



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA

**INTERACCIÓN SIMBIÓTICA *Rhizobium*-LEGUMINOSAS
ARBÓREAS EN SISTEMAS CONTAMINADOS CON
HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS**

CARLOS LÓPEZ ORTIZ

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2011

La presente tesis titulada: **Interacción simbiótica *Rhizobium*-leguminosas arbóreas en sistemas contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos**, realizada por el alumno: **Carlos López Ortiz**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
EDAFOLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. RONALD FERRERA-CERRATO

ASESOR:



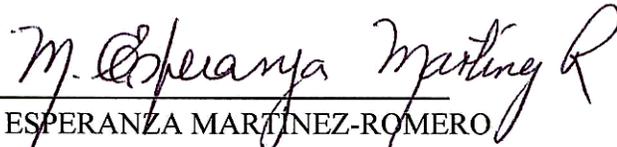
DR. ALEJANDRO ALARCÓN

ASESOR:



DR. JUAN JOSÉ ALMARAZ SUÁREZ

ASESORA:



DRA. ESPERANZA MARTÍNEZ-ROMERO

ASESORA:



DRA. MA. REMEDIOS MENDOZA LÓPEZ



La presente tesis “**Interacción simbiótica *Rhizobium*-leguminosas arbóreas en sistemas contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos**, forma parte del Proyecto: **SEP-CONACYT 79456 “Simbiosis tripartita *Rhizobium*-leguminosa-micorriza arbuscular y su respuesta a los hidrocarburos del petróleo”**. Carlos López Ortiz agradece al CONACYT el apoyo brindado durante sus estudios de postgrado.

INTERACCIÓN SIMBIÓTICA *Rhizobium*-LEGUMINOSAS ARBÓREAS EN SISTEMAS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

Carlos López Ortiz, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2011

RESUMEN

En este estudio se evaluó el establecimiento de la simbiosis entre *Rhizobium tropici* CIAT899 y las leguminosas arbóreas *Leucaena leucocephala* (Lam.) y *Acaciella angustissima* (Mill.) en sistemas contaminados con naftaleno (NAF) y fenantreno (FEN), y contempló dos fases experimentales. En la primera fase se evaluó el efecto de NAF y FEN en la dinámica de formación de nódulos, así como la respuesta de la planta en el contenido de compuestos fenólicos totales, actividad antioxidante total y contenido total de clorofilas y carotenos. En la segunda fase se evaluó la degradación de 60 mg FEN kg⁻¹ de arena, así como la actividad de la enzima nitrogenasa en las rizosfera de las plantas. La contaminación con NAF y/o FEN tuvo efectos tóxicos para la formación de nódulos en ambas especies vegetales. Sin embargo, mientras que *Leucaena* fue más susceptible al NAF, *Acaciella* fue ligeramente más susceptible a la contaminación por FEN. Además, para ambas especies, las plantas expuestas a 20 mg FEN L⁻¹ no mostraron inhibición en la formación de nódulos. La simbiosis con *Rhizobium*, incrementó el peso seco total hasta 150% en el caso de *Leucaena*, y 100% en el caso de *Acaciella*. Para ambas especies, el contenido de compuestos fenólicos totales en hojas fue significativamente mayor en los tratamientos no inoculados en comparación con los tratamientos inoculados con *Rhizobium*, y significativamente mayor en las plantas expuestas a FEN con respecto a las expuestas a NAF. Los resultados de este trabajo apoyan la hipótesis que *Leucaena leucocephala* y *Acaciella angustissima* experimentan un estrés oxidativo inducido por hidrocarburos policíclicos aromáticos y que este estrés es mayor en ausencia de *Rhizobium* y en presencia de FEN. El FEN se degradó hasta en un 98.4% en *Acaciella*, un 98.2% en el testigo sin planta, un 98.1% en *Leucaena* y un 98% en *Leucaena+Acaciella*. Los tratamientos inoculados con *Rhizobium* presentaron significativamente mayor degradación de FEN (99.5%) que aquellos tratamientos sin *Rhizobium* (97.5%). La actividad de la enzima nitrogenasa no presentó efectos significativos por la presencia de FEN, pero fue significativamente mayor en *Leucaena* comparada con *Acaciella* y la combinación de ambas especies.

Palabras clave: nódulo, HPA's, compuestos fenólicos, contaminación

SYMBIOTIC INTERACTION *Rhizobium*-LEGUME TREES IN CONTAMINATED SYSTEMS WITH POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS

Carlos López Ortiz, M.Sc.

Colegio de Postgraduados, 2011

ABSTRACT

This study evaluated the establishment of the symbiosis between *Rhizobium tropici* CIAT899 and the leguminous trees *Leucaena leucocephala* (Lam.) and *Acaciella angustissima* (Mill.) in systems contaminated with naphthalene (NAF) and phenanthrene (FEN). The present work was divided in two experimental stages. First stage evaluated the effect of NAF and FEN in the dynamics of nodule formation, as well as the plant responses in total phenolic compound content, total antioxidant activity, and total content of chlorophylls and carotenoids. The second stage evaluated the degradation of 60 mg FEN kg⁻¹, as well as the activity of the enzyme nitrogenase in the rhizosphere. As general conclusions, the contamination with NAF and/or FEN had inhibitory effects on nodule formation in both plants species. Nevertheless, whereas *Leucaena* was more susceptible to the NAF, *Acaciella* was slightly more susceptible to FEN contamination. In addition, both plants exposed to 20 mg FEN L⁻¹ did not show inhibition on the formation of nodules. The inoculation with *Rhizobium* resulted in PST increases of 150% for *Leucaena* and 100% for *Acaciella*. For both plant species, the CFT in leaves was significantly greater in non-inoculated treatments when compared to those inoculated with *Rhizobium*, and significantly greater in plants under FEN contamination in comparison to NAF. Results support the hypothesis that *L. leucocephala* and *A. angustissima* faced an oxidative stress induced by the polycyclic aromatic hydrocarbons, and this stress is greater in the absence of *Rhizobium*, and under FEN contamination. The FEN was degraded in 98.4% in *Acaciella*, 98.2% in the control without plant, 98.1% in *Leucaena*, and 98% in *Leucaena*+*Acaciella*. Treatments inoculated with *Rhizobium* had significantly greater degradation of FEN (99.5%) that those treatments without *Rhizobium* (97.5%). The activity of the enzyme nitrogenase did not show significant effects due to FEN, but was significantly greater in *Leucaena* when compared to *Acaciella*, and the combination of both species.

Key words: nodule, HPA's, phenolic compounds, contamination

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas por la oportunidad y las facilidades proporcionadas para realizar mis estudios de Maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento brindado para el desarrollo de esta investigación la cual forma parte de mi formación profesional.

Al Dr. Ronald Ferrera-Cerrato por la dirección y formación académica en la realización de esta investigación, por su disciplina, consejos y amistad.

Al Dr. Alejandro Alarcón por su apoyo en cada etapa de este trabajo, la revisión del escrito, sus consejos, paciencia y amistad.

A los doctores Dr. Juan José Almaraz-Suárez (Colegio de Postgraduados), Dra. Esperanza Martínez-Romero (UNAM) y Dra. Remedios Mendoza-López (Universidad Veracruzana) por sus valiosas aportaciones, revisiones y consejos para la realización de la investigación y trabajo de tesis.

Al personal del Área de Microbiología de suelos del Colegio de Postgraduados por su apoyo en el laboratorio de Microbiología de Suelos.

Al Personal de la Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica (SARA) de la Universidad Veracruzana por su apoyo en el análisis de fenantreno en el suelo.

DEDICATORIA

A mi madre María Teresa,

A mi hermana Carolina

A mi abuela Tenchi

Por haberme entregado lo mejor de si mismas, apoyarme y aconsejarme en cada momento de mi vida... Las amo con toda mi alma, Dios las bendiga siempre

Al Dr. Ronald Ferrera-Cerrato

Al Dr. Alejandro Alarcón

Con especial cariño y profunda admiración, por las valiosas contribuciones que le han dado a mi carrera profesional, porque sin su dirección y amistad no podría haberlo logrado

A Dios, Nuestro Señor Jesucristo y El Espíritu Santo

Por hacerme tan feliz desde que nací y así siempre cada día de mi vida...

CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE CUADROS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	3
OBJETIVO GENERAL.....	3
OBJETIVOS PARTICULARES.....	3
HIPÓTESIS GENERAL.....	4
HIPÓTESIS PARTICULARES.....	4
CAPÍTULO III. REVISIÓN DE LITERATURA	
EL PAPEL DE LA SIMBIOSIS <i>Rhizobium</i>-LEGUMINOSA EN LA	
REMEDIACIÓN DE SITIOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS	
POLICÍCLICOS AROMÁTICOS.....	5
Contaminación del suelo por hidrocarburos.....	5
Hidrocarburos policíclicos aromáticos.....	7
Biorremediación.....	11
Fitorremediación.....	11
El potencial de la rizósfera en la degradación de hidrocarburos.....	12
Degradación de naftaleno y fenantreno.....	14
Fijación biológica de nitrógeno.....	16
<i>Rhizobium</i>	16
Las leguminosas en suelos contaminados con hidrocarburos.....	17
<i>Acaciella angustissima</i> (Mill.) y <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.).....	19
Respuestas fisiológicas de la planta a la contaminación por hidrocarburos.....	20
CAPÍTULO IV.	
ESTABLECIMIENTO Y RESPUESTAS FISIOLÓGICAS DE LA SIMBIOSIS	
<i>Rhizobium tropici</i>-<i>Leucaena leucocephala</i> EN PRESENCIA DE FENANTRENO	
Y NAFTALENO.....	22
RESUMEN.....	22
ABSTRACT.....	23
INTRODUCCIÓN.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
RESULTADOS.....	29
DISCUSIÓN.....	49
CONCLUSIONES.....	53

	Pág.
CAPÍTULO V.	
RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y DEGRADACIÓN DE FENANTRENO POR	
LA SIMBIOSIS <i>Rhizobium tropici</i>-LEGUMINOSAS ARBÓREAS.....	54
RESUMEN.....	54
ABSTRACT.....	55
INTRODUCCIÓN.....	56
MATERIALES Y MÉTODOS.....	58
RESULTADOS.....	63
DISCUSIÓN.....	70
CONCLUSIONES.....	76
 CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES GENERALES.....	 77
 LITERATURA CITADA.....	 79
 APÉNDICES.....	 96
APÉNDICE I.....	96
APÉNDICE II.....	97
APÉNDICE III.....	98

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburos en suelos.....	6
Cuadro 2. Límites máximos permisibles para hidrocarburos específicos en el suelo.....	6
Cuadro 3. Propiedades fisicoquímicas de trece hidrocarburos policíclicos aromáticos considerados como principales contaminantes (ATSDR, 2005).....	8
Cuadro 4. Porcentajes de degradación de fenantreno en arena contaminada con 60 mg FEN kg ⁻¹	68

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Mecanismo de rizodegradación por acción de la asociación planta-microorganismos (ITRC, 2007).....	13
Figura 2. Ruta metabólica en la degradación de naftaleno (Phale <i>et al.</i> , 2007).....	14
Figura 3. Ruta metabólica en la degradación de fenantreno (Phale <i>et al.</i> , 2007).....	15
Figura 4. Dinámica de aparición de nódulos formados por <i>Rhizobium tropici</i> en raíces de <i>Leucaena leucocephala</i> durante 31 días de establecidas en sistema “growth pouch” atendiendo a los factores independientes: A) tipo de hidrocarburo, y B) concentración del contaminante.....	30
Figura 5. Dinámica de aparición de nódulos formados por <i>Rhizobium tropici</i> en raíces de <i>Leucaena leucocephala</i> durante 31 días de establecidas en sistema “growth pouch” en presencia de dos hidrocarburos policíclicos aromáticos.....	30
Figura 6. Dinámica de aparición de nódulos formados por <i>Rhizobium tropici</i> en raíces de <i>Acaciella angustissima</i> durante 31 días de establecidas en sistema “growth pouch” atendiendo a los factores independientes: A) tipo de hidrocarburo, y B) concentración del contaminante.....	31
Figura 7. Dinámica de aparición de nódulos formados por <i>Rhizobium tropici</i> en raíces de <i>Acaciella angustissima</i> durante 31 días de establecidas en sistema “growth pouch” en presencia de dos hidrocarburos policíclicos aromáticos.....	31
Figura 8. Peso seco total de <i>Leucaena leucocephala</i> inoculadas y no-inoculadas con <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 en presencia de dos hidrocarburos policíclicos durante 31 días.....	33
Figura 9. Peso seco total de <i>Acaciella angustissima</i> inoculadas y no-inoculadas con <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 en presencia de dos hidrocarburos policíclicos durante 31 días.....	33
Figura 10. Compuestos fenólicos totales en hojas (A y C) y en raíz (B y D) de <i>Leucaena leucocephala</i> en presencia de dos hidrocarburos policíclicos aromáticos, evaluados a los 31 días.....	35
Figura 11. Compuestos fenólicos totales en nódulos de <i>Leucaena leucocephala</i> en presencia de contaminación con dos hidrocarburos policíclicos aromáticos, durante 31 días.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 12. Compuestos fenólicos totales en hojas (A y C) y en raíz (B y D) de <i>Acaciella angustissima</i> en presencia de dos hidrocarburos policíclicos aromáticos, evaluados a los 31 días.....	38
Figura 13. Compuestos fenólicos totales en nódulos de <i>Acaciella angustissima</i> en presencia de contaminación con dos hidrocarburos policíclicos aromáticos, durante 31 días.....	39
Figura 14. Actividad antioxidante total en hojas (A y C) y en raíz (B y D) de <i>Leucaena leucocephala</i> en presencia de dos hidrocarburos policíclicos aromáticos, a los 31 días.....	41
Figura 15. Actividad antioxidante total en nódulos de <i>Leucaena leucocephala</i> en presencia de dos hidrocarburos policíclicos aromáticos, durante 31 días.....	42
Figura 16. Actividad antioxidante total en hojas (A y C) y en raíz (B y D) de <i>Acaciella angustissima</i> en presencia de dos hidrocarburos policíclicos aromáticos, a los 31 días.....	43
Figura 17. Actividad antioxidante total en nódulos de <i>Acaciella angustissima</i> en presencia de dos hidrocarburos policíclicos aromáticos, durante 31 días.....	44
Figura 18. Contenido foliar de clorofilas totales (A y C) y carotenos totales (B y D) en <i>Leucaena leucocephala</i> en presencia de contaminación con dos hidrocarburos policíclicos aromáticos, evaluados a los 31 días.....	47
Figura 19. Contenido foliar de clorofilas totales (A y C) y carotenos totales (B y D) en <i>Acaciella angustissima</i> en presencia de contaminación con dos hidrocarburos policíclicos aromáticos, evaluados a los 31 días.....	48
Figura 20. Esquema de los 24 tratamientos que conformaron la segunda fase experimental. Factores: Contaminación (Con y sin 60 mg FEN kg ⁻¹ de arena); Planta (<i>Leucaena</i> , <i>Acaciella</i> , <i>Leu+Aca</i> , sin planta), Fuente de nitrógeno (<i>Rhizobium</i> , con Ninorg, sin nitrógeno).....	59
Figura 21. Peso seco total obtenido por los factores independientes: A) Planta (<i>Leucaena</i> , <i>Acaciella</i> y <i>Leu+Aca</i>); B) Contaminación (con 60 mg FEN kg ⁻¹ y sin FEN); C) Fuente de N (Sin N, Ninorg y <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899) durante 40 días.....	63

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 22. Peso seco total obtenido por tratamientos después de 40 días. Planta (<i>Leucaena</i> , <i>Acaciella</i> y <i>Leu+Aca</i>); Contaminación (con 60 mg FEN kg ⁻¹ y sin FEN); Fuente de N (<i>Rhizobium tropici</i> CIAT899, Ninorg y Sin N).....	64
Figura 23. Número de nódulos formados por <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899 en raíces de dos leguminosas arbóreas y la combinación de ellas, en presencia de 60 mg FEN kg ⁻¹ , después de 40 días.....	65
Figura 24. Actividad de la enzima nitrogenasa en raíces de dos leguminosas y la combinación de ellas, en presencia de 0 y 60 mg FEN kg ⁻¹ de arena, después de 40 días. A) Por efecto de factor independiente planta y B) Por efecto de factor independiente contaminación con FEN.....	66
Figura 25. Actividad de la enzima nitrogenasa en raíces de dos leguminosas y la combinación de ellas, en presencia de 0 y 60 mg FEN kg ⁻¹ después de 40 días, por efecto de factor tratamiento.....	66
Figura 26. Cromatogramas que muestran la presencia/degradación de fenantreno en las rizósferas de dos leguminosas, la combinación de ellas y sustrato sin planta; con inoculación de <i>Rhizobium tropici</i> , aplicación de Ninorg y sin nitrógeno, después de 40 días.....	68

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El suelo es un recurso natural indispensable para la supervivencia del ser humano. Sin embargo, éste es susceptible de alteración por contaminantes orgánicos resultantes de la deposición atmosférica, riego con aguas residuales y accidentes industriales. La contaminación del suelo por compuestos orgánicos representa una seria amenaza mundial en calidad de los alimentos, alteraciones en los ecosistemas y eventualmente para la salud humana (Gao *et al.*, 2010).

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA's) son una clase de compuestos orgánicos ampliamente distribuidos en el ambiente, subproductos de la combustión incompleta o pirólisis de materiales orgánicos, los cuales son potencialmente peligrosos por sus características carcinogénicas y recalcitrantes (Wilcke, 2000). En algunos países la cantidad de HPA's en el suelo se encuentra hasta en cientos de miligramos por kilogramo (Sung *et al.*, 2001). Por lo tanto, se requiere de acciones inmediatas para remediar dichos sitios contaminados en situación de grave riesgo ambiental.

La rizodegradación es una tecnología que busca potencializar la degradación de compuestos orgánicos contaminantes como los HPA's, mediante el uso de plantas y la asociación de microorganismos con la raíz (Chiapusio *et al.*, 2007). En este sentido, la rizósfera de las plantas leguminosas representa un hábitat ideal para microorganismos degradadores de hidrocarburos (Radwan *et al.*, 2007). La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa favorece la asimilación de N atmosférico en estas plantas, por lo que estas plantas son más competitivas en suelos con baja fertilidad. Además, especies de leguminosas arbóreas como

Leucaena leucocephala Lam. y *Acaciella angustissima* Mill. son consideradas importantes en la reforestación de áreas con problemas de erosión y tienen un especial interés en sistemas agroforestales debido a su rápido crecimiento y su tolerancia a cambios extremos en el ambiente (NAS, 1997; Rincón-Rosales y Gutiérrez-Miceli, 2008).

La efectividad de algunas leguminosas (*Medicago sativa*, *Phaseolus coccineus*) en la remediación de suelos contaminados con HPA's ha sido descrita previamente (Muratova *et al.*, 2003; Ferrera-Cerrato *et al.*, 2008), aunque el efecto de estos en las leguminosas y su sistema simbiótico ha recibido poca atención. Por otro lado, el estudio de las respuestas fisiológicas de leguminosas ante contaminantes orgánicos como los HPA's, proporciona datos desde el punto de vista ecológico que permiten comprender el efecto tóxico que el contaminante provoca en la planta y su simbiote.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de dos hidrocarburos poliaromáticos (naftaleno y fenantreno) en el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium tropici*-leguminosas arbóreas y en respuestas fisiológicas selectas en hojas, raíz y nódulos, así como determinar la adaptación y degradación de fenantreno por *Rhizobium tropici* CIAT899 asociado a *Leucaena leucocephala*, *Acaciella angustissima*, y la combinación de estas dos especies.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de diferentes concentraciones de fenantreno y naftaleno en el establecimiento de la simbiosis entre *Rhizobium tropici* con las leguminosas arbóreas *Acaciella angustissima* y *Leucaena leucocephala*, así como su respuesta en la acumulación de compuestos fenólicos, actividad antioxidante total y en el contenido de clorofilas totales carotenos totales, y en la degradación del contaminante.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de fenantreno y naftaleno en el número de nódulos de leguminosas inoculadas con *Rhizobium tropici* en un sistema modelo de bolsas de crecimiento (growth pouch).
- 2) Determinar el efecto del fenantreno y naftaleno en la respuesta fisiológica de la planta y el nódulo en la producción de compuestos fenólicos y actividad antioxidante, así como el contenido de clorofilas y carotenoides en hojas, además de la actividad de la enzima nitrogenasa frente a fenantreno.
- 3) Conocer la capacidad de degradación de fenantreno por el sistema simbiótico *Rhizobium tropici*-leguminosas arbóreas.

HIPÓTESIS GENERAL

El sistema simbiótico *Rhizobium tropici*-leguminosas arbóreas tolera y degrada hidrocarburos poliaromáticos, además reduce el estrés abiótico en la planta, reflejado en la producción de compuestos fenólicos totales, actividad antioxidante total, y contenido de clorofilas y carotenos.

HIPÓTESIS PARTICULARES

- 1) La tolerancia y el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium tropici*-leguminosas depende de la naturaleza química del hidrocarburo policíclico aromático.
- 2) La simbiosis con *Rhizobium* reduce el estrés abiótico provocado por los contaminantes en las leguminosas arbóreas, y que se ve reflejado en la reducción de los compuestos fenólicos totales, actividad antioxidante total y contenido de clorofilas y carotenos.
- 3) El sistema simbiótico *Rhizobium*-Leguminosas arbóreas tiene la capacidad de degradar fenantreno con mayor eficiencia comparado con el testigo sin inocular.

CAPÍTULO III

REVISIÓN DE LITERATURA

EL PAPEL DE LA SIMBIOSIS *Rhizobium*-LEGUMINOSA EN LA REMEDIACIÓN DE SITIOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

Contaminación del suelo por hidrocarburos

En la actualidad, México al igual que otros países en vías de desarrollo, ha experimentado profundos cambios económicos y sociales que se han acompañado de un creciente deterioro del ambiente y pérdida de sus recursos naturales (SEMARNAT, 2008). La Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (LGEEPA), define “contaminación” como la presencia en el ambiente de uno o más contaminantes o de cualquier combinación de ellos que cause desequilibrio ecológico; y define “contaminante” como toda materia o energía en cualesquiera de sus estados físicos y formas, que al incorporarse o actuar en la atmósfera, agua, suelo, flora, fauna o cualquier elemento natural, altere o modifique su composición y condición natural.

En México, las actividades industriales y la agricultura han provocado serios daños al ambiente afectando casi a la totalidad de los ecosistemas. El suelo representa un sistema donde en la actualidad, se puede encontrar amplia variedad de compuestos tóxicos entre los cuales se incluyen los plaguicidas derivados de las prácticas agrícolas y los hidrocarburos derivados de las actividades petroleras (Fernández-Linares *et al.*, 2006; Manahan, 2007).

La NOM-138-SEMARNAT/SS-2003, define “suelo contaminado con hidrocarburos” como aquél en el cual se encuentran presentes hidrocarburos que por sus cantidades y características, afecta la naturaleza del suelo. La contaminación del suelo por hidrocarburos ocurre durante su explotación, transporte y por rupturas de los ductos; los derrames de estos combustibles ocasionan graves problemas sobre todo si el suelo es permeable porque la contaminación puede extenderse rápidamente (Saval, 1998). Los límites máximos permisibles en México para fracciones de hidrocarburos en suelo y los límites máximos permisibles para hidrocarburos específicos en suelo se muestran en los Cuadros 1 y 2 (NOM-138-SEMARNAT/SS-2003).

Cuadro 1. Límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburos en el suelo

Fracción de Hidrocarburos	Uso de suelo predominante ¹ (mg kg ⁻¹ base seca)		
	Agrícola ²	Residencial ³	Industrial
Ligera	200	200	500
Media	1200	1200	5000
Pesada	3000	3000	6000

Cuadro 2. Límites máximos permisibles para hidrocarburos específicos en el suelo

Hidrocarburos específicos	Uso de suelo predominante ¹ (mg kg ⁻¹ base seca)		
	Agrícola ²	Residencial ³	Industrial
Benceno	6	6	15
Tolueno	40	40	100
Etilbenceno	10	10	25
Dibenzo (a,h) antraceno ⁴	2	2	10
Benzo (a) pireno ⁴	2	2	10
Benzo (a) antraceno ⁴	2	2	10
Indeno (1,2,3-cd) pireno ⁴	2	2	10

1. Para usos de suelo mixto, deberá aplicarse la especificación al menor valor de los usos de suelo involucrados
2. Agrícola incluye suelo forestal, recreativo, y de conservación.
3. Industrial incluye comercial.
4. La determinación de hidrocarburos aromáticos polinucleares deberá realizarse únicamente en los casos que se pretende demostrar que se está cumpliendo con los límites máximos permisibles.

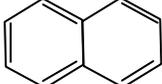
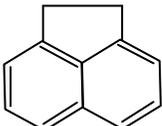
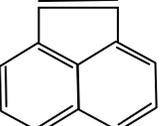
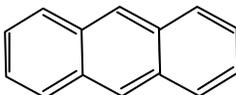
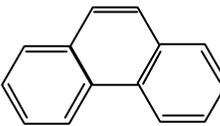
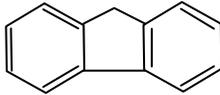
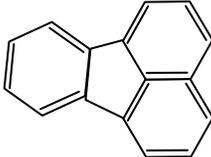
Hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA's)

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA's) constituyen una familia de compuestos de amplia distribución ambiental, que se caracterizan por contener dos o más anillos de benceno unidos entre sí (Cuadro 3). La mayoría contiene únicamente carbono e hidrógeno, y son siempre estructuras polinucleares de tipo aromático (Vives *et al.*, 2001). Los HPA's son sustancias lipofílicas, tendencia que se incrementa con el aumento de su masa molecular, además, son inestables fotoquímicamente, por lo que se degradan con la luz (proceso de fotooxidación) (Albers, 1995)

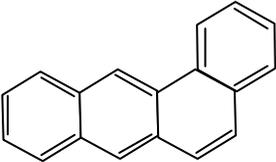
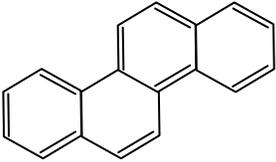
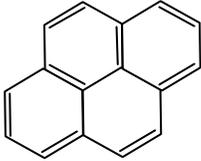
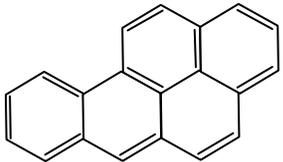
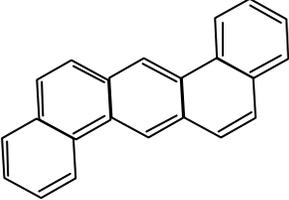
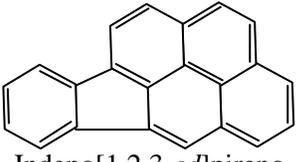
Las características químicas y ambientales de los HPA's dependen del número de anillos aromáticos presentes y de la naturaleza del acoplamiento entre estos anillos (Doyle *et al.*, 2008). Los HPA's se dividen generalmente en: 1) HPA's de bajo peso molecular (compuestos que contienen hasta tres anillos aromáticos) y 2) HPA's de alto peso molecular (contienen cuatro o más anillos aromáticos). La hidrofobicidad, recalcitrancia y toxicidad de estos compuestos aumentan con el número de anillos aromáticos (Cerniglia, 1993). Los HPA's de bajo peso molecular tienden a ser más solubles y volátiles y tienen menos afinidad para las superficies que los HPA's de alto peso molecular (WHO, 1998).

Los HPA's son encontrados en sitios industriales a muy altas concentraciones, su acumulación es debido a su baja solubilidad y sus propiedades recalcitrantes (Wilson y Jones, 1993). El problema que representa este tipo de compuestos en los sistemas biológicos, se relaciona con su alto grado de toxicidad y con sus características carcinogénicas y mutagénicas (Edwards, 1983; ATSDR, 1995). En la actualidad se ha demostrado la toxicidad de al menos 20 de estos compuestos, siendo los derivados del antraceno los más peligrosos (Vives *et al.*, 2001).

Cuadro 3. Propiedades fisicoquímicas de trece hidrocarburos policíclicos aromáticos considerados como principales contaminantes (ATSDR, 1995).

HPA	Fórmula química	Peso molecular	Punto de ebullición (°C)	Punto de fusión (°C)	Solubilidad ^{H₂O} (mg L ⁻¹)
	C ₁₀ H ₈	180	218	77	31
Naftaleno					
	C ₁₂ H ₁₀	154	279	95	3.8
Acenaftaleno					
	C ₁₂ H ₈	152	280	94	16.1
Acenaftileno					
	C ₁₄ H ₁₀	178	340	318	0.045
Antraceno					
	C ₁₄ H ₁₀	178	340	99.5	1.1
Fenantreno					
	C ₁₃ H ₁₀	166	295	116	1.9
Fluoreno					
	C ₁₆ H ₁₀	203	375	111	0.26
Fluorantreno					

Cuadro 3. (Continuación...)

HPA	Fórmula química	Peso molecular	Punto de ebullición (°C)	Punto de fusión (°C)	Solubilidad ^{H₂O} (mg L ⁻¹)
	C ₁₈ H ₁₂	228	438	158	0.011
Benzo[<i>a</i>]antraceno					
	C ₁₈ H ₁₂	228	448	253	0.0015
Criseno					
	C ₁₆ H ₁₀	202	404	145	0.134
Pireno					
	C ₂₀ H ₁₂	252	495	179	0.0038
Benzo[<i>a</i>]pireno					
	C ₂₂ H ₁₄	278	524	266	0.0005
Dibenzo[<i>a,h</i>]antraceno					
	C ₂₂ H ₂₂	276	536	162	0.062
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pireno					

La exposición a los HPA's puede ocurrir vía inhalación, ingestión o contacto cutáneo. Además, también se ha observado que los HPA's pueden llegar a la placenta y causar efectos nocivos al embrión y al feto (Collins *et al.*, 1991). Una vez ingeridos, los HPA's son absorbidos rápidamente por el aparato gastrointestinal. Muchos casos de cáncer de pulmón, hígado, intestino, páncreas y de piel se han asociado a HPA's (Samantha *et al.*, 2002).

El grado de toxicidad se relaciona generalmente con el peso molecular; los HPA's con alto peso molecular exhiben a menudo mayor toxicidad, aunque la forma de exposición y la presencia de otras sustancias tóxicas influyen en gran medida en los efectos toxicológicos (Doyle *et al.*, 2008). La carcinogenicidad se asocia particularmente al peso de molecular, tal como en el caso del benzo[a]pireno. Los estudios de la mutagenicidad han indicado que los únicos HPA's que no son claramente mutágenicos son el naftaleno, fluoreno y antraceno (Cerniglia, 1993; Juhasz y Naidu, 2000).

Los HPA's pueden originarse de fuentes naturales y antropogénicas (Blumer, 1976; Mueller *et al.*, 1996). Son componentes naturales de combustibles fósiles tales como carbón o petróleo, y pueden incorporarse al ambiente como resultado de derrames accidentales y/o la salida natural de estos productos. Las HPA's también pueden formarse a partir de la combustión incompleta de la materia orgánica, la actividad volcánica, bosques, praderas, la combustión de combustibles fósiles, incineración, y en menor grado al cocinar los alimentos (Maliszewska-Kordybach, 1999). Además, estos compuestos se han detectado en las emisiones de motores, en el humo de tabaco, y en alimentos tales como carnes al carbón de leña, asadas a la parrilla o ahumadas, pescados ahumados, además en grasas y aceites (Maliszewska-Kordybach, 1999; Trapido, 1999).

Biorremediación

La biorremediación es una tecnología que utiliza organismos vivos o sus enzimas para transformar, acumular o degradar bioquímicamente contaminantes hasta concentraciones que no produzcan efectos nocivos a la salud humana o al ambiente en el corto y largo plazo (Fernández-Linares, 2000).

El fundamento bioquímico de la biorremediación se basa en que en la cadena respiratoria, o transportadora de electrones de las células, se produce una serie de reacciones de óxido-reducción cuyo fin es la obtención de energía. La cadena la inicia con un sustrato orgánico que es externo a la célula y que actúa como donador de electrones, de modo que la actividad metabólica de la célula acaba degradando y consumiendo dicha sustancia, la cual es transformada en el mejor de los casos, en CO₂ y agua (Maroto-Arroyo y Rogel-Quesada, 2001). La susceptibilidad a la biodegradación varía de acuerdo al tipo y tamaño de la molécula del hidrocarburo. Los *n*-alcanos tienen mucha similitud con los ácidos grasos y las parafinas, y éstos son utilizados por muchos microorganismos como fuente de carbono y energía. Los compuestos aromáticos se degradan más lentamente que los alcanos (National Research Council, 1985).

Fitorremediación

Estudios recientes han demostrado que algunas plantas con determinadas características fisiológicas, incrementan la degradación de diversos compuestos orgánicos en suelos contaminados. Sin embargo, se conoce poco acerca de la participación directa o indirecta, de las interacciones simbióticas con microorganismos y de los mecanismos y etapas que ayudan a las transformación de estos compuestos (López-Martínez *et al.*, 2005).

El término “fitorremediación” que consiste en el prefijo griego *Phyto* (planta) y la raíz latina *remedium* (remover), se refiere al saneamiento de sitios contaminados mediante el uso y aprovechamiento de las plantas (Walton *et al.*, 1994) y que mediante el uso de técnicas agronómicas, se puede dar una remoción del contaminante presente en el suelo (Cunningham *et al.*, 1996). Hay diferentes formas de fitorremediación y el definir estas formas es útil para entender los distintos procesos que pueden ocurrir en presencia de las plantas; qué sucede con el contaminante, dónde ocurre la remediación, y qué debe hacerse para una fitorremediación eficaz. Estas diferentes formas de fitorremediación se pueden aplicar a contaminantes específicos, a ciertos niveles de contaminación y también requieren de distintos tipos de plantas (USEPA, 2000).

El potencial de la rizósfera en la degradación de hidrocarburos

Las raíces de las plantas son un hábitat ideal para el desarrollo de microorganismos. Las poblaciones microbianas que se encuentran asociadas en las raíces son muchas y muy variables (Atlas y Bartha, 2002). Cuando la planta se encuentra presente en suelos contaminados con hidrocarburos se crea un hábitat ideal para bacterias y hongos que utilizan al compuesto como fuente de carbono, necesario para su metabolismo. Estas poblaciones microbianas se multiplican rápidamente en la zona rizosférica, promoviendo de esta forma la degradación del contaminante (Hernández-Acosta *et al.*, 2003; Hernández-Acosta, 2007).

La rizodegradación es la degradación del contaminante por la actividad microbiana y compuestos metabólicos activos, exudados por las raíces de las plantas (Schonoor *et al.*, 1995; Ferrera-Cerrato, 2000). Otra definición se refiere a la biodegradación natural que ocurre en el suelo por la influencia de las raíces, y que conducirá a la destrucción o la desintoxicación de

un contaminante orgánico (Figura 1). Los contaminantes orgánicos en el suelo se convierten en productos menos tóxicos o son completamente mineralizados a compuestos inorgánicos como CO₂ ó H₂O. La rizósfera de las plantas incrementa la cantidad y variedad de las poblaciones microbianas en el suelo debido a los exudados de las plantas que incluyen carbohidratos, aminoácidos, ácidos orgánicos, ácidos grasos, enzimas y otros compuestos (Shimp *et al.*, 1993; Muratova *et al.*, 2009). Para la degradación de compuestos orgánicos se han utilizado plantas como *Brachiaria brizantha*, *Panicum maximun* (Hernández y Mager, 2003; Merkl *et al.*, 2006; Sangabriel *et al.*, 2006), *Phaseolus coccineus* (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2008), entre otras.

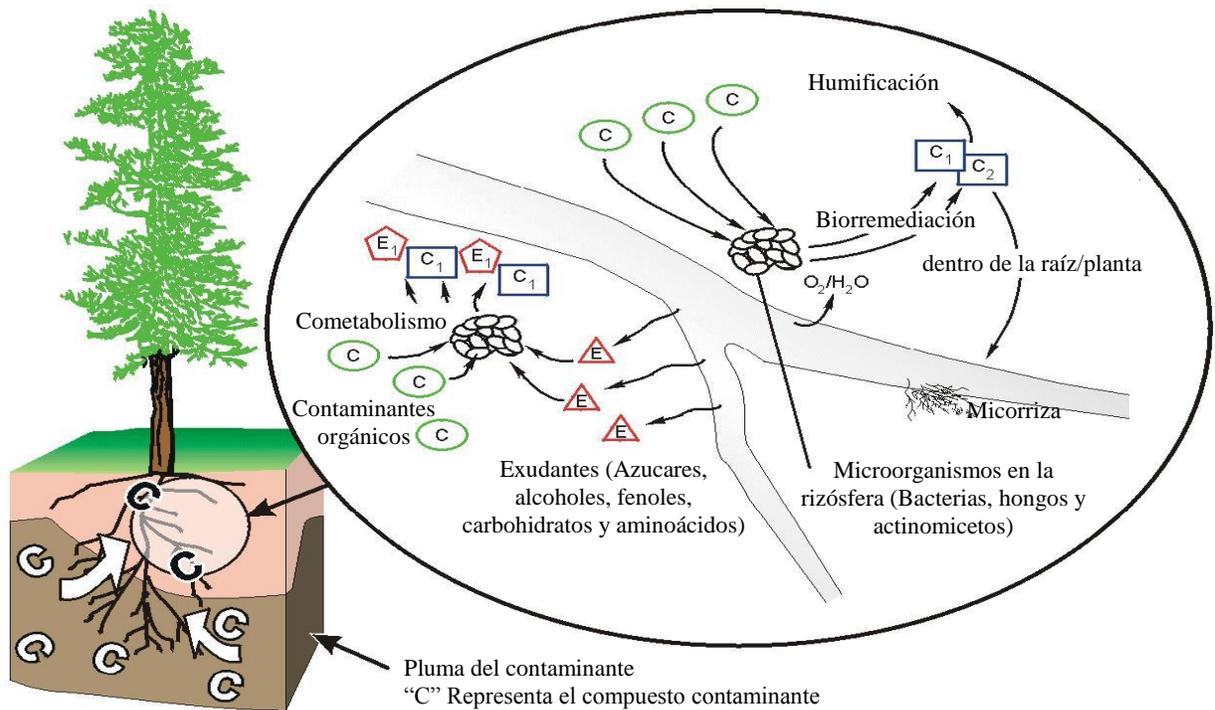


Figura 1. Mecanismo de rizodegradación por acción de la asociación planta-microorganismos (ITRC, 2001).

Degradación del naftaleno y fenantreno

La habilidad de algunas bacterias para utilizar naftaleno como fuente de carbono y energía fue reportada desde 1927 (Tattersfield, 1927; Tausson, 1927). Años más tarde, Strawinsky y Stone (1943, 1954) aislaron salicilato al filtrar un cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* creciendo en naftaleno. Davies y Evans (1964) describieron por primera vez una ruta metabólica de la degradación de naftaleno. De esta forma, se conoce que la degradación de naftaleno por bacterias es iniciada por la doble hidroxilación de uno de los anillos, para formar un intermediario hidrodíol (Phale *et al.*, 2007) (Figura 2).

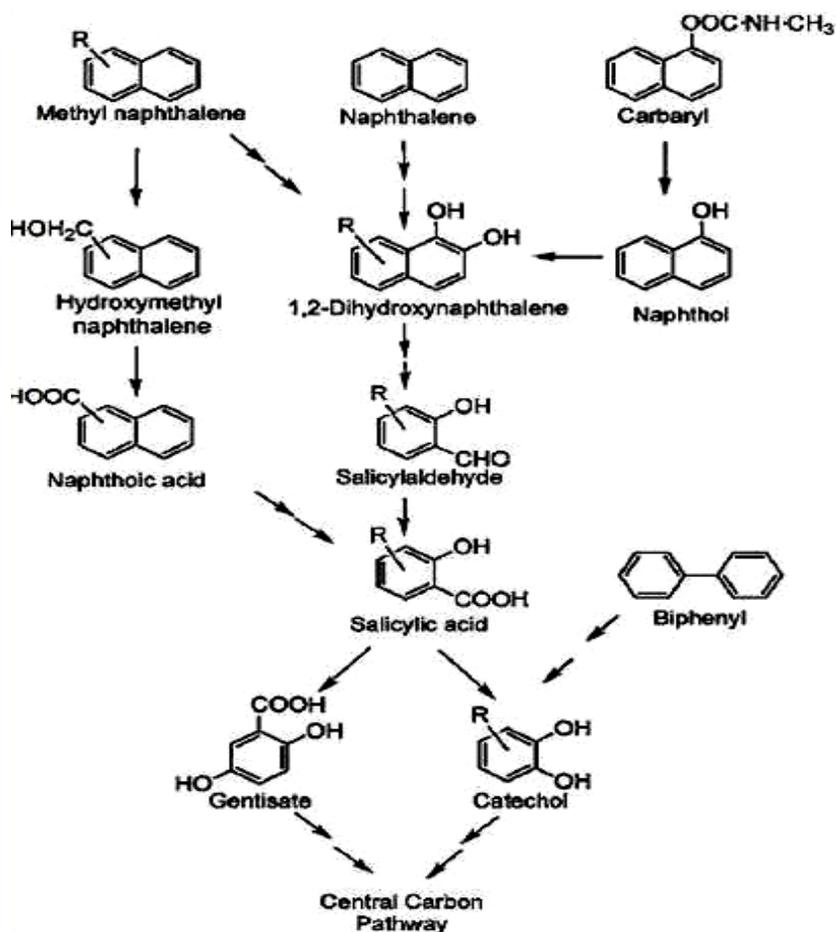


Figura 2. Ruta metabólica en la degradación de naftaleno (Phale *et al.*, 2007).

En el caso del fenantreno, la degradación inicia con la doble hidroxilación de uno de los anillos por acción de la enzima fenantreno dioxigenasa para formar 3,4-dihidroxifenantreno (Barnsley, 1983; Doddamani y Ninnekar, 2000) (Figura 3). El fenantreno es usado frecuentemente como modelo para comprender el metabolismo de compuestos orgánicos carcinogénicos (Phale *et al.*, 2007).

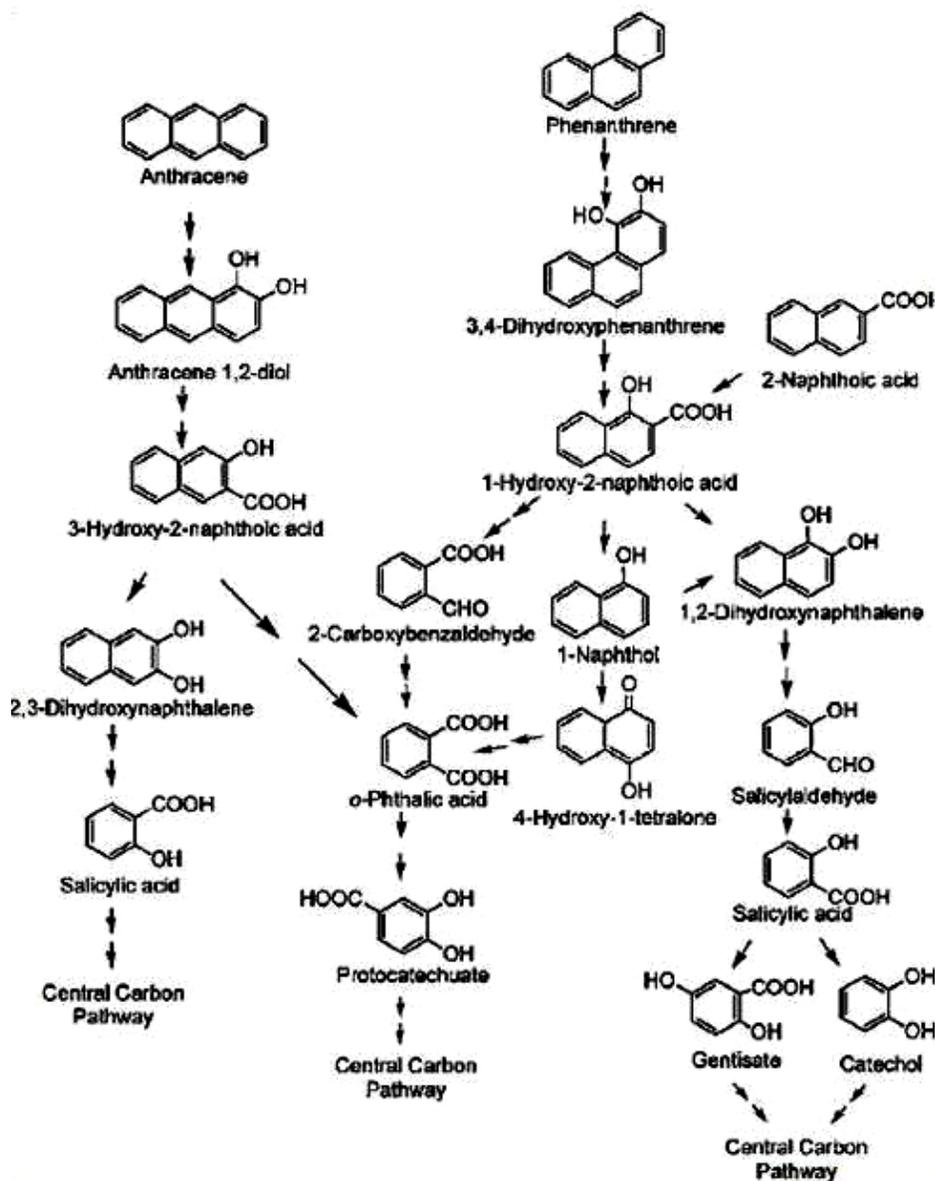


Figura 3. Ruta metabólica en la degradación de fenantreno (Phale *et al.*, 2007).

Fijación biológica de nitrógeno

El nitrógeno biológicamente disponible es llamado también nitrógeno fijado y es un elemento esencial para la vida. La capacidad de fijar nitrógeno es exclusiva de microorganismos procariotes que viven libres en el suelo o que establecen una relación simbiótica con las raíces de algunas plantas (Lloret y Martínez-Romero, 2005; Almaraz-Suárez y Ferrera-Cerrato, 2007).

La fijación biológica del nitrógeno en asociación simbiótica incluye tres grupos de interacciones (Lloret y Martínez-Romero, 2005):

1. Los heterocistos de las cianobacterias que ocupan tejidos de helechos (Wagner, 1997), cícadas (Ahern y Staff, 1994) y dicotiledóneas.
2. Actinomicetos representados por *Frankia* (Knowlton *et al.*, 1980), que forman nódulos con plantas no leguminosas, incluyendo géneros como *Alnus* y *Prusia*.
3. Los rizobios que forman nódulos en muchas leguminosas (Martínez-Romero, 1994; Young, 1996; Sessitsch *et al.*, 2002) y excepcionalmente con una no leguminosa, *Parasponia*, miembro de la familia Ulmaceae (Trinick, 1979).

Rhizobium

Los rizobios son bacterias del suelo, bacilos del tipo gram-negativos, que establecen simbiosis con plantas de la familia Fabaceae (Leguminosas). En las raíces de estas plantas se forman nódulos, estructuras especializadas donde el nitrógeno atmosférico es reducido a amonio. Así, la planta aprovecha el nitrógeno y la bacteria recibe a cambio carbohidratos y nutrimentos (Almaraz-Suárez y Ferrera-Cerrato, 2007).

Pocos trabajos han estudiado el impacto de la inoculación con rizobios durante la remediación de HPA's y la interacción de dos o más especies vegetales (Johnson *et al.*, 2004). Los rizobios juegan un papel muy importante en estas interacciones pues estimulan el crecimiento aéreo y radical de las plantas, a la vez que incrementan los exudados radicales (Phillips y Streit, 1996). Al incrementarse la cantidad de exudados en las raíces se puede potencializar el crecimiento de la planta, las poblaciones microbianas y la disponibilidad del contaminante como una fuente de carbono. Recientemente se ha demostrado que los rizobios tienen la capacidad de degradar compuestos haloaromáticos y compuestos tan complejos como los bifenilos policlorados (Damaj y Ahmad, 1996). Sin embargo, la habilidad de rizobios en vida libre o simbiótica, para degradar HPA's es poco conocida (Johnson *et al.*, 2004).

Las leguminosas en suelos contaminados con hidrocarburos

La capacidad de ciertas leguminosas arbóreas y arbustivas para fijar nitrógeno atmosférico simbióticamente tiene importancia ecológica; por ejemplo estas plantas en sistemas semiáridos-agroforestales permiten la restauración y mantenimiento de la fertilidad del suelo, además del combate de la erosión y la desertificación (Marcano *et al.*, 2001).

Las leguminosas normalmente tienen un sistema radical poco ramificado pero profundo que les permite actuar sobre contaminantes en las capas más profundas del suelo (Kirk *et al.*, 2002). La simbiosis *Rhizobium*-Leguminosa favorece la asimilación de N en estas plantas por lo que son más competitivas en suelos con baja fertilidad. Esta característica es importante, ya que la contaminación con hidrocarburos incrementa la relación C/N, afectando de manera negativa la disponibilidad del N (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2008).

Algunas especies de leguminosas se postulan como candidatas importantes para los procesos de fitorremediación, debido a sus adaptaciones al clima y a condiciones de suelo donde otras plantas no prosperarían.

El interés principal en la selección de leguminosas radica en su rápido crecimiento y su alta capacidad para fijar nitrógeno. *Acaciella angustissima* y *Leucaena leucocephala* son dos especies arbóreas de amplia distribución en regiones tropicales y subtropicales de México (Rincón-Rosales y Gutiérrez-Miceli, 2008; CONABIO, 2008), que forman islas de fertilidad, incrementan el contenido de materia orgánica en el suelo y proveen refugio a la flora y la fauna (Reyes-Reyes *et al.*, 2003). Además, son consideradas especies importantes en la reforestación de áreas con problemas de erosión (Lloret *et al.*, 2007).

Por otro lado, leguminosas herbáceas como frijol (*Phaseolus vulgaris*), *Phaseolus coccineus* y alfalfa (*Medicago sativa*) también pueden ser efectivas en los sistemas de remoción de contaminantes (Gonzalez-Paredes *et al.*, 2007; Sangabriel *et al.*, 2006). Sangabriel *et al.* (2006) reportaron tolerancia *Phaseolus coccineus* a contaminantes como el combustóleo. Sin embargo, para la fitorremediación es importante seleccionar especies de leguminosas con adaptación a diversas condiciones de sitios y a la concentración del contaminante (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2008).

El uso de leguminosas para potencializar la biorremediación de suelos contaminados con compuestos orgánicos se ha convertido actualmente en objeto de intensas investigaciones, debido principalmente a su bajo costo y a la posibilidad de remediar superficies grandes de terreno. Las leguminosas en simbiosis con microorganismos fijadores de nitrógeno atmosférico, ofrecen una ventaja nutrimental a los suelos con problemas de contaminación (Johnson *et al.*, 2004).

Hay evidencia que la actividad microbiana en la rizósfera puede favorecer la degradación de plaguicidas (Anderson *et al.*, 1994), y la degradación de químicos industriales como los hidrocarburos poliaromáticos (Reilley *et al.*, 1996; Joner *et al.*, 2001).

Merkl *et al.* (2004) indican que una de las principales características para la selección de leguminosas con capacidad de fitorremediar suelos contaminados con hidrocarburos, es la capacidad que tienen las semillas para germinar en esas condiciones. Además, sugieren dos leguminosas tropicales (*Centrosema brasilianum* y *Calopogonium mucunoides*) como buenas candidatas para la utilización en este tipo de tratamientos. Al respecto, Amadi *et al.* (1993) mencionaron que la inhibición de la germinación está correlacionada con las propiedades hidrofóbicas de los hidrocarburos, que impiden y reducen el intercambio de agua y gases. De cualquier forma, es necesario evaluar los efectos negativos que pueden ocasionar los hidrocarburos en las plantas durante todo su ciclo de vida (Quiñones-Aguilar *et al.*, 2003).

***Acaciella angustissima* (Mill.) y *Leucaena leucocephala* (Lam.)**

Acaciella angustissima pertenece a la familia Fabaceae y tiene su centro de origen en América Central (Rico-Arce y Bachean, 2006). Esta especie tiene un especial interés en sistemas agroforestales debido a su rápido crecimiento, capacidad de fijar nitrógeno, por la calidad de compuestos secundarios (fenoles, taninos, entre otros) que acumula en su corteza (Rincón-Rosales *et al.*, 2003). Esta leguminosa se puede encontrar en las regiones áridas y semiáridas de México (Dzowela, 1994), además de Chiapas, donde es usada para el curtido artesanal de pieles (Rincón-Rosales y Gutiérrez-Miceli, 2008).

Leucaena leucocephala es una planta de la familia Fabaceae originaria de América tropical y es una especie de amplia distribución en las regiones tropicales y subtropicales del

país, y se extiende desde México hasta Nicaragua (CONABIO, 2008). Los españoles la introdujeron en Filipinas y desde ahí se extendió por todo el sureste asiático. Además, es considerada una especie importante en la reforestación de áreas con problemas de erosión (Martínez-Romero *et al.*, 1997; Lloret *et al.*, 2007).

Respuestas fisiológicas de la planta a la contaminación por hidrocarburos

El efecto tóxico de los HPA's puede relacionarse con la producción exacerbada de especies reactivas de oxígeno (ROS), que incluyen el H₂O₂, el O₂ y HO, las cuales pueden servir como moléculas de señalización y/o como subproductos citotóxicos (Liu *et al.*, 2009).

Bajo condiciones fotosintéticas y respiratorias normales, estos compuestos se producen en las cadenas de transporte de electrones en cloroplastos y mitocondrias, y son subproductos de rutas metabólicas en el peroxisoma (Vranova *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2009). Debido a que las ROS atacan químicamente nucleótidos, proteínas, carbohidratos y ácidos grasos, las plantas emplean diversos mecanismos para neutralizar estos compuestos (Moller *et al.*, 2007). Foyer *et al.* (1994) sugieren que la tolerancia al estrés biótico y/o abiótico es debida a un aumento en la capacidad antioxidante de las plantas.

Los sistemas antioxidantes han sido clasificados como enzimáticos y no enzimáticos, aunque en muchos casos, ambos sistemas de antioxidantes funcionan en forma conjunta (Dalal y Khanna-Chopra, 2001). Dentro de las enzimas antioxidantes se encuentran la superóxido dismutasa (SOD, elimina el anión-radical superóxido), la catalasa (CAT, elimina H₂O₂ en los peroxisomas), glutatión reductasa (GR, implicada en la regeneración del glutatión), ascorbato peroxidasa (APX, elimina H₂O₂ en diversos compartimentos celulares) y glutatión oxidasa, GSSG (Asada, 1999; Arora *et al.*, 2002; Blokhina *et al.*, 2003). Como

antioxidantes no-enzimáticos se pueden distinguir los antioxidantes hidrosolubles (como el ácido ascórbico y el glutatión) y los liposolubles (carotenos, xantofilas y el α -tocoferol, presentes en membranas (Arora *et al.*, 2002; Blokhina *et al.*, 2003).

Por otro lado, los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios sintetizados por la planta de forma normal en el proceso de desarrollo y como defensa de la planta contra el estrés hídrico, tolerancia a los cambios de temperatura ambiental, contaminantes, radiación UV, entre otros factores (Naczk y Shahidi, 2004). Además, participan en la limpieza de ROS, controlan la simbiosis mutualista, y ayudan a la aclimatación de las plantas (Treutter, 2005).

Al respecto, Liu *et al.* (2009) en un estudio con *Arabidopsis thaliana* encontraron a los 30 días de exposición a concentraciones de 0 a 1.25 mM de fenantreno, mayor actividad de enzimas antioxidantes así como un incremento de H₂O₂. Estos autores sugieren un estrés abiótico provocado por la presencia del poliaromático en el sistema, que se ve reflejado en la producción de enzimas antioxidantes a medida que se incrementa la concentración del contaminante.

Sin embargo, en la actualidad son pocos los estudios que muestran evidencia del estrés que provocan los hidrocarburos poliaromáticos bajo condiciones de simbiosis mutualista, como es el caso de la interacción *Rhizobium*-leguminosas.

CAPÍTULO IV

ESTABLECIMIENTO Y RESPUESTAS FISIOLÓGICAS DE LA SIMBIOSIS *Rhizobium tropici*-leguminosas arbóreas EN PRESENCIA DE FENANTRENO Y NAFTALENO

RESUMEN

Este estudio evaluó el establecimiento de la simbiosis entre *Rhizobium tropici* CIAT899 y las leguminosas arbóreas *Leucaena leucocephala* (Lam.) y *Acaciella angustissima* (Mill.) en sistemas contaminados con naftaleno (NAF) y fenantreno (FEN), así como la respuesta de la planta en el contenido de compuestos fenólicos totales (CFT), actividad antioxidante total (AAT) y contenido total de clorofilas (CloroT) y carotenos (CaT). A los 31 días, el NAF tuvo mayor efecto negativo en la formación de nódulos en *Leucaena*, mientras que el FEN lo hizo ligeramente con *Acaciella*. Ambas leguminosas no mostraron diferencias significativas en la formación de nódulos a concentraciones de 20 mg FEN L⁻¹, mientras que las concentraciones de 60 y 100 mg FEN L⁻¹ redujeron significativamente la nodulación. La inoculación con *Rhizobium* incrementó el peso seco total (PST) hasta en 150% en el caso de *Leucaena*, y en 100% en el caso de *Acaciella*, comparado con las plantas no inoculadas. Para ambas especies, el contenido de CFT en hojas fue significativamente mayor en los tratamientos no inoculados en comparación con los tratamientos inoculados con *Rhizobium*, y significativamente mayor en las plantas expuestas a FEN en comparación con el NAF. Para ambas especies, la exposición a 100 mg HPA's L⁻¹ produjo mayor producción de CFT y AAT en hojas en comparación con las expuestas a bajas concentraciones de HPA's. Para el caso de raíz, los testigos no contaminados presentaron mayor producción de CFT y AAT. En ambas especies, el tipo de contaminante (NAF o FEN) no tuvo efectos significativos en el contenido de CloroT y CaT; sin embargo, el contenido de CloroT fue mayor en las plantas inoculadas con respecto a las plantas no inoculadas. El NAF y FEN actuaron de forma distinta en el establecimiento de la simbiosis entre *Rhizobium tropici*-Leguminosas. Además, la inoculación con *Rhizobium* fue un factor determinante en el PST y contenido foliar de CFT y AAT de ambas especies.

Palabras claves: nódulo, HPA's, compuestos fenólicos, contaminación

ABSTRACT

This study evaluated the establishment of the symbiosis between *Rhizobium tropici* and two legume trees: *Leucaena leucocephala* (Lam.) and *Acaciella angustissima* (Mill.) under contaminated systems with naphthalene (NAF) and phenanthrene (FEN), as well as the plant responses measured as the total phenolic compound content (CFT), total antioxidant activity (AAT), and the content of chlorophylls (CloroT) and carotenoids (CaT). After 31 days, the NAF had major negative effects on nodule formation in both species. Both legumes did not show significant differences on the number of nodules at 20 mg FEN L⁻¹, whereas concentrations of 60 and 100 mg FEN L⁻¹ significantly reduced the nodulation. The inoculation with *Rhizobium*, resulted in increased plant dry weight (PST) of 150% for *Leucaena*, and 100% for *Acaciella*, when compared to uninoculated plants. For both plant species, the leaf content of CFT was significantly greater in uninoculated treatments in comparison to those inoculated with *Rhizobium*, and significantly greater in plants exposed to FEN than to NAF. For both plants, exposure to 100 mg HPA's L⁻¹ resulted in higher CFT and AAT in leaves when compared to those exposed at low concentrations. For roots, the uncontaminated control showed more CFT and AAT. In both species, neither NAF nor FEN had significant effects in the content of CloroT and CaT; nevertheless, the content of CloroT was greater in inoculated plants than those uninoculated. NAF and FEN had differential effects on the establishment between *Rhizobium tropici*-legume trees. In addition, the inoculation with *Rhizobium* was a determining for in the PST and for the leaf content of CFT and AAT of both species.

Key words: nodule, PAH's, phenolic compounds, contamination

INTRODUCCIÓN

Las leguminosas son importantes en la agricultura, ya que incrementan la fertilidad de los suelos a través de la fijación simbiótica del nitrógeno (Almaraz-Suárez y Ferrera-Cerrato, 2007). El nitrógeno es fijado dentro de estructuras especializadas denominadas nódulos, que se desarrollan en la raíz de las leguminosas (Lloret y Martínez-Romero, 2005). La simbiosis *Rhizobium*-Leguminosa favorece la asimilación de N en estas plantas, por lo que son más competitivas en suelos con baja fertilidad. Esta característica de las leguminosas puede ser benéfica en suelos contaminados donde la baja disponibilidad de N, es limitante para el crecimiento de aquellos microorganismos que degradan compuestos orgánicos como los hidrocarburos (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2008).

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA's) son encontrados en sitios industriales a muy altas concentraciones, su acumulación es debido a su baja solubilidad y sus propiedades recalcitrantes (Wilson y Jones, 1993). El problema que representan estos compuestos en los sistemas biológicos, se relaciona con su alto grado de toxicidad y por sus características carcinogénicas y mutagénicas (Edwards, 1983).

La efectividad de algunas plantas en la remediación de suelos contaminados con HPA's ha sido descrita previamente (Binet *et al.*, 2000; Muratova *et al.*, 2003), aunque el efecto de las leguminosas y su simbiosis con rizobios ha recibido poca atención. Por ejemplo, la contaminación del suelo con fenantreno a una concentración de 1000 mg kg⁻¹ incrementa el número de nódulos activos en *Trifolium pratense* (Chiapusio *et al.*, 2007); mientras que, la exposición a fenantreno a una concentración de 100 µg mL⁻¹ reduce significativamente la nodulación en *Phaseolus vulgaris* (González-Paredes *et al.*, 2007). El estudio de respuestas fisiológicas de leguminosas arbóreas ante los HPA's, proporciona datos interesantes desde el

punto de vista ecológico, pues estas plantas forman islas de fertilidad que incrementan el contenido de materia orgánica en el suelo y pueden proveer de refugio a la flora y fauna. Además, *Leucaena leucocephala* y *Acaciella angustissima* son consideradas especies importantes en la reforestación de áreas con problemas de erosión y tienen un especial interés en sistemas agroforestales debido a su rápido crecimiento y su tolerancia a cambios extremos en el ambiente (NAS, 1997; Rincón-Rosales y Gutiérrez-Miceli, 2008).

En las plantas, el efecto tóxico de los HPA's puede relacionarse con la producción exacerbada de especies reactivas de oxígeno (ROS), que incluyen el H_2O_2 , el O_2^{2-} y HO^- , las cuales pueden servir como moléculas de señalización y/o como subproductos citotóxicos (Liu *et al.*, 2009). Sin embargo, existe poca información sobre las respuestas fisiológicas de los sistemas simbióticos planta-microorganismos en presencia de HPA's.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de dos hidrocarburos poliaromáticos (naftaleno y fenantreno) en el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium tropici*-Leguminosas arbóreas y las respuestas fisiológicas selectas de hojas, raíz y nódulos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Semillas de *Leucaena leucocephala* (Lam.) y *Acaciella angustissima* (Mill.) fueron escarificadas con H₂SO₄ al 90% durante 15 minutos y posteriormente, desinfectadas superficialmente con NaClO durante 10 minutos, y germinadas en agar-agua al 1%. A los cinco días después de la germinación, las plántulas fueron transferidas a una bolsa “Growth Pouch” con 40 mL de solución nutritiva de Fahraeus (Fahraeus, 1957) (ver Apéndice I) contaminada con naftaleno (NAF) o fenantreno (FEN). Cada hidrocarburo poliaromático fue disuelto en acetona y aplicado a la solución Fahraeus en las siguientes concentraciones: 20, 60 y 100 mg L⁻¹. Además se establecieron plantas en un sistema no contaminado (0 mg L⁻¹) como tratamiento testigo. A los tres días del trasplante, las plántulas fueron inoculadas con 1.0 mL de una suspensión con *Rhizobium tropici* CIAT899 (720 x 10⁸ UFC mL⁻¹ y 350 x 10⁹ UFC mL⁻¹, para *L. leucocephala* y *A. angustissima*, respectivamente). Además, se consideraron tratamientos sin inoculación de la bacteria.

El experimento se mantuvo durante 31 días en cámara de crecimiento de ambiente controlado con 12 h de fotoperiodo; la temperatura máxima/mínima y humedad relativa máxima/mínima fueron 26.0/24.0°C y 65/70%, respectivamente. Durante este periodo, los nódulos radicales fueron cuantificados cada tercer día, a partir de su aparición hasta el final del experimento. Las plantas fueron cosechadas a los 31 días, y secadas a 70°C durante 72 h para determinar el peso seco total (PST).

El contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) fue determinado mediante el ensayo con el reactivo Folin-Ciocalteu, utilizando ácido clorogénico como estándar (Singleton y Rossi, 1965; Soong y Barlow, 2004). Muestras de hoja, raíz y nódulos de las plantas fueron maceradas en mortero con 1.5 mL de metanol al 80%, y centrifugadas durante 15 min a 15000 rpm. Los

extractos fueron conservados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. El análisis consistió en reaccionar alícuotas de $30\text{ }\mu\text{L}$ de los extractos con $90\text{ }\mu\text{L}$ de carbonato de sodio (Na_2CO_3), y $150\text{ }\mu\text{L}$ de solución de Folin-Ciocalteu en microplacas de 96 pozos. Después de 30 minutos, se tomaron lecturas de absorbancia a 725 nm en espectrofotómetro (Synergy 2, Biotech® Instruments). Los resultados fueron expresados como miligramos de equivalentes de ácido clorogénico por gramo de tejido fresco ($\text{mg ácido clorogénico g}^{-1}$).

Para evaluar la actividad antioxidante total (AAT) se utilizó el ensayo de decoloración del radical 1,1-difenil-2-picrildrazil (DPPH) utilizando Trolox como compuesto antioxidante (Matthäus, 2002). A partir de los extractos obtenidos para CFT, se tomaron alícuotas de $15\text{ }\mu\text{L}$ que fueron transferidas a microplacas de 96 pozos y reaccionadas con $285\text{ }\mu\text{L}$ solución de DPPH. Se tomaron lecturas de absorbancia inicial a 515 nm y las placas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 15 min, para tomar una lectura de absorbancia final con espectrofotómetro (Synergy 2, Biotech® Instruments). Los resultados fueron expresados como milimoles de equivalentes de Trolox por gramo de tejido fresco (mM Trolox g^{-1}).

Para la cuantificación de clorofilas y carotenos se usó la metodología de Dere *et al.* (1998). Muestras de peso conocido de hojas fueron maceradas en morteros con 1.5 mL de metanol al 80%, y los extractos fueron mantenidos en refrigeración hasta el momento de tomar lecturas de absorbancia ($470, 645, 662\text{ nm}$) en espectrofotómetro (Synergy 2, Biotech® Instruments). Los resultados fueron expresados en miligramos por gramo de tejido fresco (mg g^{-1}). La cuantificación de los pigmentos fue estimada mediante las siguientes ecuaciones:

Clorofila a	Clorofila b	Carotenos
$\text{Ca} = 11.75 A_{662} - 2.350 A_{645}$	$\text{Cb} = 18.61 A_{645} - 3.960 A_{662}$	$\text{C}_{X+C} = 1000 A_{470} - 2.270 \text{Ca} - 81.4 \text{Cb} / 227$

A=Absorbancia

Para cada especie de leguminosa arbórea, se utilizó un experimento factorial 2x4x2, que incluyó 16 tratamientos con seis repeticiones, distribuidos en un diseño experimental completamente al azar. Los factores fueron HPA en el sistema (NAF y FEN), concentración del HPA (0, 20, 60 y 100 mg L⁻¹), y la inoculación de *Rhizobium tropici* (con y sin). Los datos obtenidos fueron analizados mediante análisis de varianza y prueba de comparación de medias (LSD, $\alpha=0.05$) mediante el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2002).

RESULTADOS

Dinámica de nodulación en *Leucaena leucocephala*

A los 31 días, el tipo de contaminante, la concentración del contaminante y el tratamiento, tuvieron efectos significativos ($P < 0.001$) para la aparición de nódulos de *R. tropici* en *L. leucocephala*. En el caso del tipo de contaminante, las plantas ante FEN presentaron una aparición más temprana de nódulos, en comparación con las plantas expuestas a NAF (Figura 4A). Con respecto al factor concentración del contaminante, los primeros nódulos aparecieron en la concentración de 20 mg L^{-1} , a los 11 días. Sin embargo, después de los 14 días se observó que a mayor concentración del contaminante menor número de nódulos (Figura 4B).

En el caso de tratamientos, las plantas expuestas a 20 mg FEN L^{-1} mostraron hasta el día 28, mayor número de nódulos (8.2), sin mostrar diferencias estadísticas con el tratamiento testigo. En contraste, las concentraciones de 60 y $100 \text{ mg FEN L}^{-1}$ disminuyeron significativamente la formación de nódulos con 6.5 y 4.3 respectivamente (Figura 5A). Por otro lado, las plantas expuestas al NAF mostraron la tendencia de retardar significativamente la aparición de nodulos al incrementar la concentración de este hidrocarburo poliaromático, especialmente ante 60 y $100 \text{ mg NAF L}^{-1}$ en comparación con el testigo (Figura 5B).

Dinámica de nodulación de *Acaciella angustissima*

A los 31 días, únicamente la concentración del contaminante tuvo efectos significativos ($P < 0.05$) para la formación de nódulos en raíces de *Acaciella* (Figura 6B), mientras que el tipo de HPA no fue significativo para la aparición de nódulos (Figura 6A). Con respecto al factor concentración, los primeros nódulos aparecieron en el tratamiento testigo (0 mg L^{-1}), siguiendo una tendencia de disminución en el número de nódulos al aumentar la concentración (Figura 6B).

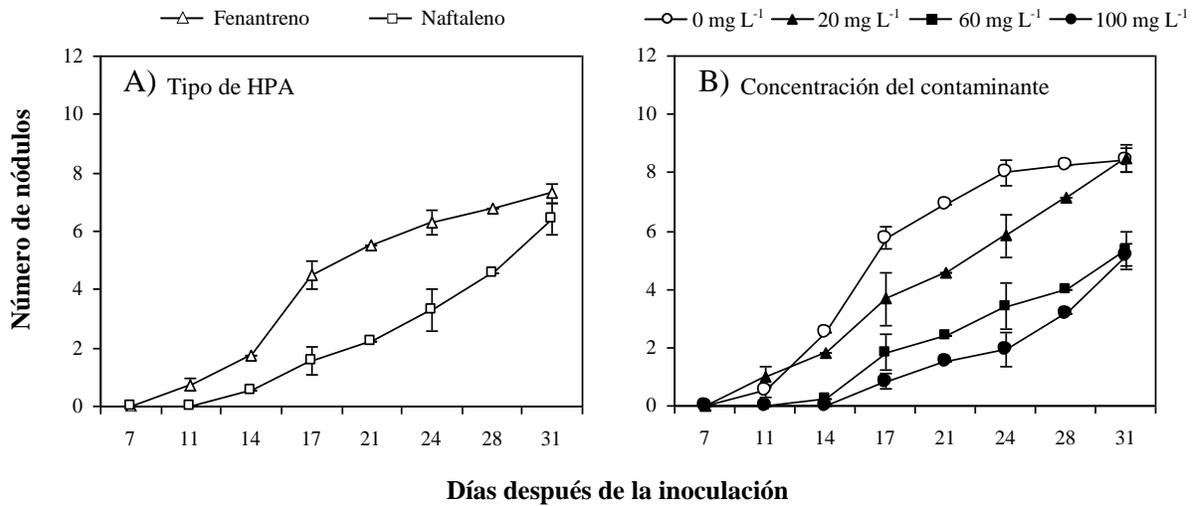


Figura 4. Dinámica de aparición de nódulos formados por *Rhizobium* en raíces de *Leucaena leucocephala* durante 31 días de establecidas en sistema “growth pouch” atendiendo a los factores independientes: A) tipo de hidrocarburo (n=24), y B) concentración del contaminante (n=12). Medias \pm Error estándar.

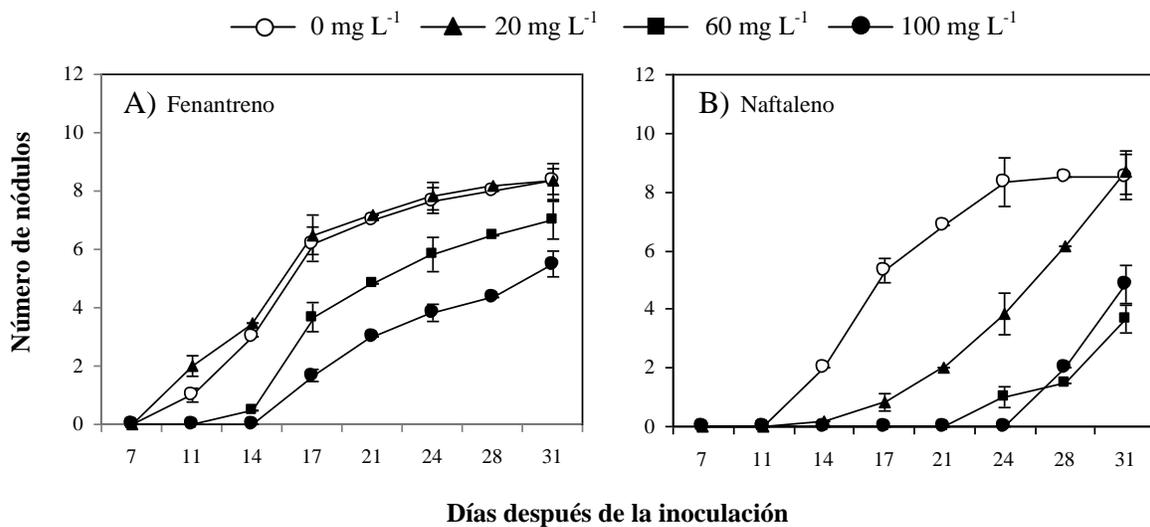


Figura 5. Dinámica de aparición de nódulos formados por *Rhizobium* en raíces de *Leucaena leucocephala* durante 31 días de establecidas en sistema “growth pouch” en presencia de contaminación con dos hidrocarburos policíclicos aromáticos. n=6. Medias \pm Error estándar.

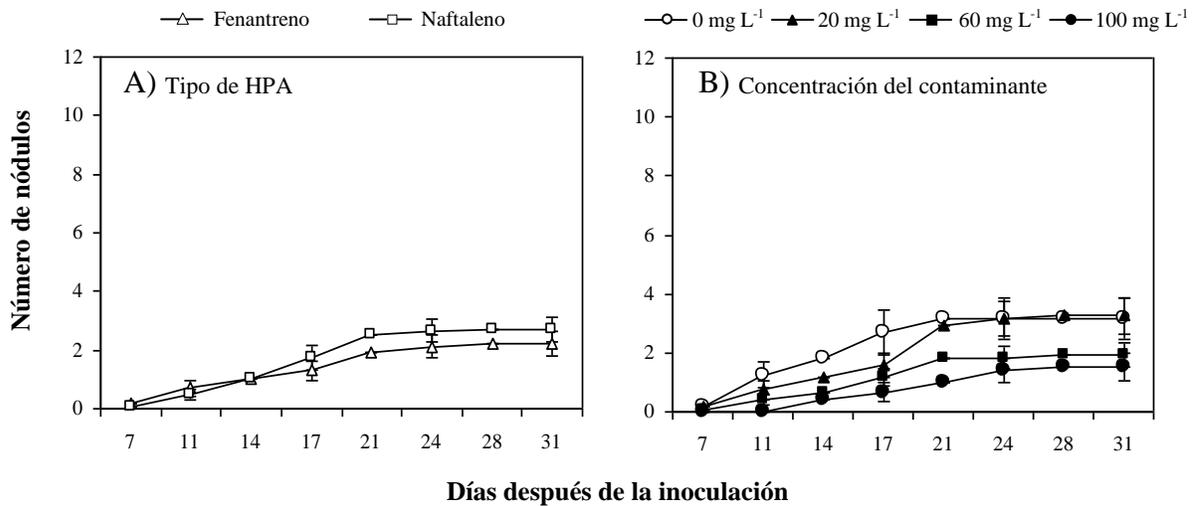


Figura 6. Dinámica de aparición de nódulos formados por *Rhizobium* en raíces de *Acaciella angustissima* durante 31 días de establecidas en sistema “growth pouch” atendiendo a los factores independientes: A) tipo de hidrocarburo (n=24), y B) concentración del contaminante (n=12). Medias \pm Error estándar.

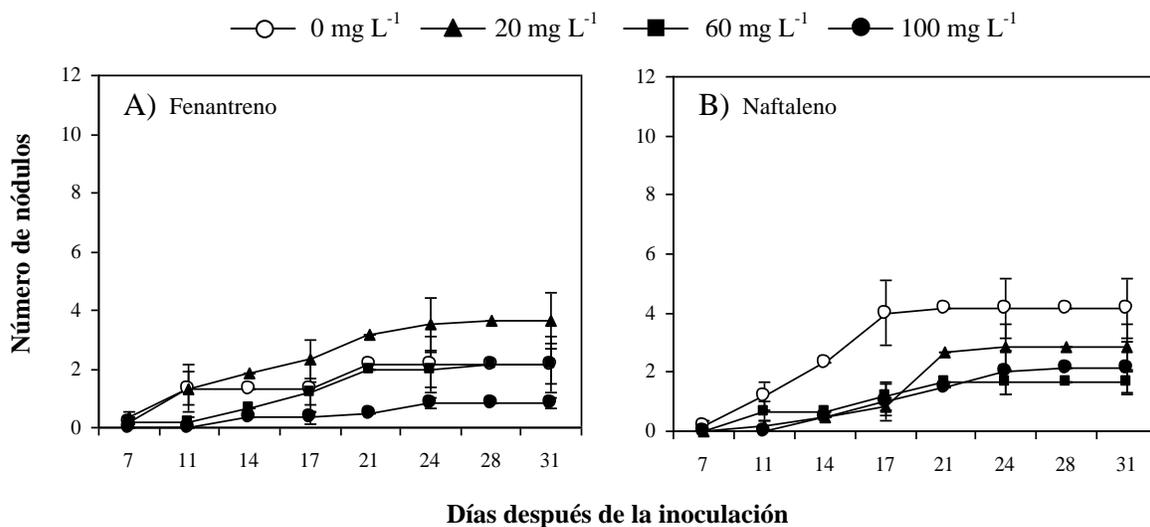


Figura 7. Dinámica de aparición de nódulos formados por *Rhizobium* en raíces de *Acaciella angustissima* durante 31 días de establecidas en sistema “growth pouch” en presencia de contaminación con dos hidrocarburos policíclicos aromáticos. n=6. Medias \pm Error estándar.

En el caso de tratamientos, las plantas expuestas a 20 mg FEN L⁻¹ mostraron hasta el día 31, mayor número de nódulos (3.7), en comparación con las concentraciones de 0, 60 y 100 mg FEN L⁻¹ que disminuyeron la formación de nódulos, con 2.2, 2.2 y 0.8, respectivamente (Figura 7A). Por otro lado, las plantas expuestas al NAF mostraron la tendencia de retardar significativamente la aparición de nódulos al incrementar la concentración de este hidrocarburo poliaromático (Figura 7B), especialmente ante 60 y 100 mg NAF L⁻¹ en comparación con el testigo, como en el caso de *Leucaena*.

Peso seco total de *Leucaena leucocephala*

El peso seco total de *Leucaena* mostró diferencias significativas únicamente por el factor inoculación y el tratamiento ($P < 0.001$) (ver Apéndice II). La inoculación con *Rhizobium* resultó en 150% mayor biomasa seca con respecto a las plantas no inoculadas (Figura 8). En lo que respecta a tratamientos, las plantas inoculadas en presencia 100 mg FEN L⁻¹ tuvieron mayor biomasa seca (Figura 8A), mientras que el tratamiento con el menor PST correspondió a las plantas no inoculadas expuestas a 60 mg NAF L⁻¹ (Figura 8B).

Peso seco total de *Acaciella angustissima*

El peso seco total de *Acaciella* mostró diferencias significativas por el factor inoculación ($P < 0.001$), concentración de contaminante ($P < 0.05$) y el tratamiento ($P < 0.01$); mientras que el tipo de contaminante no tuvo efectos significativos en el PST producido. La inoculación con *Rhizobium* resultó en 102% mayor biomasa seca con respecto a las plantas no inoculadas. Por efecto del factor independiente concentración del contaminante, las plantas expuestas a 20 mg L⁻¹ presentaron mayor PST en comparación a las expuestas a 0, 60 y 100 mg L⁻¹.

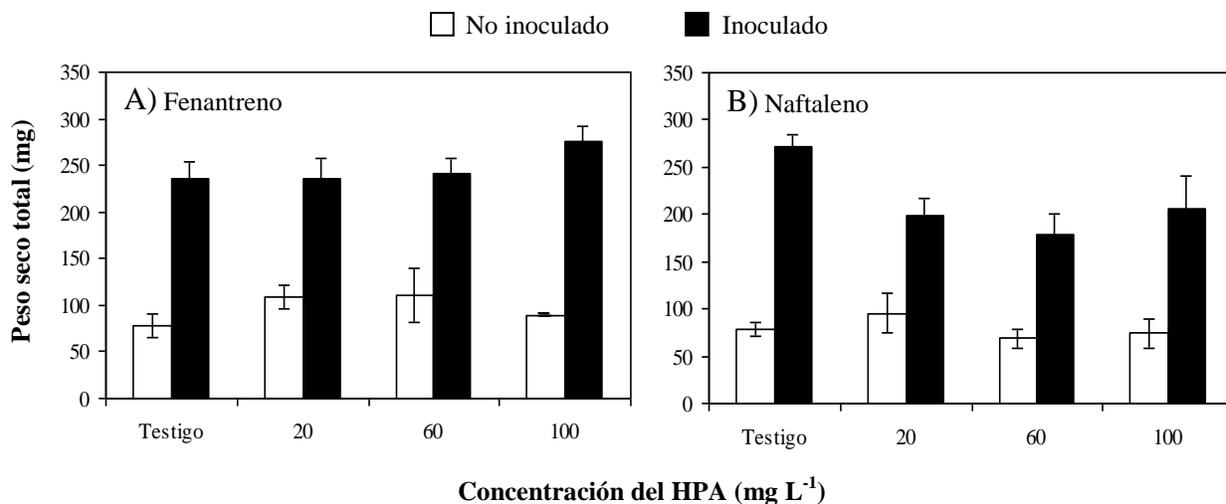


Figura 8. Peso seco total de *Leucaena leucocephala* inoculadas y no inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y expuestas a dos hidrocarburos policíclicos aromáticos durante 31 días. A) Fenantreno, B) Naftaleno. n=4. Medias \pm Error estándar.

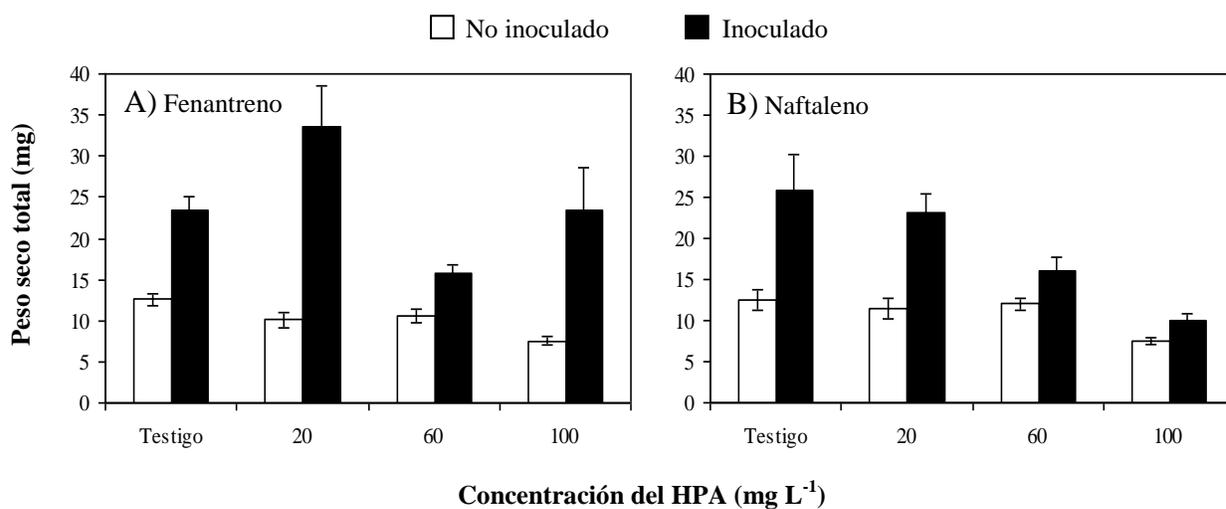


Figura 9. Peso seco total de *Acaciella angustissima* inoculadas y no inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y expuestas a dos hidrocarburos policíclicos aromáticos durante 31 días. A) Fenantreno, B) Naftaleno. n=4. Medias \pm Error estándar.

En lo que respecta a tratamientos, las plantas inoculadas en presencia de 20 mg FEN L⁻¹ tuvieron mayor biomasa seca, mientras que los tratamientos con el menor PST correspondieron a las plantas no inoculadas expuestas a 100 mg FEN L⁻¹ y 100 mg NAF L⁻¹ (Figura 9A y B).

Compuestos fenólicos totales en *Leucaena leucocephala*

El contenido de CFT en hojas presentó diferencias significativas por efecto del tipo de contaminante, la inoculación ($P<0.001$), la concentración del HPA ($P<0.01$) y el tratamiento ($P<0.001$). En el caso del tipo de contaminante, las plantas expuestas al FEN presentaron significativamente mayor contenido de CFT (>36%) que las plantas expuestas al NAF (Figura 10A y C). Con respecto al factor inoculación, las plantas no inoculadas presentaron hasta 167% mayor contenido de CFT con respecto a las plantas con *Rhizobium* (Figura 10A y C). Por efecto del factor concentración de los HPA's, las plantas expuestas a 100 mg L⁻¹ y 60 mg L⁻¹ presentaron mayor concentración de CFT en comparación con plantas testigo sin contaminante, y con plantas con 20 mg L⁻¹ (Figura 10A y C). El tratamiento que presentó mayor contenido de CFT fueron las plantas no inoculadas expuestas a 60 mg FEN L⁻¹, mientras que las plantas inoculadas expuestas a 20 mg FEN L⁻¹ presentaron el menor contenido de CFT (Figura 10A y C).

En el caso de raíz, el tipo de contaminante, la inoculación, la concentración del HPA y el tratamiento presentaron efectos significativos ($P<0.001$), en el contenido de CFT. En el caso del tipo de contaminante, las raíces expuestas al NAF presentaron significativamente mayor contenido de CFT que aquellas expuestas al FEN (Figura 10B y D). Con respecto a la inoculación, las plantas con *Rhizobium* presentaron significativamente mayor contenido de CFT en comparación con las plantas no inoculadas (Figura 10B y D). Para el factor concentración de los hidrocarburos poliaromáticos, las plantas ante 60 mg L⁻¹ presentaron significativamente mayor concentración de CFT con respecto al resto de las plantas (Figura 10B y D). El tratamiento

que presentó mayor contenido de CFT en raíz fueron las plantas inoculadas expuestas a 100 mg NAF L⁻¹, mientras que las plantas no inoculadas expuestas a 100 mg FEN L⁻¹ presentaron el menor contenido de CFT (Figura 10B y D).

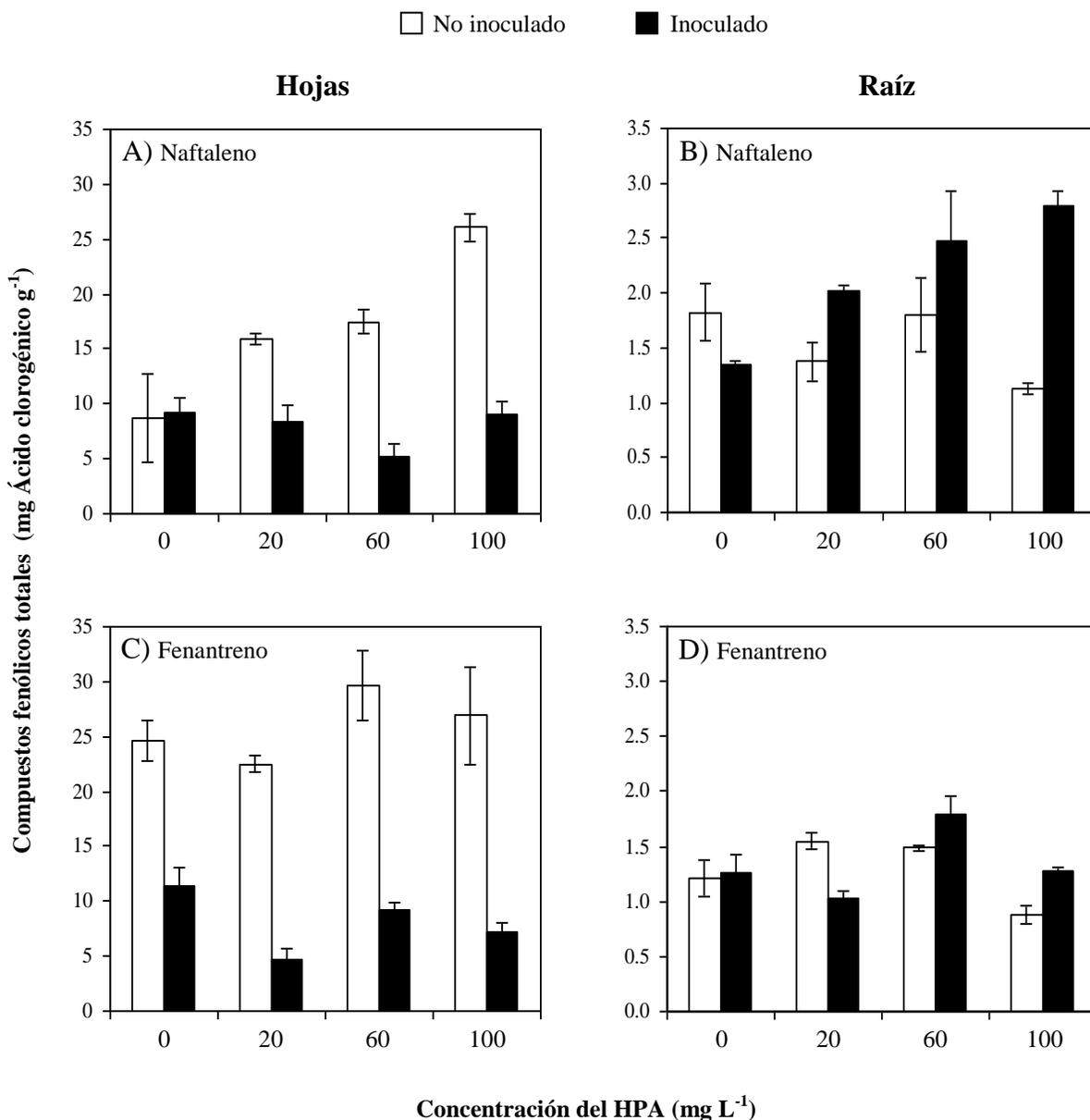


Figura 10. Compuestos fenólicos totales de *Leucaena leucocephala* en hojas (A y C) y raíz (B y D) expuestas a diferentes concentraciones de naftaleno (A y B) y fenantreno (C y D) por efecto de tratamiento, evaluados a los 31 días. n=16. Medias ± Error estándar.

El contenido de CFT en nódulos presentó efectos significativos por el tipo de contaminante ($P < 0.001$) y el tratamiento ($P < 0.01$). Los nódulos expuestos al FEN presentaron mayor concentración de CFT que aquellos expuestos a NAF (Figura 11). En el caso de la respuesta a la concentración del HPA, aunque sin presentar diferencias estadísticas, los nódulos expuestos a concentraciones de 60 mg L^{-1} presentaron mayor producción de CFT, en comparación con el resto de los tratamientos (Figura 11). El tratamiento que presentó mayor contenido de CFT en nódulos fueron las plantas expuestas a 20 mg FEN L^{-1} , mientras que las plantas expuestas a 20 mg NAF L^{-1} y $100 \text{ mg FEN L}^{-1}$ presentaron el menor contenido de CFT en nódulos (Figura 11).

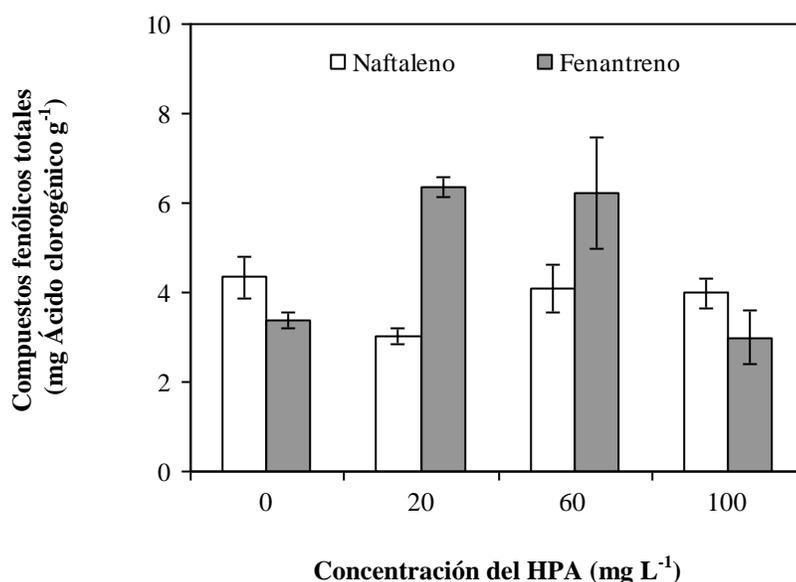


Figura 11. Compuestos fenólicos totales en nódulos de *Leucaena leucocephala* expuestos a diferentes concentraciones de dos hidrocarburos policíclicos aromáticos, durante 31 días. $n=16$. Medias \pm Error estándar.

Compuestos fenólicos totales en *Acaciella angustissima*

El contenido de CFT en hojas presentó diferencias significativas por efecto del tipo de contaminante, la inoculación ($P<0.001$), la concentración del HPA ($P<0.05$) y el tratamiento ($P<0.001$). En el caso del tipo de contaminante, las plantas expuestas a FEN presentaron, aunque no significativamente, mayor contenido de CFT que las plantas expuestas al NAF (Figura 12A y C). Con respecto al factor inoculación, las plantas no inoculadas presentaron hasta 100% mayor contenido de CFT con respecto a las plantas con *Rhizobium* (Figura 12A y C). Por efecto del factor concentración de los HPA's, las plantas expuestas a 20 mg L⁻¹ presentaron mayor concentración de CFT, aunque no estadísticamente diferente a los tratamientos con 60 y 100 mg L⁻¹. En contraste, las plantas testigo sin contaminación presentaron la menor concentración de CFT (Figura 12A y C). El tratamiento que presentó mayor contenido de CFT en hojas fueron las plantas no inoculadas expuestas a 60 mg FEN L⁻¹, mientras que las plantas inoculadas expuestas a 60 mg FEN L⁻¹ presentaron el menor contenido (Figura 12A y C).

En el caso de raíz, el tipo de contaminante, la inoculación, la concentración del HPA y el tratamiento presentaron efectos significativos ($P<0.001$) en el contenido de CFT. En el caso del tipo de contaminante, las raíces expuestas al NAF presentaron significativamente mayor contenido de CFT que aquellas expuestas al FEN (Figura 12B y D). Con respecto a la inoculación, las plantas con *Rhizobium* presentaron significativamente mayor contenido de CFT en comparación con las plantas no inoculadas (Figura 12B y D). Para el factor concentración de HPA, las plantas testigo no contaminadas presentaron significativamente mayor concentración de CFT en comparación con el resto de los tratamientos (Figura 12B y D). El tratamiento que presentó mayor contenido de CFT en raíz fueron las plantas inoculadas expuestas a 0 mg NAF L⁻¹, mientras que las plantas no inoculadas expuestas a 60 mg FEN L⁻¹ presentaron el menor contenido de CFT en raíz (Figura 12B y D).

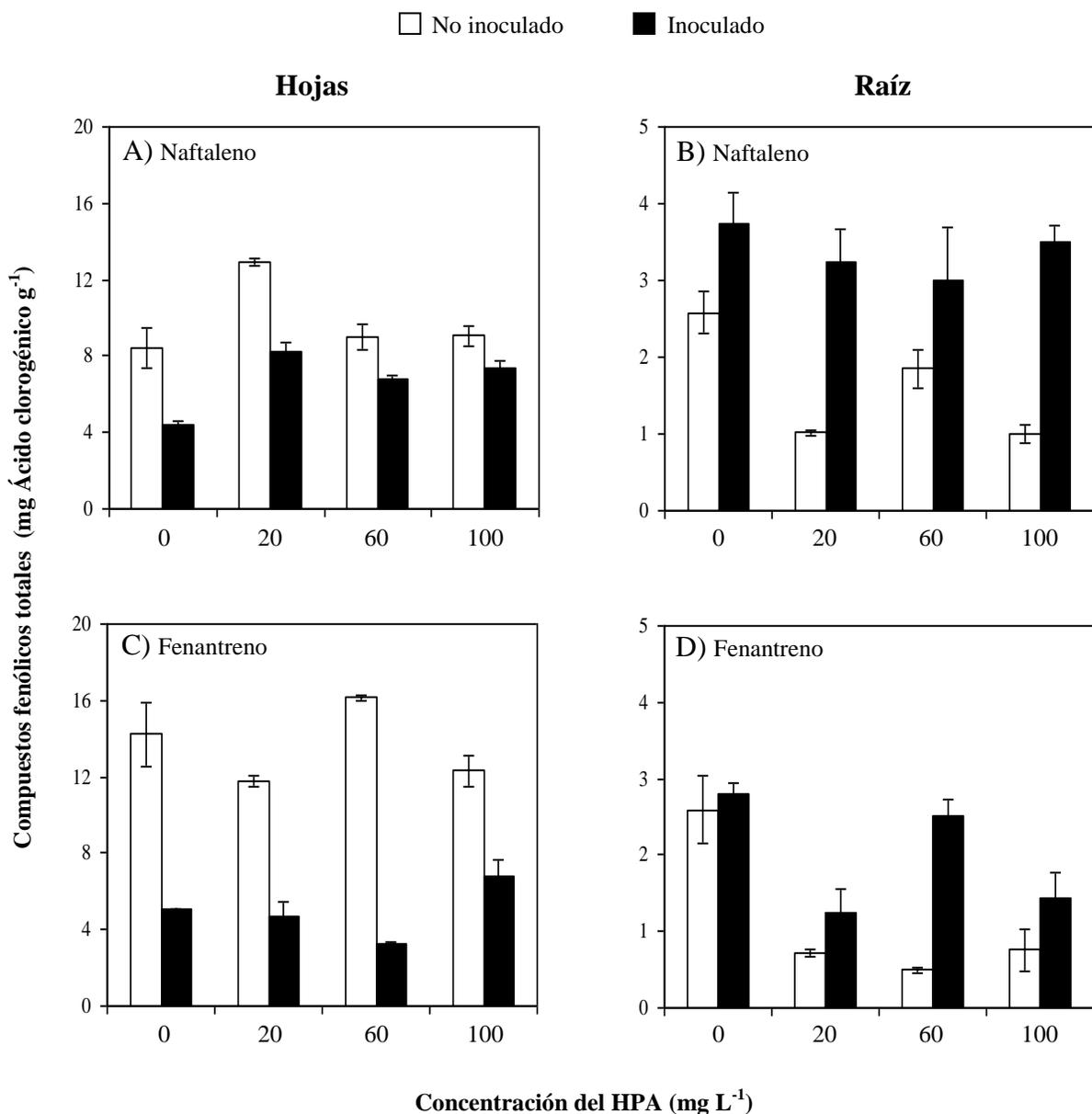


Figura 12. Compuestos fenólicos totales de *Acaciella angustissima* en hojas (A y C) y raíz (B y D) expuestas a diferentes concentraciones de naftaleno (A y B) y fenantreno (C y D) por efecto de tratamiento, evaluados a los 31 días. n=16. Medias \pm Error estándar.

En contenido de CFT en nódulos de *Acaciella angustissima* fue influenciado significativamente por el tipo de contaminante ($P < 0.001$). Contrario a lo ocurrido con *L. leucocephala*, los nódulos de *A. angustissima* expuestos al NAF presentaron mayor

concentración de CFT que los nódulos expuestos al FEN. El factor independiente concentración del HPA no tuvo efectos significativos en la producción de CFT; sin embargo, al igual que *en L. leucocephala*, los nódulos expuestos a concentraciones de 60 mg L⁻¹ y 20 mg L⁻¹ presentaron mayor producción de CFT (6.4 mg g⁻¹ y 5.8 mg g⁻¹, respectivamente), en comparación con el resto de los tratamientos (Figura 13). El tratamiento que presentó mayor contenido de CFT en nódulos fueron las plantas expuestas a 20 mg NAF L⁻¹, mientras que las plantas testigos expuestas a 0 mg FEN L⁻¹ presentaron el menor contenido de CFT (Figura 13).

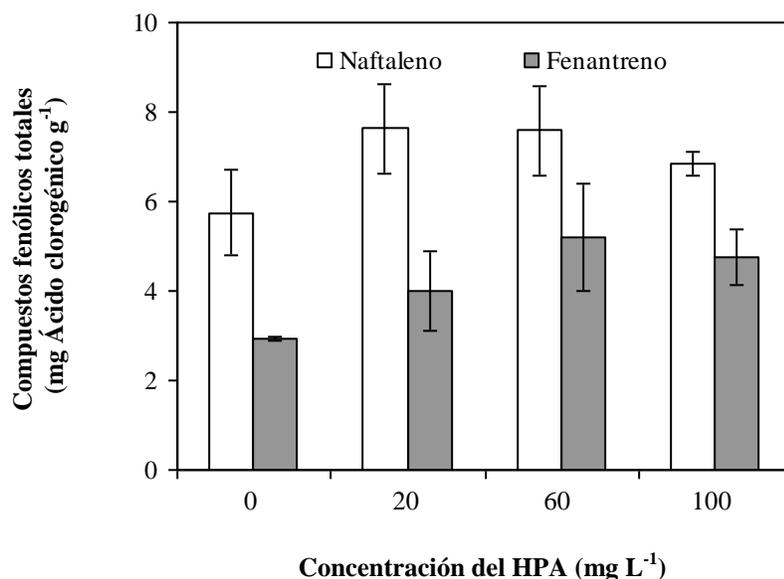


Figura 13. Compuestos fenólicos totales en nódulos de *Acaciella angustissima* expuestos a diferentes concentraciones de dos hidrocarburos policíclicos aromáticos, durante 31 días. n=16. Medias ± Error estándar.

Actividad antioxidante total en *Leucaena leucocephala*

La AAT en hojas presentó diferencias significativas por efecto de la inoculación, la concentración del HPA y el tratamiento ($P < 0.001$). Las plantas no inoculadas presentaron hasta

300% mayor AAT que las plantas con *Rhizobium* (Figura 14A y C). Para el caso de la concentración, las plantas expuestas a concentraciones de 100 mg L⁻¹ presentaron significativamente mayor AAT con respecto a los tratamientos restantes (Figura 14A y C). El tratamiento que presentó mayor AAT en hojas fueron las plantas no inoculadas expuestas a 100 mg FEN L⁻¹, mientras que las plantas inoculadas expuestas a 20 mg FEN L⁻¹ presentaron menor AAT (Figura 14A y C).

En la raíz, la AAT presentó efectos significativos por el tipo de contaminante, la inoculación, la concentración del HPA y el tratamiento ($P < 0.001$). Las raíces ante NAF presentaron significativamente mayor AAT con respecto al FEN (Figura 14B y D). Para el caso de la inoculación, las raíces sin *Rhizobium* presentaron significativamente mayor AAT que los tratamientos inoculados. En el caso de la respuesta a la concentración, las raíces ante concentraciones de 0 y 20 mg L⁻¹ presentaron significativamente mayor AAT en comparación con la concentración de 100 mg L⁻¹ en la que se obtuvo el menor valor (Figura 14B y D). El tratamiento que presentó mayor AAT en raíz fueron las plantas no inoculadas expuestas a 20 mg FEN L⁻¹, mientras que las plantas inoculadas expuestas a 20 mg FEN L⁻¹ presentaron la menor AAT (Figura 14B y D).

La AAT en nódulos fue afectada significativamente por el tipo de contaminante y el tratamiento ($P < 0.001$). Los nódulos expuestos al NAF presentaron mayor AAT comparados con los expuestos al FEN. En la respuesta al factor independiente concentración del contaminante, las plantas ante 100 mg L⁻¹ presentaron mayor AAT aunque no estadísticamente diferente al resto de los tratamientos (Figura 15). El tratamiento que presentó mayor AAT en nódulos fueron las plantas expuestas a 60 mg NAF L⁻¹, mientras que las plantas expuestas a 60 mg FEN L⁻¹ presentaron menor AAT (Figura 15).

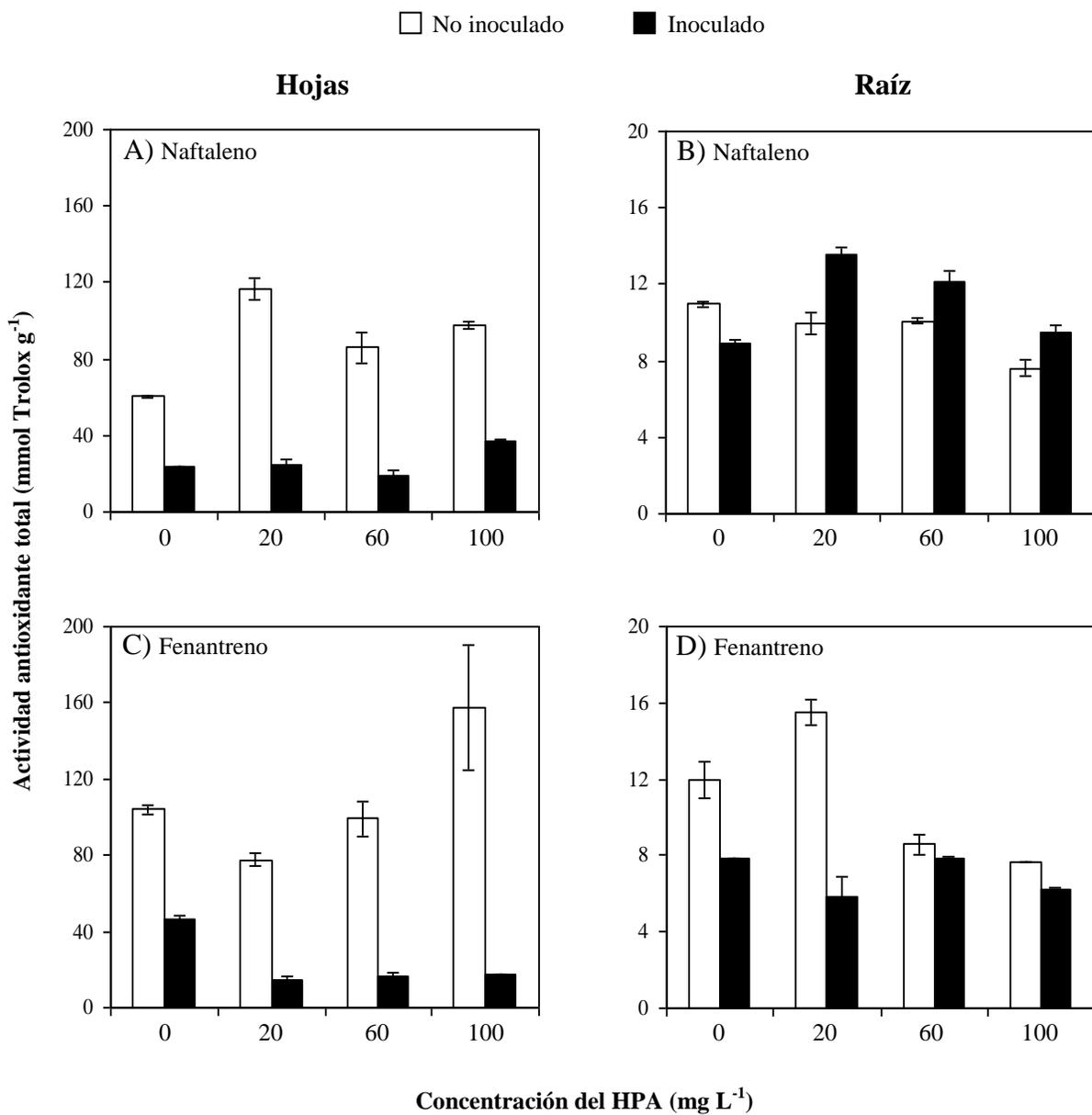


Figura 14. Actividad antioxidante total de *Leucaena leucocephala* en hojas (A y C) y raíz (B y D) expuestas a diferentes concentraciones de naftaleno (A y B) y fenantreno (C y D) por efecto de tratamiento, evaluados a los 31 días. n=16. Medias \pm Error estándar.

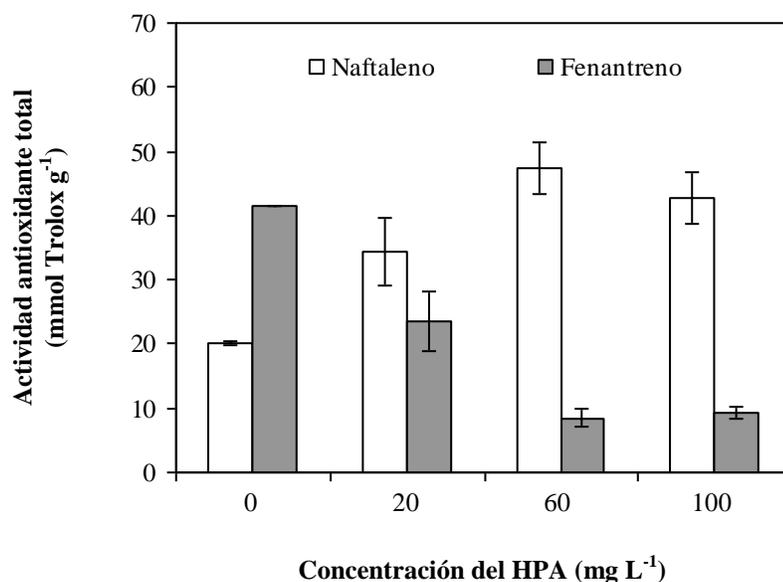


Figura 15. Actividad antioxidante total en nódulos de *Leucaena leucocephala* expuestos a diferentes concentraciones de dos hidrocarburos policíclicos aromáticos, durante 31 días. n=16. Medias \pm Error estándar.

Actividad antioxidante total en *Acaciella angustissima*

La AAT en hojas fue afectada significativamente por la inoculación, la concentración del HPA y el tratamiento ($P < 0.001$). Las plantas no inoculadas presentaron hasta 168% más AAT (117.67 mM Trolox g⁻¹) que las plantas inoculadas (43.87 mM Trolox g⁻¹). Para el caso del factor concentración de contaminante, las plantas expuestas a concentraciones de 100 mg L⁻¹ de HPA's presentaron significativamente mayor AAT comparadas con los tratamientos restantes (Figura 16A y C). El tratamiento que presentó mayor AAT en hojas fueron las plantas no inoculadas expuestas a 100 mg FEN L⁻¹, mientras que las plantas inoculadas expuestas a 60 mg FEN L⁻¹ presentaron menor AAT (Figura 16A y C).

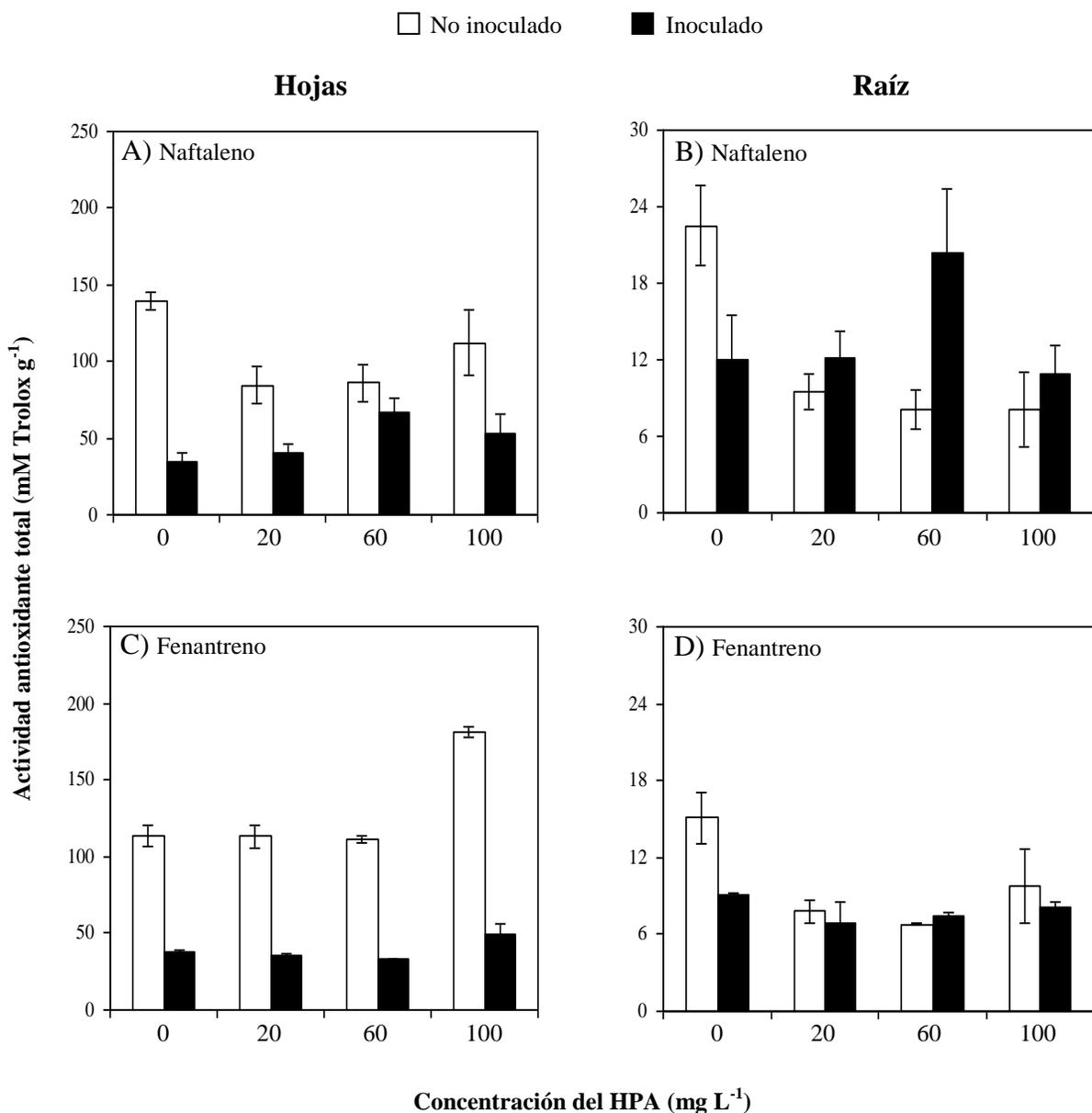


Figura 16. Actividad antioxidante total de *Acaciella angustissima* en hojas (A y C) y raíz (B y D) expuestas a diferentes concentraciones de naftaleno (A y B) y fenantreno (C y D) por efecto de tratamiento, evaluados a los 31 días. n=16. Medias \pm Error estándar.

En la raíz, la AAT fue afectada significativamente por el tipo de contaminante, la concentración del HPA y el tratamiento ($P < 0.001$). Las plantas expuestas al NAF presentaron 45% más AAT que las expuestas al FEN. En el caso de la respuesta al factor concentración, las

plantas testigo presentaron significativamente mayor AAT en relación con el resto de los tratamientos (Figura 16B y D). El tratamiento que presentó mayor AAT en raíz fueron las plantas no inoculadas expuestas a 0 mg NAF L⁻¹, mientras que las plantas no inoculadas expuestas a 60 mg FEN L⁻¹ presentaron menor la AAT (Figura 16B y D).

La AAT en nódulos fue afectada significativamente por el tipo de contaminante y el tratamiento ($P < 0.01$). Los nódulos expuestos al NAF presentaron mayor AAT en relación con los expuestos al FEN. El tratamiento que presentó mayor AAT en nódulos fueron las plantas expuestas a 100 mg NAF L⁻¹, mientras que 0 mg FEN L⁻¹ fue el tratamiento que presentó la menor AAT (Figura 17).

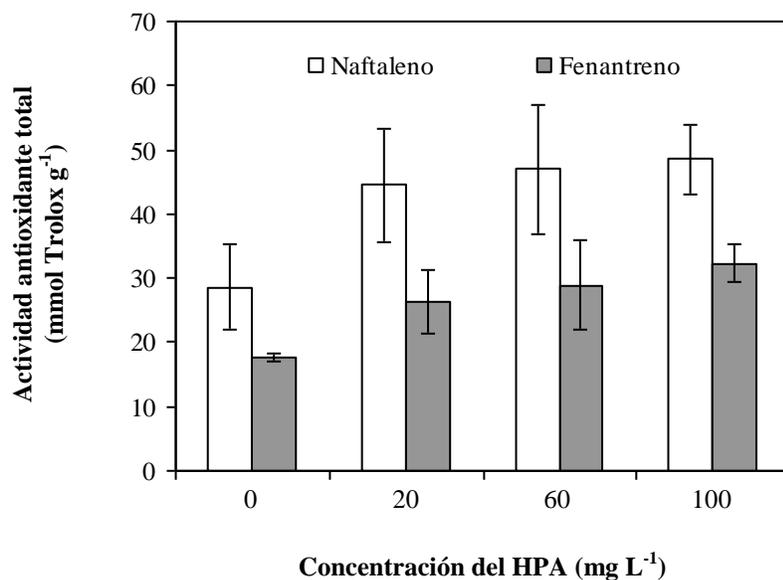


Figura 17. Actividad antioxidante total en nódulos de *Acaciella angustissima* expuestos a diferentes concentraciones de dos hidrocarburos policíclicos aromáticos, durante 31 días. n=16. Medias ± Error estándar.

Contenido clorofilas totales y carotenos en *Leucaena leucocephala*

En el caso del contenido foliar de clorofilas totales (CloroT), la inoculación, la concentración y el tratamiento ($P < 0.001$) presentaron efectos significativos. Las plantas con *Rhizobium* tuvieron mayor cantidad de CloroT con respecto a plantas no inoculadas (Figura 18A y C). En lo que respecta a la respuesta por el factor concentración del contaminante, las plantas sin contaminante presentaron significativamente mayor cantidad de CloroT que aquellas plantas ante 60 mg L^{-1} (Figura 18A y C). El tratamiento que presentó mayor cantidad de CloroT en hojas fueron las plantas inoculadas expuestas a 0 mg FEN L^{-1} (sin contaminar), mientras que las plantas no inoculadas expuestas a 60 mg FEN L^{-1} presentaron menor cantidad de CloroT (Figura 18A y C).

En el caso del contenido de carotenos totales (CaT), el tipo de contaminante, la inoculación, la concentración y el tratamiento ($P < 0.001$) presentaron efectos significativos. Las plantas ante FEN presentaron mayor contenido de CaT con respecto a las plantas expuestas al NAF (Figura 18B y D). En lo que se refiere al factor inoculación, las plantas sin *Rhizobium* tuvieron significativamente mayor cantidad de CaT que las plantas inoculadas (Figura 18B y D). En lo que respecta a la concentración del contaminante, las plantas ante 100 mg L^{-1} presentaron mayor cantidad de CaT que ante 20 mg L^{-1} (Figura 18B y D). El tratamiento que presentó mayor cantidad de CaT en hojas fueron las plantas no inoculadas expuestas a 60 mg FEN L^{-1} , mientras que las plantas inoculadas expuestas a 20 mg NAF L^{-1} presentaron menor cantidad de CaT (Figura 18B y D).

Contenido de clorofilas totales y carotenos en *Acaciella angustissima*

En el caso del contenido de CloroT, la inoculación, la concentración y tratamiento ($P < 0.001$) fueron diferencialmente significativos. En el caso del factor inoculación, las plantas

inoculadas presentaron hasta 46% mayor contenido de CloroT que las plantas no inoculadas. En lo que respecta a la respuesta por el factor concentración del contaminante, las plantas testigo presentaron hasta 64% mayor contenido de CloroT que las plantas expuestas a 20 mg de HPA's L⁻¹ (Figura 19A y C). El tratamiento que presentó mayor cantidad de CloroT en hojas fueron las plantas inoculadas expuestas a 0 mg NAF L⁻¹ (sin contaminar), mientras que las plantas no inoculadas expuestas a 60 mg FEN L⁻¹ presentaron menor cantidad de CloroT (Figura 19A y C).

En el caso del contenido de carotenos totales, la inoculación, la interacción contaminante x concentración ($P<0.05$) y el tratamiento ($P<0.01$) fueron diferencialmente significativos. Los factores independientes tipo de contaminante o concentración no tuvieron efectos significativos en el contenido de carotenos en *Acaciella*. Con respecto al factor inoculación, las plantas inoculadas presentaron significativamente mayor cantidad de carotenos que las plantas no inoculadas (Figura 19B y D). El tratamiento que presentó mayor cantidad de CaT en hojas fueron las plantas inoculadas expuestas a 0 mg NAF L⁻¹, mientras que las plantas inoculadas expuestas a 20 mg NAF L⁻¹ presentaron menor cantidad de CaT (Figura 19B y D).

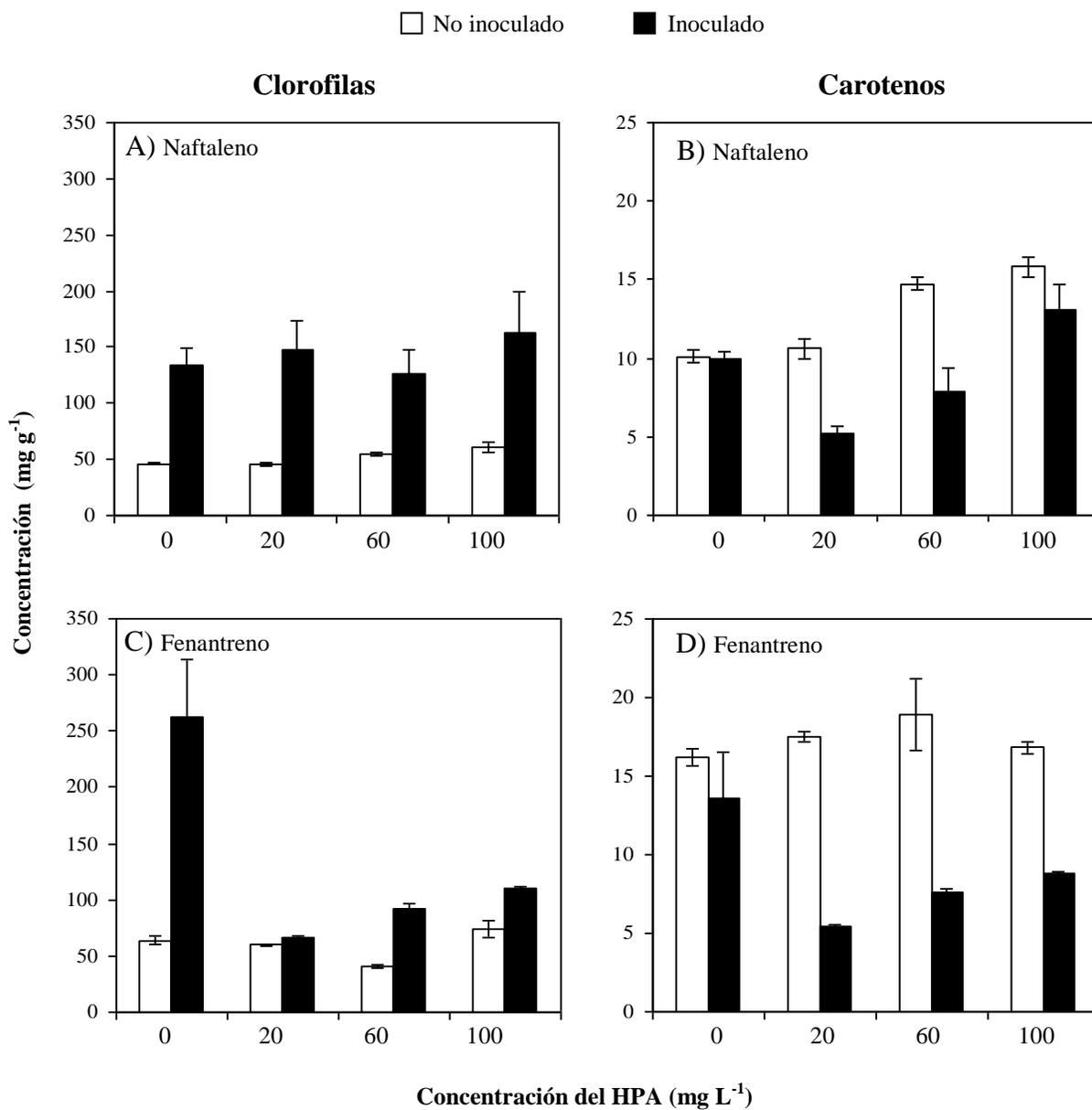


Figura 18. Clorofilas totales (A y C) y carotenos totales (B y D) en hojas de *Leucaena leucocephala* expuestas a diferentes concentraciones de naftaleno (A y B) y fenantreno (C y D) por efecto de tratamiento, evaluados a los 31 días. n=16. Medias \pm Error estándar.

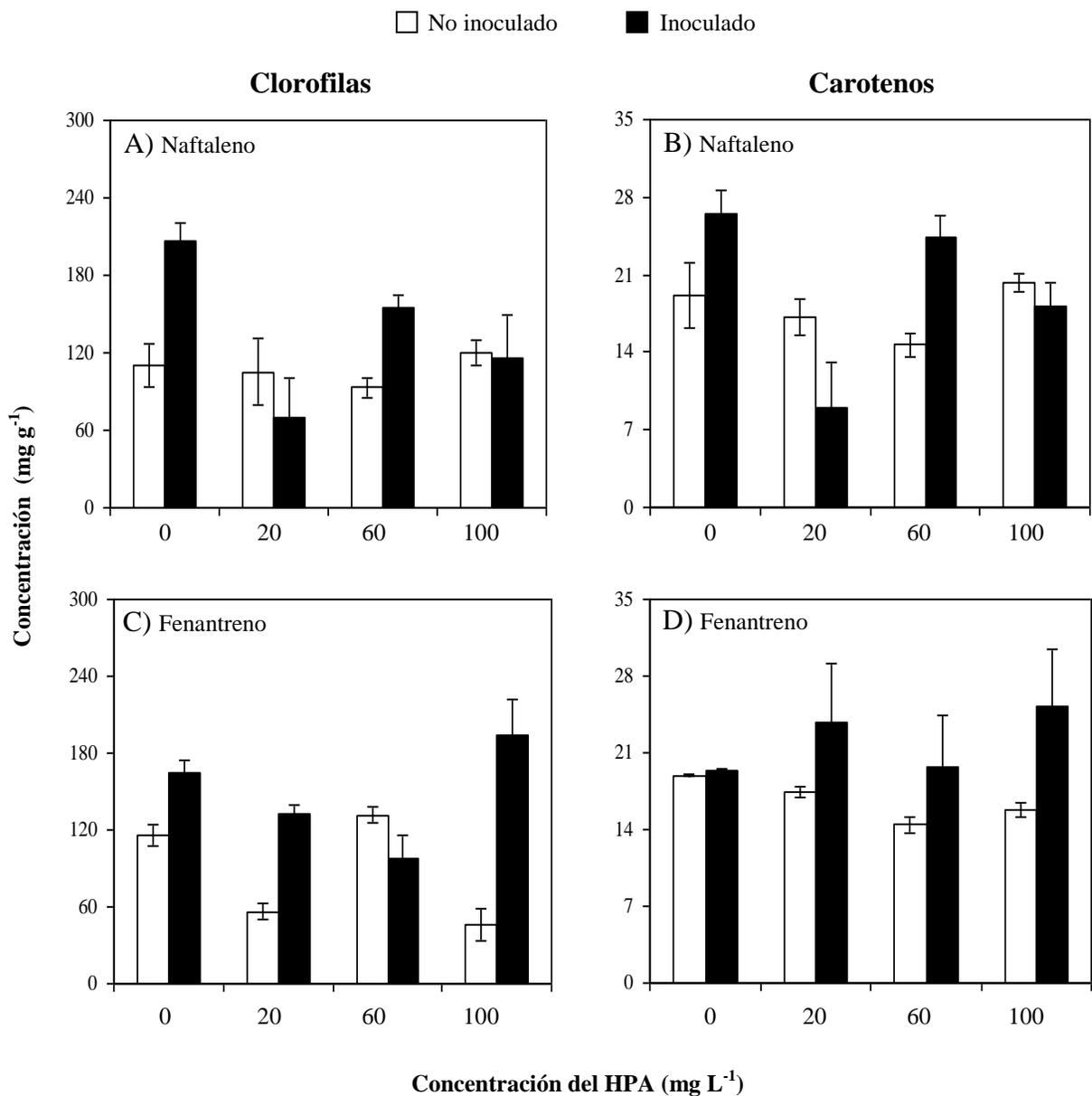


Figura 19. Clorofilas totales (A y C) y carotenos totales (B y D) en hojas de *Acaciella angustissima* expuestas a diferentes concentraciones de naftaleno (A y B) y fenantreno (C y D) por efecto de tratamiento, evaluados a los 31 días. n=16. Medias \pm Error estándar.

DISCUSIÓN

El NAF fue el HPA con mayor efecto negativo en la formación de nódulos en la simbiosis *Rhizobium-Leucaena*, mientras que el FEN lo hizo ligeramente para *Rhizobium-Acaciella*; por el contrario, para ambas especies, las plantas expuestas a 20 mg FEN L⁻¹ no mostraron diferencias significativas en comparación con el testigo, lo que permite proponer hacer nuevas investigaciones para conocer el efecto estimulante de este hidrocarburo poliaromático en el proceso inicial de reconocimiento *Rhizobium*-leguminosa. Estos resultados concuerdan con González-Paredes *et al.* (2007), al evaluar la simbiosis entre *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium tropici* CIAT899, y obtener una aparición más temprana de nódulos con FEN (20 mg L⁻¹) en comparación con su exposición a NAF o benzo(a)pireno. La formación más temprana de nódulos en plantas expuestas a bajas concentraciones de FEN se puede deber a una mayor producción de exudados radicales que el contaminante induce en la planta. Al respecto, Muratova *et al.* (2009) indican que 10 mg FEN kg⁻¹ estimula la producción de carbohidratos en las raíces de *Sorghum bicolor*.

Por otro lado, cantidades traza de flavonoides en los exudados radicales fueron reportados por primera vez por Lundegardh y Stenlid (1944). Los flavonoides son una clase de compuestos fenólicos que están activos a bajas concentraciones y que juegan un papel importante en las señales que establecen la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, al actuar como quimioatrayentes e influir en la expresión de los genes *nod* y estimulación del crecimiento de *Rhizobium* (Sundaravarathan y Kannaiyan, 2002).

Por otro lado, Rivera-Cruz *et al.* (2005) evaluaron el número de nódulos de cuatro especies de leguminosas tropicales, entre ellas *Leucaena* sp., donde observaron hasta 86% de disminución de nódulos al incrementar la concentración de petróleo en el suelo. Además, estos

investigadores concluyen que uno de los indicadores más sensibles para medir el efecto negativo de los hidrocarburos en el suelo es la formación de nódulos en plantas leguminosas. El presente trabajo muestra que la naturaleza química del HPA juega un papel importante en el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium-Leucaena* y *Rhizobium-Acaciella*.

En contraste con los resultados del presente trabajo, la contaminación con 1000 mg FEN kg⁻¹ incrementó el número de nódulos en algunas leguminosas como *Trifolium pratense* (Chiapusio *et al.*, 2007). En otros estudios, Ahmad *et al.* (1997) encontraron que algunas cepas de *Rhizobium meliloti* son capaces de habitar suelos contaminados con HPA's y compuestos cloroaromáticos, pero únicamente en presencia de su hospedante (*Medicago sativa*).

El efecto tóxico de los HPA's en el crecimiento y desarrollo de las plantas ha sido previamente reportado (Henner *et al.*, 1999; Baek *et al.*, 2004; Alkio *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2005; Muratova *et al.*, 2009). En el presente estudio, el PST no fue afectado significativamente por el tipo de HPA o la concentración del mismo, pero fue estimulado hasta 150% y 100% más por la inoculación con *Rhizobium* en *Leucaena* y *Acaciella*, respectivamente. La nula toxicidad de los HPA's en la biomasa de la planta, ha sido reportada en *Phaseolus nipponensis*, *Zea mays* y *Sorgum bicolor* cuando fueron expuestas a concentraciones bajas (10 mg kg⁻¹) de NAF y FEN (Baek *et al.*, 2004; Muratova *et al.*, 2009). Sin embargo, al exponer plantas de sorgo a concentraciones de 100 mg FEN kg⁻¹, éstas presentaron menor acumulación de biomasa y producción de ácidos carboxílicos, aminoácidos y carbohidratos en el sistema radical (Muratova *et al.*, 2009). Por otro lado, Cheema *et al.* (2009) encontraron que concentraciones de FEN y pireno menores a 200 mg kg⁻¹ no afectan significativamente la producción de biomasa seca de *Festuca arundinacea*. Los efectos tóxicos de los HPA's en la planta dependen de dos variables: 1) factores ambientales y 2) estructura química del contaminante, concentración y tiempo de exposición (Henner *et al.*, 1999; Baek *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2005). El presente estudio muestra

la capacidad de *Leucaena leucocephala* y *Acaciella angustissima* para tolerar concentraciones de 100 mg HPA's L⁻¹, sin afectar la producción de biomasa seca.

El contenido de CFT y la AAT fueron significativamente mayores en las plantas sin la inoculación de *Rhizobium* lo que sugiere que estas bacterias contribuyen en aminorar la posible toxicidad generada por los HPA's. El efecto tóxico de los HPA's puede relacionarse con la producción exacerbada de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las que se incluyen el H₂O₂, el O₂²⁻ y HO⁻, las cuales pueden servir como moléculas de señalización y/o como subproductos citotóxicos. Bajo condiciones fotosintéticas y respiratorias normales, estos compuestos se producen en las cadenas de transporte de electrones en cloroplastos y mitocondrias, y son subproductos de rutas metabólicas en el peroxisoma (Vranova *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2009). Debido a que las ROS atacan químicamente nucleótidos, proteínas, carbohidratos y ácidos grasos, las plantas deben tener mecanismos bioquímicos para neutralizarlas (Moller *et al.*, 2007). Por el contrario, bajo condiciones de estrés, las plantas utilizan niveles bajos de ROS como señalización que dan lugar a respuestas complejas a la defensa o detoxificación de sustancias externas (Liu *et al.*, 2009).

En el presente trabajo, el estrés inducido por el tipo de HPA's y la concentración del mismo pueden estar contribuyendo al incremento en la producción de ROS que pueden causar efectos negativos en las células de las plantas (Mittler, 2002). Ante tal estrés, las plantas activan respuestas metabólicas específicas como son la síntesis y/o la actividad de compuestos enzimáticos o no enzimáticos con poder antioxidante (Mittler, 2002; Lee *et al.*, 2007), así como compuestos fenólicos, los cuales participan en la limpieza de ROS (Treutter, 2005). En este trabajo, las plantas de *Leucaena* y *Acaciella* no inoculadas tuvieron mayor contenido de CFT y AAT, mismos que podrían estar relacionados con la eliminación de ROS inducidas por el estrés causado por la contaminación, en donde la presencia de *Rhizobium* puede tener un papel

relevante en la tolerancia de estas leguminosas arbóreas ante los HPA's. Estas respuestas reflejan ciertos efectos benéficos de *Rhizobium* en plantas expuestas a HPA's, al inducir mayor resistencia en estas condiciones adversas.

Las respuestas fisiológicas como el contenido de CFT, AAT y clorofilas y carotenos totales han sido poco descritas para plantas expuestas a hidrocarburos del petróleo o HPA's. Al respecto, Liu *et al.* (2009) encontraron una reducción en los niveles de clorofila *a*, *b* y total en *Arabidopsis thaliana* ante diferentes concentraciones de FEN. Lo anterior, confirma el efecto de la concentración del contaminante en la reducción del contenido de CloroT en plantas expuestas a FEN en comparación con las plantas testigo no contaminadas.

Los resultados de este trabajo soportan la hipótesis que *Leucaena* y *Acaciella* experimentan un estrés oxidativo en presencia de HPA's, el cual es atenuado por *Rhizobium* en el sistema radical de las plantas. Dado que no existen comparaciones en simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, se cuenta que de manera análoga, la simbiosis micorrízica atenúa este tipo de estrés en las plantas. Por ejemplo, Debiane *et al.* (2008, 2009) reportaron que *Glomus intraradices* reduce notablemente el daño oxidativo en *Chichorium intybus* causado por la presencia de antraceno y benzo(a)pireno. Sin embargo, estos mismos autores afirman que la presencia de los HPA's también reduce la densidad de hifas, la intensidad de esporulación del hongo y el tamaño de las raíces de *C. intybus*.

El presente trabajo es uno de los primeros en evaluar el efecto de dos HPA's en el sistema simbiótico *Rhizobium*-*Leucaena* y *Rhizobium*-*Acaciella* y contribuye al conocimiento de las respuestas de aquellos procesos fisiológicos que limiten la capacidad de las plantas y sus simbiontes de tolerar compuestos aromáticos recalcitrantes.

CONCLUSIONES

La contaminación con NAF y/o FEN tuvo efectos tóxicos para la formación de nódulos en ambas especies vegetales. Sin embargo, mientras que *Leucaena* fue más susceptible al NAF, *Acaciella* fue ligeramente más susceptible a la contaminación por FEN, demostrando que las propiedades químicas de cada HPA actúan de forma distinta en estas dos leguminosas arbóreas.

Para ambas especies, las plantas expuestas a 20 mg FEN L⁻¹ no mostraron diferencias significativas en la formación de nódulos.

La presencia de la simbiosis con *Rhizobium*, incrementó el PST hasta en un 150% en el caso de *Leucaena*, y en un 100% en el caso de *Acaciella*, comparado con las plantas no inoculadas, demostrando, de esta forma, el efecto benéfico que proporciona la bacteria a la planta.

Para ambas especies, el contenido de CFT en hojas fue significativamente mayor en los tratamientos no inoculados comparada con los tratamientos inoculados con *Rhizobium*, y significativamente mayor en las plantas expuestas a FEN comparadas con las expuestas a NAF.

L. leucocephala y *A. angustissima* experimentan un estrés oxidativo inducido por HPA's, y este estrés es mayor en ausencia de *Rhizobium* y en presencia de fenantreno.

Para ambas plantas, la exposición a 100 mg L⁻¹ del HPA, mostró mayor producción de CFT y AAT en hojas, en comparación con bajas concentraciones. La inoculación con *Rhizobium* redujo significativamente la producción de CFT y AAT en hojas de ambas especies.

En ambas especies, el tipo de HPA no tuvo efectos significativos en el contenido de CloroT y CaT. Sin embargo, el contenido de CloroT fue mayor en plantas con *Rhizobium*.

CAPÍTULO V

RESPUESTAS FISIOLÓGICAS DE DOS LEGUMINOSAS ARBÓREAS EN SIMBIOSIS CON *Rhizobium tropici* Y CAPACIDAD DE DEGRADACIÓN DE FENANTRENO

RESUMEN

Este estudio evaluó la degradación de 60 mg FEN kg⁻¹ de arena estéril, así como la actividad de la enzima nitrogenasa (ANitro) en la rizósfera *Leucaena leucocephala* Lam. y *Acaciella angustissima* Mill. y la combinación de ambas (*Leucaena+Acaciella*), inoculadas con *Rhizobium*, o con la aplicación de NH₄NO₃ (Ninorg) como fuente de nitrógeno. A los 40 días, la combinación *Leucaena+Acaciella* presentó mayor número de nódulos en comparación con *Leucaena* y *Acaciella* en tratamientos separados. La presencia de 60 mg FEN kg⁻¹ no afectó la formación de nódulos con respecto a las plantas establecidas en arena no contaminada. Las plantas inoculadas con *Rhizobium* presentaron significativamente mayor peso seco total con respecto a las plantas con Ninorg, y con aquellas sin aporte de nitrógeno. *Leucaena* presentó significativamente mayor ANitro con respecto a la combinación *Leucaena+Acaciella*, y con *Acaciella*. Aunque no se mostraron diferencias significativas, las plantas en arena no contaminada mostraron mayor ANitro con respecto a plantas con 60 mg FEN kg⁻¹. El factor fuente de nitrógeno tuvo efectos significativos (P<0.001) en la degradación de FEN en la rizósfera de *Leucaena*, *Acaciella* y *Leucaena+Acaciella*. Sin embargo, la presencia o no de la planta no influyó significativamente en la degradación del FEN. Por efecto de la planta, el FEN fue degradado en 98.4% en *Acaciella*, 98.2% en el testigo sin planta, 98.1% en *Leucaena* y 98% en *Leucaena+Acaciella*. Para el factor fuente de N, los tratamientos inoculados con *Rhizobium* presentaron significativamente mayor degradación de FEN (99.5%) en comparación con aquellos tratamientos con Ninorg y sin fuente de nitrógeno (97.5 y 97.5%, respectivamente).

Palabras claves: fenantreno, rizodegradación, actividad nitrogenasa, leguminosa

ABSTRACT

This study evaluated the degradation of 60 mg FEN kg⁻¹ as well as the activity of the enzyme nitrogenase in the rhizosphere of two legume trees (*Leucaena leucocephala* Lam. and *Acaciella angustissima* Mill.) inoculated with *Rhizobium*, or with or without the application of NH₄NO₃ (Ninorg) as nitrogen source. After 40 days of experimentation, the *Leucaena*+*Acaciella* combination had greater number of nodules in comparison with *Leucaena* and *Acaciella* alone. The application of 60 mg FEN kg⁻¹ did not affect the formation of nodules with respect to the control without FEN. The *Leucaena*+*Acaciella* combination showed greater dry weight when compared to *Leucaena* and *Acaciella* alone. Plants inoculated with *Rhizobium* had significantly greater PST than plants with or without Ninorg. *Leucaena* presented greater activity of the enzyme nitrogenase (ANitro) in comparison to the combination of *Leucaena*+*Acaciella*, and *Acaciella* alone. Plants without FEN tended to have higher ANitro than plants with FEN. The nitrogen source factor had significant effects on the degradation of FEN in the rhizosphere of *Leucaena*, *Acaciella* and *Leucaena*+*Acaciella*. Nevertheless, the presence of the plant did not influence significantly the degradation of FEN. Thus, the FEN was degraded up to 98.4% in *Acaciella*, 98.2% in the controls without plants, 98.1% in *Leucaena*, and 98% in *Leucaena*+*Acaciella*. With respect to the factor source of N, treatments inoculated with *Rhizobium* showed significantly greater degradation of FEN (99.5%) than those treatments with Ninorg and without nitrogen, whose degradation percentage was 97.5 and 97.5%, respectively.

Key words: phenanthrene, rhizodegradation, nitrogenase activity, legumes

INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA's) son compuestos orgánicos ampliamente distribuidos en el ambiente, potencialmente peligrosos por sus características carcinogénicas y recalcitrantes (Wilcke, 2000). Estudios recientes han demostrado que las plantas sufren estrés oxidativo a causa de la exposición a los HPA's (Liu *et al.*, 2009), y que ese estrés puede ser contrarrestado por microorganismos simbióticos de las plantas (Debiane *et al.*, 2009).

La rizodegradación es un mecanismo dentro de la fitorremediación que busca aumentar la degradación de compuestos orgánicos contaminantes como los hidrocarburos, mediante el uso de plantas y la asociación microorganismos-raíz (Chiapusio *et al.*, 2007). Estudios recientes han demostrado que algunas plantas incrementan la degradación de diversos compuestos orgánicos en suelos contaminados (Gan *et al.*, 2009). Sin embargo, se conoce poco acerca de la participación directa o indirecta, de las interacciones simbióticas y de los mecanismos y etapas que ayudan a la transformación de estos compuestos (López-Martínez *et al.*, 2005). En este sentido, la rizósfera de las plantas leguminosas representa un hábitat ideal para microorganismos degradadores de hidrocarburos (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2008).

Recientemente Joner *et al.* (2002) demostraron que los microorganismos degradadores de hidrocarburos, como los HPA's, muestran las más altas poblaciones en presencia de exudados radicales. Además, los niveles de biodegradación de HPA's y de poblaciones bacterianas están en función de la distancia en que estos se encuentran de la raíz de la planta (Corgié *et al.*, 2003, 2004), debido a que las raíces liberan exudados radicales, los cuales son fuente de carbono para los microorganismos, y éstos últimos liberan enzimas encargadas de la degradación de los contaminantes orgánicos (Atlas y Bartha, 2002). La efectividad de algunas leguminosas (*Crotalaria incana*, *Leucaena leucocephala*, *Medicago sativa*, *Phaseolus coccineus*) como

indicadores de toxicidad en suelos contaminados con HPA's e hidrocarburos totales del petróleo ha sido descrita previamente (Vázquez-Luna *et al.*, 2010; Muratova *et al.*, 2003; Ferrera-Cerrato *et al.*, 2008), aunque el efecto de estos en el sistema simbiótico rizobio-leguminosa ha recibido poca atención.

Pocos trabajos han estudiado el impacto de la inoculación con *Rhizobium* y la interacción de dos o más leguminosas en la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos (Johnson *et al.*, 2004). Los rizobios juegan un papel muy importante en estas interacciones pues estimulan el crecimiento aéreo y radical de las plantas, aún cuando se presentan limitaciones de nutrimentos como el N (Dashti *et al.*, 2009). Se sabe que los rizobios incrementan los exudados radicales en las raíces de sus hospedantes (Phillips y Streit, 1996). Al incrementarse los exudados radicales se pueden incrementar las poblaciones microbianas que usan al contaminante como una fuente de carbono. Damaj y Ahmad (1996) demostraron que los rizobios tienen la capacidad de degradar compuestos haloaromáticos y compuestos tan complejos como los bifenilos policlorados. Sin embargo, la habilidad de rizobios en simbiosis con leguminosas para degradar ciertos contaminantes es todavía desconocida (Johnson *et al.*, 2004).

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la adaptación y degradación de fenantreno por *Rhizobium tropici* CIAT asociado a las raíces de *Leucaena leucocephala*, *Acaciella angustissima* y la combinación de estas especies, durante 40 días.

MATERIALES Y MÉTODOS

Semillas de *Leucaena leucocephala* (Lam.) y *Acaciella angustissima* (Mill.) se escarificaron con H_2SO_4 al 90% durante 15 minutos y posteriormente se desinfectaron superficialmente con NaClO durante 10 minutos. Posteriormente, las semillas fueron puestas a germinar (en grupos de seis) en frascos de vidrio previamente esterilizados y con agar-agua al 1%.

A los cinco días después de la germinación, las plántulas (*Leucaena*, *Acaciella*, y la combinación *Leucaena+Acaciella*) fueron transferidas a tubos tipo Falcón que contenían 65 g de arena estéril contaminada con fenantreno (FEN). El FEN fue disuelto en diclorometano y aplicado a la arena para obtener una concentración final de 60 mg kg^{-1} . Posteriormente, la arena fue mezclada hasta su completa homogenización y se dejó reposar un día hasta el transplante de las plántulas. Además se incluyeron plantas en un sistema no contaminado (0 mg L^{-1}) como tratamiento testigo, y se consideraron tratamientos sin planta en arena contaminada y no contaminada como controles para cuantificar la degradación natural del FEN (Figura 20).

A los tres días del transplante, algunos tratamientos fueron inoculados con 2.0 mL de la cepa de *Rhizobium tropici* CIAT899 ($720 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$). Todos los tratamientos fueron irrigados diariamente con 2 mL de la solución nutritiva Fahraeus (ver Apéndice I) (Fahraeus, 1957) sin nitrógeno. Sin embargo, se consideraron tratamientos sin la inoculación de la bacteria y con la aplicación de solución nutritiva Fahraeus (ver Apéndice I) que contenía $20 \text{ mg NH}_4\text{NO}_3 \text{ L}^{-1}$, además de los testigos sin inoculación de la bacteria y sin Ninorg (Figura 20).

El experimento se mantuvo durante 40 días en condiciones de cámara de crecimiento de ambiente controlado con 12 h de fotoperiodo; la temperatura máxima/mínima y humedad relativa máxima/mínima promedio fueron $26.0/24.0^\circ\text{C}$ y 65/70%, respectivamente.



Figura 20. Esquema de los 24 tratamientos que conformaron la segunda fase experimental. Factores: Contaminación (Con y sin 60 mg FEN kg⁻¹ de arena); Planta (*Leucaena*, *Acaciella*, *Leucaena+Acaciella*, sin planta), Fuente de nitrógeno (*Rhizobium*, con Ninorg, sin nitrógeno).

Las plantas se cosecharon a los 40 días después de establecerse el ensayo, se secaron a 70°C durante 72 h y se determinó el peso seco total (PST) que correspondió a la suma del peso seco de hojas, raíz y nódulos, en el caso de las inoculadas con *Rhizobium*.

La actividad de la enzima nitrogenasa (ANitro) fue determinada mediante la prueba de reducción de acetileno (Hardy *et al.*, 1968). La raíz de cada unidad experimental fue colectada y colocada en viales transparentes de vidrio de 60 mL que fueron sellados herméticamente con un tapón de goma. Posteriormente, el 10% del volumen de aire fue extraído y remplazado por 10% de acetileno. Después de una hora se extrajeron 3 mL de la fase gaseosa y se transfirieron a tubos al vacío (Vacutainer®) de 10 mL. Las muestras obtenidas se analizaron inyectando 0.6 mL de éstas a un cromatógrafo de gases Varian (3300 Gas Chromatograph) y con detector de ionización de flama de hidrógeno. Las temperaturas del inyector y detector fueron de 95°C y 105°C, respectivamente, para medir la cantidad de acetileno reducido a etileno y, de esta forma, estimar la actividad de la enzima nitrogenasa (Hardy *et al.*, 1968). Los resultados fueron expresados en nM de etileno h⁻¹ vial⁻¹.

La degradación del FEN se determinó mediante la extracción y cuantificación del FEN al inicio (inmediatamente después de la contaminación) al final del experimento (40 días). Para la extracción del FEN se utilizó diclorometano como disolvente y agitación mecánica (Schwab *et al.*, 1999). Brevemente, a un tubo de vidrio de 50 mL con tapa de rosca se le agregaron 3 g de sulfato de sodio (Na₂SO₄) para absorber el agua de la muestra de arena (5 g) procedente de cada tratamiento contaminado y 10 mL de diclorometano (CH₂Cl₂). Los tubos se colocaron horizontalmente en una agitadora rotatoria durante 1 h a 250 rpm. Después de la agitación, los tubos se colocaron en una centrifuga a 3000 rpm durante 15 min. El sobrenadante fue extraído con una pipeta Pasteur y colocado en viales color ámbar. Posteriormente, se volvieron a agregar 10 mL de CH₂Cl₂ a los tubos y se repitió el procedimiento dos veces más para garantizar la

mayor extracción posible del hidrocarburo poliaromático (Schwab *et al.*, 1999). Los extractos fueron disueltos en 500 μL de hexano y analizados mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS) utilizando un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890 y un espectrómetro de masas Agilent Technologies 5975 y una columna capilar DB-5 (5%-fenil)-metilpolisiloxano (60 m, 250 μm i.d., 0.25 μm de espesor de película). Las temperaturas del inyector y detector fueron de 250°C y 280°C, respectivamente; y se utilizó Helio como gas acarreador (1.0 mL min^{-1}). La temperatura de inicio fue 70°C (5.0 min) e incrementada a 280°C a una velocidad de 40°C min^{-1} y mantenida por 35 min. El FEN fue identificado con base en su tiempo de retención y comparación de su espectro de masas a 70 eV con una base de datos HPChemstation-NIST 05, Mass Spectral Search Program, versión 2.0d. Además de la comparación con un estándar de FEN (Sigma-Aldrich con 98% de pureza) analizado bajo las mismas condiciones. Los cromatogramas del GC/MS mostraron la degradación del FEN.

Para los análisis de peso seco total se utilizó un experimento factorial 2x3x3, que incluyó 18 tratamientos con seis repeticiones, distribuidos en un diseño experimental completamente al azar. Los factores de estudio fueron: contaminación (con y sin 60 mg FEN kg^{-1}), especie vegetal (*Leucaena*, *Acaciella* y la combinación *Leucaena+Acaciella*) y fuente de nitrógeno (inoculación con *Rhizobium*, Ninorg y sin N).

Para los análisis de la actividad de la enzima nitrogenasa y número de nódulos, se utilizó un experimento factorial 2x3, que incluyó seis tratamientos con tres repeticiones, distribuidos en un diseño experimental completamente al azar. Los factores de estudio fueron: contaminación (con y sin 60 mg FEN kg^{-1}) y especie vegetal (*Leucaena*, *Acaciella* y la combinación *Leucaena+Acaciella*).

Para los análisis de degradación de FEN se utilizó un experimento factorial 4x3, que incluyó 12 tratamientos con seis repeticiones, distribuidos en un diseño experimental

completamente al azar. Los factores de estudio fueron: especie vegetal (*Leucaena*, *Acaciella*, la combinación *Leucaena+Acaciella* y ausencia de planta) y fuente de nitrógeno (inoculación con *Rhizobium*, Ninorg y sin N).

Los datos obtenidos fueron analizados mediante análisis de varianza y prueba de comparación de medias (LSD, $\alpha=0.05$) mediante el programa SAS (SAS Institute, 2002).

RESULTADOS

Peso seco total

A los 40 días, el peso seco total mostró diferencias significativas por el factor planta, fuente de nitrógeno y el tratamiento ($P<0.001$). En el caso del factor planta, la combinación *Leucaena+Acaciella* presentó significativamente mayor biomasa seca comparada con *Leucaena* y *Acaciella* crecidas individualmente (Figura 21A). El factor independiente contaminación no tuvo efectos significativos en el PST (Figura 21B). Con respecto al factor independiente fuente de nitrógeno, las plantas inoculadas con *Rhizobium* presentaron significativamente mayor PST comparadas con las plantas con Ninorg y sin N (Figura 21C) (ver Apéndice III). En lo que respecta a tratamientos, el mayor PST correspondió a la combinación *Leucaena+Acaciella* contaminado con FEN e inoculado con *Rhizobium* y el que presentó el menor PST correspondió a *Acaciella* contaminado con FEN y sin N (Figura 22).

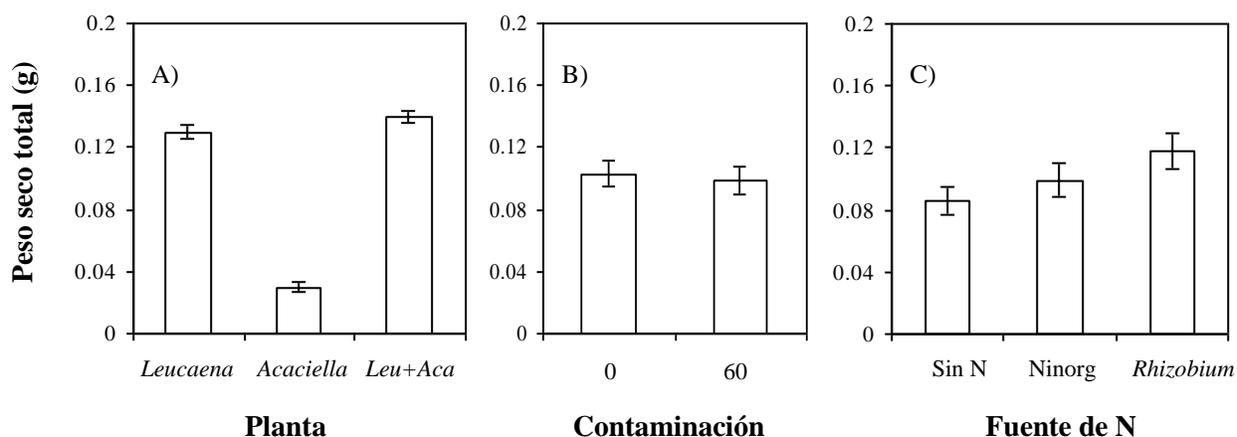


Figura 21. Peso seco total obtenido por los factores independientes: A) Planta (*Leucaena*, *Acaciella* y *Leucaena+Acaciella*); B) Contaminación (con 60 mg FEN kg⁻¹ y sin FEN); C) Fuente de N (Sin N, Ninorg y *Rhizobium tropici* CIAT899) durante 40 días. A) y C) n=24; B) n=36. Medias \pm Error estándar.

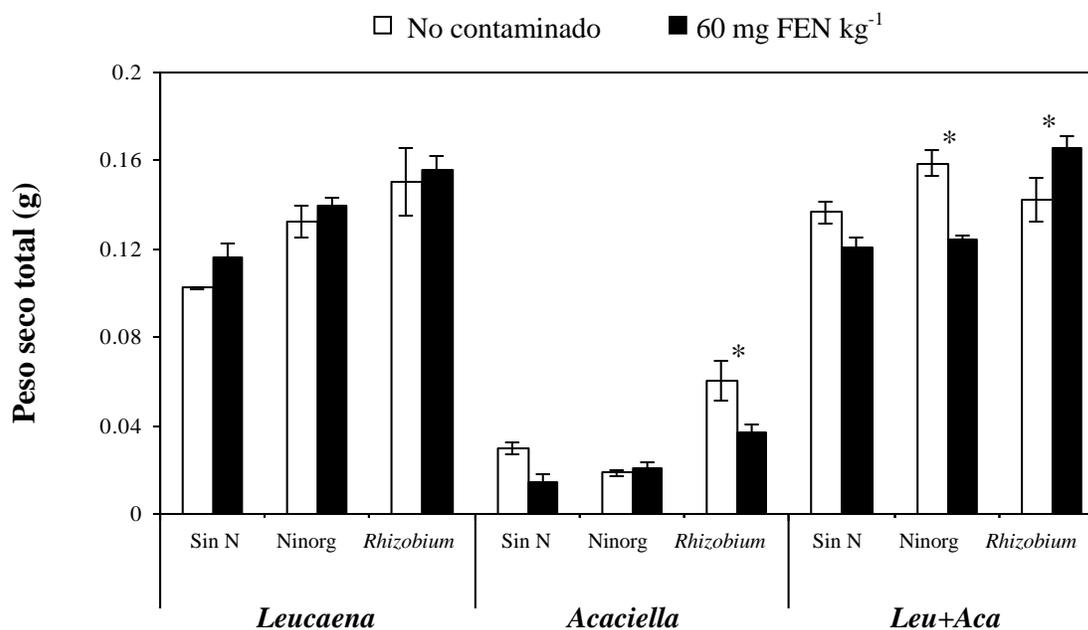


Figura 22. Peso seco total obtenido por tratamientos después de 40 días. Planta (*Leucaena*, *Acaciella* y *Leucaena+Acaciella*); Contaminación (con 60 mg FEN kg⁻¹ y sin FEN); Fuente de N (*Rhizobium tropici*, Ninorg y Sin N). n=4. Medias ± Error estándar. * Indica diferencias significativas entre tratamientos con o sin la presencia de FEN (LSD, $\alpha=0.05$).

Número de nódulos

A los 40 días, el número de nódulos mostró diferencias significativas por el tipo de planta y el tratamiento ($P<0.001$). Por efecto del tipo de planta, la combinación *Leucaena+Acaciella* presentó significativamente mayor número de nódulos comparada con *Leucaena* y *Acaciella*. La presencia o ausencia del FEN no afectó significativamente el número de nódulos en ambas leguminosas. En lo que respecta al tratamiento, la combinación *Leucaena+Acaciella* ante FEN fue el tratamiento que presentó mayor número de nódulos, mientras que *Acaciella* con FEN fue el tratamiento que presentó significativamente la menor nodulación (Figura 23).

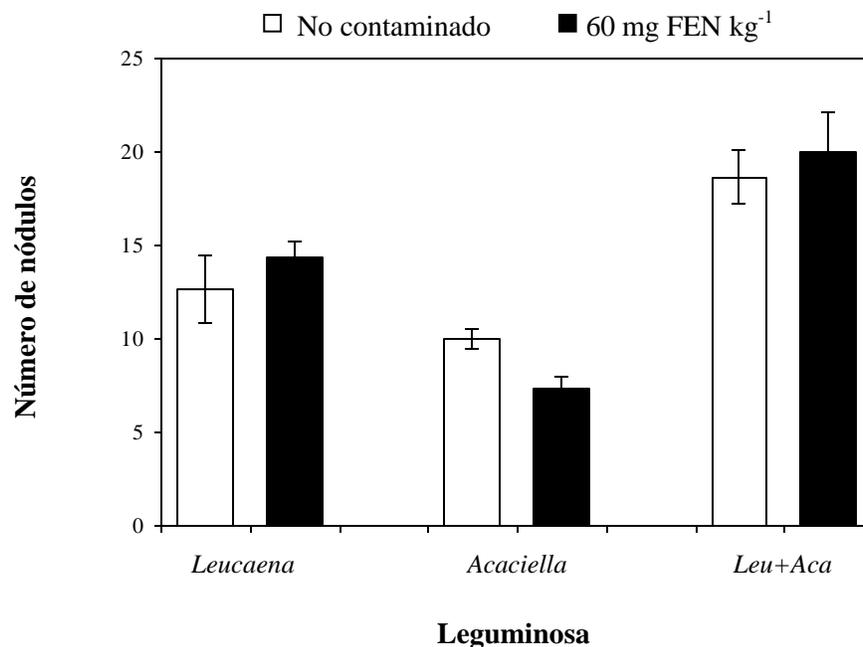


Figura 23. Número de nódulos formados por *Rhizobium tropici* CIAT899 en raíces de dos leguminosas arbóreas y la combinación de ellas, en presencia de 60 mg FEN kg⁻¹, después de 40 días. n=3. Medias ± Error estándar.

Actividad de la enzima nitrogenasa (ANitro)

La ANitro en las raíces no mostró diferencias estadísticas significativas por los factores planta, contaminación o tratamiento. En el caso del factor independiente planta, *Leucaena* presentó mayor ANitro, aunque no significativamente diferente, en comparación con *Leucaena+Acaciella* y *Acaciella* (Figura 24A). Con respecto al factor contaminación, aunque no se mostraron diferencias estadísticas significativas, las plantas en arena no contaminada mostraron numéricamente mayor ANitro con respecto a las plantas con 60 mg FEN kg⁻¹ de arena (Figura 24B). En el caso de tratamientos, *Leucaena* no contaminada presentó la mayor ANitro, mientras que *Acaciella* en arena no contaminada presentó la menor ANitro (Figura 25).

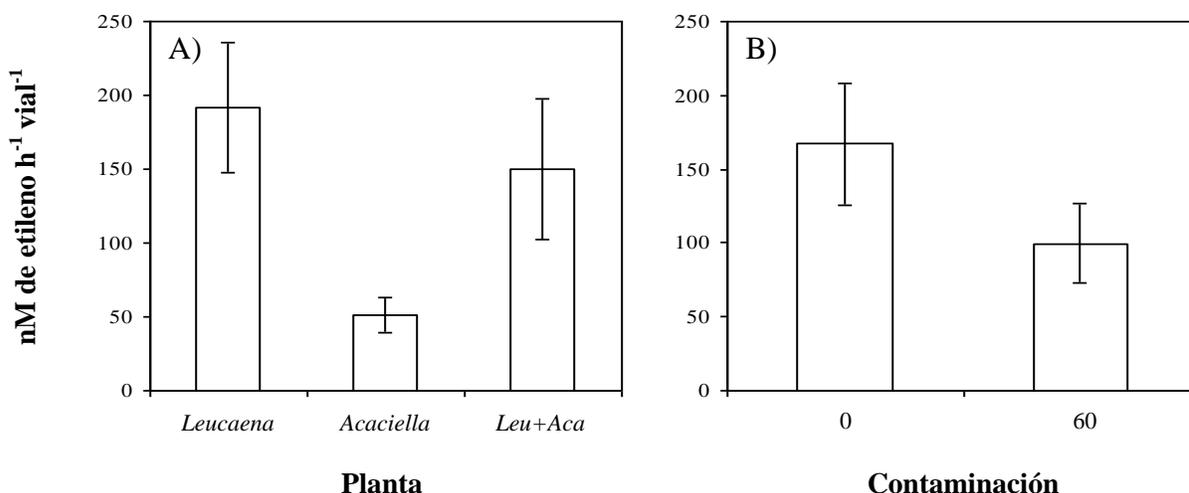


Figura 24. Actividad de la enzima nitrogenasa en raíces de dos leguminosas y la combinación de ellas, en presencia de 0 y 60 mg FEN kg⁻¹ de arena, después de 40 días. A) Por efecto de factor independiente planta, n=6; y B) Por efecto de factor independiente contaminación con FEN, n=9. Medias ± Error estándar.

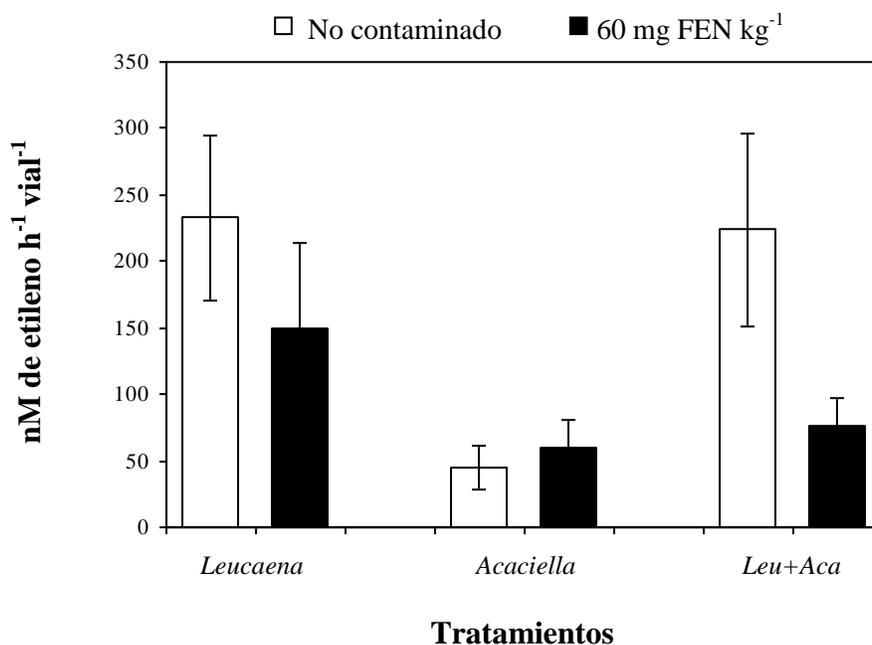


Figura 25. Actividad de la enzima nitrogenasa en raíces de dos leguminosas y la combinación de ellas, en presencia de 0 y 60 mg FEN kg⁻¹ después de 40 días, por efecto de factor tratamiento. n=3. Medias ± Error estándar.

Porcentaje de degradación del fenantreno

La degradación de FEN en la rizosfera de *Leucaena*, *Acaciella* y la combinación *Leucaena+Acaciella* tuvo efectos significativos únicamente por el factor fuente de N y tratamiento ($P<0.001$). Sin embargo, la presencia o ausencia de la planta no influyó significativamente en la degradación del FEN. Por efecto de la planta, el FEN se degradó hasta en un 98.4% en la rizósfera de *Acaciella*, 98.2% en arena sin planta, 98.1% en la rizósfera de *Leucaena* y 98.0% en la rizósfera combinada de *Leucaena+Acaciella*. En lo que respecta al factor fuente de N, los tratamientos inoculados con *Rhizobium* presentaron significativamente mayor degradación de FEN (hasta 99.5%) en comparación con aquellos tratamientos con Ninorg y sin fuente de nitrógeno, cuyos porcentajes de degradación fueron de 7.5 y 97.5, respectivamente (Cuadro 4). En el caso de tratamientos, el tratamiento que mostró el mayor porcentaje de degradación de FEN fue el testigo sin planta + *Rhizobium* (99.7), mientras que los tratamientos con menor porcentaje de degradación (97.2) correspondieron a *Leucaena+Acaciella* + Ninorg, y *Leucaena* y sin fuente de nitrógeno (Cuadro 4). La Figura 26 expone los cromatogramas que muestran la degradación del FEN en cada tratamiento.

Cuadro 4. Porcentajes de degradación de fenantreno en arena contaminada con 60 mg FEN kg⁻¹.

Factor planta (n=18)		Factor fuente de nitrógeno (n=24)	
	% de degradación Fenantreno		% de degradación Fenantreno
<i>Leucaena leucocephala</i>	98.1 ± 0.306 a	<i>Rhizobium</i>	99.5 ± 0.306 a
<i>Acaciella angustissima</i>	98.4 ± 0.214 a	20 mg NH ₄ NO ₃ L ⁻¹ (Ninorg)	97.5 ± 0.306 b
<i>Leucaena</i> + <i>Acaciella</i>	98.0 ± 0.274 a	Sin nitrógeno	97.5 ± 0.306 b
Sin planta	98.2 ± 0.310 a		
Significancia	NS	Significancia	P<0.001
Factor Tratamiento (n=6)			
Tratamiento	% de degradación Fenantreno	Tratamiento	% de degradación Fenantreno
<i>Leucaena</i> + <i>Rhizobium</i>	99.6 ± 0.100 a	<i>Leu+Aca</i> + <i>Rhizobium</i>	99.3 ± 0.344 a
<i>Leucaena</i> + Ninorg	97.4 ± 0.317 c	<i>Leu+Aca</i> + Ninorg	97.2 ± 0.289 c
<i>Leucaena</i> - Sin nitrógeno	97.2 ± 0.300 c	<i>Leu+Aca</i> - Sin nitrógeno	97.5 ± 0.211 bc
<i>Acaciella</i> + <i>Rhizobium</i>	99.3 ± 0.229 a	Sin Planta + <i>Rhizobium</i>	99.7 ± 0.050 a
<i>Acaciella</i> + Ninorg	97.8 ± 0.375 bc	Sin Planta + Ninorg	97.6 ± 0.503 bc
<i>Acaciella</i> - Sin nitrógeno	98.2 ± 0.174 b	Sin Planta - Sin nitrógeno	97.2 ± 0.147 c
Significancia P<0.001			

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes. (LSD, α=0.05).

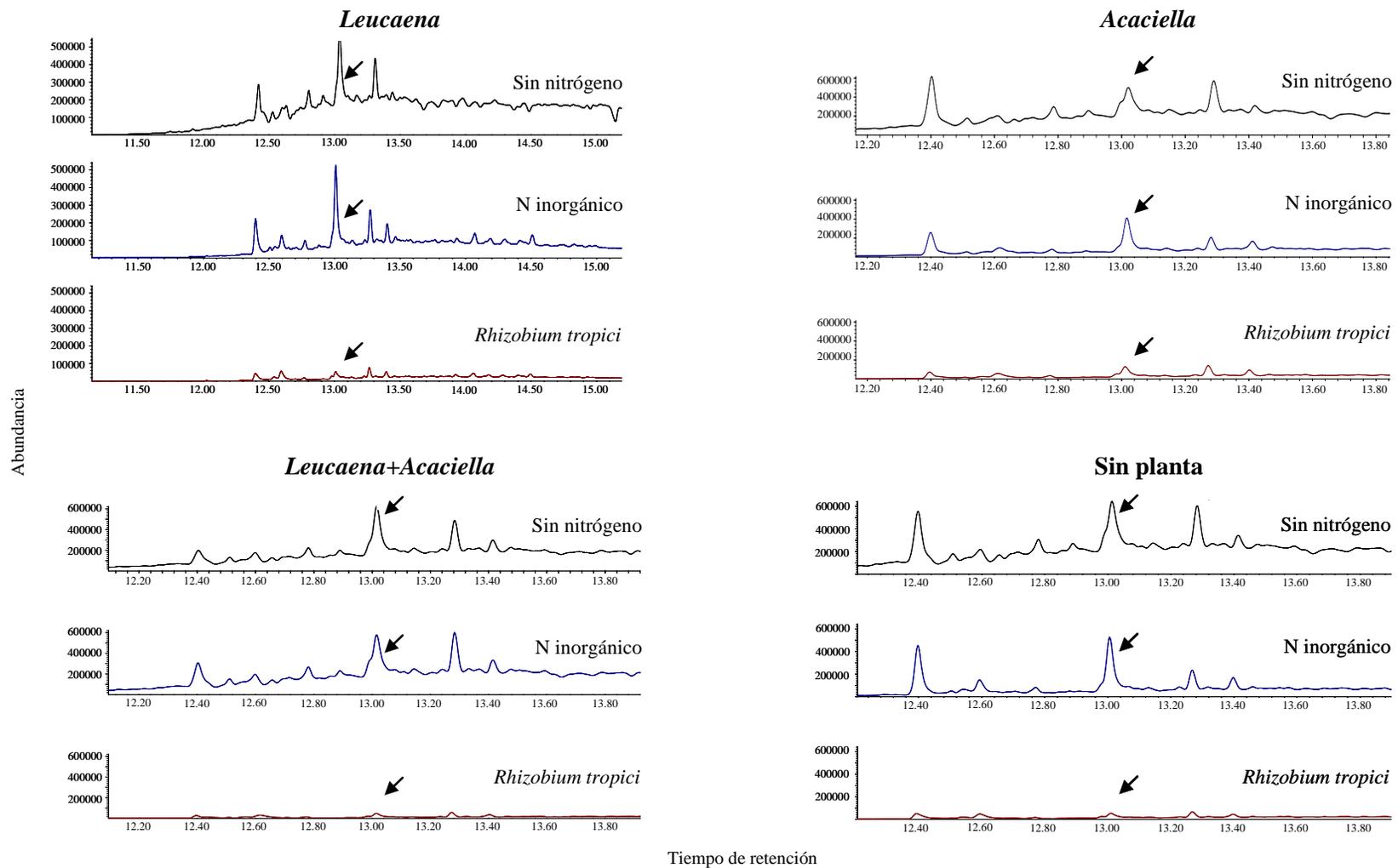


Figura 26. Cromatogramas que muestran la presencia/degradación de fenantreno en las rizósferas de dos leguminosas, la combinación de ellas y sustrato sin planta; con inoculación de *Rhizobium tropici*, aplicación de Ninorg y sin nitrógeno, después de 40 días. Las flechas muestran el pico correspondiente a fenantreno.

DISCUSIÓN

Se ha demostrado que los HPA's tienen un efecto tóxico en el crecimiento y desarrollo de algunas plantas (Baek *et al.*, 2004; Alkio *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2005), no obstante los resultados del presente estudio soportan la hipótesis de que la aplicación de 60 mg FEN kg⁻¹ no redujo significativamente el peso seco total de *Leucaena* o *Acaciella*. Las características fisicoquímicas del FEN determinan su baja absorción por las raíces de las plantas (Gao y Zhu, 2004; Alkio *et al.*, 2005), por lo que en este estudio, la concentración de FEN podría no estar afectando el metabolismo de estas leguminosas.

Cheema *et al.* (2009) encontraron que concentraciones de FEN y pireno menores a 200 mg kg⁻¹ no afectan significativamente la producción de biomasa de *Festuca arundinacea*. En contraste, Gao y Zhu (2004) observaron efectos negativos sobre la biomasa de *Glycine max* y *Phaseolus vulgaris* aplicando bajas concentraciones de FEN (133 mg kg⁻¹) y pireno (172 mg kg⁻¹). Reilley *et al.* (1996) sugirieron posibles efectos indirectos de estos hidrocarburos; los HPA's podrían reducir la capacidad de los suelos contaminados para proporcionar agua y nutrimentos a las plantas a causa de sus carácter hidrofóbico, lo que provocaría una disminución en la producción de biomasa vegetal.

Las leguminosas arbóreas como *Leucaena* y *Acaciella* son especies muy versátiles que crecen en diferentes tipos de suelos, en zonas con temperaturas y altitudes variables, forman islas de fertilidad, son refugio de flora y fauna, además de ser regeneradoras de suelos con problemas de erosión (Rincón-Rosales y Gutiérrez-Miceli, 2008), características que podrían postularlas como importantes candidatas para procesos de fitorremediación. La presencia de microorganismos fijadores de N₂ podría explicar cómo especies arbóreas pueden crecer bajo limitación del nitrógeno en suelos pobres, erosionados o contaminados (Weyens *et al.*, 2009). En el presente estudio, *Leucaena* se desarrolló más rápido que *Acaciella* y tuvo mayor producción de

biomasa, lo que podría significar una ventaja de la planta para establecerse en un sustrato contaminado con 60 mg FEN kg⁻¹. Este trabajo es uno de los primeros que proporciona información sobre el efecto de dos HPA's en el peso seco de las leguminosas *Leucaena leucocephala*, *Acaciella angustissima* y la combinación de sus rizósferas.

En el presente estudio, *Leucaena* y *Acaciella* inoculadas con *Rhizobium* tuvieron significativamente mayor producción de biomasa seca con respecto a las plantas con N inorgánico (20 mg NH₄NO₃ kg⁻¹) y las plantas sin fuente de nitrógeno. El efecto benéfico de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa en la nutrición de la planta a través de la fijación de nitrógeno podría también contribuir en su tolerancia a contaminantes orgánicos y potenciar la degradación de los mismos.

A los 40 días, la rizósfera combinada de *Leucaena*+*Acaciella* mostró el mayor número de nódulos formados por *Rhizobium tropici*. Sin embargo, *Leucaena* fue la especie vegetal que mostró mayor nodulación comparada con *Acaciella*. Diversos reportes confirman que *Leucaena leucocephala* y *Acaciella angustissima* forman simbiosis con *Rhizobium tropici* (Martínez-Romero *et al.*, 1991; Rincón-Rosales *et al.*, 2009). La subfamilia Mimosoideae contiene especies de leguminosas promiscuas como los géneros *Acacia* y *Leucaena*, que son capaces de establecer simbiosis con dos o más especies de rizobias (Lloret y Martínez-Romero, 2005). Las leguminosas también pueden ser específicas por un simbiote en particular. Por ejemplo, algunas leguminosas no promiscuas son *Galega officinalis* y *G. orientalis*, las cuales son noduladas únicamente por *Rhizobium galegae*; el caso de *Vicia faba* que es nodulada por *R. leguminosarum* bv. *Viciae* y *Medicago* sp. nodulada únicamente por *Sinorhizobium meliloti* (Lloret y Martínez-Romero, 2005). En el presente estudio, *Leucaena* mostró más afinidad por *Rhizobium tropici* CIAT899 con respecto a *Acaciella*, lo que se reflejó en una mayor nodulación, producción de biomasa y fijación de N₂ por parte de *Leucaena*.

Algunos géneros y especies de rizobios son tolerantes a ciertos HPA's. Ejemplos de estos microorganismos son *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, el cual es tolerante al criseno (Johnson *et al.*, 2004), *Sinorhizobium* sp. que es tolerante al fenantreno y además es capaz de utilizarlo como fuente de carbono (Young-Soo *et al.*, 2006). En un estudio previo, González-Paredes *et al.* (2007) demostraron que *Rhizobium tropici* CIAT889 es capaz de formar nódulos en *Phaseolus vulgaris* aún en presencia de NAF, FEN y benzo(a)pireno. En el presente estudio, la supervivencia a los 40 días de nódulos de *Rhizobium tropici* sugieren que esta cepa es potencialmente resistente a concentraciones de 60 mg FEN kg⁻¹.

La actividad nitrogenasa en sistemas simbióticos como el caso de *Rhizobium*-leguminosa ha sido poco estudiada en presencia de HPA's. Stahl y Williams (1986) indicaron que la presencia de petróleo redujo significativamente la actividad nitrogenasa en el sistema simbiótico *Rhizobium*-trébol. Sin embargo, existen antecedentes de que esta actividad enzimática en raíces de trébol inoculadas con *Rhizobium leguminosarum* var. *trifolii*, puede ser estimulada en presencia de dosis bajas de Cr (10 mg kg⁻¹); mientras que a dosis más altas (70 mg kg⁻¹) se inhibe el crecimiento de *Rhizobium* y su actividad nitrogenasa (Casella *et al.*, 1988). En la cianobacteria *Nostoc muscorum* la actividad nitrogenasa y la absorción de N (NH₄⁺ y NO₃⁻) son sensiblemente afectadas por la aplicación de Cr, Ni y Pb (Rai y Raizada, 1989). La nitrogenasa en bacterias de vida libre fijadoras de N₂ atmosférico presenta variaciones en su inhibición y/o estimulación por efecto de plaguicidas, de manera particular, el paraquat inhibe esta actividad enzimática (Jagnow *et al.*, 1979). En el presente estudio, la actividad nitrogenasa de las raíces noduladas no presentó diferencias estadísticas significativas entre arena no contaminada y expuesta a 60 mg FEN kg⁻¹; sin embargo, ésta fue hasta 40% más alta en *Leucaena* y en la combinación de *Leucaena+Acaciella* sin la exposición al poliaromático.

Para que la fitorremediación sea efectiva, es necesario conocer un amplio rango de especies vegetales que crezcan en diversos tipos de clima (Merkl *et al.*, 2004). Al respecto, *Leucena leucocephala* es capaz de absorber y metabolizar contaminantes comunes en el ambiente como el dibromoetano y el tricloroetileno por medio de la producción de enzimas peroxidasas y deshalogenasas (Doty *et al.*, 2003). Este antecedente es importante en la búsqueda de especies como *Leucaena* promisorias para la degradación de contaminantes.

En el presente estudio la degradación del fenantreno fue estimulada por la presencia de *Rhizobium* en el sustrato contaminado, lo cual contribuyó en la degradación/atenuación del mismo. Sin embargo, en los tratamientos sin planta e inoculados con *Rhizobium* también se produjo mayor degradación del FEN, lo que sugiere que esta bacteria podría estar utilizando el hidrocarburo como fuente de energía.

Pocos trabajos han estudiado el impacto de la inoculación con *Rhizobium* durante la remediación de HPA's y la interacción de dos o más especies vegetales (Johnson *et al.*, 2004). Así, Joner *et al.* (2002) y Muratova *et al.* (2009) demostraron que los microorganismos degradadores de HPA's mostraron las más altas poblaciones en presencia de exudados radicales. Los niveles de biodegradación de HPA's y de poblaciones bacterianas están en función de la distancia a la raíz, esto es, entre más cerca de la raíz mayor es la degradación y las poblaciones bacterianas (Corgié *et al.*, 2003, 2004). Johnson *et al.* (2004) utilizaron una mezcla de pasto (*Lolium perenne*) y leguminosa (*Trifolium repens*) para remediar un suelo agrícola contaminado con un hidrocarburo poliaromático (Criseno, 500 mg kg⁻¹), e inocularon con *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Los resultados de su estudio mostraron mayor degradación del contaminante en los suelos inoculados con *Rhizobium*, misma que fue asociada con la estimulación tanto del crecimiento radical de las plantas como de la estimulación en la actividad microbiana en el suelo.

Se sabe que *Sinorhizobium meliloti* Orangel fue capaz de degradar dibenzotiofeno (Frassinetti *et al.*, 1998). Este fue el primer ejemplo de que *Rhizobium* puede degradar compuestos aromáticos y sugiere el potencial del uso de la inoculación con rizobios para los procesos de biorremediación que pueden llevar una doble función: la degradación de contaminante y la fijación de N₂ (Suominen *et al.*, 2000). Vela *et al.* (2002) encontraron que *Sinorhizobium xinjiangensis*, *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* y *Bradyrhizobium japonicum* son capaces de utilizar como fuente de carbono varios compuestos aromáticos y alifáticos como benzoatos, fenoles, catecol, resolcinol y hexadecano. En otro estudio, Ahmad *et al.* (1997) encontraron que algunas cepas de *Rhizobium meliloti* habitan suelos contaminados con compuestos poliaromáticos y cloroaromáticos, pero únicamente en presencia de su leguminosa hospedera (*Medicago sativa*). Además, los resultados de dicha investigación sugieren que la interacción *Rhizobium meliloti*-Leguminosa podría estar actuando de forma conjunta en la degradación de estos compuestos. En contraste, algunos trabajos presentan resultados menos optimistas al respecto. En un estudio de la rizósfera de alfalfa (*Medicago sativa*) y la inoculación con *Sinorhizobium meliloti*, las plantas no inoculadas de alfalfa fueron más efectivas que las plantas inoculadas en la degradación de bifenilos policlorados (Mehmannavaz *et al.*, 2002).

En el caso del FEN, dadas sus características químicas, su vida media en el suelo es de 16 a 126 días (Kanaly y Harayama, 2000), dependiendo de las condiciones abióticas y presencia de microorganismos capaces de degradarlo. Además, el FEN no es una molécula tan volátil, debido al valor bajo de su constante de Henry ($2.56 \times 10^{-5} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$) (ATSDR, 1995). Lo que sugiere que la degradación en los tratamientos sin planta y sin bacteria podría darse por la acción fotoquímica, por temperatura o por la acción de algún compuesto oxidante (Gan *et al.*, 2009). La reacción de fotooxidación más frecuente es la formación de endoperoxidos, que pueden convertirse en quinonas (Castaño *et al.*, 2004). Corona-Ramírez e Iturbe-Argüelles (2005)

obtuvieron hasta 90% de degradación de HPA's en un suelo arenoso, expuesto a una atenuación natural y sin la presencia de plantas, en donde un alto contenido de agua (30% de humedad) fue un factor importante para favorecer la tasa de degradación en corto tiempo (60 días). En el presente estudio, la degradación del FEN en arena sin planta fue de hasta 98%, lo que sugiere que la rizodegradación no es el único mecanismo que está actuando en la remediación de la arena contaminada.

Durante la degradación de contaminantes por la acción de los microorganismos y sus enzimas o de la acción conjunta interacción microorganismo-raíz, se llevan a cabo otros procesos que influyen en la sobrestimación o subestimación de dicha degradación (Miranda-Martínez *et al.*, 2007), como lo son los procesos de adsorción y absorción de HPA, tanto en suelo, como en planta (Schwab *et al.*, 1998). En este sentido, se recomienda realizar estudios relacionados con la evaluación de estos dos procesos que influyen en la determinación de la mineralización de contaminantes orgánicos en el suelo (Miranda-Martínez *et al.*, 2007).

CONCLUSIONES

A los 40 días, la exposición de las plantas a $60 \text{ mg FEN kg}^{-1}$ no afectó significativamente la formación de nódulos por *Rhizobium tropici*. Las plantas inoculadas con *Rhizobium* presentaron significativamente mayor PST con respecto a las plantas con Ninorg y a las que no tuvieron aporte de nitrógeno.

Leucaena fue la especie vegetal que presentó significativamente mayor ANitro con respecto a la combinación *Leucaena+Acaciella* y *Acaciella*.

La presencia o no de la planta no influyó significativamente en la degradación del FEN.

Por efecto de la planta, el FEN fue degradado hasta en 98.4% en *Acaciella*, un 98.2% en el testigo sin planta, un 98.1% en *Leucaena* y un 98% en *Leucaena+Acaciella*.

En lo que respecta al factor fuente de N, los tratamientos inoculados con *Rhizobium* presentaron significativamente mayor degradación de FEN (99.5%) que aquellos tratamientos con Ninorg y sin fuente de nitrógeno cuyos porcentajes de degradación fueron de 97.5%, respectivamente.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES GENERALES

El sistema simbiótico *Rhizobium*-leguminosas arbóreas toleró niveles de contaminación en el rango de 20-100 mg L⁻¹ de NAF y FEN, sin embargo, el número de nódulos disminuyó a medida que aumentó la concentración del HPA.

Leucaena leucocephala y *Acaciella angustissima* experimentaron un estrés oxidativo inducido por los HPA's, y este estrés fue mayor en ausencia de *Rhizobium* y en presencia de FEN.

La presencia de *Rhizobium* aumentó ligeramente la degradación de FEN en el sistema.

PRIMERA FASE

La contaminación con NAF y/o FEN tuvo efectos tóxicos en la formación de nódulos en ambas especies vegetales. Sin embargo, mientras que *Leucaena* fue más susceptible al NAF, *Acaciella* fue ligeramente más susceptible a la contaminación por FEN.

La inoculación con *Rhizobium*, incrementó el PST hasta en un 150% para *Leucaena*, y en 100% para *Acaciella*, en comparación con las plantas no inoculadas.

Para ambas especies, el contenido de CFT en hojas fue significativamente mayor en los tratamientos no inoculados comparado con los tratamientos inoculados con *Rhizobium*, y significativamente mayor en las plantas expuestas a FEN en comparación con el NAF. Para ambas plantas, la exposición de 100 mg L⁻¹ resultó en mayor producción de CFT y AAT en hojas en comparación con las expuestas a bajas concentraciones de HPA's.

Los resultados de este trabajo apoyan la hipótesis que *Leucaena leucocephala* y *Acaciella angustissima* experimentan un estrés oxidativo inducido por HPA's, y que este estrés es mayor en ausencia de *Rhizobium* y en presencia de FEN.

SEGUNDA FASE

La exposición de las dos especies de leguminosas a 60 mg FEN kg⁻¹ no afectó significativamente la formación de nódulos.

Las plantas inoculadas con *Rhizobium* presentaron significativamente mayor PST con respecto a las plantas con Ninorg y con aquellas que no tuvieron aporte de nitrógeno.

Leucaena fue la especie vegetal que presentó significativamente mayor ANitro con respecto a la combinación *Leucaena+Acaciella* y *Acaciella*.

La presencia de la planta no influyó significativamente en la degradación del FEN.

Por efecto de la planta, el FEN fue degradado hasta en 98.4% en *Acaciella*, un 98.2% en el testigo sin planta, un 98.1% en *Leucaena* y un 98% en *Leucaena+Acaciella*.

En lo que respecta al factor fuente de N, los tratamientos inoculados con *Rhizobium* presentaron significativamente mayor degradación de FEN (99.5%) que aquellos tratamientos con Ninorg y sin fuente de nitrógeno cuyos porcentajes de degradación fueron de 97.5 y 97.5%, respectivamente.

Un 97.5% de FEN se degradó en el sistema por la acción de otros mecanismos no evaluados (factores abióticos); sin embargo, la presencia de *Rhizobium* aumentó ligeramente (a 99.5%) la degradación del FEN en la arena contaminada.

LITERATURA CITADA

- Ahern, C.P. y Staff I.A. (1994). Symbiosis in cycads: The origin and development of coralloid roots in *Macrozamia communis* (Cycadaceae). *Am. J. Bot.* 81, 1559-1570.
- Ahmad D., Mehmannaavaz R. y Damaj M. (1997). Isolation and characterization of symbiotic N₂-fixing *Rhizobium meliloti* from soils contaminated with aromatic and chloroaromatic hydrocarbons: PAHs and PCBs. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 39, 33-43.
- Albers P.H. (1995). Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons. *In: Handbook of ecotoxicology* (Hoffman D.J., Rattner B.A, Burton G.A.Jr., y Cairns J. Jr. Eds.). Lewis Publishers, Boca Raton, Florida. pp. 330-355.
- Alkio M., Tabuchi T.M., Wang X. y Colon-Carmona, A. (2005). Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in *Arabidopsis* include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms. *J. Exp. Bot.* 56, 2983-2994.
- Almaraz-Suárez J.J. y Ferrera-Cerrato R. (2007). Fijación simbiótica de nitrógeno en leguminosas. *In: Microbiología agrícola* (Ferrera-Cerrato R. y Alarcón A. Eds.). Editorial Trillas, México, D.F. pp. 225-238.
- Amadi A., Dickson A.A. y Maate G.O. (1993). Remediation of oil polluted soils: Effect of organic and inorganic nutrient supplements on the performance of maize (*Zea mays* L.). *Water Air Soil Poll.* 66, 59-76.
- Anderson T.A., Kruger E.L y Coats J.R. (1994). Enhanced degradation of a mixture of three herbicides in the rhizosphere of a herbicide-tolerant plant. *Chemosphere.* 28, 1551-1557.
- Arora A, Sairam R.K. y Srivastava G.C. (2002). Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr. Sci. India.* 82, 1227-1238.

- Asada K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Phys.* 50, 601-639.
- Atlas, R.M. y Bartha R. (2002). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Prentice May. 4ª Edición. Madrid, España. 677 p.
- ATSDR (1995). Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). Atlanta, GA, US Department of Health and Human Services, Public health service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Baek K.H., Kim H.S., Oh H.M., Yoon B.D., Kim J. y Lee I.S. (2004). Effects of crude oil, oil components, and bioremediation on plant growth. *J. Environ. Sci. Health.* A39, 2465-2472.
- Barnsley E.A. (1983). Phthalate pathway of phenanthrene metabolism: formation of 2-carboxybenzalpyruvate. *J. Bacteriol.* 154, 113–117.
- Binet P., Portal J.M. y Leyval C. (2000). Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the rhizosphere and mycorrhizosphere of ryegrass. *Plant Soil.* 227, 207-213.
- Blokhina O., Virolainen E. y Fagerstedt K.V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot-London.* 91, 179-194.
- Blumer M. (1976). Polycyclic aromatic compounds in nature. *Sci. American.* 243, 35-45.
- Casella S., Frassinetti S., Lupi F. y Squartini A. (1988). Effect of cadmium, chromium and copper on symbiotic and free living *Rhizobium leguminosarum* biovar. *trifolii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 49, 343-347.

- Castaño G.E., Malats N. y Kogevinas M. (2004). Biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental air pollution. *Occup. Environ. Med.* 61, 12.
- Cerniglia C.E. (1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Curr. Opin. Biotechnol.* 4, 331-338.
- Cheema S.A., Khan M.I. Tang X., Zhang C., Shen C., Malik Z., Ali S., Yang J., Shen K., Chen X. y Chen Y. (2009). Enhancement of phenanthrene and pyrene degradation in rhizosphere of tall fescue (*Festuca arundinacea*). *J. Hazard. Mater.* 166, 1226–1231.
- Chiapusio G., Pujol S., Toussaint M.L., Badot P.M. y Binet, P. (2007). Phenanthrene toxicity and dissipation in rhizosphere of grassland plants (*Lolium perenne* L. and *Trifolium pratense* L.) in three spiked soils. *Plant Soil.* 294, 103-112.
- Collins J.F., Brown J.P., Dawson S.V. y Marty M.A. (1991). Risk assessment for benzo[a]pyrene. *Regul. Toxicol. Pharm.* 13, 170-184.
- CONABIO. 2008. Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. http://www.conabio.gob.mx / conocimiento / info_especies / arboles / doctos / 44-legum26m.pdf. Consultado en enero de 2008. México.
- Corgié S.C., Joner E. y Leyval C. (2003). Rhizospheric degradation of phenanthrene is a function of proximity to roots. *Plant Soil.* 257, 143-150.
- Corgié S.C., Beguiristain T. y Leyval C. (2004). Spatial distribution of bacterial communities and phenanthrene degradation in the rhizosphere of *Lolium perenne* L. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3552-3557.
- Corona-Ramírez L. e Iturbe-Argüelles R. (2005). Atenuación natural en suelos contaminados con hidrocarburos. *Ingeniería Investigación y Tecnología.* 7, 119-126.

- Cunningham S.D., Anderson T.A., Schwab A.P y Hsu F.C. (1996). Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Adv. Agron.* 56: 55-114.
- Dalal M. y Khanna-Chopra R. (2001). Differential response of antioxidant enzymes in leaves of necrotic wheat hybrids and their parents. *Physiol. Plant.* 111, 297-304.
- Damaj M. y Ahmad D. (1996). Biodegradation of polychlorinated biphenyls by rhizobia: a novel finding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218, 908–915.
- Dashti N., Khanafer M., El-Nemr I., Sorkhoh N., Ali N. y Radwan S. (2009). The potential of oil-utilizing bacterial consortia associated with legume root nodules for cleaning oily soils. *Chemosphere.* 74, 1354-1359.
- Davies J.I. y Evans, W.C. (1964). Oxidative metabolism of naphthalene by soil pseudomonas. The ring-fission mechanism. *Biochem. J.* 91, 251–261.
- Debiane D., Garçon G., Verdin A., Fontaine J., Durand R., Grandmougin-Ferjani A., Shirali P. y Lounès-Hadj Sahraoui A. (2008). In vitro evaluation of the oxidative stress and genotoxic potentials of anthracene on mycorrhizal chicory roots. *Environ. Exp. Bot.* 64, 120-127.
- Debiane D., Garçon G., Verdin A., Fontaine J., Durand R., Shirali P., Grandmougin-Ferjani A., y Lounès-Hadj Sahraoui A. (2009). Mycorrhization alleviates benzo[a]pyrene-induced oxidative stress in an in vitro chicory root model. *Phytochemistry.* 70, 1421-1427.
- Dere S., Günes T. y Sivaci R. (1998). Spectrophotometric determination of chlorophyll - A, B and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. *Tr. J. Of Botany.* 22, 13-17.

- Doddamani H.P. y Ninnekar H.Z. (2000). Biodegradation of phenanthrene by a *Bacillus* species. *Curr. Microbiol.* 41, 11-14.
- Doty S.L., Shang T.Q. y Wilson A.M. (2003). Metabolism of the soil and groundwater contaminants, ethylene dibromide and trichloroethylene, by the tropical leguminous tree, *Leuceana leucocephala*. *Water Res.* 37, 441-449.
- Doyle E., Muckian L., Hickey A.M. y Clipson N. (2008). Microbial PAH Degradation. *Adv. Appl. Microbiol.* 65, 27-66.
- Dzowela B.H. (1994). *Acacia angustissima* a Central American tree that's going places. *Agroforestry Today.* 6, 13-14.
- Edwards N.T. (1983). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's) in the terrestrial environment- A review. *J. Environ. Qual.* 12, 427-441.
- Fahraeus, G. (1957). The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by simple glass slide technique. *J. Gen. Microbiol.* 16, 374-381.
- Fernández-Linares, L. (2000). Tecnologías de biorremediación de suelos. *In: La edafología y sus perspectivas al siglo XXI* (Quintero-Lizaola R., Reyna-Trujillo T., Colay-Chee L., Ibáñez-Huerta A. y García-Calderón N.E. Eds). Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, UNAM, UACH. México. Tomo II. pp. 700-705.
- Fernández-Linares, L., Rojas-Avelizapa N.G, Roldán-Carrillo T.G., Ramírez-Islas M.E., Zegarra-Martínez H.G., Uribe-Hernández R., Reyes-Ávila R.J., Flores-Hernández D. y Arce-Ortega J.M. (2006). Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. IMP-SEMARNAT-INE. México. 180 pp.

- Ferrera-Cerrato R. (2000). Microorganismos de la rizósfera y su potencial en la degradación de hidrocarburos. *In: La edafología y sus perspectivas al siglo XXI* (Quintero-Lizaola R., Reyna-Trujillo T., Colay-Chee L., Ibáñez-Huerta A. y García-Calderón N.E. Eds). Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, UNAM, UACH. México. Tomo II. pp. 706-713.
- Ferrera-Cerrato R., Alarcón A., Trejo-Aguilar D., Sangabriel W., Mendoza-López M.R., Cruz-Sánchez J.S., López-Ortiz C. y Delgadillo-Martínez J. (2008). Fitorremediación de un suelo contaminado con combustóleo utilizando *Phaseolus coccineus* y fertilización orgánica e inorgánica. *Agrociencia*. 41, 817-826.
- Foyer C.H., Descourvières P. y Kunert K.J. (1994). Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ.* 17, 507-523.
- Frassinetti S., Setti L., Corti A., Farrinelli P., Montevecchi P. y Vallini G. (1998). Biodegradation of dibenzothiophene by a nodulating isolate of *Rhizobium meliloti*. *Can. J Microbiol.* 44, 289-297.
- Gan S., Lau E.V. y Ng H.K. (2009). Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *J. Hazard. Mater.* 172, 532–549.
- Gao Y. y Zhu L. (2004). Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils. *Chemosphere*. 55, 1169-1178.
- Gao Y., Ren L., Ling W., Gong S., Sun B. y Zhang Y. (2010). Desorption of phenanthrene and pyrene in soils by root exudates. *Bioresour. Technol.* 101, 1159-1165.
- González-Paredes Y., Ferrera-Cerrato R. y Alarcón A. (2007). Effect of three polycyclic aromatic hydrocarbons on nodulation of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium tropici*.

Scientific Program and Abstracts. Annual Meeting Soils in Cold Environments. Canadian Society of Soil Science. 3 al 7 de junio. p. 77.

Hardy R.W.F., Holsten R.D., Jackson E.K. y Burns R.C. (1968). The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43, 1185-1207.

Henner P., Schiavon M., Druelle V. y Lichtfouse E. (1999). Phytotoxicity of ancient gaswork soils. Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on plant germination. *Org. Geochem.* 30, 963-969.

Hernández-Acosta E., R. Ferrera-Cerrato R. y Rodríguez-V R. (2003). Bacterias de vida libre fijadoras de N₂ atmosférico en rizósfera de frijol contaminada con queroseno. *Terra.* 21, 81-89.

Hernández-Acosta E. (2007). Fitorremediación de suelos contaminados con compuestos orgánicos. *In: Microbiología agrícola* (Ferrera-Cerrato R. y Alarcón A. Eds.). Editorial Trillas. México, D.F. pp. 568

Hernández, V.I. y Mager D. 2003. Uso de *Panicum maximum* y *Brachiaria brizantha* para fitorremediar suelos contaminados con un crudo de petróleo liviano. *Bioagro.* 15, 149-155.

ITRC (Interstate Technology and Regulatory Cooperation Work Group). (2001). *Phytotechnology Technical and Regulatory Guidance Document. Technical/Regulatory Guidelines.* USA. pp. 84.

Jagnow G., Heinemeyer O. y Draeger S. (1979). Choice of liquid, semisolid, or soil suspension media: An important factor modifying the effect of pesticides on the nitrogenase (C₂H₂) activity of *Clostridium pasterianum*, *Azotobacter chroococum* and *Spirillum lipoferum* beijerenk. *Ecotoxicol. Env. Saf.* 3, 152-158.

- Johnson D.L., Maguire K.L., Anderson D.R. y McGrath S.P. (2004). Enhanced dissipation of chrysene in planted soil: the impact of a rhizobial inoculum. *Soil Biol. Biochem.* 36, 33–38.
- Joner E.J., Johansen A., Loibner A.P., Dela-Cruz M.A., Szolar O.H.J., Portal J.M., y Leyval C. (2001). Rhizosphere effects on microbial community structure and dissipation and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in spiked soil. *Environ. Sci. Technol.* 35, 2773–2777.
- Joner E.J., Corgié S.C., Amellal N. y Leyval C. (2002). Nutritional constraints to degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a simulated rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 34, 859-864.
- Juhasz A.L. y Naidu R. (2000). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: A review of the microbial degradation of benzo[*a*]pyrene. *Int. Biodeter. Biodegr.* 45, 57-88.
- Kanaly R.A. y Harayama S. (2000). Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J. Bacteriol.* 182, 2059-2067.
- Kirk J.L., Klironomos J.N., Lee H., y Trevors J.T. (2002). Phytotoxicity assay to assess plant species for phytoremediation of petroleum-contaminated soil. *Biorem. J.* 6, 57-63.
- Knowlton S., Berry A. y Torrey J.G. (1980). Evidence that associated soil bacteria may influence root hair infection of actinorhizal plants by *Frankia*. *Can. J. Microbiol.* 26, 971-977.
- Lee S.H., Ahsan N, Lee K.W., Kim D.H., Lee D.G., Kwak S.S., Kwon S.Y., Kim T.H. y Lee B.H. (2007). Simultaneous overexpression of both Cu Zn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in transgenic tall fescue plants confers increased tolerance to a wide range of abiotic stresses. *J. Plant Physiol.* 164, 1626-1638.

- Liu H., Weisman D., Ye Y., Cui B., Huang Y., Colon-Carmona A. y Wang Z. (2009). An oxidative stress response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* 176, 375–382.
- López-Martínez S., Gallegos-Martínez M.E., Pérez-Flores L.J. y Gutiérrez-Rojas M. (2005). Mecanismos de fitorremediación de suelos contaminados con moléculas orgánicas xenobióticas. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 21, 91-100.
- Lloret L., Ormeño-Orillo E., Rincón-Rosales R., Martínez-Romero J., Rogel-Hernández M.A. y Martínez-Romero E. (2007). *Ensifer mexicanus* sp. Nov. A new species nodulating *Acacia angustissima* (Mill.) Kuntze in Mexico. *Syst. Appl. Microbiol.* 30, 280-290.
- Lloret L. y Martínez-Romero E. (2005). Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 47, 43-60.
- Lundegardh H. y Stenlid G. (1944). On the exudation of nucleotides and flavonone from living roots. *Arkiv. Bot.* 31A, 1-27.
- Maliszewska-Kordybach, B. (1999). Sources, concentrations, fate, and effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the environment. Part A: PAHs in air. *Pol. J. Environ. Stud.* 8, 131-136.
- Manahan, S.T. 2007. Introducción a la química ambiental. Editorial Reverté – UNAM. México.
- Marcano L., González M., Leal A. y Michelena V. (2001). Fijación biológica por *Pachecoa venezuelensis* en dos suelos de sabana del Oriente venezolano. *Revista UDO Agrícola.* 1, 64-69.
- Maroto-Arroyo, M.E. y Rogel-Quesada J.M. (2001). Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas con hidrocarburos. *In: Investigación,*

gestión y recuperación de acuíferos contaminados (Ballester Rodríguez A., Grima Olmedo J., López Geta J.A., y Rodríguez Hernández L. Eds). Alicante, España. pp. 298-305.

Martínez-Romero E. (1994). Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. *Plant Soil*. 161, 11-20.

Martínez-Romero E., Segovia L., Martins-Mercante F., Franco A.A., Graham P. y Pardo M.A. (1991). *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 417-426.

Martínez-Romero E., Oswald-Spring U. y Miranda M. (1997). Towards the application of nitrogen fixation research to forestry and agriculture. *In: Biological fixation of nitrogen for ecology and sustainable agriculture* (Legocki A., Bothe H. y Pühler A. Eds). NATO ASI Series G: Ecological Sciences. Vol.39. Springer, Berlin. pp 187-190.

Matthäus M. (2002). Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *J. Agric. Food. Chem.* 50, 3444-3452.

Mehmannavaz R., Prasher S.O. y Ahmad D. (2002). Rhizospheric effects of alfalfa on biotransformation of polychlorinated biphenyls in a contaminated soil augmented with *Sinorhizobium meliloti*. *Process Biochem.* 37, 955-963.

Merkel N., Schultze-Kraft R. y Infante C. (2004). Phytoremediation in the tropics- The effect of the crude oil on the growth of tropical plants. *Biorem. J.* 8, 177-184.

Merkel N., Schultze-Kraft R. y Arias M. (2006). Effect of the tropical grass *Brachiaria brizantha* (Hochst. Ex A. Rich.) Stapf on microbial population and activity in petroleum-contaminated soil. *Res. Microbiol.* 161, 80-91.

- Miranda-Martínez M.R., Delgadillo-Martínez J., Alarcón A. y Ferrera-Cerrato R. (2007). Degradación de fenentreno por microorganismos en la rizosfera del pasto alemán. *Agrociencia*. 25, 25-33.
- Mittler R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405-410.
- Møller I.M., Jensen P.E., Hansson A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 459.
- Mueller J.G., Cerniglia C.E. y Pritchard P.H. (1996). Bioremediation of environment contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons. *In: Bioremediation: Principles and applications* (Crawford R.L. y Crawford D.L. Eds.). Cambridge University Press, Cambridge. pp. 125-194.
- Muratova A., Hübner Th., Tischer S., Turkovskaya O., Möder M. y Kusch P. (2003). Plant-rhizosphere-microflora association during phytoremediation of PAH contaminated soil. *Int. J. Phytorem.* 5, 137-151.
- Muratova A., Golubev S., Wittenmayer L., Dmitrieva T., Bondarenkova A., Hirche F., Merbach W. y Turkovskaya O. (2009). Effect of the polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene on root exudation of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Environ. Exp. Bot.* 66, 514-521.
- Naczki M. y Shahidi F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatog. A.* 1054, 95-111.
- National Research Council. (1985). *Oil in the Sea: Inputs, fates and effects*. National Academy Press, Washington, DC.

- NAS (1997). *Leucaena*: Promising forage and tree crop for the tropics. National Academy of Sciences. Washington. D.C. pp.115
- NOM-138-SEMARNAT/SS-2003. Límites máximos permisibles de hidrocarburos en el suelo y las especificaciones para su caracterización y remediación. Norma Oficial Mexicana.
- Phale P.S., Basu A., Majhi P.D., Deveryshetty J., Vamsee-Krishna C. y Shrivastava R. (2007) Metabolic diversity in bacterial degradation of aromatic compounds. *Journal of Integrative Biology*. 11, 252-279.
- Phillips D.A. y Streit W.R. (1996). Legume signals to rhizobial symbionts: a new approach for defining rhizosphere colonization. *In: Plant-Microbe Interactions* (Stacey G. y Keen N.T. Eds.). Chapman & Hall, New York. pp. 236–271.
- Quiñones-Aguilar E.E., Ferrera-Cerrato R., Gavi-Reyes F., Fernández-Linares L., Rodríguez-Vázquez R. y Alarcón A. (2003). Emergence and growth of maize in a crude oil polluted soil. *Agrociencia*. 37, 585-594.
- Radwan S.S., Dashti N., El-Nemr I. y Khanafer M. (2007). Hydrocarbon utilization by nodule bacteria and plant growth-promoting rhizobacteria. *Int. J. Phytorem.* 9, 475-486.
- Rai L.C. y Raizada M. (1989). Effect of biometallic combinations of Ni, Cr, and Pb on growth uptake of nitrate and ammonia, $^{14}\text{CO}_2$ fixation, and nitrogenase activity of *Nostoc muscorum*. *Ecotoxicol. Env. Saf.* 17, 75-85.
- Reilley K.A., Banks M.K y Schwab A.P. (1996). Organic chemicals in the environment: Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere. *J. Environ. Qual.* 25, 212-219.

- Reyes-Reyes B.G., Zamora-Villafranco E., Reyes-Reyes M.L., Frías-Hernández J.T., Olalde-Portugal V. y Dendooven L. (2003). Decomposition of leaves of huizache (*Acacia tortuosa*) and mesquite (*Prosopis* spp) in soil of central highlands of Mexico. *Plant and Soil*. 256, 359-370.
- Rico-Arce M.L. y S. Bachean S. (2006). A taxonomic revisión of *Acaciella* (Leguminosae, Mimosoideae). *An. Jardín Bot. Madrid*. 63, 189-244.
- Rincón-Rosales R. y Gutiérrez-Miceli F.A. (2008). Características biológicas de *Acaciella angustissima* (Mill.) Britton & Rose en su hábitat natural y evaluación de su potencial cortical en Chiapas, México. *Agrociencia*. 42, 129-137.
- Rincón-Rosales R., Culebro N.R., Gutiérrez-Miceli F.A. y Dendooven L. (2003). Scarification of sedes of *Acacia angustissima* (Mill.) Kuntze and its effect on germination. *Seed Sci. Tech.* 31, 301-307.
- Rincón-Rosales R., Lloret L., Ponce E. y Martínez-Romero E. (2009). Rhizobia with different symbiotic efficiencies nodulate *Acaciella angustissima* in Mexico, including *Sinorhizobium chiapanecum* sp. nov. which has common symbiotic genes with *Sinorhizobium mexicanum*. *FEMS Microbiol Ecol.* 67, 103–117.
- Rivera-Cruz M.C., Trujillo-Narcía A., Miranda A. y Maldonado, E. (2005). Evaluación toxicológica de suelos contaminados con petróleo nuevo e intemperizado mediante ensayos con leguminosas. *Interciencia*. 30, 326-331.
- Samantha S.K., Singh O.V. y Jain R.K. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol.* 20, 243-248.

- Sangabriel W., Ferrera-Cerrato R., Trejo-Aguilar D., Mendoza-López M.R., Cruz-Sánchez J.S., López-Ortiz C., Delgadillo-Martínez J., y Alarcón A. (2006). Tolerancia y fitorremediación de suelo contaminado con combustóleo por seis especies vegetales. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 22, 63-73.
- SAS Institute Inc. (2002). The SAS system for windows, ver. 9.0. SAS Institute Inc, Cary, North Carolina. EUA.
- Saval S. (1998). Biorremediación: Alternativa para la limpieza de suelos y acuíferos contaminados con hidrocarburos. *Ingeniería y Ciencias Ambientales.* 34, 6-9.
- Schonoor J.L., Licht L.A., McCutcheon S.C., Wolfe N.L. y Carreira L.H. (1995). Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 29, 318-323.
- Schwab, A.P., Al-Assi A.A. y Banks M.K. (1998). Adsorption of naphthalene onto plant roots. *J. Environ. Qual.* 27, 220-224.
- Schwab A.P., Su J., Wetzell S., Pekarek S. y Banks K.M. (1999). Extraction of petroleum hydrocarbons from soil by mechanical shaking. *Environ. Sci. Technol.* 33, 1940-1945.
- Sessitsch, A., Howieson J.G., Perret X., Antoun H. y Martínez-Romero E. (2002). Advances in *Rhizobium* research. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21, 323-378.
- Shimp J.F., Tracy J.C, Davis L.C., Lee E., Huang W., Erickson L.E. y Schonoor J.L. (1993). Beneficial effects of plants in the remediation of soils and groundwater contaminated with organic materials. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.* 23, 41-77.
- SEMARNAT (2008). Informe de la situación de medio ambiente en México. Compendio de estadísticas ambientales. Edición 2008. [http:// app1. semarnat. gob. mx / dgeia / informe_2008/ pdf/completo.pdf](http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_2008/pdf/completo.pdf)

- Singleton V.L. y Rossi J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticul.* 16, 144-147.
- Song Y.F., Gong P., Zhou Q.X. y Sun T.H. (2005). Phytotoxicity assessment of phenanthrene, pyrene and their mixtures by a soil-based seedling emergence test. *J. Environ. Sci. Chin.* 17, 580-583.
- Soong Y.Y. y Barlow P.J. (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chem.* 88, 411-417.
- Stahl P.D. y Williams S.E. (1986). Oil shale process water affects activity of vesicular-arbuscular fungi and *Rhizobium* 4 years after application to soil. *Soil Biol. Biochem.* 18, 451-455.
- Strawinsky R.J. y Stone R.W. (1943). Conditions governing the oxidation of naphthalene and the chemical analysis. *J. Bacteriol.* 45, 16.
- Strawinsky R.J. y Stone R.W. (1954). Biological oxidation of naphthalene. *Can. J. Microbiol.* 1, 206-210.
- Sundaravarathan S. y Kannaiyan S. (2002). Role of plant flavonoids as signal molecules to *Rhizobium*. *In: Biotechnology of biofertilizers* (Kannaiyan S. Ed.). Narosa Publishing House, Nueva Delhi, India. pp. 144-164.
- Sung K., Corapcioglu Y., Drew M.C. y Munster C.L. (2001). Plant contamination by organic pollutants in phytoremediation. *J. Environ. Qual.* 30, 2081-2090.
- Suominen L., Jussila M.M., K. Mäkeläinen K., Romantschuk M. y Lindström K. (2000). Evaluation of the *Galega-Rhizobium galegae* system for the bioremediation of oil-contaminated soil. *Environ. Pollut.* 107, 239-244.

- Tattersfield F. (1927). The decomposition of naphthalene in the soil and the effect upon its insecticidal action. *Ann. Appl. Biol.* 15, 67.
- Tausson W.O. (1927). Naphthalin als kohlenstoffquelle für bakterien. *Planta.* 4, 214–256.
- Trapido M. (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbons in Estonian soil: contamination and profiles. *Chemosphere.* 105, 67-74.
- Treutter D. (2005). Significance of flavanoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biol.* 7, 581-591.
- Trinick M.J. (1979). Structure of nitrogen-fixing nodules formed by *Rhizobium* on roots of *Parasponia andersonii* Planch. *Can. J. Microbiol.* 25, 565-578.
- USEPA (U.S. Environmental Protection Agency). 2000. Introduction to Phytoremediation. EPA/600/r-99/107. Cincinnati, Ohio.
- Vázquez-Luna D., Castelán-Estrada M., Rivera-Cruz M.C., Ortiz-Ceballos A.I. y Izquierdo-R F. (2010). *Crotalaria incana* L. y *Leucaena leucocephala* Lam. (Leguminosae): Especies indicadoras de toxicidad por hidrocarburos del petróleo en el suelo. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 26, 183-191.
- Vela S., Hässblom M.M. y Youn L.Y. (2002). Biodegradation of aromatic and aliphatic compounds by rhizobial species. *Soil Sci.* 167, 802-810.
- Vives I., Grimalt J.O. y Guitart R. (2001). Los hidrocarburos aromáticos policíclicos y la salud humana. *Apuntes de Ciencia y Tecnología.* 3, 45-51.
- Vranova E., Inze D. y Van Breusegem F. (2002) Signal transduction during oxidative stress. *J. Exp. Bot.* 53, 1227-1236.

- Wagner G.M. (1997). *Azolla*: A review of its biology and utilization. Bot. Rev. 63, 1-26.
- Walton, B.T., Guthrie E.A y Hoylman A.M. (1994). Toxicant degradation in the rhizosphere. American Chemical Society. U.S.A. p. 11-25.
- Weyens N., Van Der-Lelie D., Taghavi S., Newman L. y Vangronsveld J. (2009). Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation. Trends Biotechnol. 27, 591-598.
- WHO (1998). Environmental health criteria 202, selected non-neterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. Geneva, World Health Organization.
- Wilcke W. (2000). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil – a review. J. Plant Nutr. Soil Sc. 163, 229-248.
- Wilson S.C. y Jones K.C. (1993). Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. Environ. Pollut. 80, 229-249.
- Young J.P.W. (1996). Phylogeny and taxonomy of rhizobia. Plant Soil. 186, 45-52.
- Young-Soo K., Jong-Su S., Yuting H. y Qing-X. L. (2006). Degradation pathways of phenanthrene by *Sinorhizobium* sp. C4. Appl. Microbiol. Biotechnol. 71, 935-941.

APÉNDICE I

Cuadro AI. Composición química de la solución nutritiva Faraheus modificada.

Reactivo	Cantidad g L-1
CaCl ₂	0.1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.12
KH ₂ PO ₄	0.1
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	0.15
Citrato férrico	0.005
NH ₄ NO ₃ *	0.2
MnSO ₄ .H ₂ O	traza
CuSO ₄ .5H ₂ O	traza
ZnSO ₄ .7H ₂ O	traza
H ₃ BO ₃	traza
NaCl	traza
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	traza

* Omitir para una solución libre de nitrógeno
Esterilizar en autoclave y llevar el pH a 6.5

APÉNDICE II



Inoculado con *Rhizobium tropici*

No inoculado

Figura AII. Efecto de la inoculación de *Rhizobium tropici* en *Leucaena leucocephala* en sistemas “growth pouch” contaminados con 60 mg NAF L⁻¹. (Fase experimental I)

APÉNDICE III

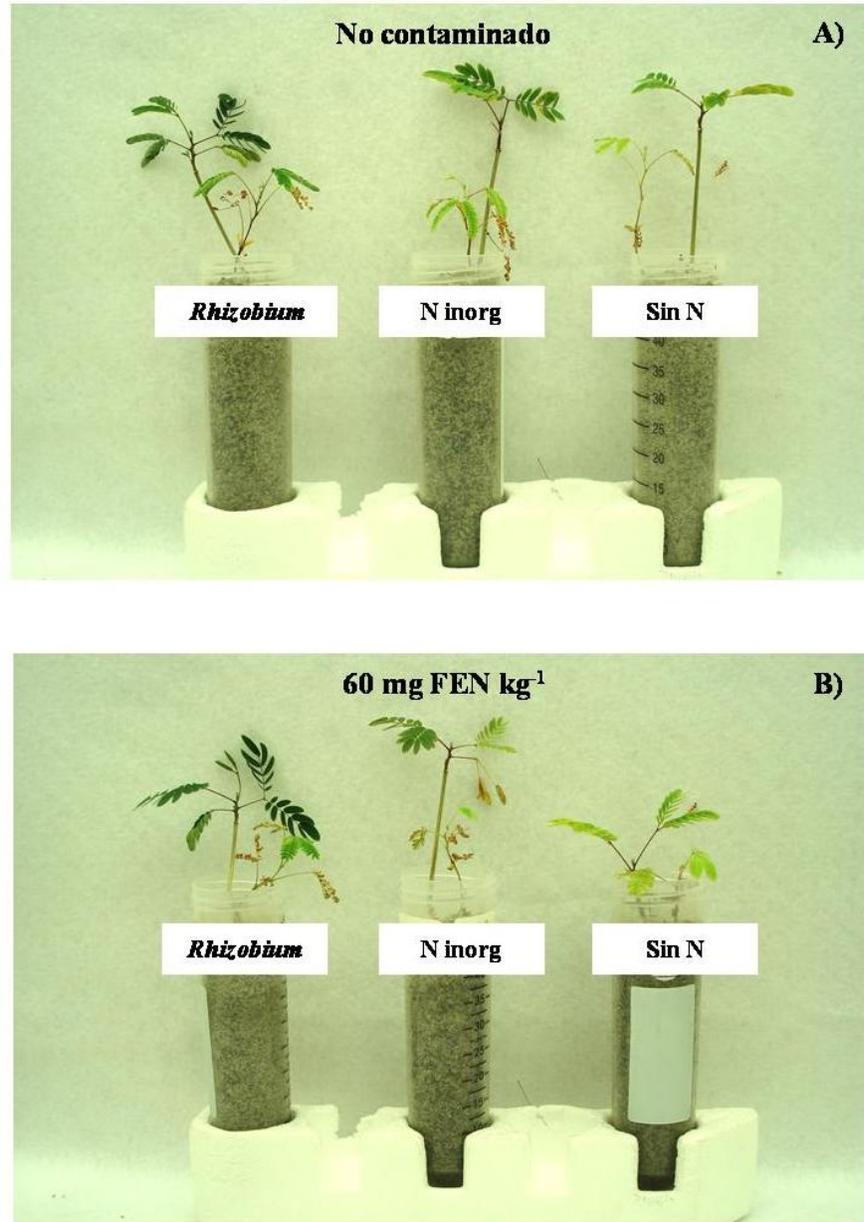


Figura AIII. Efecto de la inoculación con *Rhizobium*, la fertilización inorgánica (20 mg $\text{NH}_4\text{NO}_3 \text{ kg}^{-1}$) y los tratamientos sin fuente de nitrógeno; en *Leucaena leucocephala* y *Acaciella angustissima*. A) No contaminados; B) con 60 mg FEN kg^{-1} .