumulación de metal en plantas de *S. densiflora* tras la inoculación con rizobacterias seleccionadas: implicaciones para la restauración de salinas contaminadas con metales.

Las tres cepas bacterianas seleccionadas, especialmente *Pantoea agglomerans*, promueven el crecimiento de plantas en sedimentos contaminados. Por otro lado, son también capaces de mitigar el estrés producido por la presencia de metales, tal y como revelan los parámetros fisiológicos tales como funcionalidad del aparato fotosintético (PSII) y balance nutritivo. Sin embargo, mientras las cepas bacterianas gram-negativas no afectaron significativamente la acumulación de metales en plantas, la cepa gram-positiva mejoró la acumulación de los metales en las raíces de *S. densiflora*, sin que estos se transloquen a la parte aérea. Nuestros resultados confirman la posibilidad de modular de alguna manera la acumulación de metales y el crecimiento de plantas en sedimentos contaminados gracias a la selección del tipo de inoculante bacteriano, así como la idoneidad de las interacciones halófito-rizobacterias como herramienta biotecnológica para la fitoestabilización de estuarios contaminados.

Discusión

El estuario conjunto de los ríos Tinto y Odiel está afectado por un problema ambiental de contaminación debido a la presencia de varias fuentes de metales que se derivan tanto de procesos geoquímicos naturales como de actividades antropogénicas (Morillo et al., 2008). Nuestros datos también confirman la contaminación del estuario Odiel por metales; las concentraciones de varios de ellos sobrepasaron el umbral permitido por la normativa regional de parques naturales. De manera particular, son estos tres elementos (As, Cu y Zn) los principales contaminantes de este estuario. El Pb también alcanza niveles elevados, si bien no por encima de los límites establecidos por la normativa autonómica (Junta de Andalucía, 1999).

El género *Spartina* está compuesto por gramíneas perennes pertenecientes a la familia *Poaceae*. La mayoría de las especies son tolerantes a sal y colonizan las marismas costeras o interiores. Se ha dado un énfasis especial a las especies hiperacumuladoras, tales como *Spartina alternifolia* y *Spartina maritima*, centrando su uso potencial en procesos de fitorremediación gracias a sus altos niveles de acumulación de metales en tejidos de la parte aérea (1000 mg^{-1}), permitiendo de esta manera obtener una gran cantidad de biomasa vegetal (Caçador et al., 2009; Redondo-Gómez, 2013). Por el contrario, *S. densiflora* inmoviliza una alta concentración de metal en el suelo, previniendo la translocación de los metales desde el rizosedimento a la raíz (Cambrollé et al., 2008), y posteriormente su translocación a la parte aérea de la planta, con lo cual disminuye el riesgo de entrada de estos metales tóxicos en la cadena trófica (Méndez y Maier, 2008).

Spartina densiflora Brongn. es una halófila facultativa con una alta versatilidad fisiológica (Mateos-Naranjo et al., 2008b) a la que se le atribuye interacciones con rizobacterias autóctonas con propiedades PGP (Andrades-Moreno et al., 2014; Mateos-Naranjo et al., 2015b; Mesa et al., 2015a). Por otro lado, esta especie de planta muestra una alta capacidad para acumular metales pesados en sus tejidos (Cambrollé et al., 2008, 2011; Mateos-Naranjo et al., 2008a; 2012; Idaszkin et al., 2015; Mesa et al., 2015 a, b).

El uso de microbios en procesos de biorremediación podría ejercer una influencia positiva al reducir la toxicidad de los metales para las plantas o mejorando su crecimiento; al mismo tiempo, se puede dar un incremento en la biodisponibilidad de los metales para lograr una

mejor absorción, disminuyendo al mínimo el riesgo para las aguas subterráneas y superficiales (Phieler et al., 2013).

Los microorganismos del suelo pueden sustituir los efectos que se obtienen de la aplicación de sustancias químicas con el objetivo de mejorar la solubilidad y biodisponibilidad de los metales en el suelo. En el caso de *Spartina*, existen algunos reportes que muestran la importancia de las bacterias rizosféricas en ensayos de fitorremediación tanto para contaminantes orgánicos como para metales (Hong et al., 2015; Reboreda y Caçador 2008; Su et al., 2016).

Varios trabajos sugieren que la interacción halófilas-microorganismos puede ser potencialmente útil para acelerar la fitorremediación de estuarios salinos debido a la mejora del crecimiento de la planta y/o el incremento de la acumulación de metales en las mismas (Andrades-Moreno et al., 2014; Mesa et al., 2015a, b, c). La desventaja de esta técnica es la translocación de los metales hacia la parte aérea, por lo que las plantas halófilas podrían estar no solamente involucradas en los ciclos de metales de las zonas costeras (Caçador et al., 2009; Reboreda y Caçador, 2008), sino también como fuente de metales en estuarios no contaminados (Couto et al., 2013).

Uno de los objetivos principales de nuestro trabajo fue evaluar el efecto por separado de las bacterias gram-positivas y gram-negativas como inoculantes. Dicho efecto sólo podía ser estudiado en una planta cuya propagación se realice a partir de semillas, como es el caso de *S. densiflora*. Dado que la propagación de *S. marítima* se da por el fraccionamiento de rizomas, su uso para este tipo de estudio impedía analizar el efecto individual de los inoculantes bacterianos, debido a que sus raíces están previamente colonizadas por microorganismos autóctonos (Bortolus, 2006).

Aislamiento, identificación y caracterización de rizobacterias con propiedades PGP

En este trabajo se aislaron y caracterizaron bacterias presentes en la rizósfera de *S. marítima*. Nuestros resultados indicaron que las bacterias gram-positivas son la comunidad bacteriana predominante entre los aislados de la rizósfera de *S. marítima*, especialmente el

género *Bacillus* y *Staphylococcus*, que son bastante conocidos por su tolerancia a la sal (Parfentjev y Catelli, 1964; Sharma et al., 2015). Los medios ambientes asociados a ciclos de sequía e inundaciones favorecen el crecimiento de bacterias gram-positivas debido a que son más resistentes a la desecación (Potts, 1994; Billi y Potts, 2002). En lo que concierne a las bacterias gram-negativas, sólo se pudieron aislar bacterias pertenecientes a los géneros *Pantoea* y *Pseudomonas*. Todos los géneros aislados son comúnmente encontrados en la rizósfera y como endófitos de plantas (Lugtenberg et al., 2001; Sergeeva et al., 2007; Santoyo et al., 2012; Del Castillo et al., 2015; Mesa et al., 2015a, b).

Nuestros datos muestran un alto nivel de resistencia de las bacterias aisladas frente a Cu, Zn, As y Pb. El comportamiento en general fue diferente dependiendo de los metales. Mientras que la resistencia frente al Zn fue de manera general bastante alta (más del 50% de las cepas presentaron resistencia a 10 mM de Zn), la resistencia media frente a Pb fue baja (<2 mM) y la resistencia frente a As y Cu fue intermedia (4-6 mM).

De todos los aislados, tres cepas fueron seleccionadas para posteriores ensayos debido a sus múltiples resistencias: las dos cepas gram-negativas *Pantoea* sp. (RSO6 y RSO7) y la cepa gram-positiva *Bacillus aryabhatai* (RSO25). Estas cepas también indicaron una alta capacidad de bioacumulación. Nuevamente se observaron diferencias entre las cepas gram-positivas y gram-negativas. En estas últimas, el 70-90 % de Zn y Cu fue adsorbido dentro de la superficie celular, mientras que el Pb se distribuyó equitativamente dentro y fuera de la célula. Además, la cepa RSO7 fue capaz de acumular hasta 26 000 µg de Pb por mg de biomasa seca, con una distribución igual tanto fuera como dentro de la célula, como se puede observar en SEM-EDX. En la cepa RSO25, la capacidad de bioadsorción del metal fue claramente reducida y el porcentaje de Zn adsorbido en la superficie celular fue menor al 20%, viéndose de esta manera que la mayor parte del metal fue acumulado en el interior de la célula. Por el contrario, el Pb fue mayormente acumulado fuera de la célula. Se conoce que las diferencias entre las paredes celulares de los organismos (bacterias gram-positivas, gram-negativas, algas, hongos, cianobacterias, actinomicetes etc.) dirigen las diferentes propiedades de bioadsorción (Abbas et al., 2014).

Cuando se selecciona un inoculante bacteriano para plantas, es importante saber si las bacterias tienen propiedades promotoras del crecimiento (PGP), y lo que es más importante,

si son capaces de mantenerlas, o incluso incrementarlas, aún bajo condiciones de estrés, como es el caso de la presencia de metales pesados en el medio. Es nuestro estudio se demostró la presencia de dichas propiedades en las cepas seleccionadas. Algunas de estas propiedades están relacionadas con la adquisición de nutrientes.

El nitrógeno y el fósforo son dos de los macronutrientes más importantes en los ecosistemas agrícolas. Existen reportes que nombran a bacterias del género *Pantoea* y *Bacillus* como fijadoras de nitrógeno, haciéndolo accesible a las plantas (Bhattacharyya y Jha, 2012). En nuestro caso, parece ser que esta propiedad no se ve afectada por la presencia de As, sin-embargo, muestra una sensibilidad considerable frente al Zn, ya que ninguna cepa, a excepción de la RSO7, fue capaz de fijar nitrógeno en la presencia de este elemento.

Después del nitrógeno, el fósforo es uno de los elementos más esenciales para la planta. Bajos niveles de este elemento causa deficiencias que pueden restringir severamente el crecimiento de las plantas. El fosfato es frecuentemente encontrado en el suelo en formas insolubles; además, el uso de inoculantes microbianos representan una alternativa amigable a los fertilizantes químicos (Burd et al., 2000). En el caso del género *Pantoea*, existen muchas especies con la capacidad de solubilizar fosfatos por medio de mecanismos que incluyen la habilidad de producir y excretar ácido glucónico, así como la reducción del pH del medio gracias a la secreción de grandes cantidades de ácidos orgánicos (Castagno et al., 2011; Park et al., 2011). Por su parte, cuando el fósforo está unido covalentemente a compuestos orgánicos del suelo, la actividad de las enzimas fosfatasas ácidas o fosfatasas alcalinas, es capaz de liberar este elemento (Nannipieri et al., 2011). Sin embargo, cuando está unido a mio-inositol (fitatos), son las enzimas fitasas las que se encargan de liberar el P de estos compuestos (Singh y Satyanarayana, 2011).

En este estudio, pese a que las tres cepas analizadas fueron capaces de solubilizar fosfato en ausencia de metales, sólo la cepa RSO6 retuvo ésta capacidad en presencia de todos los metales probados. La cepa RSO7 mantuvo esta capacidad en frente todos los metales, excepto el Pb, y la cepa RSO25 únicamente en presencia de Cu.

En términos generales, el hierro es un elemento escaso de difícil asimilación por parte de las plantas y los microorganismos. Pese a que el Fe parece no ser un elemento limitante en nuestros sedimentos de acuerdo a las concentraciones totales reportadas (Morillo et al., 2008; Sáinz y Ruiz, 2006), la biodisponibilidad de este metal podría estar limitada. Muchas PGPR son capaces de producir varios quelantes de Fe con una alta afinidad por el Fe^{3+} conocidos como sideróforos. Esta capacidad ayuda a la planta a adquirir suficientes cantidades de hierro en la presencia de grandes cantidades de otros metales tóxicos, lo cual tiene implicaciones no sólo en la nutrición de las plantas, sino también el control de fitopatógenos (Burd et al., 2000). Otras posibles funciones de los sideróforos engloban su participación como elicitores de la resistencia sistémica inducida (IRS) a través de moléculas como los lipopolisacáridos de las paredes celulares (LPS), flagelos bacterianos, antibióticos, o compuestos volátiles como el 2,3-butanodiol (Bakker et al., 2007). Nuestros resultados muestran que únicamente las cepas del género *Pantoea* fueron capaces de producir sideróforos tanto en ausencia como en presencia de metales.

La producción de fitohormonas, especialmente auxinas, es un mecanismo importante y bien estudiado que contribuye al crecimiento de la planta por medio de la estimulación del crecimiento de la raíz. También tiene una repercusión directa en la resistencia al estrés biótico y abiótico y la germinación de semillas (Lugtenberg y Kamilova, 2009). La mayoría de las auxinas de la rizósfera de la planta provienen de la conversión del triptófano (secretado por las raíces) en ácido indol acético (IAA) gracias a las rizobacterias (Spaepen y Vanderleyden, 2011). Estudios hechos por Del Castillo et al., (2015) exhiben 26 aislados del género *Pantoea* con una alta capacidad de producir auxinas. Nuestros resultados indican que todas las cepas fueron capaces de producir IAA en ausencia de metales, en especial las cepas de *Pantoea*. En términos generales, las propiedades PGP de las cepas seleccionadas fueron similares a aquellas aisladas de la rizósfera de *S. densiflora* y *S. maritima* que crecen en estuarios contaminados (Andrades-Moreno et al., 2014; Mesa et al., 2015a). El incremento en la producción de auxinas (10 veces más) en presencia de metales pesados tiene un particular interés debido a que el incremento en el sistema radicular de las plantas está directamente relacionado con la mejora en la eficiencia de procesos de fitorremediación (Sergeeva et al., 2007; Gamalero et al., 2009).

Finalmente, se evaluó la capacidad de formar biofilms de las cepas seleccionadas. La formación de biofilms es una estrategia usada por microorganismos con la finalidad de sobrevivir a metales tóxicos gracias a la acción combinada de mecanismos físicos, químicos y fisiológicos vinculados a la diversificación celular del biofilm (Harrison et al., 2007; Das et al., 2012). Se ha reportado que la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida para diferentes metales se incrementa hasta 100 veces en células de biofilms en comparación con las células plantónicas. Por lo tanto se piensa que los biofilms tienen la capacidad de proteger dianas celulares específicas frente a los iones metálicos tóxicos, que provoca la muerte de células plantónicas debido al estrés oxidativo (Harrison et al., 2007).

En nuestro caso, la cepa RSO25 fue incapaz de formar biofilms bajo las condiciones probadas. Por el contrario, las cepas RSO6 y RSO7 sí consiguieron formar biofilms, siendo esta última la mejor en lo que concierne a esta capacidad en particular. Esta cepa fue, con diferencia, la que produjo la mayor cantidad de polisacárido. Esta característica, junto con las buenas propiedades de bioadsorción mostradas por las cepas de *Pantoea*, nos sugiere una posible aplicación en la inmovilización/fitoestabilización de metales en la rizósfera de *Spartina*, tomando en cuenta que los efectos de las poblaciones de bacterias rizosféricas en los ciclos de metales y especiación han sido previamente reportados (Duarte et al., 2009; Reboreda y Caçador, 2008).

Germinación de *Spartina densiflora*

Existen varios estudios que indican que las bacterias PGP pueden disminuir el estrés de las plantas cuando crecen sobre sedimentos con diferentes propiedades físico-químicas y/o altos niveles de contaminación por metales (Yang et al., 2008; Rajkumar et al., 2012; Mateos-Naranjo et al., 2015a, b; Ullah et al., 2015; Choudhary et al., 2016). Pese a esto, no existe mucha información disponible que hable sobre el efecto de estas bacterias sobre el estadio de germinación de semillas (Miransari y Smith, 2014). Se ha reportado que la germinación es la fase más sensible a factores ambientales y a la contaminación por metales comparada con otras fases del ciclo de vida de las plantas, esto se da debido a la ausencia

de varios mecanismos de defensa que hacen frente a condiciones estresantes (Liu et al., 2005; Xiong y Wang, 2005; Mateos-Naranjo et al., 2008c; Navarro-Torre et al., 2016b). Sin embargo, no existe un patrón claro de germinación en respuesta a estas condiciones, ya que han descrito especies en donde se puede apreciar una inhibición evidente (Kjær et al., 1998; Ahsan et al., 2007), mientras que otras no se han visto afectadas por factores ambientales o la presencia de metales (Mahmood et al., 2005; Street et al., 2007; Mateos-Naranjo et al., 2008c, 2011).

La capacidad de *S. densiflora* para germinar en sedimentos contaminados ha sido mostrada en estudios hechos por Curado et al. (2010) y Mateos-Naranjo et al. (2011), los cuales señalan que la alta biodisponibilidad del metal puede inhibir o alterar la germinación en esta planta. Nuestros resultados indican que la cinética de germinación, el porcentaje final de germinación y las características de germinación de *S. densiflora* estuvieron fuertemente influenciados por las características de los sedimentos, tal como indican resultados previos. Además, este es el primer estudio que demuestra la influencia de las bacterias rizosféricas en la mejora de las características de germinación.

En lo que a porcentaje final de germinación se refiere, los resultados obtenidos muestran diferencias significativas entre los tratamientos sin inocular de los dos tipos de sedimentos utilizados, viéndose que el porcentaje disminuye del 90% al 18% en sedimentos del Río Piedras y Río Odiel, respectivamente. Por otro lado, la tasa de germinación en los sedimentos del Piedras indica que la germinación de semillas empezó rápidamente, entre el día 7 y 14; por el contrario, la germinación de *S. densiflora* en los sedimentos del Odiel sufrió un retraso medio en el período de germinación (entre los días 24 y 30). Estas diferencias pueden atribuirse a las diferentes características físico-químicas de ambos sedimentos, particularmente al contenido de metal, como ha sido previamente mostrado por Sethy y Ghosh (2013). Los análisis físico-químicos de los sedimentos indican que las concentraciones de metal/metaloides fueron bajas en los sedimentos del Piedras, mientras que en el Odiel, los niveles de metal estuvieron sobre el umbral de toxicidad para las plantas. Por otro lado, se pudo ver un aumento en la biodisponibilidad de los metales gracias a valores de pH ligeramente más bajos, lo que contribuyó a la reducción de la capacidad de germinación de *S. densiflora*. Sin embargo, los diferentes tratamientos de

inoculación ayudaron a contrarrestar el impacto negativo del exceso de metales sobre la capacidad de germinación de *S. densiflora*.

Nuestros resultados muestran que la inoculación con la cepa gram-positiva *Bacillus aryabhatai* RSO25 y con las cepas gram-negativas RSO6 y RSO7 juntas, incrementan el porcentaje de germinación del 18% al 46% y 42% respectivamente en sedimentos contaminados, lo que supone una mejora de entre 2.5-3 veces respecto a los controles no inoculados. Además, la cinética de germinación también se vio afectada; por ejemplo, el primer día de germinación tuvo un adelanto: del día 24 al día 13 y 10. Por el contrario, la inoculación con la cepa RSO25 o con las cepas RSO6 y RSO7 juntas sobre suelo no contaminado, no produjo en general ningún efecto significativo en la respuesta a la germinación de *S. densiflora* comparado con el tratamiento sin inocular, ya que en este caso la germinación fue muy alta (90%) incluso sin inoculación.

Son las características biológicas de las cepas escogidas para la inoculación las que producen una mejora en la germinación de *S. densiflora* en sedimentos con exceso de metal. Las cepas *Bacillus aryabhatai* (RSO25) y *Pantoea agglomerans* (RSO6 y RSO7) mostraron una elevada tolerancia a metales así como una buena capacidad de bioadsorción; por ejemplo, la cepa RSO7 es capaz de acumular sobre los 26.000 $\mu\text{g Pb g}^{-1}$ de peso seco (Paredes et al., 2016). Además, las cepas bacterianas utilizadas, en especial las gram-negativas, tienen una gran capacidad de formar biofilms (Paredes et al., 2016). Por lo tanto, es posible que estas características contribuyan a la germinación de las semillas, absorbiendo el metal sobre la superficie y disminuyendo la disponibilidad de metales alrededor de las mismas.

Existen varias publicaciones que muestran que las bacterias resistentes a metal y con una alta capacidad de bioadsorción potencian el crecimiento de la planta (Rodríguez-Llorente et al., 2010; Dary et al., 2010). Sin embargo, la información que se tiene de la etapa de la germinación es escasa. En este sentido, la ingeniería genética de la superficie celular bacteriana ha sido utilizada para mejorar la bioadsorción de metales e incrementar la protección de las plantas frente a los mismos (Valls et al., 2000; Biondo et al., 2012). Además, se sabe que los diferentes tipos de microorganismos (bacterias gram-positivas, gram-negativas, levaduras, hongos micorrícicos, algas, cianobacterias etc.) con paredes

celulares de diferente naturaleza química, pueden presentar distintas capacidades de bioadsorción de metales, dependiendo de los grupos químicos que estén sobre su superficie (Wang y Chen, 2009; Das, 2010). Por otra parte, las poblaciones microbianas pueden afectar la movilidad de los metales pesados y la disponibilidad hacia la planta a través de agentes quelantes, acidificación, solubilización de fosfatos y cambios en el potencial redox (Gadd, 2004; Ullah et al., 2015), por lo que es posible que estos mecanismos puedan contribuir a la mejora en la germinación de *S. densiflora* bajo condiciones de contaminación por metales pesados.

También se ha podido ver que las tres cepas seleccionadas mostraron, en estudios hechos por Paredes et al. (2016a), propiedades PGP incluso en la presencia de As, Cu, Zn y Pb cuando se las evaluó *in vitro*. Estas propiedades podrían ayudar a la germinación. Por ejemplo, las auxinas están claramente involucradas en el mantenimiento de la latencia de las semillas (Miransari and Smith, 2014; Shu et al., 2016). Además, aunque las auxinas parecen no estar directamente relacionadas con la germinación, cumplen un rol crucial una vez que la radícula ha emergido (Kucera et al., 2005; Miransari y Smith, 2014). Estas fitohormonas pueden ser producidas tanto por microorganismos rizosféricos como por la propia planta una vez que se haya dado la alteración de la expresión de los genes de la misma debido a las bacterias. En ambos casos, el rol de las poblaciones rizosféricas en la germinación constituyen una herramienta eficaz para mejorar los procesos de germinación, especialmente bajo condiciones de estrés (Miransari y Smith, 2014), ya que como se ha comentado anteriormente, uno de los principales problemas a la hora de instaurar proyectos de fitorremediación es la baja tasa de germinación de las semillas en estas condiciones desfavorables.

Finalmente, en lo referente a la inoculación con el consorcio integrado por todas las cepas individuales; podemos decir que, pese a que se esperaba un fuerte efecto positivo en la capacidad de germinación de *S. densiflora*, no se obtuvieron grandes mejoras en la germinación en los dos tipos de sedimentos ensayados respecto a las inoculaciones con cepas individuales. Varios estudios han mostrado que la comunicación bacteriana entre los miembros de una población específica en la rizósfera, podrían ser interceptados por otros microbios, particularmente cepas de *Bacillus* dentro de sistemas naturales, los mismos que

podrían afectar a las propiedades PGP dependientes del mecanismo conocido como *quorum sensing* (Boyer y Wisniewski-Dyé, 2009). Por lo tanto, es posible este comportamiento entre las cepas que formaron nuestro consorcio explique la ausencia de un gran efecto positivo en la respuesta de germinación de *S. densiflora*.

Influencia de las PGPR sobre la tolerancia de las plantas a sedimentos contaminados por metales pesados

Las plantas usadas en fitorremediación deben ser capaces de tolerar altas concentraciones de metales (Grčman et al., 2001). Pese a que *S. densiflora* ha sido considerada altamente tolerante a la contaminación por metales pesados (Mateos-Naranjo et al., 2008a), en este estudio las plantas cultivadas en los sedimentos más contaminados mostraron una reducción en el crecimiento. Por lo tanto, la masa seca de la raíz disminuyó un 50% en los sedimentos contaminados; sin embargo, no se encontró un efecto significativo de la contaminación de los metales en la masa seca de la parte aérea en plantas no inoculadas. Este efecto negativo también fue evidente en la longitud de los tallos y en la longitud de la raíz, con reducción del 30% y 50%, respectivamente. Estos resultados son consistentes con los obtenidos previamente por Mateos-Naranjo et al. (2011) en el mismo tipo de sedimento.

Por otro lado, la inoculación con las cepas gram-negativas RSO6 y RSO7, así como con el consorcio bacteriano, mitigó el efecto perjudicial de los metales provocando un incremento en la biomasa y longitud de raíces y parte aérea. Los mejores resultados fueron obtenidos tras la inoculación con las bacterias gram-negativas y con el consorcio, en comparación con las plantas inoculadas con la cepa gram-positiva RSO25.

La mitigación del impacto negativo de sedimentos contaminados sobre el crecimiento de *S. densiflora*, así como el efecto positivo en sedimentos no contaminados, también ha sido apoyada por la mejora general en la asimilación de carbono fotosintético gracias a la inoculación bacteriana. Nuestros datos de intercambio gaseoso mostraron que los valores de AN fueron mayores en plantas inoculadas frente a sus homólogos no inoculados en sedimentos contaminados, viéndose un incremento de hasta 2 veces en la inoculación con las cepas gram-negativas RSO6 y RSO7 así como con el consorcio; y 1,5 veces con la cepa

gram-negativa RSO25. Por el contrario, en sedimentos no contaminados, el efecto positivo fue detectado únicamente en plantas inoculadas con las cepas RSO6 y RSO7 y con el consorcio bacteriano. La conductancia estomática (g_s) mostró una tendencia muy similar a AN. En contraste, los valores de C_i no variaron de forma significativa en lo que refiere al tipo de sedimento y a los tratamientos de inoculación con respecto al control. Por otro lado, el efecto beneficioso de la inoculación con las diferentes cepas bacterianas y su consorcio en el aparato fotosintético de *S. densiflora* se vio también reflejado en términos de funcionalidad del PSII, tal como indican los altos valores de F_v/F_m y Φ_{PSII} a mediodía en sedimentos contaminados en plantas inoculadas con las cepas RSO6 y RSO7, y con el consorcio bacteriano. La inoculación con la cepa RSO25 tuvo un efecto positivo evidente únicamente para el Φ_{PSII} . Estos resultados indican que, hasta cierto punto, el efecto beneficioso de la inoculación bacteriana en plantas cultivadas bajo condiciones de contaminación por metales puede estar vinculado con la protección del aparato fotosintético. Resultados similares han sido ya previamente reportados por Mesa et al. (2015) para plantas de *Spartina marítima* inoculadas con un consorcio bacteriano formado por *Bacillus methylotrophicus* SMT38, *Bacillus aryabhattai* SMT48, *Bacillus aryabhattai* SMT50 y *Bacillus licheniformis* SMT51, todos resistentes a metales pesados y aislados de la rizósfera de *S. marítima*.

Existen cada vez más trabajos que indican que las bacterias resistentes a los metales pueden disminuir el estrés de las plantas cuando crecen en suelos contaminados con metal (Yang et al., 2009; Ahemad y Kibret, 2014, Mesa et al., 2015a, Rajkumar et al., 2012, Ullah et al., 2015; Navarro-Torres et al., 2016a). En nuestro caso, el tratamiento de inoculación más eficaz para disminuir los efectos tóxicos de los metales sobre el crecimiento de *S. densiflora* fue el realizado por las cepas bacterianas gram-negativas RSO6 y RSO7, seguidas por el consorcio; mientras que la cepa gram-positiva RSO25 parecía proporcionar una protección menor. Las cepas de *Pantoea agglomerans* RSO6 y RSO7 son resistentes a varios metales simultáneamente (multiresistencia); es decir, son capaces de crecer a altas concentraciones de As (2-4 mM), Cu (8 mM), Zn (10 mM) y Pb (6-7 mM) (Paredes-Páliz et al., 2016a). Por su parte, *Bacillus aryabhattai* RSO25 mostró menor tolerancia al metal en comparación con RSO6 y RSO7 (Paredes-Páliz et al., 2016a). Además, estas bacterias

tienen una gran capacidad de bioadsorción, en particular RSO7, que fue capaz de fijar hasta 26.000 μg de Pb. g^{-1} de peso seco (Paredes-Páliz et al., 2016a).

Por otro lado, las cepas gram-negativas han mostrado una gran capacidad de formar biofilms (Paredes-Páliz et al., 2016a). En este estudio en particular, es posible que la alta resistencia a metales y la capacidad de bioadsorción de los metales de las bacterias pudiera contribuir al crecimiento de la planta, debido a la adsorción del metal sobre la superficie bacteriana dentro del biofilm, disminuyendo así la disponibilidad del metal en la proximidad de las raíces. De esta forma se evita la captación de metal y su translocación a los tejidos fotosintéticos más sensibles y, por lo tanto, mejora la tolerancia al metal pesado mediante el mantenimiento de la función fotosintética. De hecho, la fotosíntesis es comparativamente, uno de los procesos más fuertemente afectado por la presencia de metales pesados, como el zinc (Mateos-Naranjo et al., 2008 b) o el cobre (Materos-Naranjo et al., 2008c), incluso el arsénico (Lafuente et al., 2015), presentes éstos dos últimos a elevadas concentraciones en los sedimentos de esta marisma (Sáinz et al., 2006; Morillo et al., 2008).

Por otro lado, debe tenerse en cuenta que las cepas gram-negativas RSO6 y RSO7 mostraron mejores propiedades promotoras del crecimiento de las plantas (PGP) que la cepa gram-positiva RSO25, produciendo puntualmente una mayor cantidad de auxinas (IAA), incluso en mayor medida en presencia de metales pesados (Paredes-Páliz et al., 2016a). Las auxinas tienen un papel importante en el crecimiento de las raíces y la formación de raíces laterales (Remans et Al., 2008; Zhao, 2010; Ljung, 2013), lo que podría contribuir también a explicar mejor el por qué de la mejora en el crecimiento de plantas en ambientes contaminados tras la inoculación con RSO6 y RSO7 y/o el consorcio.

Por otra parte, se sabe que la presencia de metales pesados en los sedimentos puede afectar el estado mineral de las plantas al competir con el transporte de iones hacia las células de las raíces (Vacheron et al., 2013). Por lo tanto, el control preciso del equilibrio nutricional podría permitir que ciertas especies de plantas puedan hacer frente al exceso de metal (Li et al., 2015). Nuestros resultados indicaron que la contaminación por metales fue el principal factor que afectó la concentración de iones en las plantas, los mismos que son los responsables del equilibrio nutricional en los tejidos de *S. densiflora*. Así, el contenido de N

disminuyó (en un 33%) en las raíces de plantas cultivadas en sedimentos contaminados, mismo que se restableció como consecuencia de la inoculación bacteriana sobre las plantas. Este efecto podría deberse al hecho de que todas las cepas bacterianas usadas como inoculantes fueron reportadas como fijadores de N₂ (Paredes-Páliz et al., 2016a). Se conoce que los diazótrofos mejoran el crecimiento de las plantas y la asimilación de N en plantas bajo estrés metálico (Ye et al., 2005), o en condiciones de estrés salino (Ullah et al., 2015; Ogar et al., 2015). Además, las plantas podían aprovechar los aminoácidos liberados por los diazótrofos en la rizosfera, en condiciones de agotamiento de N (de Oliveira et al., 2011).

En contraste, el contenido de S aumentó en las plantas cultivadas en sedimentos contaminados con metales, sin diferencias significativas entre los tratamientos de inoculación. Esta tendencia podría explicarse por una mayor síntesis de compuestos de tiol, tales como, glutatión y fitoquelatinas, así como metalotioneínas, como parte de las vías de detoxificación de metal de células vegetales ante condiciones de exceso de metal (Zagorchev et al., 2013; Gill y Tuteja, 2011; Lafuente et al., 2015). Por otro lado, hubo un aumento de la concentración de Na, K, Mg y Fe en los tejidos vegetales en condiciones contaminadas, particularmente en las raíces, lo que podría explicarse por la mayor concentración de estos elementos en los sedimentos de Odiel, como se describió anteriormente en Paredes-Páliz et al. (2016b). En particular, se sabe que el contenido de Fe es extremadamente elevado en los suelos y aguas de los pantanos de Odiel, donde se recogió el sedimento contaminado, debido al drenaje ácido de la mina en el Cinturón de Pirita Ibérico (Sánchez-España et al., 2013). Además, algunas bacterias de la rizósfera están implicadas en la promoción de la formación de una placa de hierro en las raíces de las plantas, como el arroz, y se comportan como una barrera para la acumulación de metales en los tejidos vegetales (Koch y Nearing, 2016). El contenido de Mn en las plantas cultivadas en los sedimentos de Odiel fue siempre menor que el de las cultivadas en el sedimento no contaminado, particularmente en plantas inoculadas. Este hecho podría deberse a la formación de la placa de raíz Fe / Mn, que puede limitar la disponibilidad de Mn y su transferencia a los tejidos vegetales (Dong et al., 2016). La formación de la placa de hierro en la superficie de la raíz se ha descrito previamente en otras especies de *Spartina* como un mecanismo destinado a limitar la captación de metal (Doyle y Otte, 1997). En consecuencia, es posible que los tratamientos de inoculación favorezcan la formación de

este sistema de protección en *S. densiflora*, siendo esta área digna de más investigación, ya que podría explicar la alta tolerancia de *S. densiflora* al estrés metálico. De hecho, en otras especies de plantas se ha descrito también la formación de una placa de Fe/Mn sobre las raíces. Adicionalmente, en suelos contaminados, la formación de dicha placa de hierro sobre las raíces permite limitar la entrada de metales hacia las mismas, contribuyendo a la inmovilización de los metales y el arsénico hacia la rizósfera de la planta (Andrades-Moreno et al., 2014; Idaszkin et al., 2014, 2015; Li et al., 2015; Fresno et al., 2016; Yang et al., 2016), previniéndose así la entrada de elementos tóxicos a la cadena alimenticia (Mendez y Maier, 2008). Además, algunas bacterias rizosféricas están involucradas en promover la formación de dichas placas de hierro en las raíces de las plantas, comportándose como una barrera a la acumulación de metal dentro de los tejidos de las plantas y por lo tanto ayudando a la fitoestabilización del metal (Lakshmanan et al., 2015; Dong et al., 2016; Koch y Nearing, 2016).

La formación de una placa de hierro en la superficie de la raíz ha sido descrita previamente en otras especies de *Spartina* como un mecanismo que limita o impide la entrada del metal (Doyle and Otte, 1997). En consecuencia, es posible que los tratamientos de inoculación favorezcan la formación de este sistema de protección en *S. densiflora*, confirmando a ésta área un especial interés para futuras investigaciones ya que de esta manera se podría explicar la alta tolerancia de esta planta al estrés por metal. De hecho, la presencia de una placa de hierro ayuda a la inmovilización de metales en la rizósfera de plantas como *Lupinus* (Fresno et al., 2016) y arroz (Li et al., 2015; Yang et al., 2016). Por otro lado, la placa de hierro es considerada como una fuente tanto de nutrientes como de contaminantes para las raíces de las plantas (Khan et al., 2016).

Influencia de las PGPR sobre la acumulación de metales tóxicos en tejidos de *S. densiflora*

Con el fin de diseñar una estrategia eficaz para la remediación de metales, las plantas seleccionadas como herramientas biológicas deben elegirse sobre la base de su tolerancia a los metales, así como por su capacidad de acumular grandes cantidades de metales en sus

tejidos (Marqués et al., 2011). Varios estudios han determinado que *Spartina densiflora* puede ser útil para fitostabilización de Cu, Pb y Zn en ambientes contaminados (Cambrollé et al., 2008, 2011; Mesa et al., 2015). Según el análisis de metales, nuestros resultados confirman esta idea, ya que las concentraciones de As, Cu, Pb y Zn fueron mayores en las raíces que en la parte aérea de *S. densiflora*, con marcado aumento en plantas cultivadas en suelos contaminados. Sin embargo, cada metal se acumuló en diferente grado en las raíces; mientras que la acumulación de As y Pb mostraron niveles relativamente bajos (entre 40-80 mg Kg⁻¹ de peso seco), el contenido de Cu fue intermedio (entre 200-450 mg Kg⁻¹ de peso en seco) y la acumulación de Zn alcanzó los rangos más altos (entre 900-1500 mg Kg⁻¹ peso seco).

Además, con respecto a los tratamientos de inoculación, nuestros datos indicaron que la concentración de As, Pb y Zn en la raíz aumentó 2 veces en las plantas inoculadas con la cepa gram-positiva RSO25 y con el consorcio en comparación con las plantas no inoculadas. La concentración de Cu aumentó 1,8 veces en las raíces de las plantas inoculadas con el consorcio bacteriano. Por el contrario, la inoculación con las cepas gram-negativas RSO6 y RSO7 no tuvo influencia significativa sobre la acumulación de metal en las raíces. Adicionalmente, las concentraciones de metal en la parte aérea fueron mayores en las plantas inoculadas, siendo la concentración de As 5 y 10 veces mayor tras la inoculación con la cepa RSO25 y con el consorcio, respectivamente. La concentración de Cu fue 2 veces mayor con el consorcio, y la concentración de Pb aumentó hasta 2, 4 y 8 veces después de la inoculación con cepas gram-negativas, cepas gram-positivas y con consorcio, respectivamente.

Varios estudios han encontrado que las poblaciones bacterianas pueden afectar la movilidad y disponibilidad de metales pesados a la planta mediante la liberación de agentes quelantes, acidificación, solubilización de fosfatos y cambios redox (Gadd, 2004; Ullah et al., 2015), que pueden jugar un papel importante en la absorción de metal por las plantas (Glick, 2010); por tal motivo se cree que estos mecanismos podrían contribuir a mejorar la absorción de metales en *S. densiflora*. Particularmente, la bioadsorción de metales por diferentes grupos bacterianos parece ser de gran importancia. De hecho, hemos encontrado una correlación inversa entre la capacidad de bioadsorción metálica y la acumulación en

tejidos de plantas; por lo tanto, las cepas gram-negativas, y particularmente RSO7, son conocidas por bioadsorber mayores cantidades de metal en comparación con la cepa gram-positiva RSO25 (Paredes-Páliz et al., 2016a). Esto podría explicar la menor biodisponibilidad del metal para la absorción de la planta tras la inoculación con gram-negativas. De hecho, la ingeniería de péptidos de unión a metales en la superficie de la célula bacteriana, es una estrategia bastante usada para disminuir la captación de metal por las plantas tras la inoculación con bacterias genéticamente modificadas (Valls et al., 2000; Chen y Georgiou, 2002; Qin et al., 2006; Almaguer-Cantú, et al., 2011). En estos casos se han expresado proteínas quelantes de metales en la superficie de las bacterias. Cuando las plantas se inocularon con estas bacterias, se observó un efecto protector, debido a que el metal se quedaba retenido en las proteínas expresadas en la superficie bacteriana.

Por el contrario, se sabe que las bacterias gram-positivas del género *Bacillus* secretan ácidos orgánicos, tales como los ácidos láctico, isovalérico, isobutírico y acético, que son frecuentemente producida por las cepas de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens* para la solubilización de fosfato (Goswami et al., 2016). Esto podría contribuir a la movilización de metales debido a la acidificación local, y puede ser la razón del aumento de la acumulación de metal en las raíces tras la inoculación con la cepa gram-positiva o el consorcio. Cuando la fitostabilización se propone como técnica de remediación, es importante lograr una alta acumulación de metal en raíces con baja translocación a los brotes (Méndez y Maier, 2008). Los diferentes tratamientos de inoculación permiten modular la acumulación del metal en esta planta, brindándonos la capacidad de escoger el tipo de fitorremediación que más nos convenga en base a las capacidades y características de cada una de nuestras cepas evaluadas.

En general, podría decirse que se alcanzó una mayor acumulación de metales en las raíces de plantas inoculadas con RO25 y el consorcio, mientras que la translocación a los brotes dependía de elementos particulares. Por el contrario, la inoculación con gram-negativas no tuvo un efecto significativo y los valores registrados para la acumulación de metales en raíces y translocación a la parte aérea fueron casi idénticos al tratamiento control sin inocular. Otro hecho a tener en cuenta es la promoción del crecimiento de las raíces tras la inoculación con las cepas RSO6 y RSO7 productoras de auxinas. De hecho, un sistema

radicular grande y profundo es uno de los requisitos para las plantas utilizadas en la fitorremediación eficiente (Pilon-Smits, 2005; Vangronsveld et al., 2009).

Finalmente, vale la pena recalcar que todos los datos referentes a las determinaciones de metales en la parte aérea de las plantas se situaron muy por debajo de los umbrales establecidos para el consumo de herbívoros (Méndez y Maier, 2008), por lo que la interacción entre *S. densiflora* y PGPR es una herramienta adecuada y ambientalmente segura para la fitostabilización de los sedimentos contaminados, evitando así la movilización de altas cantidades de metales a las partes aéreas de las plantas.

Conclusiones

1. Pese a que el mayor número de aislamientos pertenecen al grupo de bacterias Gram-positivas, los dos aislados de *P. agglomerans* RSO6 y RSO7 fueron los que mostraron mejores resultados en cuanto a resistencia y bioacumulación de metales pesados, propiedades PGP y capacidad de formar biofilms. Estas capacidades los hacen muy interesantes como inoculantes en procesos de fitorremediación.
2. La inoculación con aislados bacterianos seleccionados de forma apropiada de la rizósfera de *Spartina densiflora* podría contribuir a mejorar su tasa y período de germinación, lo cual sería crucial en el diseño de proyectos de restauración de zonas contaminadas con metales pesados.
3. La cepa Gram-positiva *Bacillus aryabhatai* RSO25, así como las cepas Gram-negativas *Pantoea agglomerans* RSO6 y RSO7 han demostrado ser eficientes en cuanto a la protección de las semillas en presencia de un exceso de metales, incrementando 2,5 veces más el porcentaje de germinación en comparación con las semillas no inoculadas, mientras que la inoculación con el consorcio de las tres cepas no generó una mejora adicional.
4. Son varios los factores que explican el efecto positivo de la inoculación bacteriana. Entre estos tenemos: alta resistencia a metales, capacidad de bioadsorción y formación de biofilms, que junto a sus propiedades PGP (que se mantienen aún en presencia de metales), podrían disminuir la biodisponibilidad del metal alrededor de las semillas.
5. La inoculación con las bacterias rizosféricas apropiadas (PGPR) aisladas de la rizósfera de plantas de *Spartina* que crecen en el estuario del Odiel, podría contribuir a mejorar la tolerancia al exceso de metal, en términos de funcionalidad e integridad de su aparato fotosintético, así como, en cierto grado, al mantenimiento de su balance nutricional.
6. La inoculación con las cepas Gram-negativas RSO6 y RSO7, así como con el consorcio bacteriano, mitiga el efecto perjudicial del exceso de metales en el rendimiento de las plantas.
7. En lo concerniente a la toma de metales, la adecuada selección de inoculantes rizosféricos podrían permitir modular la acumulación en las raíces, sin una translocación adicional hacia la parte aérea. Por lo tanto, se logró una mayor

acumulación de metales en las raíces inoculadas con la cepa RSO25 y el consorcio, mientras que la translocación hacia la parte aérea dependió de elementos particulares, manteniéndose en niveles bajos. Por el contrario, la inoculación con las cepas RSO6 y RSO7 no afectó significativamente ni la acumulación de metales en las raíces, ni la translocación hacia la parte aérea.

8. En consecuencia, la inoculación con rizobacterias seleccionadas es un método adecuado que permite una inmovilización segura de metales en sedimentos costeros contaminados con el fin de evitar la dispersión de metales en el ambiente y su entrada en la cadena alimentaria a través de la resiliencia de *S. densiflora* al estrés metálico y su capacidad de captación de metal.

Referencias

Abbas SH, Ismail IM, Mostafa TM, Sulaymon AH. 2014. Biosorption of heavy metals: a review. *J Chem Sci Technol* 3: 74-102.

Abdel-Baki AS, Dkhil MA, Al-Quraishy S. 2011. Bioaccumulation of some heavy metals in tilapia fish relevant to their concentration in water and sediment of Wadi Hanifah, Saudi Arabia. *Afr J Biotechnol* 10: 2541–2547.

Adams GO, Fufeyin PT, Okoro SE, Ehinomen I. 2015. Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review. *Int J Environ Bioremediation Biodegradation* 3: 28-39.

Adriano DC, 2001. Zinc (capítulo 16). En: *Trace Elements in the Terrestrial Environment: Biogeochemistry, bioavailability and risks of metals*. Springer-Verlag, New York, USA. pp. 625-665.

Agarwal SK. 1998. *Environmental Biotechnology* (1st ed). APH Publishing Corporation, New Delhi, India. pp.267-289.

Agrawal S, Flora G, Bhatnagar P, Flora S. 2014. Comparative oxidative stress, metallothionein induction and organ toxicity following chronic exposure to arsenic, lead and mercury in rats. *Cell Mol Biol (Noisy-le-Grand, France)* 60:13.

Ahemad M, Kibret M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *J King Saud Univ Sci* 26: 1-20.

Ahsan N, Lee D, Lee S, Kang KY, Lee JJ, Kim PJ, Yoon H, Kim J, Lee B. 2007. Excess copper induced physiological and proteomic changes in germinating rice seeds. *Chemosphere* 67: 1182 –1193.

Ali H, Khan E, Sajad MA. 2013. Phytoremediation of heavy metals. Concepts and applications. *Chemosphere* 91: 869-881.

Alloway B, Ayres DC. 1997. *Chemical principles of environmental pollution*. CRC press.

Amils R, Fernández-Remolar D, Parro V, Rodríguez-Manfredi JA, Timmis K, Oggerin M, Sánchez-Román M, López FJ, Fernández JP, Puente F, Gómez-Ortiz D, Briones C, Gómez

F, Omoregie EO, García M, Rodríguez N, Sanz JL. 2013. Iberian pyrite belt subsurface life (IPBSL), a drilling project of biohydrometallurgical interest. *Adv Mater Res* 825:15-18.

Andrades-Moreno L, del Castillo I, Parra R, Doukkali B, Redondo-Gómez S, Pérez-Palacios P, Caviedes MA, Pajuelo E, Rodríguez-Llorente ID. 2014. Prospecting metal-resistant plant-growth promoting rhizobacteria for rhizoremediation of metal contaminated estuaries using *Spartina densiflora*. *Environ Sci Pollut Res* 21: 3713-3721.

Andresen E, Küpper H. 2013. Cadmium toxicity in plants. *Met Ions Life Sci* 11: 395-413.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 2014. Priority list of Hazardous Substances. <http://www.atsdr.cdc.gov/spl/>

Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol* 57: 233-266.

Bakker PA, Pieterse CM, van Loon LC. 2007. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* sp. *Phytopathology* 97:239–243.

Banerjee S, Datta S, Chattyopadhyay D, Sarkar P. 2011. Arsenic accumulating and transforming bacteria isolated from contaminated soil for potential use in bioremediation. *J Environ Sci Health* 46: 1736-1747.

Bang SW, Clark DS, Keasling JD. 2000. Engineering hydrogen sulfide production and cadmium removal by expression of the thiosulfate reductase gene (*phsABC*) from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in *Escherichia coli*. *App Environ Microbiol* 66: 3939-3944.

Barcelo J, Poschenrieder C. 2003. Phytoremediation: Principles and Perspectives. *Contributions to Science* 2: 333-334.

Bastida F, Zsolnay A, Hernandez T, Garcia C. 2008. Past, present and future of soil quality indices: a biological perspective. *Geoderma* 147:159-171.

- Benach J, Yasui Y, Martínez JM, Borrell C, Pasarin MI, Daponte A. 2004. The geography of the highest mortality areas in Spain: a striking cluster in the southwestern region of the country. *Occup Environ Med* 61: 280-281.
- Bermejo JS, Beltrán R, Ariza JG. 2003. Spatial variations of heavy metals contamination in sediments from Odiel river (Southwest Spain). *Environ Int* 29: 69-77.
- Bert V, Seuntjens P, Dejonghe W, Lacherez S, Thuy HT, Vandecasteele B. 2009. Phytoremediation as a management option for contaminated sediments in tidal marshes, flood control areas and dredged sediment landfill sites. *Environ Sci Pollut Res Int* 16: 745-764.
- Bhattacharjee H, Rosen BP. 2007. Arsenic metabolism in prokaryotic and eukaryotic microbes. En: *Molecular microbiology of heavy metals*. Springer Berlin Heidelberg. pp. 371-406.
- Bhattacharya P, Welch AH, Stollenwerk KG, McLaughlin MJ, Bundschuh J, Panaullah G. 2007. Arsenic in the environment: Biology and Chemistry. *Sci Total Environ* 379:109-120.
- Bhattacharyya PN, Jha DK. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol* 28:1327-1350.
- Billi D, Potts M. 2002. Life and death of dried prokaryotes. *Res Microbiol* 153:7-12.
- Biondo R, Almeida da Silva F, Vicente EJ, Souza JE, Guerrini-Schenberg AC. 2012. Synthetic phytochelatin surface display in *Cupriavidus metallidurans* CH34 for enhanced metals bioremediation. *Environ Sci Technol* 46: 8325-8332.
- Bodek I. 1988. *Environmental inorganic chemistry: properties, processes, and estimation methods*. Pergamon.
- Borremans B, Hobman JL, Provoost A, Brown NL, van Der Lelie D. 2001. Cloning and functional analysis of the *pbr* lead resistance determinant of *Ralstonia metallidurans* CH34. *J Bacteriol* 183: 5651-5658.

- Bortolus A, Laterra P, Iribarne O. 2004. Phenotypic plasticity in the sexual reproduction of *Spartina densiflora*: interactive effects of burrowing crabs and disturbance. *Estuarine Coastal Shelf Sci* 59: 97–107.
- Bortolus A, Schwindt E, Bouza P, Idaszkin Y. 2009. A Characterization of Patagonian Salt Marshes. *Wetlands* 29: 772-780.
- Bortolus A. 2005. Finding a lost world in the mythic Patagonia: setting physiographic and ecological baseline information of the austral salt marshes of South America. *Jornadas Argentinas de Botánica*. Rosario, Argentina.
- Bortolus A. 2006. The austral cordgrass *Spartina densiflora* Brong.: its taxonomy, biogeography and natural history. *Journal of Biogeography* 33: 158-168.
- Boucher O, Muckle G, Jacobson JL, Carter RC, Kaplan-Estrin M, Ayotte P, Jacobson S. W. 2014. Domain-specific effects of prenatal exposure to PCBs, mercury, and lead on infant cognition: results from the Environmental Contaminants and Child Development Study in Nunavik. *Environ Health Perspect* 122: 310.
- Boyd ES, Barkay T. 2012. The mercury resistance operon: from an origin in a geothermal environment to an efficient detoxification machine. *Front Microbiol* 3: 349.
- Boyer M, Wisniewski-Dyé F. 2009. Cell-cell signaling in bacteria: not simply a matter of *quorum*. *FEMS Microbiol Ecol* 70: 1 –19.
- Bradl H. 2002. *Heavy Metals in the Environment: Origin, Interaction and Remediation* Volume 6. Academic Press, London.
- Burd G, Dixon DG, Glick BR. 2000. Plant growth-promoting bacteria that decreases heavy metal toxicity in plants. *Can J Microbiol* 46: 237-245.
- Caçador I, Caetano M, Duarte B, Vale C. 2009. Stock and losses of trace metals from salt marsh plants. *Mar Environ Res* 67:75-82
- Callahan DL, Baker AJM, Kolev SD, Wedd AG. 2006. Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *J Biol Inorg Chem* 11: 2-12.

Cambrollé J, Mancilla-Leytón JM, Muñoz-Vallés S, Luque T, Figueroa ME. 2012. Zinc tolerance and accumulation in the salt-marsh shrub *Halimione portulacoides*. *Chemosphere* 86: 867-874.

Cambrollé J, Mateos-Naranjo, Redondo-Gómez S, Luque T, Figueroa ME. 2011. The role of two *Spartina* species in phytostabilization and bioaccumulation of Co, Cr, and Ni in the Tinto-Odiel estuary (SW Spain). *Hydrobiología* 671: 95-103.

Cambrollé J, Redondo-Gómez S, Mateos-Naranjo E, Figueroa ME. 2008. Comparison of the role of two *Spartina* species in terms of phytostabilization and bioaccumulation of metals in the estuarine sediment. *Mar Pollut Bull* 56: 2037-2042.

Campbell PG. 2007. Cadmium-a priority pollutant. *Environ Chem* 3: 387-388.

Cánovas D, Durán C, Rodríguez N, Amils R, De Lorenzo V. 2003. Testing the limits of biological tolerance to arsenic in a fungus isolated from the River Tinto. *Environ Microbiol* 5: 133-138.

Castagno LM, Estrella MJ, Sannazzaro AI, Grassano AE, Ruiz OA. 2011. Phosphate-solubilization mechanism and *in vitro* plant growth promotion activity mediated by *Pantoea eucalypti* isolated from *Lotus tenuis* rhizosphere in the Salado River Basin (Argentina). *J Appl Microbiol* 110:1151-1165.

Cervantes C, Espino-Saldaña AE, Acevedo-Aguilar F, León-Rodríguez IL, Rivera-Cano ME, Avila-Rodríguez M, Wróbel-Kaczmarczyk K, Wróbel-Zasada K, Gutiérrez-Corona JF, Rodríguez-Zavala JS, Moreno-Sánchez R. 2006. Interacciones microbianas con metales pesados. *Revista Iberoamericana de Microbiología* 48: 203-210.

Chaney RL. 1983. Plant uptake of inorganic waste constituents. En: *Land Treatment of Hazardous Wastes*. Noyes Data Corp, Park Ridge. pp 50-76.

Chen J, Chen Y, Liu W, Bai C, Liu X, Liu K, Huang, C. 2012. Developmental lead acetate exposure induces embryonic toxicity and memory deficit in adult zebrafish. *Neurotoxicol Terato* 34: 58 1-586.

Choudhary DK, Kasotia A, Jain S, Vaishnav A, Kumari S, Sharma KP, Varma A, 2016. Bacterial-mediated tolerance and resistance to plants under abiotic and biotic stresses. *J Plant Growth Regul* 35: 276-300.

Communication from the Commission to the Council, the European Parliament, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions - Thematic Strategy for Soil Protection.COM (2006) 231.

Corpas FJ, Barroso JB. 2014. Peroxynitrite (ONOO-) is endogenously produced in *Arabidopsis* peroxisomes and is overproduced under cadmium stress. *Ann Bot* mct260.

Couto T, Duarte B, Barroso D, Caçador I, Marques JC. 2013. Halophytes as sources of metals in estuarine systems with low levels of contamination. *Funct Plant Biol* 40:931-939.

Curado G, Rubio-Casal, AE, Figueroa E, Castillo JM. 2010. Germination and establishment of the invasive cordgrass *Spartina densiflora* in acidic and metal polluted sediments of the Tinto River. *Mar Pollut Bull* 60: 1842-1848.

Dalla Vecchia F, Pagliano C, Raviolo M, Gabbrielli R, Gonnelli C, Rascio N, Barbato R, La Rocca N. 2006. Evidence for PSII donor-side damage and photoinhibition induced by cadmium treatment on rice (*Oryza sativa L.*). *J Photochem Photobiol* 84: 70-78.

Dary M, Chamber-Pérez MA, Palomares AJ, Pajuelo E. 2010. “In situ” phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. *J Hazard Mater* 177: 323 –330.

Das N, Geetanjali-Basak LV, Salam JA, Abigail MEA. 2012. Application of biofilms on remediation of pollutants-an overview. *J Microbiol Biotechnol Res* 2: 783–790.

Das N. 2010. Recovery of precious metals through biosorption - a review. *Hydrometallurgy* 103: 180 –189.

Davies BE, Jones LHP, Wild A. 1988. Micronutrients and toxic elements. Russell's soil conditions and plant growth. (11th ed). 780-814.

De Lorenzo V. 2008. Systems biology approaches to bioremediation. *Curr Opin Biotechnol* 19:579–589.

De-Bashan LE, Hernandez JP, Bashan Y, 2012. The potential contribution of plant growth promoting bacteria to reduce environmental degradation: a comprehensive evaluation. *Appl Soil Ecol* 61: 171-189.

Del Castillo I, Ojeda J, Megías E, Manyani H, López-Baena FJ, Pérez-Montaña F, Bellogín RA, Espuny MR, Cubo MT, Ollero FJ, Megías M. 2015. Isolation of endophytic, epiphytic and rhizosphere plant growth-promoting bacteria from cultivated rice paddy soils of the Guadalquivir river marshes. *Global Adv Res J Agric Sci* 4: 127-136.

Dong MF, Feng RW, Wang RG, Sun Y, Ding YZ, Xu YM, Guo JK. 2016. Inoculation of Fe/Mn-oxidizing bacteria enhances Fe/Mn plaque formation and reduces Cd and As accumulation in Rice Plant tissues. *Plant Soil* 404: 75-83.

Dosnon-Olette R, Couderchet M, Oturan MA, Oturan N, Eullaffroy P. 2011. Potential use of *Lemna minor* for the phytoremediation of isoproturon and glyphosate. *Int J Phytorem* 13: 601-612.

Doyle MO, Otte ML. 1997. Organism-induced accumulation of iron, zinc and arsenic in wetland soils. *Environ Pollut* 96: 1-11.

Duarte B, Almeida PR, Caçador I. 2009. *Spartina maritima* (cordgrass) rhizosediment extracellular enzymatic activity and its role in organic matter decomposition processes and metal speciation. *Mar Ecol* 30: 65-73.

Duffus JH. Heavy metals-a meaningless term? 2002. *Pure Appl Chem* 74: 793-807.

Eid MA. 2011. Halophytic plants for phytoremediation of heavy metals contaminated soil. *J American Sci* 7: 377-382.

Elekes CC. 2014. Eco-Technological Solutions for the Remediation of Polluted Soil and Heavy Metal Recovery. En: Hernández-Soriano MC (Ed). *Environmental Risk Assessment of Soil Contamination*, InTech, Rijeka, 309-335.

El-Nekeety AA, El-Kady AA, Soliman MS, Hassan NS, Abdel-Wahhab MA. 2009. Protective effect of *Aquilegia vulgaris* (L.) against lead

acetate-induced oxidative stress in rats. *Food Chem Toxicol* 47: 2209-2215.

Environmental Protection Agency (EPA). <http://www.epa.gov>

Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. 2001. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Cur Top Med Chem* 1: 529-539.

Eriksson J, Andersson A, Andersson R. 1997. The state of Swedish farmlands. Tech Rep. 4778.

European Commission. 2012. The State of Soil in Europe – A contribution of the JRC to the European Environment Agency's State and Outlook Report – SOER 2010. Luxembourg: Publications Office of the European Union. Available at: http://ec.europa.eu/dgs/jrc/downloads/jrc_reference_report_2012_02_soil.pdf

European Environment Agency (EEA). 2007. Progress in management of contaminated sites (CSI 015). Copenhagen. Available at: www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/progress-in-management-ofcontaminated-sites/progress-in-management-of-contaminated-1

FAO (Food and Agriculture Organization in the United Nations). 2015. <http://www.fao.org/soils-2015/es/>.

Favas PJ, Pratas J, Varun M, D'Souza R, Paul MS. 2014. Phytoremediation of soils contaminated with metals and metalloids at mining areas: potential of native flora. En: Environmental risk assessment of soil contamination. Hernández-Soriano MC (Ed). 485-517.

Fergusson JE (Ed). 1990. *The Heavy Elements: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*. Pergamon Press. Oxford.

Fernandes C, Fontainhas-Fernandes A, Peixoto F, Salgado MA. 2007. Bioaccumulation of heavy metals in *Liza saliens* from the Esomriz-Paramos coastal lagoon, Portugal. *Ecotoxicol Environ Saf* 66:426-431.

Fernández-Caliani JC, Ruiz F, Galán E. 1997. Clay mineral and heavy metal distributions in the lower estuary of Huelva and adjacent Atlantic shelf, SW Spain. *Sci Total Environ* 198:181-200.

Festa RA, Thiele DJ. 2011. Copper: an essential metal in biology. *Current Bio* 21: 877-883.

Figuerola ME, Castillo JM, Redondo S, Luque T, Castellanos EM, Nieva FJ, Luque CJ, Rubio-Casal AE, Davy AJ. 2003. Facilitated invasion by hybridization of *Sarcocornia* species in a salt-marsh succession. *J Ecol* 91: 616-626.

Fresno T, Peñalosa JM, Santner J, Puschenreiter M, Prohaska T, Moreno-Jiménez E. 2016. Iron plaque formed under aerobic conditions efficiently immobilizes arsenic in *Lupinus albus* L. roots. *Environ Pollut* 216: 215-222.

Fulekar MH, Geetha M, Sharma J. 2009. Bioremediation of Trichloropyr Butoxyethyl Ester (TBEE) in bioreactor using adapted *Pseudomonas aeruginosa* in scale up process technique. *Biol & Med* 1: 1-6.

Gadd GM, Griffiths AJ. 1977. Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microb Ecol* 4: 303-317.

Gadd GM. 2004. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma* 122: 109-119.

Galán E, Gómez-Ariza JL, González I, Fernández-Caliani JC, Morales E, Giráldez I. 2003. Heavy metal partitioning in river sediments severely polluted by acid mine drainage in the Iberian Pyrite Belt. *Appl Geochem* 18: 409-421.

Gamalero E, Lingua G, Berta G, Glick BR. 2009. Beneficial role of plant growth promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on plant responses to heavy metal stress. *Can J Microbiol* 55: 501-514.

Gao Y, Ren L, Ling W, Gong S, Sun B, Zhang Y. 2010. Desorption of phenanthrene and pyrene in soils by root exudates. *Bioresource Technol* 101: 1159-1165.

- Gargouri M, Magné C, Dauvergne X, Ksouri R, El Feki A, Metges MAG, Talarmin H. 2013. Cytoprotective and antioxidant effects of the edible halophyte *Sarcocornia perennis* L. (swampfire) against lead-induced toxicity in renal cells. *Ecotox Environ Saf* 95: 44-51.
- Garza A, Vega R, Soto E. 2006. Cellular mechanisms of lead neurotoxicity. *Med Sci Monit* 12: 57-65.
- Ghosh M, Singh SP. 2005. A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of it's by products. *Asian J Energy Environ* 6: 18.
- Gill SS, Hasanuzzaman M, Nahar K, Macovei A, Tuteja N. 2013. Importance of nitric oxide in cadmium stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Bioch* 63: 254-261.
- Giusti L. 2009. A review of waste management practices and their impact on human health. *Waste Manag* 29: 2227-2239.
- Glick BR. 2003. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnol Adv* 21: 383-393.
- Glick BR. 2010. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnol Adv* 28: 367-374.
- Golding J, Steer CD, Hibbeln JR, Emmett PM, Lowery T, Jones R. 2013. Dietary predictors of maternal prenatal blood mercury levels in the ALSPAC birth cohort study. *Environ Health Perspect* 121:1214-1218.
- Gómez-Mercado F, Moral-Torres F, Jiménez-Luque E, de Haro-Lozano S. 2012. Salinity tolerance of the hygrophilous plant species in the wetlands of the south of the Iberian peninsula. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici* 40: 18-28.
- Greaney, KM. 2005. An assessment of heavy metal contamination in the marine sediments of Las Perlas Archipelago, Gulf of Panama. School of Life Sciences Heriot-Watt University, Edinburgh.
- Greenpeace, 2011. Boletín de prensa. <http://greenpeace.org/españa>

Guo H, Luo S, Chen L, Xiao X, Xi Q, Wei W, He Y. 2010. Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulaor endophytic bacterium *Bacillus* sp. L14. *Biores Technol*, 101: 8599-8605.

Gupta A, Whitton BA, Morby AP, Huckle JW, Robinson NJ. 1992. Amplification and rearrangement of a prokaryotic metallothionein locus *smt* in *Synechococcus* PCC 6301 selected for tolerance to cadmium. *Proc Royal Soc B Biol Sci* 248: 273-281.

Hall AH. 2002. Chronic arsenic poisoning. *Toxicol Lett* 128: 69-72.

Harrison JJ, Ceri H, Turner RJ. 2007. Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nat Rev Microbiol* 5: 928-938.

He ZL, Yang XE, Stoffella PJ. 2005. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *J Trace Elem Med Biol* 19: 125-140.

Hinsinger P, Gobran GR, Gregory PJ, Wenzel WW. 2005. Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New Phytol* 168: 293-303.

Hobman JL, Julian DJ, Brown NL. 2012. Cysteine coordination of Pb (II) is involved in the *PbrR* dependent activation of the lead resistance promoter, *PpbrA*, from *Cupriavidus metallidurans* CH34. *BMC Microbiol* 12: 109.

Hong Y, Liao D, Chen J, Khan S, Su J, Li H. 2015. A comprehensive study of the impact of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contamination on salt marsh plants *Spartina alterniflora*: implication for plant-microbe interactions in phytoremediation. *Environ Sci Pollut Res* 22: 7071-7081.

Hossain MA, Piyatida P, da Silva JAT, Fujita M. 2012. Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *J Bot*, 2012: Article ID 872875, 37 pages.

<http://rabida.uhu.es/dspace/bitstream/handle/10272/8544/La%20contaminacion%20de%20la%20Ria%20de%20Huelva.pdf?sequence=2>

Huber S, Prokop A. 2012. Progress in the management of contaminated sites. EIONET Workshop on Soil, Ispra, 10- 12 December 2012.

Idaszkin Y L, Lancelotti JL, Bouza PJ, Marcovecchio JE. 2015. Accumulation and distribution of trace metals within soils and the austral cordgrass *Spartina densiflora* in a Patagonian salt marsh. Mar Pollut Bull 101: 457-465.

Idaszkin YL, Bouza PJ, Marinho CH, Gil MN. 2014. Trace metal concentrations in *Spartina densiflora* and associated soil from a Patagonian salt marsh. Mar Pollut Bull 89: 444-450.

Iriarte A, Bouza P, Simón M, Aguilar J, Díez M, Mertín F, Sierra M. 2007. Contaminación por metales pesados y arsénico en los suelos de la Ría de Huelva. En: Bellinfante, N., Jordán, A. (Eds.), Tendencias Actuales de la Ciencia del Suelo. Universidad de Sevilla. 148-154. ISBN 978-84-690-4129-1

Iskandar IK, Adriano DC. 1997. Remediation of soils contaminated with metals: a review of current practices in the USA. I.K. Iskandar, D.C. Adriano (Eds.), Remediation of Soils Contaminated with Metals. Adv Environ Sci. Northwood, UK. 1-26.

Jadia CD, Fulekar MH. 2009. Phytoremediation of Heavy Metals: Recent Techniques. Afr J Biotechnol 8: 921-928.

Ji G, Silver S. 1992. Reduction of arsenate to arsenite by the ArsC protein of the arsenic resistance operon of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. Proc Nat Acad Sci 89: 9474-9478.

Jomova K, Valko M. 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. Toxicol 283: 65-87.

Junta de Andalucía. Consejería de Medioambiente. 1999. Los criterios y estándares para declarar un suelo contaminado en Andalucía y la metodología y técnicas de toma de muestra y análisis para su investigación.

http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/web/Bloques_Tematicos/Estado_Y_Calidad_De_Los_Recursos_Naturales/Suelo/Criterios_pdf/Elementos.pdf

Kabir E, Ray S, Kim KH, Yoon HO, Jeon EC, Kim, YS, Brown RJC. 2012. Current status of trace metal pollution in soils affected by industrial activities. *Scientific World J.* 2012: 916705.

Kalia K, Sharma K, Singh HP, Singh B. 2008. Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of *Potentilla atrosanguinea* Lodd. and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC. *J Agric Food Chem* 56: 10129-10134.

Kamika I, Momba MN. 2013. Assessing the resistance and bioremediation ability of selected bacterial and protozoan species to heavy metals in metal-rich industrial wastewater. *BMC Microbiology* 13: 1.

Khan AG. 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *J of Trace Elem Med Biol* 18: 355-364.

Khan MS, Zaidi A, Wani PA, Oves M. 2009. Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. *Environ chem lett* 7: 1-19.

Khan N, Seshadri B, Bolan N, Saint C P, Kirkham MB, Chowdhury S, Qi F. 2016. Root Iron Plaque on Wetland Plants as a Dynamic Pool of Nutrients and Contaminants. *Adv Agron* (in press) doi: 10.1016/bs.agron.2016.04.002

Khan S, Cao Q, Zheng YM, Huang YZ, Zhu YG. 2008. Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China. *Environ Pollut* 152: 686-692.

Kirchmann H, Thorvaldsson G. 2000. Challenging targets for future agriculture. *Eur J Agron* 12:145-161.

Kjær C, Pedersen MB, Elmegaard N. 1998. Effects of soil copper on black bindweed (*Fallopia convolvulus*) in the laboratory and in the field. *Arch Environ Contam Toxicol* 35: 14-19.

- Kobayashi E, Suwazono Y, Dochi M, Honda R, Kido T. 2009. Influence of consumption of cadmium-polluted rice or Jinzu River water on occurrence of renal tubular dysfunction and/or Itai-itai disease. *Biol Trace Elem Res* 127: 257-268.
- Koch I, Nearing MM. 2016. A barrier to metal movement: Synchrotron study of iron plaque on roots of wetland plants. *J Environ Sci* 44: 1-3.
- Krämer U. 2010. Metal Hyperaccumulation in Plants. *Ann Rev Plant Biol* 61: 517-534.
- Kucera B, Cohn MA, Leubner-Metzger G. 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Sci Res* 15: 281-307.
- Kuiper I, Legendijk EL, Bloemberg GV, Lugtenberg BJ. 2004. Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. *Mol Plant Microb Interac* 17: 6-15.
- Lafuente A, Pérez-Palacios P, Doukkali B, Molina-Sánchez MD, Jiménez-Zurdo JI, Caviedes MA, Rodríguez-Llorente ID, Pajuelo E. 2015. Unraveling the effect of arsenic on the model *Medicago-Ensifer* interaction: a transcriptomic meta-analysis. *New Phytol* 205: 255-272.
- Lakshmanan V, Shantharaj D, Li G, Seyfferth AL, Sherrier DJ, Bais HP. 2015. A natural rice rhizospheric bacterium abates arsenic accumulation in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* 242: 1037-1050.
- Lasat MM. 2000. Phytoextraction of metals from contaminated soil: A review of plant/soil/metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues. *J Haz Subs Res* 5: 1-25.
- Leblanc M, Morales JA, Borrego J, Elbaz-Poulichet E. 2000. A 4,500-year-old mining pollution in Southwestern Spain: long-term implications for modern mining pollution. *Econom Geol* 95: 655-662.
- Leung M, Bioremediation: techniques for cleaning up a mess. 2004. *J Biotechnol* 2: 18-22.
- Li R, Zhou Z, Zhang Y, Xie X, Li Y, Shen X. 2015. Uptake and Accumulation Characteristics of Arsenic and Iron Plaque in Rice at Different Growth Stages. *Commun Soil Sci Plant Anal* 46: 2509-2522.

- Li XD, Thornton I. 2001. Chemical partitioning of trace and major elements in soils contaminated by mining and smelting activities. *Appl Geochem* 16: 1693-1706.
- Liu DY, Li Y, Chu L. 2005. Study of the tolerance of *Hippochaete ramosissimum* to Cu stress. *Sci China Ser C Life Sci* 48: 150-155.
- Liu J, Diamond J. 2005. China's environment in a globalizing world. *Nature* 435:1179-1186.
- López-González N, Borrego-Flores J, Carro-Flores B. 2008. La contaminación de la Ría de Huelva. Universidad de Huelva.
- Lu K, Ryan PA, Schlieper KA, Graffam M E, Levine S, Wishnok JS, Fox JG. 2014. Arsenic exposure perturbs the gut microbiome and its metabolic profile in mice: an integrated metagenomics and metabolomics analysis. *Environ Health Perspect* 122: 284.
- Lugtenberg B, Kamilova F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Ann Rev Microbiol* 63: 541-56.
- Lugtenberg BJ, Dekkers L, Bloemberg GV. 2001. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annu Rev Phytopathol* 39: 461-490.
- Magnani D, Solioz M. 2007. How bacteria handle copper. In: *Molecular microbiology of heavy metals*. Springer Berlin Heidelberg. 259-285
- Mahmood S, Hussain A, Saeed Z, Athar M. 2005. Germination and seedling growth of corn (*Zea mays* L.) under varying levels of copper and zinc. *Int J Environ Sci Technol* 2: 269-274.
- Mandal A, Purakayastha TJ, Patra AK, Sanyal SK. 2012. Phytoremediation of arsenic contaminated soil by *Pteris vittata* L. II. Effect on arsenic uptake and rice yield. *Int J Phytorem* 14: 621-628.
- Marrero J, Auling G, Coto O, Nies DH. 2007. High level resistance to cobalt and nickel but probably no transenvelope efflux: Metal resistance in the Cuban *Serratia marcescens* strain C-1. *Microb Ecol* 53: 123-133.

Martínez CE, Motto HL. 2000. Solubility of lead, zinc and copper added to mineral soils. *Environ pollut* 107: 153-158.

Mateos LM, Ordóñez E, Letek M, Gil JA. 2010. *Corynebacterium glutamicum* as a model bacterium for the bioremediation of arsenic. *Int Microbiol* 9: 207-215.

Mateos-Naranjo E, Andrades-Moreno L, Redondo-Gómez S. 2011. Comparison of germination, growth, photosynthetic responses and metal uptake between three populations of *Spartina densiflora* under different soil pollution conditions. *Ecotoxicol Environ Saf* 74: 2040-2049.

Mateos-Naranjo E, Gallé A, Flórez-Sarasa I, Perdomo JA, Galmés J, Ribas-Carbó M, Flexas J. 2015a. Assessment of the role of silicon in the Cu-tolerance of the C4 grass *Spartina densiflora*. *J Plant Physiol* 178: 74-83.

Mateos-Naranjo E, Mesa J, Pajuelo E, Pérez-Martín A, Caviedes MA, Rodríguez-Llorente. 2015b. Deciphering the role of plant growth-promoting rhizobacteria in the tolerance of the invasive cordgrass *Spartina densiflora* to physicochemical properties of salt-marsh soils. *Plant Soil* 394: 45-55.

Mateos-Naranjo E, Redondo-Gómez S, Luque CJ, Castellanos EM, Davy AJ, Figueroa ME. 2008a. Environmental limitations recruitment from seed in invasive *Spartina densiflora* on a southern European salt marsh. *Estuar Coast Shelf Sci* 79: 727-732.

Mateos-Naranjo E, Redondo-Gómez S, Cambrollé J, Figueroa ME. 2008b. Growth and photosynthetic responses to copper stress of an invasive cordgrass, *Spartina densiflora*. *Mar Environ Res* 66: 459-465.

Mateos-Naranjo E, Redondo-Gómez S, Cambrollé J, Luque T, Figueroa ME. 2008c. Growth and photosynthetic responses to zinc stress of an invasive cordgrass, *Spartina densiflora*. *Plant Biol* 10: 754-762.

Meagher RB, Heaton AC. 2005. Strategies for the engineered phytoremediation of toxic element pollution: mercury and arsenic. *J Ind Microbiol Biotechnol* 32: 502-513.

Mendez MO, Maier RM. 2008. Phytostabilization of mine tailings in arid and semiarid environments: an emerging remediation technology. *Environ Health Perspect* 116: 278.

Meng XY, Qin J, Wang LH, Duan GL, Sun GX, Wu HL, Chu CC, Ling HQ, Rosen BP, Zhu YG. 2011. Arsenic biotransformation and volatilization in transgenic rice. *New Phytol* 191: 49-56.

Mesa J, Mateos-Naranjo E, Caviedes MA, Redondo-Gómez S, Pajuelo E, Rodríguez-Llorente ID. 2015a. Scouting contaminated estuaries: heavy metal resistant and plant growth promoting rhizobacteria in the native metal rhizoaccumulator *Spartina maritima*. *Mar Pollut Bull* 90: 150-159.

Mesa J, Mateos-Naranjo E, Caviedes MA, Redondo-Gómez S, Pajuelo E, Rodríguez-Llorente ID. 2015b. Endophytic cultivable bacteria of the metal bioaccumulator *Spartina maritima* improve plant growth but not metal uptake in polluted marshes soils. *Front Microbiol* 6.

Mesa J, Rodríguez-Llorente ID, Pajuelo E, Piedras JMB, Caviedes MA, Redondo-Gómez S, Mateos-Naranjo E. 2015c. Moving closer towards restoration of contaminated estuaries: Bioaugmentation with autochthonous rhizobacteria improves metal rhizoaccumulation in native *Spartina maritima*. *J Hazard Mater* 300: 263-271.

Miransari M, Smith DL, 2014. Plant hormones and seed germination. *Environ Exp Bot* 99: 110-121.

Montinaro S, Concas A, Pisu M, Cao G. 2012. Remediation of Heavy Metals Contaminated Soils by Ball Milling. *Chem Eng Trans* 28: 187-192.

Moosavi SG, Seghatoleslami MJ. 2013. Phytoremediation: A Review. *Adv Agric Biol* 1: 5-11

Moreno-Jiménez E, Esteban E, Peñalosa JM. 2012. The fate of arsenic in soil-plant systems. In: *Reviews of environmental contamination and toxicology*. Springer, New York. 1-37.

Morillo J, Usero J, Rojas R. 2008. Fractionation of metals and as in sediments from a biosphere reserve (Odiel salt marshes) affected by acidic mine drainage. *Environ Monit Assess* 139: 329-337.

Mudgal V, Madaan N, Mudgal A. 2010. Heavy Metals in Plants: Phytoremediation: Plants Used to Remediate Heavy Metal Pollution. *Agric Biol J North America* 1: 40-46.

Nadeem SM, Naveed M, Ahmad M, Zahir ZA. 2015. Rhizosphere bacteria for crop production and improvement of stress tolerance: mechanisms of action, applications, and future prospects. In: *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets*. Springer, India. 1-36

Nagajyoti PC, Lee KD, Sreekanth TVM. 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ Chem Lett* 8: 199-216.

Nannipieri P, Giagnoni L, Landi L, Renella G. 2011. Role of phosphatase enzymes in soil. In: *Phosphorus in action*. Springer Berlin Heidelberg. 215-243.

Navarro CA, Orellana LH, Mauriaca C , Jerez CA. 2009. Transcriptional and functional studies of *Acidithiobacillus ferrooxidans* genes related to survival in the presence of copper. *Appl Environ Microbiol* 75: 6102-6109.

Navarro-Torre S, Barcia-Piedras JM, Mateos-Naranjo E, Redondo-Gómez S, Camacho M, Caviedes MA, Pajuelo E, Rodríguez-Llorente ID. 2016a. Assessing the role of endophytic bacteria in the halophyte *Arthrocnemum macrostachyum* salt tolerance. *Plant Biology*. Doi: 10.1111/plb.12521

Navarro-Torre S, Mateos-Naranjo E, Caviedes MA, Pajuelo E, Rodríguez-Llorente ID. 2016b. Isolation of plant-growth-promoting and metal-resistant cultivable bacteria from *Arthrocnemum macrostachyum* in the Odiel marshes with potential use in phytoremediation. *Mar Pollut Bull* 110: 133-142.

Neamțu S, Cocârță DM, Reșetar-Deac AM, Adrian B. 2012. Environmental assessment of PCB's occurrence in soil due to industrial pollution: a case study in correlation with the legal limits in force in Romania and European provisions. *Analele Universității din Craiova, seria Agricultură – Montanologie – Cadastru* 42: 405-414.

Nelson CH, Lamothe PJ. 1993. Heavy metal anomalies in the Tinto and Odiel river and estuary system, Spain. *Estuaries* 16: 496-511.

Nies DH, Silver S (Eds.). 2007. *Molecular microbiology of heavy metals* (Vol. 6). Springer Science & Business Media.

Nies DH. 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 27: 313-339.

Nieto JM, Sarmiento AM, Olías M, Cánovas CR, Riba I, Kalman J, Delvalls TA. 2007. Acid mine drainage pollution in the Tinto and Odiel rivers (Iberian Pyrite Belt, SW Spain) and bioavailability of the transported metals to the Huelva estuary. *Environ Int* 33: 445-455.

Nieva FJJ, Diaz-Espejo A, Castellanos EM, Figueroa E. 2001. Field variability of invading populations of *Spartina densiflora* Brong. in different habitats of the Odiel marshes (SW Spain). *Estuarine, Coastal Shelf Sci* 52: 515-527.

Nieva FJJ, Eloy M, Castellanos EM, Castillo JM, Figueroa ME. 2005. Clonal growth and tiller demography of the invader cordgrass *Spartina densiflora* Brongn. at two contrasting habitats in SW European salt marshes. *Wetlands* 25: 122-129.

Nucifora G, Chu L, Misra TK, Silver S. 1989. Cadmium resistance from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258 *cadA* gene results from a cadmium-efflux ATPase. *Proc Nat Acad Sci. USA* 86: 3544-3548.

Oremland RS, Stolz JF. 2003. The ecology of arsenic. *Science* 300: 939-944.

Pajuelo E, Rodríguez-Llorente ID, Lafuente A, Caviedes MA. 2011. Legume–Rhizobium symbioses as a tool for bioremediation of heavy metal polluted soils. In *Biomanagement of metal-contaminated soils*. Springer Netherlands. 95-123.

Pajuelo E, Rodríguez-Llorente ID, Lafuente A, Pérez-Palacios P, Doukkali B, Caviedes M A. 2014. Engineering the rhizosphere for the purpose of bioremediation: an overview. *CAB Reviews* 9: 1.

Paredes-Páliz KI, Caviedes MA, Doukkali B, Mateos-Naranjo E, Rodríguez-Llorente ID, Pajuelo E. 2016a. Screening beneficial rhizobacteria from *Spartina maritima* for phytoremediation of metal polluted salt marshes: comparison of gram-positive and gram-negative strains. *Environ Sci Pollut Res* 23: 19825-19837.

Paredes-Páliz KI, Pajuelo E, Doukkali B, Caviedes MA, Rodríguez-Llorente ID, Mateos-Naranjo E. 2016b. Bacterial inoculants for enhanced seed germination of *Spartina densiflora*: Implications for restoration of metal polluted areas. *Mar Pollut Bull* 110: 396-400.

Parfentjev IA, Catelli AR. 1964. Tolerance of *Staphylococcus aureus* to sodium chloride. *J Bacteriol* 88: 1-3.

Park JH, Bolan N, Megharaj M, Naidu R. 2011. Isolation of phosphate solubilizing bacteria and their potential for lead immobilization in soil. *J Hazard Mater* 185: 829-836.

Patel PC, Goulhen F, Boothman C, Gault AG, Charnock JM, Kalia K, Lloyd JR. 2007. Arsenate detoxification in a *Pseudomonas* hypertolerant to arsenic. *Arch Microbiol* 187: 171-183.

Patra M, Sharma A. 2000. Mercury toxicity in plants. *Bot Rev* 66: 379-422.

Patrick L. 2006. Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Altern Med Rev* 11: 114-127.

Paz-Ferreiro J, Lu H, Fu S, Mendez A, Gasco G. 2014. Use of Phytoremediation and Biochar to Remediate Heavy Metal Polluted Soils: A Review. *Solid Earth* 5: 65-75.

Peijnenburg WJGM, Jager T. 2003. Monitoring Approaches to Assess Bioaccessibility and Bioavailability of Metals: Matrix Issues. *Ecotoxicol Environ Saf* 56: 63-77.

Peñarrubia L, Andrés-Colás N, Moreno J, Puig S. 2010. Regulation of copper transport in *Arabidopsis thaliana*: a biochemical oscillator. *J Biol Inorg Chem* 15: 29-36.

Peng JF, Song YH, Yuan P, Cui XY, Qiu GL. 2009. The remediation of heavy metals contaminated sediment. *J Haz Mat* 161: 633-640.

Phielers R, Voit A, Kothe E. 2013. Microbially supported phytoremediation of heavy metal contaminated soils: strategies and applications. In: *Geobiotechnology I*. Springer Berlin Heidelberg. 211-235

Pilon-Smits E. 2005. Phytoremediation. *Ann Rev Plant Biol* 56: 15-39.

Pilon-Smits EAH, LeDuc DL. 2009. Phytoremediation of selenium using transgenic plants. *Curr Opin Biotechnol* 20: 207-212.

Potts M. 1994. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol Rev* 58: 755-805.

Prajapati SK, Meravi N. 2014. Heavy metal speciation of soil and *Calotropis procera* from thermal power plant area. *Proc Int Acad Ecol Environ Sci* 4: 68-71.

Prasad MNV. 1995. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environ Exp Bot* 35: 525-545.

Prasad MNV. 2004. Phytoremediation of metals and radionuclides in the environment: the case for natural hyperaccumulators, metal transporters, soil-amending chelators and transgenic plants. In: Prasad MNV. (ed.) *Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems*, (2nd Edition). Springer Berlin. 345-391.

Rajkumar M, Sandhya S, Prasad MNV, Freitas H, 2012. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnol Adv* 30: 1562-1574.

Raju KV, Somashekar RK, Prakash KL. 2013. Spatio-temporal variation of heavy metals in Cauvery River basin. *Proc Int Acad Ecol Environ Sci* 3: 59-75.

Rascio N, Navari-Izzo F. 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Sci* 180: 169-181.

Read DB, Bengough AG, Gregory PJ, Crawford JW, Robinson D, Scrimgeour CM, Zhang, X. 2003. Plant roots release phospholipid surfactants that modify the physical and chemical properties of soil. *New Phytol* 157: 315-326.

Reboreda R, Caçador I, Pedro S, Raposo-Almeida P. 2008. Mobility of metals in salt marsh sediments colonised by *Spartina maritima* (Tagus estuary, Portugal). *Hydrobiologia* 606: 129-137.

Redondo-Gómez S, Andrades-Moreno L, Mateos-Naranjo E, Parra R, Valera-Burgos J, Aroca R. 2011. Synergic effect of salinity and zinc stress on growth and photosynthetic responses of the cordgrass, *Spartina densiflora*. *J Exp Bot* 62: 5521-5530.

Redondo-Gómez S. 2013. Bioaccumulation of heavy metals in *Spartina*. *Funct Plant Biol* 40: 913-921.

Registro Estatal de Emisiones y Fuentes Contaminantes de España. <http://www.prtr.es>

Rensing C, Mitra B. 2007. Zinc, cadmium, and lead resistance and homeostasis. In: *Molecular microbiology of heavy metals*. Springer Berlin Heidelberg. 321-341.

Rodríguez-Llorente ID, Dary M, Gamane D, El Hamdaoui A, Doukkali B, Lafuente A, Delgadillo J, Caviedes MA, Pajuelo E, 2010. Cadmium biosorption properties of the metal resistant *Ochrobactrum cytisi* Azn6.2. *Eng Life Sci* 10: 49-56.

Rosen BP. 2002. Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS letters* 529: 86-92.

Ruiz F. 2001. Trace metals in estuarine sediments of southwestern Spain. *Mar Pollut Bull* 42: 481-489.

Saha P, Banerjee A, Sarkar S. 2015. Phytoremediation Potential of Duckweed (*Lemna minor* L.) On Steel Wastewater. *Int J of phytoremediation* 17: 589-596.

Sáinz A, Ruiz F. 2006. Influence of the very polluted inputs of the Tinto-Odiel system on the adjacent littoral sediments of south-western Spain: a statistical approach. *Chemosphere* 62: 1612–1622.

Salomons W, Stigliani W. (Eds.). 2012. *Biogeodynamics of pollutants in soils and sediments: risk assessment of delayed and non-linear responses*. Springer Science and Business Media.

Santos-Echeandía J, Vale C, Caetano M, Pereira P, Prego R. 2010. Effect of tidal flooding on metal distribution in pore waters of marsh sediments and its transport to water column (Tagus Estuary, Portugal). *Mar Environ Res* 70: 358-367.

Santoyo G, Orozco-Mosqueda MDC, Govindappa M. 2012. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Sci Tech* 22: 855-872.

Sarma, H. 2011. Metal hyperaccumulation in plants: a review focusing on phytoremediation technology. *J Environ Sci Tech* 4: 118-138.

Sayadi MH, Rezaei MR. 2014. Impact of land use on the distribution of toxic metals in surface soils in Birjand city, Iran. *Proc Int Acad Ecol Environ Sci* 4: 18-29.

Science for Environment Policy. 2012. European Commission DG Environment News Alert Service, edited by SCU, The University of the West of England, Bristol. DG ENV News Alert Issue 288, 15 June 2012. Raising the profile of soil's essential contribution to society. <http://ec.europa.eu/environment/integration/research/newsalert/pdf/288na2.pdf>

Scragg A. 2006. *Environmental Biotechnology*, (2nd Edition). Oxford University Press. Oxford, UK.

Semple KT, Reid BJ, Fermor TR. 2001. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environ Pollut* 112: 269-283.

Sergeeva E, Hirkala DL, Nelson LM. 2007. Production of indole-3-acetic acid, aromatic amino acid aminotransferase activities and plant growth promotion by *Pantoea agglomerans* rhizosphere isolates. *Plant Soil* 297:1-13.

Sethy SK, Ghosh S. 2013. Effect of heavy metals on germination of seeds. *J Nat Sci Biol Med* 4: 272-275.

Sgherri C, Cosi E, Navari-Izzo F. 2003. Phenols and antioxidative status of *Raphanus sativus* grown in copper excess. *Physiol Plant* 118: 21-28.

- Shallari S, Schwartz C, Hasko A, Morel JL. 1998. Heavy metals in soils and plants of serpentine and industrial sites of Albania. *Sci Total Environ* 209:133-142.
- Shao D, Kang Y, Wu S, Wong MH. 2012. Effects of sulfate reducing bacteria and sulfate concentrations on mercury methylation in freshwater sediments. *Sci Total Environ* 424: 331-336.
- Sharma A, Singh P, Kumar S, Kashyap PL, Srivastava AK, Chakdar H, Sharma AK. 2015. Deciphering diversity of salt-tolerant bacilli from saline soils of eastern Indo-gangetic plains of India. *Geomicrobiol J* 32:170-180.
- Sharma S S, Dietz KJ. 2009. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends Plant Sci* 14: 43-50.
- Sharma S. 2012. Bioremediation: features, strategies and applications. *Asian J Pharm Life Sci* 2231, 4423.
- Shu K, Liu XD, Xie Q, He ZH. 2016. Two faces of one seed: hormonal regulation of dormancy and germination. *Mol Plant* 9: 34-45.
- Shukla KP, Sharma S, Singh N K, Singh V, Tiwari K, Singh S. 2011. Nature and role of root exudates: efficacy in bioremediation. *African J Biotech* 10: 9717-9724.
- Singh B, Satyanarayana T. 2011. Microbial phytases in phosphorus acquisition and plant growth promotion. *Physiol Mol Biol Plants* 17: 93-103.
- Singh R. 2014. Microorganism as a tool of bioremediation technology for cleaning environment: A review. *Proc Int Acad Ecol Environ Sci* 4: 1.
- Smith LA, Brauning SE. 1995. Remedial options for metals-contaminated sites. Boca Raton: CRC Press.
- Soliman NF, Nasr SM, Okbah AA. 2015. Potential ecological risk of heavy metals in sediments from the Mediterranean coast, Egypt. *J Environ Health Sci Eng* 13:70.

Spaepen S, Vanderleyden J. 2011. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: 001438.

Spector JT, Navas-Acien A, Fadrowski J, Guallar E, Jaar B, Weaver VM. 2011. Associations of blood lead with estimated glomerular filtration rate using MDRD, CKD-EPI and serum cystatin C-based equations. *Nephrol Dial Transpl* 26: 2786-92.

Srinath T, Verma T, Ramteke PW, Garg SK. 2002. Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. *Chemosphere* 48: 427-435.

Srivastava S, Verma PC, Chaudhry V, Singh N, Abhilash PC, Kumar KV, Sharma N, Singh N. 2012. Influence of inoculation of arsenic-resistant *Staphylococcus arlettae* on growth and arsenic uptake in *Brassica juncea* (L.) Czern. Var. R-46. *J Haz Mat* 262: 1039-1047.

Street RA, Kulkarni MG, Stirk WA, Southway C, Van Staden J. 2007. Toxicity of metal elements on germination and seedling growth of widely used medicinal plants belonging to *Hyacinthaceae*. *Bull Environ Contam Toxicol* 79: 371-376.

Su J, Ouyang W, Hong Y, Liao D, Khan S, Li H. 2016. Responses of endophytic and rhizospheric bacterial communities of salt marsh plant (*Spartina alterniflora*) to polycyclic aromatic hydrocarbons contamination. *J Soils Sediments* 16: 707-715.

Subhashini V, Swamy AVVS. 2013. Phytoremediation of Pb and Ni Contaminated Soils Using *Catharanthus roseus* (L.). *Univ J Environ Res Technol* 3: 465-472.

Teng Y, Wang X, Li L, Li Z, Luo Y. 2015. Rhizobia and their bio-partners as novel drivers for functional remediation in contaminated soils. *Front Plant Sci* 6: 32.

Theofanis ZU, Astrid S, Lidia G, Calmano WG. 2001. Contaminants in sediments: remobilisation and demobilization. *Sci Total Environ* 266: 195-202.

Tripathi RD, Tripathi P, Dwivedi S, Dubey S, Chakrabarty D. 2012. Arsenomics: omics of arsenic metabolism in plants. *Front Physiol* 3: 275.

Ullah A, Heng S, Munis MFH, Fahad S, Yang X. 2015. Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: a review. *Environ Exp Bot* 117: 28-40.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). 2001. *Brownfields Technology Primer: Selecting and Using Phytoremediation for Site Cleanup*. Washington DC, 46.

USDHHS, Toxicological profile for lead. 1999. United States Department of Health and Human Services, Atlanta, Ga, USA.

Valls M, Atrian S, Lorenzo V, Fernández LA, 2000. Engineering a mouse metallothionein on the cell surface of *Ralstonia eutropha* CH34 for immobilization of heavy metals in soil. *Nat Biotechnol* 18: 661-665.

Vamerali T, Bandiera M, Mosca G. 2010. Field Crops for Phytoremediation of Metal-Contaminated Land: A Review. *Environ Chem Lett* 8: 1-7.

Van Aken B. 2008. Transgenic plants for phytoremediation: helping nature to clean up environmental pollution. *Trends Biotechnol* 26: 225-227.

Van Commodities Inc (VCI), Copper history/Future. 2011. <http://trademetal futures.com/copperhistory.html>.

Van der Ent A, Baker AJM, Reeves RD, Pollard AJ, Schat H. 2013. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: Facts and fiction. *Plant Soil* 362: 319-334.

Vangronsveld J, Cunningham S. 1999. *Metal-contaminated soils: in-situ inactivation and phytoremediation*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 265 p.

Wang J, Chen C. 2009. Biosorbents for heavy metal removal and their future. *Biotechnol Adv* 27: 195-226.

Watanabe T, Osaki M. 2002. Role of organic acids in aluminium accumulation and plant growth in *Melastoma malabathricum*. *Tree Physiol* 22: 785-792.

- Watson W A, Litovitz TL, Belson MG, Wolkin ABF, Patel M, Schier JG, Rubin C. 2005. The Toxic Exposure Surveillance System (TESS): risk assessment and real-time toxicovigilance across United States poison centers. *Toxicol Appl Pharm* 207: 604-610.
- Weggler K, McLaughlin MJ, Graham RD. 2004. Effect of chloride in soil solution on the plant availability of biosolid-borne cadmium. *J Environ Quality* 33: 496-504.
- Wuana RA, Okieimen FE. 2011. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *ISRN Ecology* 2011: Article ID 402647, 20 pages.
- Xia P, Meng X, Yin P, Cao Z, Wang X. 2011. Eighty-year sedimentary record of heavy metal inputs in the intertidal sediments from the Nanliu River estuary, Beibu Gulf of South China Sea. *Environ Pollut* 59: 92-99.
- Xiong ZT, Wang H. 2005. Copper toxicity and bioaccumulation in Chinese cabbage (*Brassica pekinensis* Rupr.). *Environ Toxicol* 20: 188-194.
- Yang J, Kloepper JW, Ryu C. 2008. Rhizosphere bacteria help plants to tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci* 14: 1-4.
- Yang J, Rawat S, Stemmler TL, Rosen BP. 2010. Arsenic binding and transfer by the ArsD As(III) metallochaperone. *Biochem* 49: 3658-3666.
- Yang JX, Guo QJ, Yang J, Zhou XY, Ren HY, Zhang HZ, Wei RF. 2016. Red mud (RM)-Induced enhancement of iron plaque formation reduces arsenic and metal accumulation in two wetland plant species. *Int J Phytoremediation* 18: 269-277.
- Yruela I. 2005. Copper in plants. *Brazilian J Plant Physiol* 17: 145-156.
- Zhang H, Zheng LC, Yi XY. 2009. Remediation of soil co-contaminated with pyrene and cadmium by growing maize (*Zea mays* L.). *Int J Environ Sci Tech* 6: 249-258.
- Zhang J, Cao H, Zhang Y, Zhang Y, Ma J, Wang J, Chu L. 2013. Nephroprotective effect of calcium channel blockers against toxicity of lead exposure in mice. *Toxicol Lett* 218: 273-280

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

Zojaji F, Hassani AH, Sayadi MH. 2014. Bioaccumulation of chromium by *Zea mays* in wastewater-irrigated soil: An experimental study. *Proc Int Acad Ecol Environ Sci* 4: 62-67