



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FISIOLOGÍA VEGETAL

**RESPUESTAS DE *Leucaena leucocephala* EN
SIMBIOSIS CON *Rhizobium* Y/O MICORRIZA EN
DIFERENTES ETAPAS DE DESARROLLO DURANTE
LA FITORREMEDIACIÓN DE FENANTRENO**

ITZEL VILLEGAS VELÁZQUEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2011

La presente tesis titulada: **Respuestas de *Leucaena leucocephala* en simbiosis con *Rhizobium* y/o micorriza en diferentes etapas de desarrollo durante la fitorremediación de fenantreno**, realizada por la alumna: **Itzel Villegas Velázquez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FISIOLOGÍA VEGETAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



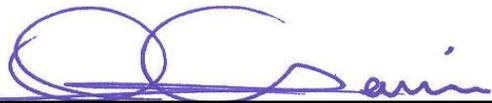
DR. RONALD FERRERA CERRATO

ASESOR:



DR. ALEJANDRO ALARCÓN

ASESOR:



DR. OSCAR GARCÍA BARRADAS

ASESOR:



DRA. MARÍA TERESA COLINAS LEÓN

La presente tesis “**Respuestas de *Leucaena leucocephala* en simbiosis con *Rhizobium* y/o micorriza en diferentes etapas de desarrollo durante la fitorremediación de fenantreno**”, forma parte del Proyecto: **SEP-CONACYT 79456 “Simbiosis tripartita *Rhizobium*-leguminosa-micorriza arbuscular y su respuesta a los hidrocarburos del petróleo**”. Itzel Villegas Velázquez agradece al CONACYT el apoyo brindado durante sus estudios de postgrado.



**RESPUESTAS DE *Leucaena leucocephala* EN SIMBIOSIS CON *Rhizobium* Y/O
MICORRIZA EN DIFERENTES ETAPAS DE DESARROLLO DURANTE LA
FITORREMEDIACIÓN DE FENANTRENO**

Itzel Villegas Velázquez, M. en C.

RESUMEN

En este estudio se evaluó la respuesta de semillas y plántulas de *Leucaena leucocephala* ante fenantreno (FEN), y el potencial de fitorremediación de FEN por la simbiosis tripartita *Rhizobium-Leucaena-Glomus*, mediante el planteamiento de dos fases experimentales.

En la primera fase, se evaluó el efecto de tres dosis de FEN (60, 80 y 100 mg L⁻¹) y la inoculación de *Rhizobium tropici* CIAT 899 en semillas y desarrollo inmediato (10 días) de las plántulas de *Leucaena*. El FEN no afectó la conductividad eléctrica ni la germinación de semillas, mientras que *Rhizobium* estimuló la germinación únicamente a las 32 h. El FEN estimuló la longitud radical, pero redujo la longitud del tallo, inhibió la proliferación de pelos radicales y causó lesiones necróticas en cotiledones; en contraste, *Rhizobium* estimuló el desarrollo de pelos radicales y atenuó los daños necróticos. La actividad antioxidante total (AOX) y el contenido de compuestos fenólicos (CFT) en raíz disminuyeron al incrementar el FEN, pero incrementaron en hipocótilos. *Rhizobium* mantuvo mejor balance en la AOX y el CFT en los diferentes órganos de las plántulas aún ante FEN.

En la segunda fase, se evaluó el efecto de *Rhizobium* y *Glomus intraradices* en el desarrollo de plántulas de *Leucaena* expuestas a 60 mg FEN kg⁻¹, durante 60 días, y el potencial de la simbiosis tripartita en la degradación de este contaminante. El FEN estimuló la nodulación, pero disminuyó la colonización micorrízica. La simbiosis tripartita incrementó el peso de materia seca de la planta, la actividad de la nitrogenasa, el contenido de N y P; en contraste, la AOX y el CFT fueron estimulados por *Glomus*. La degradación de FEN fue mayor en las plantas inoculadas con *Glomus* o con la doble simbiosis. La simbiosis tripartita tiene uso potencial para la fitorremediación de suelos contaminados con fenantreno.

Palabras clave: germinación, desarrollo de plántulas, actividad antioxidante, compuestos fenólicos, degradación.

RESPONSES OF *Leucaena leucocephala* IN SYMBIOSIS WITH *Rhizobium* AND/OR MYCORRHIZA AT DIFFERENT DEVELOPMENTAL STAGES DURING THE PHYTOREMEDIATION OF PHENANTHRENE

Itzel Villegas Velázquez, M.Sc.

ABSTRACT

In this study the responses of seeds and seedlings of *Leucaena leucocephala*, and the phytoremediation potential of phenanthrene (FEN) due to the tripartite symbiosis *Rhizobium-Leucaena-Glomus* were evaluated, two experimental stages were considered:

First stage evaluated the effect of three doses of FEN (60, 80 and 100 mg L⁻¹) and the inoculation of *Rhizobium tropici* CIAT 899 on seed germination and early development of seedlings (10 days) of *Leucaena*. FEN did not affected the electrical conductivity nor the seed germination, whereas *Rhizobium* stimulated the germination only at 32 h. FEN stimulated the total root length but diminished the stem length, inhibited the abundance of root hairs, and caused necrotic spots on cotyledons. Total antioxidant activity (AOX) and content of phenolic compounds (CFT) in roots decreased due to FEN, but increase in hypocotyls. *Rhizobium* maintained a balance in AOX and CFT in all seedling organs even in presence of FEN.

The second stage evaluated the effect of *Rhizobium* and *Glomus intraradices* on the growth of *Leucaena* at 60 mg FEN kg⁻¹, during 60 days, as well as the potential of the tripartite symbiosis on FEN degradation. FEN stimulated the nodulation, but diminished the mycorrhizal colonization. The tripartite symbiosis increased the plant dry weight, the nitrogenase activity, and the content of N and P; in contrast, the AOX and the CFT were stimulated by *Glomus*. FEN-degradation was greater in plants inoculated with *Glomus* or with the double inoculation. The tripartite symbiosis has potential use in phytoremediation of contaminated soils with FEN.

Key words: *germination, seedling growth, antioxidant activity, phenolic compounds, degradation.*

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas por brindarme el apoyo y las herramientas para realizar mi estudios de Maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento brindado para mi desarrollo personal y el de esta investigación.

Al Dr. Ronald Ferrera-Cerrato por su confianza, consejos y apoyo constante.

Al Dr. Alejandro Alarcón por estar siempre al tanto de esta investigación y porque sin su paciencia, guía e interés esta tesis no se hubiera llevado a cabo.

Al Dr. Leobigildo Córdova Téllez por facilitarme el apoyo y las herramientas para realizar la primera fase experimental.

A la Dra. Remedios Mendóza López por el apoyo y colaboración en el análisis del fenantreno en el suelo durante mi estancia en Xalapa.

A Susana Sánchez Alvarado por el apoyo, colaboración y amistad brindados durante en el análisis del fenantreno en el suelo.

A Yadira Cornejo Silva por su compañía, ayuda y amistad.

A Emmanuel García Zuñiga por el apoyo brindado, por la fortaleza constante y por estar conmigo... (Seguramente sin tu ayuda esta tesis seguiría sin escribirse).

A “Don Mundo” por su invaluable apoyo, por sus enseñanzas y por hacer alegre mi estancia en el laboratorio.

Al personal de Microbiología por su apoyo durante esta investigación.

DEDICATORIA

A mis padres

Gracias por estar siempre conmigo, guiarme y apoyarme a pesar de las circunstancias. Son el mejor ejemplo a seguir... Los quiero mucho.

A mis hermanas

Por ser mis segundas madres, por ser buen ejemplo, por su gran amistad y por apoyarme con cada sueño... Gracias, las adoro.

A Doña Quintos †

Por permitirme conocerte, aprender de ti y lo hermoso pero difícil de la vejez... Te tengo siempre presente, te quiero mucho.

A mis amigas y amigos

Porque ser como mi segunda familia y dar gran felicidad a mi vida.

CONTENIDO

Página

ÍNDICE DE CUADROS..... x

ÍNDICE DE FIGURAS..... xi

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN..... 1

CAPÍTULO II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

OBJETIVO GENERAL 3

OBJETIVOS PARTICULARES 3

HIPÓTESIS GENERAL 3

HIPÓTESIS PARTICULARES 3

CAPÍTULO III. REVISIÓN DE LITERATURA

EL FENANTRENO, IMPLICACIONES AMBIENTALES Y SU RELACIÓN CON SISTEMAS BIOLÓGICOS UTILIZADOS EN FITORREMEDIACIÓN

El fenantreno dentro de los hidrocarburos policíclicos aromáticos 4

El petróleo como fuente de contaminación de HPAs 7

Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos del petróleo 11

Rizobios 14

Hongos micorrízicos arbusculares 16

Fitorremediación 18

Leucaena leucocephala Lam. 20

Conclusiones de la revisión de literatura 24

CAPÍTULO IV.	Página
GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y DESARROLLO DE PLÁNTULAS DE <i>Leucaena leucocephala</i> INOCULADAS CON <i>Rhizobium tropici</i> ANTE FENANTRENO	
RESUMEN	26
ABSTRACT	27
INTRODUCCIÓN	28
MATERIALES Y MÉTODOS	30
RESULTADOS	33
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES	52
 CAPÍTULO V.	
BIODEGRADACIÓN DE FENANTRENO POR LA SIMBIOSIS TRIPARTITA <i>Rhizobium tropici</i> – <i>Leucaena leucocephala</i> – <i>Glomus intraradices</i>	
RESUMEN	53
ABSTRACT	54
INTRODUCCIÓN	55
MATERIALES Y MÉTODOS	56
RESULTADOS	62
DISCUSIÓN	80
CONCLUSIONES	85
 CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES GENERALES	87
LITERATURA CITADA	88

ÍNDICE DE CUADROS

Página

Cuadro 2.1. Características físico-químicas del fenantreno.....	6
Cuadro 2.2. Algunos accidentes que ocasionaron el derrame de petróleo.....	10
Cuadro 2.3. Propiedades del suelo que se modifican por la presencia de hidrocarburos en el suelo	11
Cuadro 5.1. Variables de crecimiento (diámetro del tallo, volumen radical, hojas bipinnadas y longitud del total) de plantas de <i>Leucaena leucocephala</i> por efecto de la inoculación con <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 y/o <i>Glomus intraradices</i> y la aplicación de fenantreno (60 mg kg^{-1}), a los 60 días de desarrollo	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 2.1. Principales hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs).....	4
Figura 2.2. Consumo mundial de energía primaria de 1997 – 2007.....	9
Figura 2.3. Mecanismos mediante los cuales las plantas actúan en la limpieza de los suelos durante la fitorremediación.....	19
Figura 2.4. A) Semillas y vainas, B) Flor y C) Árbol de <i>Leucaena leucocephala</i>	21
Figura 2.5. Anatomía de la semilla de <i>Leucaena leucocephala</i>	23
Figura 2.6. <i>Leucaena leucocephala</i> en asociación con <i>Rhizobium tropici</i> y <i>Glomus intraradices</i> . A) Aspecto de los nódulos, B) Arbúsculos, y C) Hifas.....	25
Figura 4.1. Conductividad eléctrica de semillas de <i>Leucaena leucocephala</i> inoculadas o no con <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 y con aplicación de tres concentraciones de fenantreno (60, 80 y 100 mg L ⁻¹), a las 24 h	34
Figura 4.2. Curva de hidratación de semillas de <i>Leucaena leucocephala</i> por efecto de la inoculación con <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 y/o por la aplicación de tres concentraciones de fenantreno.....	35
Figura 4.3. Porcentaje de germinación de semillas de <i>Leucaena leucocephala</i> inoculadas o no con <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 y/o por la aplicación de tres concentraciones de fenantreno (60, 80 y 100 mg L ⁻¹).....	37
Figura 4.4. Longitud de raíz (a) y tallo (B) de <i>Leucaena leucocephala</i> inoculadas o no con <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 y/o por la aplicación de tres concentraciones de fenantreno, a los 10 días de desarrollo.....	38
Figura 4.5. Aspecto de las raíces de <i>Leucaena leucocephala</i> por la aplicación de fenantreno a diferentes concentraciones y/o la inoculación con <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 después de los 10 días de la germinación.....	39

Figura 4.6. Peso de materia seca de raíz (A) y parte aérea (B) de *Leucaena leucocephala* inoculadas o no con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y/o por la aplicación de tres concentraciones de fenantreno, a los 10 días de desarrollo..... 41

Figura 4.7. Aspecto de las plántulas de *Leucaena leucocephala* a los 10 días de desarrollo, en las que se observan daños por la aplicación de fenantreno (80 y 100 mg L⁻¹) con o sin la inoculación de *Rhizobium tropici* CIAT 899..... 42

Figura 4.8. Actividad antioxidante total de diferentes órganos de *Leucaena leucocephala* por la aplicación de tres concentraciones de fenantreno con o sin *Rhizobium tropici* CIAT 899, a los 10 días de desarrollo..... 44

Figura 4.9. Contenido de compuestos fenólicos totales de diferentes órganos de *Leucaena leucocephala* por la aplicación de tres concentraciones de fenantreno con /sin *Rhizobium tropici* CIAT 899, a los 10 días de desarrollo..... 45

Figura 5.1. Número de nódulos rojos y blancos en raíces de *Leucaena leucocephala* por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y *Glomus intraradices*, y/o por la aplicación de fenantreno (60 mg kg⁻¹)..... 64

Figura 5.2. Peso de materia seca de nódulos de *Leucaena leucocephala* por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y *Glomus intraradices*, y/o por la aplicación de fenantreno (60 mg kg⁻¹)..... 66

Figura 5.3. Colonización micorrízica total en raíces de *Leucaena leucocephala* por efecto de la inoculación con *Glomus intraradices* y *Rhizobium tropici* CIAT 899, y/o por la aplicación de fenantreno (60 mg kg⁻¹)..... 67

Figura 5.4. Actividad de nitrogenasa de nódulos de *Leucaena leucocephala* por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y *Glomus intraradices* y/o por la aplicación de fenantreno (60 mg kg⁻¹)..... 68

Figura 5.5. Porcentaje de nitrógeno total en las plantas de *Leucaena leucocephala* por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y *Glomus intraradices* y/o por la aplicación de fenantreno (60 mg kg⁻¹)..... 70

Figura 5.6. Fósforo total en plantas de *Leucaena leucocephala* por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y *Glomus intraradices* y/o por fenantreno (60 mg kg⁻¹)..... 71

Figura 5.7. Peso de materia seca total de plantas de *Leucaena leucocephala* por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y *Glomus intraradices* y/o por fenantreno (60 mg kg⁻¹)..... 74

Figura 5.8. Actividad antioxidante de la raíz de *Leucaena leucocephala* por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y *Glomus intraradices* y/o por la aplicación de fenantreno (60 mg kg⁻¹)..... 76

Figura 5.9. Contenido de compuestos fenólicos totales de la raíz de *Leucaena leucocephala* por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y *Glomus intraradices* y/o por la aplicación de fenantreno (60 mg kg⁻¹) 77

Figura 5.10. Porcentaje de biodegradación del fenantreno (60 mg kg⁻¹) por *Leucaena leucocephala* en simbiosis con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y *Glomus intraradices*..... 78

Figura 5.11. Cromatogramas que muestran la desaparición del fenantreno en muestras rizosféricas de *Leucaena leucocephala* en simbiosis con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y/o *Glomus intraradices* expuestas a fenantreno (60 mg kg⁻¹), durante 60 días..... 79

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El petróleo es una mezcla compleja de gases, líquidos y sólidos, compuesto principalmente por hidrocarburos (76 a 86% de carbono y 10 a 14% de hidrógeno) y un pequeño porcentaje de otros compuestos orgánicos como oxígeno, azufre y algunos metales en menor proporción (Ortínez *et al.*, 2003; Van *et al.*, 2003). Tiene un gran valor para la economía de todos los países; México es el tercer productor de petróleo crudo en el mundo (PEMEX, 2011).

Los accidentes por causa del petróleo y sus derivados a través de la historia han sido diversos y han traído consigo devastadores resultados para el ambiente. Debido a los problemas ambientales causados por los hidrocarburos, se han desarrollado técnicas para recuperar suelo y agua contaminadas (Martín *et al.*, 2004). Uno de los hidrocarburos del petróleo que se ha utilizado como modelo en sistemas de biorremediación es el fenantreno, con base en sus características físico-químicas y su potencial carcinogénico (Guerrero-Zuñiga *et al.*, 2009).

La biorremediación ha tenido buen éxito en la recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos en comparación con las técnicas físico-químicas (Kaimi *et al.*, 2007; Nwoko *et al.*, 2007). La fitorremediación ha recibido especial interés ya que las plantas incrementan las actividades microbianas en la rizósfera, influyen en la concentración de CO₂, modifican el pH, el potencial osmótico, el potencial redox, aumentan la concentración de O₂ y el contenido nutricional del suelo, estimulando así la degradación de contaminantes orgánicos (Jones *et al.*, 2004; Parrish *et al.*, 2005).

Algunas bacterias, hongos y plantas son capaces de tolerar y/o degradar hidrocarburos del petróleo (Nwoko *et al.*, 2007; Ri-He *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008). Por lo que es importante identificar aquellas plantas capaces de tolerar altas concentraciones de contaminantes,

así como aislar y caracterizar microorganismos rizosféricos que en combinación con las plantas favorezcan la disipación de los contaminantes en la rizosfera (Chiapusio *et al.*, 2007).

Las leguminosas, con su capacidad de formar simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno y con hongos micorrízicos arbusculares, han sido poco estudiadas para la degradación de hidrocarburos del petróleo (Hall *et al.*, 2010). Por lo que la función de las interacciones entre estos tres organismos en la degradación de hidrocarburos del petróleo no se ha descifrado. *Leucaena leucocephala* es una leguminosa arbórea de clima tropical que es útil para la reforestación y mejoramiento de suelo debido al aporte de materia orgánica y de nitrógeno. Además, es tolerante a suelos alcalinos y ligeramente ácidos (pH 5.2), a periodos largos de sequía y exceso de luz (Zárate, 1987; Sethi y Kulkarni, 1995; Shelton y Brewbaker, 1999).

Investigaciones previas han demostrado que la presencia de bacterias del tipo de los rizobios promueve la degradación de petróleo crudo (Radwan *et al.*, 2007, Dashti *et al.*, 2008, Awadhi *et al.*, 2009); mientras que los hongos micorrízicos arbusculares contribuyen en la disipación de los hidrocarburos en el suelo y son capaces de almacenar ciertas cantidades de hidrocarburos en sus estructuras (Cabello, 1997; Robertson *et al.*, 2007; Alarcón *et al.*, 2008). En el caso de *Leucaena*, esta planta tolera altas concentraciones de hidrocarburos del petróleo (562 mg kg⁻¹), y es capaz de favorecer la disipación de petróleo crudo (Udom *et al.*, 2008; Vázquez-Luna *et al.*, 2010).

En esta investigación se eligió como planta modelo a *Leucaena leucocephala* en simbiosis con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y *Glomus intraradices*, para evaluar su capacidad de fitorremediación de fenantreno en arena y bajo condiciones controladas.

CAPÍTULO II

OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos de *Rhizobium tropici* y/o *Glomus intraradices* en el crecimiento y desarrollo de *Leucaena leucocephala*, así como en la fitorremediación de fenantreno.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el beneficio de la inoculación con *Rhizobium tropici* en la germinación de semillas y el desarrollo temprano de plántulas de *Leucaena leucocephala* ante tres concentraciones de fenantreno (60, 80 y 100 mg L⁻¹) bajo condiciones controladas.
- Evaluar la simbiosis de *Leucaena* con *Rhizobium tropici* y/o *Glomus intraradices* durante la fitorremediación de fenantreno bajo condiciones controladas.

HIPÓTESIS GENERAL

La inoculación de *Rhizobium tropici* y/o *Glomus intraradices* estimula el crecimiento y desarrollo y *Leucaena leucocephala* expuesta a fenantreno, además de estimular la fitodegradación de este contaminante.

HIPÓTESIS PARTICULARES

- La inoculación con *Rhizobium tropici* estimula la germinación de semillas y desarrollo temprano de plántulas de *Leucaena leucocephala* ante fenantreno.
- *Leucaena leucocephala* en simbiosis con *Rhizobium tropici* y *Glomus intraradices* presenta mejor crecimiento y mayor capacidad de disipación de fenantreno.

CAPÍTULO III

EL FENANTRENO, IMPLICACIONES AMBIENTALES Y SU RELACIÓN CON SISTEMAS BIOLÓGICOS UTILIZADOS EN FITORREMEDIACIÓN

El fenantreno dentro de los hidrocarburos policíclicos aromáticos

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) son compuestos orgánicos formados por anillos aromáticos, en los que al menos dos de éstos están fusionados (Ravindra *et al.*, 2008). Estos compuestos son productos de la combustión incompleta de la materia orgánica, petróleo y tabaco, por lo que pueden ser incorporados al ambiente por emisiones de volcanes, incendios, gases liberados por automóviles, descargas industriales, derrames de petróleo y sus derivados. Los HPAs suelen ser poco solubles en agua, afines a lípidos y son los compuestos más complejos y tóxicos del petróleo (Jiao *et al.*, 2007). Existen cientos de HPAs de los cuales 17 (Figura 2.1) son los más conocidos por su frecuencia en el ambiente, por su toxicidad y la exposición a los humanos (ATSDR, 1995).

La toxicidad de los HPAs radica en sus formas genotóxicas (epóxidos y dihidrodioles) que se forman a partir de la oxidación de los HPAs por las oxidasas. Estas oxidasas rompen un anillo aromático convirtiendo un HPA en un epóxido, lo cual lo hace más hidrosoluble y de fácil excreción para el cuerpo humano. Sin embargo, las exposiciones prolongadas a estos compuestos ocasionan su acumulación en el tejido adiposo, la unión covalente a las proteínas y a los ácidos nucleicos ocasionando mutaciones que dan origen a diversos tipos de cáncer (Vives *et al.*, 2001; Bracho *et al.*, 2004).

El fenantreno (FEN) es uno de los HPAs más frecuentes en el ambiente, se utiliza en investigaciones de laboratorio por su baja toxicidad y por tener una estructura química sencilla (3 anillos aromáticos) (Cuadro 2.1 y Figura 2.1), características que lo hacen un modelo útil para

investigar la contaminación por HPAs (Blumer, 1976; Narro *et al.*, 1992 citado por Guerrero-Zuñiga *et al.*, 2009).

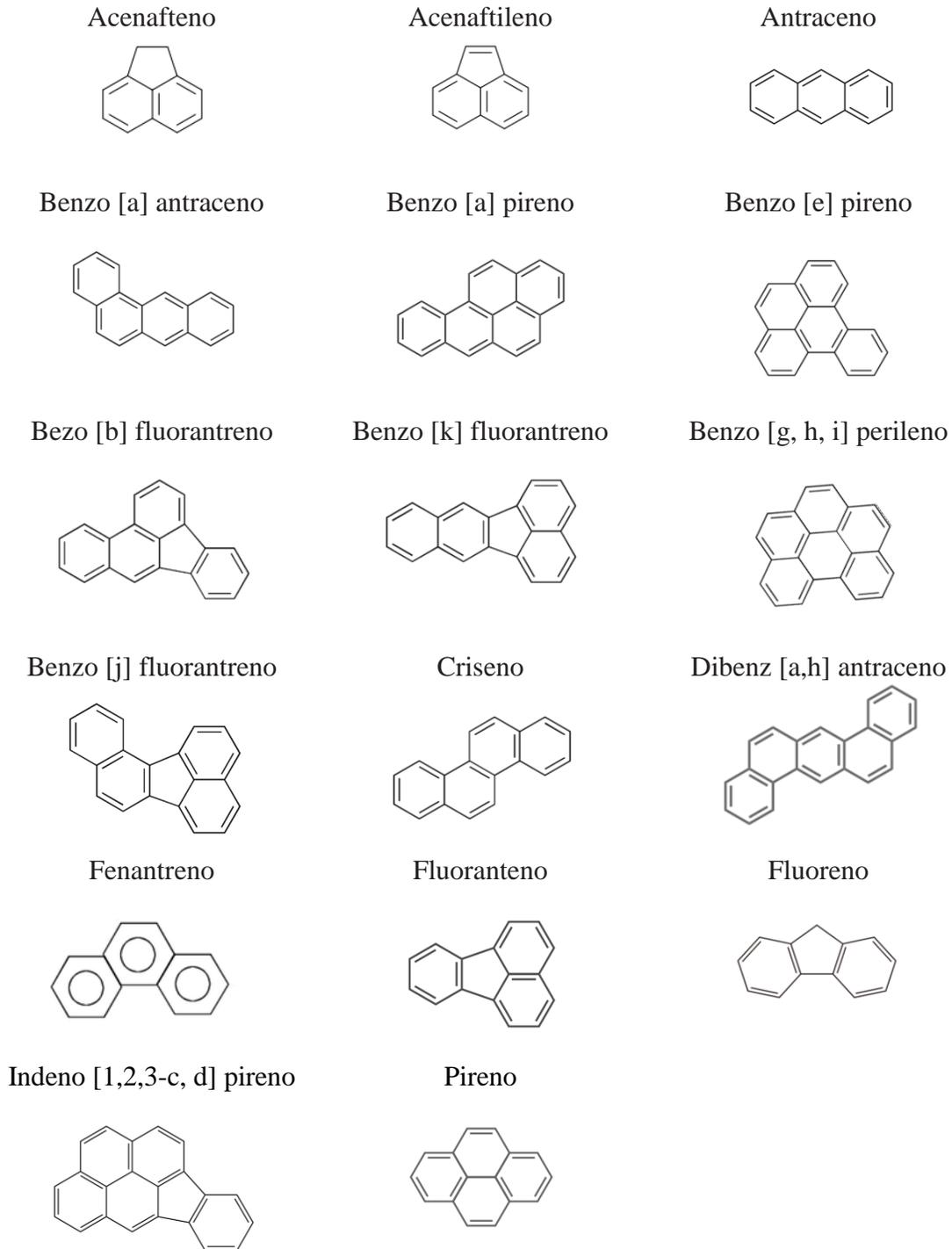


Figura 2.1. Principales hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) (ATSDR, 1995).

Cuadro 2.1. Características físico-químicas del fenantreno.

FENANTRENO (C ₁₄ H ₁₀)	
C 94.34%	H 5.66%
Peso molecular	178.23 g mol ⁻¹
Punto de fusión	100° C
Punto de ebullición	340° C
Punto de evaporación	6.8 x 10 ⁻⁴ (25° C) mm Hg
Densidad	0.980 g cm ³ a 4° C
Solubilidad en agua a 25°C	1.20 mg L ⁻¹
Soluble en	Ácido acético glacial, benceno, hexano ^a , tolueno ^a , bisulfuro de carbono, acetona, tetracloruro de carbono, éter etílico anhidro, etano.
Presión de vapor	5.8 x 10 ⁻⁴ mm Hg at 25° C
Constante de Henry	2.56 x 10 ⁻⁵ atm m ³ mol ⁻¹
	^a Presión de vapor :0.5 mm Hg a 20°C
	^a Densidad del vapor: 6 (Aire = 1)
Coeficiente de partición	Log _{kow} 4.45 Log _{Koc} 4.15

Fuentes: ATSDR (1995). ^a Ortiz-López (2004).

La degradación y movilización de los HPAs en el ambiente dependen principalmente de sus características físico-químicas, y debido a que son compuestos bastante estables y requieren de alta energía para ser oxidados o reducidos, aunque son susceptibles principalmente a la sustitución electrofílica. El FEN tiene un potencial de volatilización bajo (Constante de Henry), y suele quedarse como remanente cuando la contaminación es natural; sin embargo, cuando la contaminación se hace artificialmente la atenuación del FEN es rápida (Maila y Cloete, 2002; Chiapusio *et al.*, 2007). Su tendencia para acumularse en tejido graso (Log_{kow}) es media, y se ha

llegado a encontrar en concentraciones de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ en tejido de *Mugil curema* y *Bagre panamiensis* en la bahía de Salina Cruz, México (Salazar-Coria *et al.*, 2010). Además, este compuesto tiene afinidad media para unirse a carbono orgánico en suelos o sedimentos (Log_{koc}), por lo que tiene fuerte relación entre el carbono orgánico (dependiendo del tipo de suelo con el secuestro del FEN (Chiapusio *et al.*, 2007). Los HPAs de bajo peso molecular son volátiles, pero los más pesados permanecen en los suelos haciendo difícil su biodegradación por lo que son compuestos recalcitrantes (Vives *et al.*, 2001; Bracho *et al.*, 2004).

Existen microorganismos capaces de degradar HPAs y se ha observado que desde las primeras horas de exposición de los HPAs en el suelo se generan metabolitos secundarios que dependen de los microorganismos que estén interviniendo en el proceso de degradación. Las bacterias oxidan HPAs a *cis*-dihidrodióles por la incorporación de moléculas de oxígeno a los carbonos del HPA, posteriormente, los *cis*-dihidrodióles son oxidados formando diferentes metabolitos. En el caso del FEN se ha observado que primero ocurre la incorporación de una molécula de oxígeno, ya sea en la posición 1,2 ó 3,4 de los anillos, lo que da lugar a metabolitos como *cis*-3,4-fenantrenodihidrodióles que después de varios procesos de oxidación dan lugar a metabolitos como el ácido 1-hidroxi-2-ácido naftóico, naftaleno-1,2-diol, ácido salicílico y ácido protocatequico (Fu-Min *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1994; Parikh *et al.*, 2004; Johnsen *et al.*, 2005; Young-Soo *et al.*, 2006).

El petróleo como fuente de contaminación de HPAs

Existen diversas fuentes de contaminación por HPAs, entre las que se encuentra la contaminación por petróleo y sus derivados. El petróleo es una mezcla compleja de gases, líquidos y sólidos, compuesta principalmente por hidrocarburos, aproximadamente del 76% al

86% es carbono y del 10 al 14% es hidrógeno, y además contiene otros compuestos orgánicos como oxígeno, azufre y algunos metales en menor proporción como el vanadio (V), hierro (Fe), níquel (Ni), entre otros (Ortínez *et al.*, 2003; Van *et al.*, 2003).

El petróleo es la principal fuente de energía en el mundo (Figura 2.2) tan sólo en el 2007 la demanda mundial de petróleo crudo fue de 85,220 mbd (miles de barriles por día) (Irastorza *et al.*, 2008). México es el tercer productor de crudo en el mundo, tan solo en el último trimestre de 2010 transportó 2,601 mbd, y se pueden encontrar 6,890 pozos en explotación, 4,658 km de oleoductos, 9,115 km de poliductos y 12,768 ductos de gas. Toda esta infraestructura y movimiento del petróleo o sus derivados pone a México como un país propenso a la contaminación (PEMEX, 2011).

A lo largo de la historia, a partir del descubrimiento y uso del petróleo como fuente de energía, múltiples accidentes han aniquilado miles de especies animales y han alterado áreas ecológicas (Cuadro 2.2). Tan sólo en el 2010 un accidente en Deep Water Horizon, Luisiana, EUA provocó el derrame de cerca de 1 millón de galones de petróleo por día, lo cual afectó 45 millones de Km de costa en Luisiana (Trevors y Saier, 2010).

En el 2010, ocurrieron dos derrames en localidades del estado de Puebla (México). En San Martín Texmelucan, Puebla, se incendió un ducto de PEMEX causando una explosión que dejó heridos graves y 28 muertos. En Ahuazotepec, Puebla, una toma clandestina provocó un derrame de gasolina que causó daños al ambiente. Las tomas clandestinas en ductos de gasolina son frecuentes en México, lamentablemente no son detectadas a tiempo y, además de ocasionar accidentes, son una fuente constante de contaminación (PEMEX, 2011).

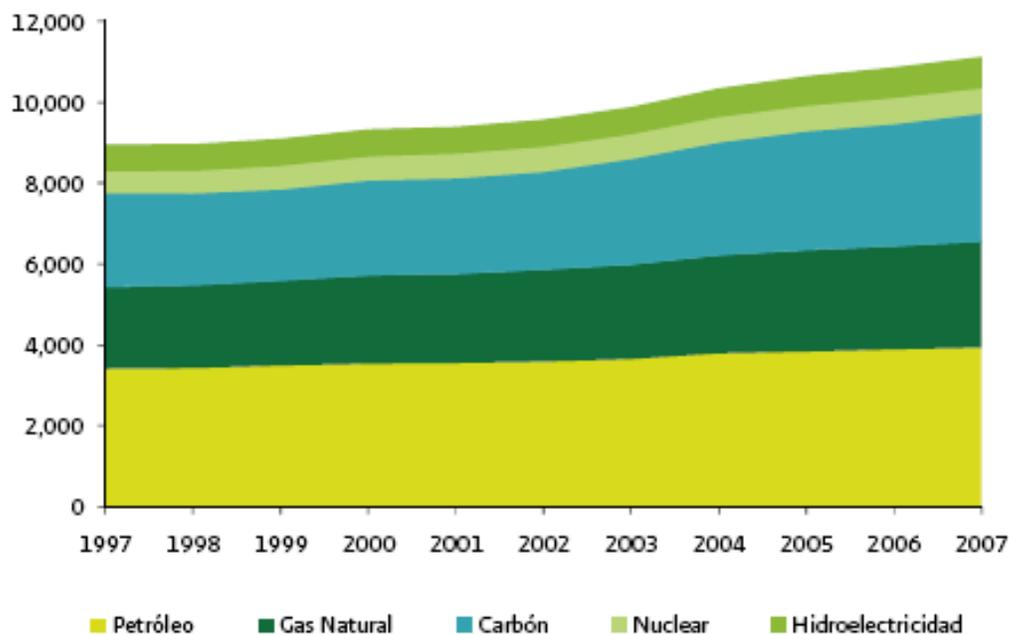


Figura 2.2. Consumo mundial de energía primaria de 1997 – 2007 (miles de toneladas de petróleo crudo equivalente). Fuente.- BP Statistical Review of World Energy, Junio 2008 en Irastorza *et al.*, 2008.

En la última década la cantidad de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo incrementó abruptamente debido a derrames de cisternas o tanques durante su distribución, rupturas en tuberías subterráneas o derrame en procesos industriales. En México y otros países se han encontrado muestras de suelo con alteraciones físicas, químicas y biológicas debido a la contaminación por hidrocarburos del petróleo (Cuadro 2.3) (Wyszkowska y Kucharski, 2000; Sangabriel *et al.*, 2006). Una vez que los hidrocarburos están en el suelo, su distribución está en función de su estructura química (por ejemplo, la densidad del petróleo), de las características fisicoquímicas del suelo, así como de los factores climatológicos.

Cuadro 2.2. Algunos accidentes que ocasionaron el derrame de petróleo (von Hippel y von Hippel, 2003; West, 2005; Trevors y Saier, 2010; Hogan y Suandry, 2011).

Año	Nombre	Lugar	Causa	Cantidad millones de galones
2010	Deep Water Horizon	Luisiana, EUA	Derrame por explosión	206
1994	Rio Kolva tributary	Rusia	Colapso de un dique	84
1989	Exxon Valdez	Alaska	Buque encallado	10
1979	IXTOC	Cd. del Carmen, Campeche, Méx.	Derrame por explosión	140
1979	Empresa Atlántica	Tobago	Choque de barcos petroleros	90
1991	Guerra del Golfo	Golfo Pérsico, Kuwait	Incendio de pozos y reservas.	520

Los efectos de los derrames de petróleo son nocivos para la salud humana y además representan una fuente de contaminación de suelos utilizados para la agricultura. Existen diferentes maneras de controlar y/o recuperar las zonas contaminadas; y en la última década se observa una significativa atención a la recuperación de suelos y de agua mediante sistemas de biorremediación.

Cuadro 2.3. Propiedades del suelo que se modifican por la presencia de hidrocarburos en el suelo (Ortinez *et al* 2003; Romaniuk *et al* 2007).

Propiedades físicas	Propiedades químicas	Propiedades biológicas
<ul style="list-style-type: none"> •Estructura del suelo Color •Disminución de la aireación •Retención del agua en la capa superficial •El potencial hídrico 	<ul style="list-style-type: none"> •Aumento en el carbón orgánico •Aumento en las concentraciones de fósforo, fierro, manganeso, sodio, sulfatos. •Disminución del pH 	<ul style="list-style-type: none"> •Se modifica la biomasa microbiana disminuyendo la diversidad pero aumentando la concentración de bacterias tolerantes o biodegradadoras de hidrocarburos.

Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos del petróleo

Existen tres mecanismos para la recuperación de zonas contaminadas con hidrocarburos del petróleo: confinamiento, limpieza y estrategia de respuesta. El confinamiento consiste en el aislamiento de la zona afectada, mientras que los últimos dos mecanismos consisten en recuperar la zona afectada mediante técnicas *in situ* o *ex situ* tomando en cuenta que la limpieza se hace desde el inicio de la contaminación, y la estrategia de respuesta se realiza mediante evaluaciones de la contaminación a largo plazo (Martín *et al.*, 2004). Varias técnicas de naturaleza física, química o biológica han sido utilizadas para la remediación de suelos contaminados por hidrocarburos. Algunas de las técnicas físicas y químicas que se pueden aplicar *in situ* son la extracción con vapor, el lavado, la solidificación y la estabilización, la separación electrocinética. Las técnicas *ex situ* que se pueden aplicar son la desorción térmica e incineración; la extracción con disolventes, lavados, óxido-reducción, deshalogenación química, solidificación y estabilización (Peressutti *et al.*, 2003; Sangabriel *et al.*, 2006).

Los métodos biológicos para la remediación de suelos son conocidos como biorremediación. Éstos consisten en aprovechar la capacidad natural de organismos vivos de

degradar contaminantes al utilizarlos como fuente de energía, pero controlando factores tales como los nutrientes inorgánicos, agua, oxígeno, pH y temperatura en ambientes terrestres o acuáticos (Garbisu *et al.*, 2002; Saul *et al.*, 2005). Es una técnica alternativa exitosa, socorrida por su bajo costo, por su efectividad y por su afinidad con el ambiente.

Las técnicas de biorremediación se pueden aplicar *ex situ* como la biolabranza, donde se mezcla el suelo contaminado con agentes de volumen y nutrientes, favoreciendo la aireación y su mezcla con suelo limpio (Velasco y Volke, 2008a). Así, se tienen los biorreactores que permiten la combinación controlada y eficiente de procesos físicos, químicos y biológicos; como las biopilas, donde se forman pilas con el suelo contaminado y agentes de volumen, se adicionan nutrientes y agua para colocarse en áreas de tratamiento que incluyen sistemas para colectar lixiviados y alguna forma de aireación (Martín *et al.*, 2004; Velasco y Volke, 2008a). Las técnicas que se aplican *in situ* pueden ser la bioaumentación, que consiste en la adición de microorganismos degradadores de algún contaminante; la fertilización o bioestimulación donde se aplica oxígeno y/o nutrientes con el fin de aumentar la actividad de los microorganismos nativos capaces de degradar los contaminantes; el bioventeo, donde se suministra aire al sitio contaminado a través de pozos de extracción o por movimientos forzados (extracción o inyección) con el fin de promover el oxígeno necesario para los microorganismos degradadores (Velasco y Volke, 2008b; Martín *et al.*, 2004). Una técnica de biorremediación que puede ser utilizada *in situ* o *ex situ*, es la fitorremediación donde se utilizan plantas para remover, transferir, estabilizar, concentrar y/o destruir contaminantes (orgánicos e inorgánicos) en suelo y agua (Martín *et al.*, 2004), la cual se describe más adelante.

El resultado final de una buena biorremediación es la transformación de los contaminantes en compuestos menos o prácticamente no tóxicos como H₂O, CO₂, CH₄ (condiciones anaeróbicas), y en biomasa microbiana (Wyszkowska y Kucharski, 2000). Dentro de la

biorremediación de suelos se consideran todos los posibles organismos que pueden vivir en el suelo como algas, actinomicetos, nematodos, oligoquetos, insectos, pequeños mamíferos y plantas. Sin embargo, como principal objeto de estudio se considera a las bacterias, hongos y plantas como los mejores organismos capaces de degradar, estabilizar y tolerar las situaciones de estrés causadas por la contaminación con hidrocarburos del petróleo (Boszczyk *et al.*, 2004; Martín *et al.*, 2004; Saul *et al.*, 2005; Tobin y O`Connor, 2005).

La mayoría de las bacterias que tienen estas capacidades se encuentran, principalmente, dentro de las divisiones *Proteobacteria* (α -, β -, γ -) y *Actinobacteria*, y se han encontrado 79 géneros bacterianos conocidos con esta capacidad como *Sphingomonas*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Sartheobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Nocordia*, *Pseudomonas*, *Azotobacter* (Wyszowska y Kucharski, 2001; Boszczyk *et al.*, 2004; Saul *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2008;).

Los hongos se caracterizan por aumentar la fertilidad de los suelos, acelerar el ciclo de minerales y compuestos orgánicos. Existen varios hongos con la capacidad de mineralizar HPAs, los principales se encuentran en el Phylum Basidiomycota, que incluye hongos tanto ligninolíticos como no-ligninolíticos como *Phanerochaete*, *Corioloopsis*, *Trametes*, *Cunninghamella* (Martín *et al.*, 2004; Ri-He *et al.*, 2008).

Algunas plantas que toleran hidrocarburos del petróleo y además promueven su degradación son *Phaseolus coccineus* L., *P. vulgaris* L., *Medicago sativa* L., *Lolium multiflorum* L., *Sorghum* spp., *Zea mays* L., *Cynodon dactylon* L., entre otros (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2007; Kaimi *et al.*, 2007; Nwoko *et al.*, 2007).

Con el incremento de las investigaciones se observa que existen diversos microorganismos capaces de tolerar y/o degradar hidrocarburos del petróleo, como *Azotobacter*

que es capaz de utilizar el carbono de los hidrocarburos como única fuente de energía y al mismo tiempo fijar nitrógeno atmosférico (Gradova *et al.*, 2002). Microorganismos como *Pseudomonas putida*, *Klebsiella* sp. y *Frankia* son capaces de degradar hidrocarburos gracias a que poseen genes que codifican monooxigenasas (*alkB1*) y dioxigenasa (*nodB*, *todC1* y *xylE*), ya que están involucrados en la degradación de hidrocarburos (Rodrigues *et al.*, 2008; Lefrancois *et al.*, 2008).

Es difícil establecer un patrón universal para la degradación de hidrocarburos en el suelo ya que influyen varios factores como las condiciones ambientales, la naturaleza del ecosistema en particular, los parámetros fisicoquímicos como la presencia de nutrientes, contenido de oxígeno, presión parcial de los gases, temperatura, pH, contenido de sales, tamaño y distribución de partículas, la capacidad reguladora del suelo, además de la estructura química y cantidad de los contaminantes (Margesin y Shinner, 1997; Peressutti *et al.*, 2003; Romaniuk *et al.*, 2007).

Los microorganismos nunca se encuentran solos en el suelo por lo que es importante estudiar la interacción de éstos en la recuperación de suelos contaminados. En los últimos años se ha dado importancia a microorganismos que forman simbiosis con especies vegetales, ya que confieren ciertas ventajas a los organismos que forman parte de la simbiosis, en el establecimiento en suelos contaminados y en la degradación de los contaminantes. Esta revisión se enfocará al papel que tiene *Rhizobium tropici* (bacteria) y *Glomus intraradices* (hongo) en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

Rizobios

Los rizobios son bacterias aerobias gram negativas que pertenecen a los subgrupos α y β de las Proteobacterias, tienen morfología bacilar, presentan un flagelo polar o subpolar, de dos a seis flagelos peritricos que les confieren movilidad (Naya, 2007). Estas bacterias se han

clasificado en los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, y *Azorhizobium*; y tienen la característica de formar nódulos fijadores de nitrógeno atmosférico en simbiosis con leguminosas. El hecho de que puedan fijar nitrógeno hace a esta simbiosis importante para la agricultura y para la recuperación de suelos contaminados, debido a la aportación de nitrógeno al suelo y por su capacidad de utilizar hidrocarburos como fuente de carbono y energía (Madigan *et al.*, 2004; Radwan *et al.*, 2007).

Existen estudios en los que se demuestra que los rizobios intervienen en la degradación de algunos hidrocarburos, promoviendo el desarrollo de otros microorganismos ya que incrementan el nitrógeno en el suelo que es afectado por la deposición de concentraciones altas de carbono. Además, la presencia de los nódulos estimula el desarrollo de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés) alrededor de éstos, y que en conjunto promueven la degradación de petróleo crudo en mayor cantidad que en las plantas que no tienen nódulos (Radwan *et al.*, 2007, Dashti *et al.*, 2008; Muratova *et al.*, 2008; Awadhi *et al.*, 2009).

A pesar de saber que estos microorganismos promueven la degradación de hidrocarburos del petróleo, falta mucho por investigar, ya que las condiciones pueden cambiar de acuerdo al simbionte y condiciones del suelo. Radwan *et al.* (2007) observaron que bacterias del género *Rhizobium* son capaces de degradar compuestos alifáticos e hidrocarburos aromáticos atenuando la contaminación en el suelo. *Rhizobium tropici* es una bacteria que tiene muchas ventajas por ser un buen fijador de nitrógeno, presenta un alto grado de competitividad con rizobios nativos, es genéticamente estable, tolera condiciones de acidez y altas temperaturas, y es una cepa promiscua con amplio espectro de plantas hospedantes, lo que incrementa la posibilidad de encontrar plantas que toleren la contaminación por hidrocarburos (Hungria *et al.*, 2003). Debido a que *Rhizobium* prolifera en climas tropicales y en México los puntos de extracción del petróleo se encuentran en zonas con estos climas, es importante estudiar el desarrollo de estas bacterias en presencia de

HPAs, ya que pueden ser útiles en los procesos de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo.

Hongos micorrízicos arbusculares

Los hongos micorrízicos son biótrofos que forman simbiosis con raíces de plantas vasculares, en las que se han clasificado siete categorías: arbuscular, ericoide, orquideoide, arbutoide, monotropoide, ectomicorriza y ectendomicorriza (Finlay, 2008). Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) tienen una gran capacidad de dispersión y un gran número de hospedantes; estos hongos transforman las condiciones físicas, químicas y biológicas de la rizósfera. Además, los HMA aumentan la absorción de nutrientes de difícil acceso para las plantas (fósforo, zinc, cobre, boro, sulfato), aumentan el área de contacto entre la planta y el suelo, e incrementan la producción de enzimas oxidativas; todas estas características brindan protección a la planta ante patógenos y condiciones de estrés que se encuentren en el suelo (Joner y Leyval, 2001; Siddiqui y Pichtel, 2008). Estas cualidades han hecho que los investigadores los tomen en cuenta en los estudios para la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos.

Los HMA atenúan los efectos tóxicos que originan los hidrocarburos del petróleo en la planta favoreciendo su crecimiento y su sobrevivencia, y contribuyen en la disipación de los hidrocarburos en el suelo; además, son capaces de almacenar ciertas cantidades de hidrocarburos en sus estructuras (Cabello, 1997; Criquet *et al.*, 2000; Gaspar *et al.*, 2002; Robertson *et al.*, 2007; Alarcón *et al.*, 2008). Los suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo afectan la relación carbono/nitrógeno en el suelo lo que dificulta la absorción de ciertos nutrimentos esenciales y la absorción de agua hacia la planta, de esta forma los HMA atenúan estas deficiencias cuando se encuentran en asociación con plantas (Bianciotto *et al.*, 2002; Wilson y Jones, 1993).

La biodegradación de HPAs es catalizada por la actividad de peroxidasa, lacasa, dioxigenasa, y monofenol monooxidasa de los microorganismos, contribuyendo a la disipación de los hidrocarburos en el suelo e incrementando las comunidades microbianas en la rizósfera (Salzer *et al.*, 1999; Criquet *et al.*, 2000; Joner y Leyval, 2001; Corgié *et al.*, 2006).

El papel de los HMA en la recuperación de los suelos contaminados con HPAs aún no está definido, como ya se mencionó, además de promover la degradación, tienen la capacidad de absorber y almacenar HPAs, lo que evita que las plantas estén en contacto directo con el contaminante y con ello, disminuir el estrés que podrían ocasionar (Gaspar *et al.*, 2002).

Aun cuando los HMA tienen ciertas ventajas sobre la recuperación de suelos contaminados por HPAs, no todos los HMA tienen la misma tolerancia ni pueden desarrollarse exitosamente, ya que algunas especies son más tolerantes que otras. *Glomus versiforme* es tolerante a altas concentraciones de FEN pero no al antraceno, mientras que *Glomus intraradices* tolera ambos contaminantes; *G. aggregatum* y *G. mosseae* son capaces de desarrollarse en suelos contaminados con petróleo crudo (Cabello, 1997; Liu y Dalpé, 2009). A pesar de esto la presencia de hidrocarburos del petróleo afecta notablemente el porcentaje de colonización micorrízica (arbúsculos, vesículas e hifas) y también inhiben la germinación de esporas de HMA (Cabello, 1997; Joner y Leyval, 2001; Gaspar *et al.*, 2002; Verdin *et al.*, 2006).

A pesar de la información anterior, es necesario profundizar en la influencia de los HMA en la degradación de hidrocarburos, además de investigar su interacción con otros microorganismos. Las bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno (rizobios) y los HMA son de los endosimbiontes más importantes y más distribuidos en la naturaleza (Provorov *et al.*, 2002; Finlay, 2008), ambos reaccionan a moléculas de identificación e infección similares (flavonoides e isoflavonoides) (Provorov *et al.*, 2002; Basis *et al.*, 2006;). Los flavonoides en los HMA incrementan la germinación de esporas *in vitro* y facilitan la colonización, mientras que en los

rizobios inducen los genes de la nodulación (genes *Nod*); es por esto que ambos simbioses pueden establecerse en una planta (Provorov *et al.*, 2002; Barea *et al.*, 2005; Basis *et al.*, 2006; Yano *et al.*, 2008).

La presencia de los HMA y los rizobios influyen en la habilidad de la planta para obtener nitrógeno y otros nutrientes. A su vez, las plantas pueden influir en el cambio del ecosistema secretando metabolitos secundarios en la rizósfera que atraen o inhiben el crecimiento de microorganismos específicos, por lo que se debe aprovechar esta ventaja ecológica para la biorremediación de suelos (Basis *et al.*, 2006).

Fitorremediación

La fitorremediación es una tecnología de la biorremediación que consiste en utilizar plantas para limpiar suelos, sedimentos y aguas contaminadas con compuestos orgánicos e inorgánicos (Zhu *et al.*, 2010; López-Martínez *et al.*, 2005). Existen varios mecanismos mediante los cuales las plantas actúan en la limpieza de los suelos (Figura 2.3), destacando la fitoextracción, la fitoestabilización, la fitovolatilización, la fitodegradación y la fitoestimulación (Hernández *et al.*, 1994; López-Martínez *et al.*, 2005; Saier y Trevors, 2010)

- Fitoextracción.- La planta absorbe los contaminantes acumulándolos en hojas, tallos o raíces facilitando la extracción de éstos; en la contaminación por metales las plantas pueden ser procesadas mediante incineración y reciclaje de los metales.
- Fitoestabilización.- El sistema radical impide la movilización de los contaminantes por impedimento físico, absorción, adsorción, o precipitación del contaminante en la zona radical.

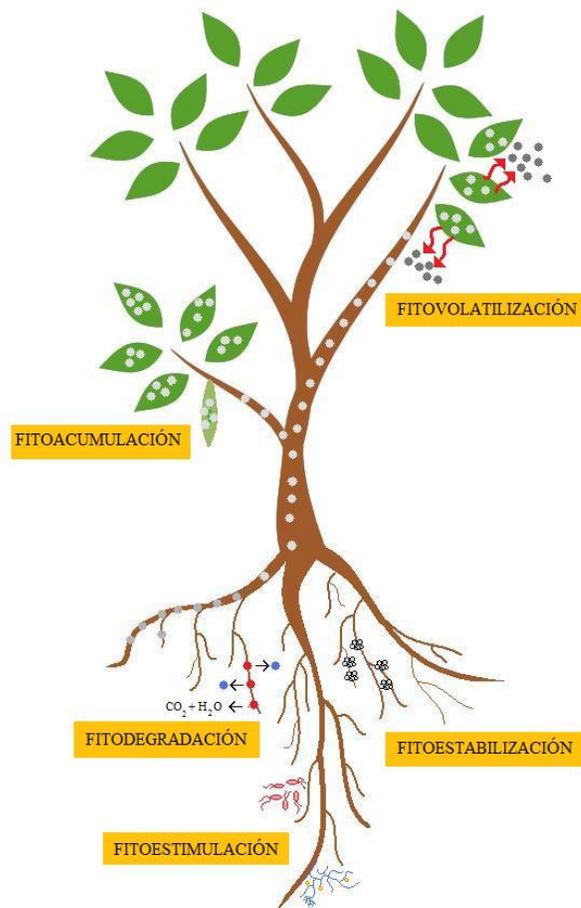


Figura 2.3. Mecanismos mediante los cuales las plantas actúan en la limpieza de los suelos durante la fitorremediación (Hernández *et al.*, 1994; López-Martínez *et al.*, 2005; Saier y Trevors, 2010).

Este último mecanismo es uno de los principales atributos que presenta la fitorremediación ya que se ha dado gran importancia a la rizósfera en la degradación de contaminantes; por lo que es importante identificar aquellas plantas capaces de tolerar altas concentraciones de contaminantes, así como aislar y caracterizar microorganismos rizosféricos que en combinación con las plantas favorezcan la disipación de los contaminantes en la rizósfera.

- Fitovolatilización.- La planta es capaz de movilizar el contaminante a las hojas y liberarlo mediante la transpiración; el contaminante puede estar en su forma original o en una forma modificada.

- Fitodegradación.- La planta tiene la capacidad de metabolizar los contaminantes y transformarlos, la mayoría de las veces en formas menos tóxicas, y en ocasiones en formas utilizables para la planta (CO_2 , H_2O).

- Fitoestimulación.- Las raíces de las plantas liberan exudados que estimulan el desarrollo de otros microorganismos con capacidad de biotransformar los contaminantes en compuestos menos tóxicos.

Las plantas estimulan la degradación de contaminantes orgánicos debido a que aumentan las actividades microbianas en la rizósfera, influyen en la concentración de CO₂, modifican el pH, el potencial osmótico, el potencial redox, aumentan la concentración de O₂ y el contenido nutricional del suelo (Jones *et al.*, 2004; Parrish *et al.*, 2005). Las gramíneas han sido muy utilizadas para la fitorremediación debido a su sistema radical y a su alta tolerancia a contaminantes orgánicos; sin embargo, las leguminosas han tomado importancia para la fitorremediación debido a que tienen la capacidad de formar simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno, incrementan el número de microorganismos en la rizósfera, y además incrementan la cantidad de nitrógeno en el suelo. Esto último es muy importante en suelos contaminados con hidrocarburos ya que existen deficiencias de nitrógeno que impide el desarrollo y la actividad de los microorganismos que favorezcan la destoxificación de hidrocarburos (Radwan *et al.*, 2007, Dashti *et al.*, 2008, Awadhi *et al.*, 2009).

***Leucaena leucocephala* Lam.**

Es un árbol de clima tropical y subtropical (25 a 30 °C) que se encuentra distribuido en América Central y del Sur, África, Australia, en el sur de Asia y en algunas islas con clima tropical. Pertenece a la familia *Mimosaceae* y en México es conocida como “Guaje”, el cual es un árbol perennifolio, sus flores son blancas, hermafroditas, sus frutos son vainas que contienen de 15 a 30 semillas que son ligeramente elípticas, aplanadas, de color café brillante (Figura 2.4) (Zárate, 1987; Shelton y Brewbaker, 1999).

Las semillas de *Leucaena* son ortodoxas, su morfología dificulta la absorción de agua ya que la testa tiene una capa de cera. En la Figura 2.5 se muestran los tejidos que conforman la testa. La capa exterior de las semillas está conformada por células ricas en cera, la cual dificulta la entrada del agua a las células del embrión y endospermo. Cuando las semillas son embebidas

ocurre un proceso de absorción de agua provocando el rompimiento de las células exteriores y con ellos se permite el paso del agua a las células en empalizada del hilio (Serrato-Valenti *et al.*, 1994). La dificultad de la entrada de agua no es meramente un proceso físico ya que la composición química de la testa también la limita. La testa está compuesta por una serie compleja de polisacáridos que acompañados de la disposición de las células, dificultan el proceso de imbibición y de respiración (Serrato-Valenti *et al.*, 1994).

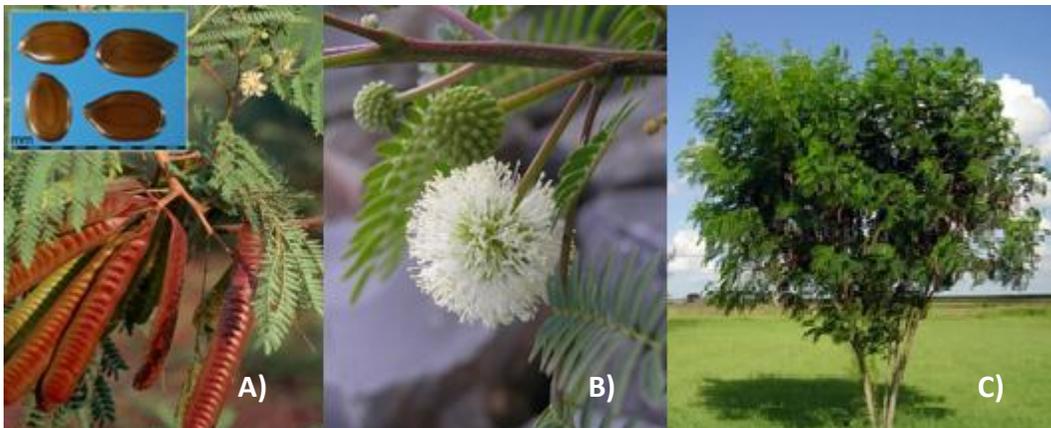


Figura 2.4. A) Semillas y vainas, B) Flor y C) Árbol de *Leucaena leucocephala* (Holmes, 2009).

Las semillas pueden ser almacenadas a 7 °C con un 70% de humedad relativa durante 6 años, y este periodo de almacenamiento puede ser mayor si se mantienen a temperaturas menores (5 °C) en recipientes sellados con una humedad de 13% (Zárate, 1987). La germinación es rápida, ya que inicia en tres días y se completa a los ocho, obteniendo 75% de germinación a los cinco días y 80-90% de germinación entre los seis a ocho días. Para una mayor germinación se requiere un tratamiento pre-germinativo, entre los que destacan la inmersión en agua a 75-85 °C de 3 a 6 min, dejando enfriar para su posterior siembra para lograr 56% de germinación. También se utiliza la escarificación mecánica o lijado de las semillas hasta que las mismas pierdan el brillo natural, o bien la escarificación con ácido sulfúrico (Zárate, 1987; Sánchez *et al.*, 2003; González

et al., 2008). Otras técnicas se relacionan con exponer las semillas al agua en ebullición por 1 min para romper el estado de latencia y aumentar considerablemente el porcentaje de germinación. Sin embargo, conforme las semillas tienen mayor tiempo de almacenamiento el porcentaje de germinación disminuye (Cervantes *et al.*, 1996).

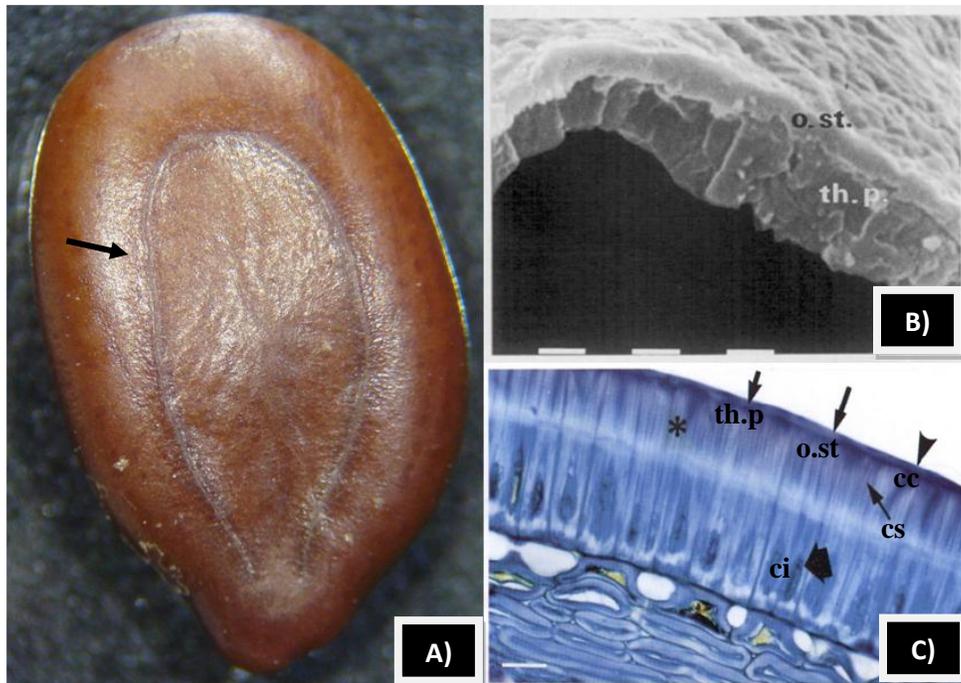


Figura 2.5. Anatomía de la semilla de *Leucaena leucocephala*. A) Semilla sin escarificar, se observa el pleurograma, el brillo dado por la capa de cera que las recubre; B) Microscopía electrónica de barrido de la capa de cera que cubre a las semillas, se puede observar la parte exterior (o. st), la parte inferior y la más gruesa (th. p.). Barra = 0.1 mm (Serrato-Valenti *et al.*, 1994); C) Microscopía óptica, teñido con azul de toluidina, pH 4, en la que se observan los surcos de las células en empalizada superiores (cs y *), la película que cubre a la capa de cera (cc), las células en empalizada inferiores (ci), barra = 19 μ m (Serrato-Valenti *et al.*, 1994).

Leucaena leucocephala es una de las leguminosas arbóreas con mayor velocidad de crecimiento, y tiene importancia por su uso como alimento para ganado (hojas y frutos), como materia orgánica, y como leña. Las hojas y las semillas son de consumo humano en Centro América, Indonesia y Tailandia, ya que son fuente de proteína, y una fuente potencial como goma de mascar comercial (Sethi y Kulkarni, 1995; Hughes, 1998). La planta produce follaje rico en nitrógeno (aproximadamente el 4.3% de su peso de materia seca) de rápida descomposición. Un árbol bien desarrollado puede producir entre 500 y 1,500 g de semilla limpia, y se llegan a cosechar hasta 50 toneladas ha⁻¹ de hojas y vainas verdes, y 50 m³ ha⁻¹ año⁻¹ de leña (Zárate, 1987).

Leucaena leucocephala es utilizada para la producción de aceites esenciales aromáticos, leña, carbón, pulpa para papel y postes; sus vainas son comestibles, ricas en vitamina A y proteínas, sus semillas son utilizadas como piezas de joyería, así como remedio para amebas y viruela (Shelton y Brewbaker, 1999; Zárate, 1987). Forma nódulos con *Rhizobium*, y fija de 100-600 kg de N ha⁻¹ año⁻¹, por lo que es útil para la reforestación y mejoramiento de suelo debido al aporte de materia orgánica y de nitrógeno. Es tolerante a suelos alcalinos y ligeramente ácidos (pH 5.2), a periodos largos de sequía y exceso de luz (Zárate, 1987; Shelton y Brewbaker, 1999; Sethi y Kulkarni, 1995).

La importancia que tiene esta leguminosa en la remediación de suelos contaminados es diversa, se ha observado que es sensible al cadmio y al plomo los cuales limitan su desarrollo y la germinación de semillas. Sin embargo, se ha observado que tolera altas concentraciones de hidrocarburos del petróleo (562 mg kg⁻¹), y que es capaz de incrementar la disipación de petróleo crudo en mayor porcentaje que otras leguminosas como *Bauhinia monandra*, sobre todo cuando se aplica 0.5% de estiércol (Zafar *et al.*, 2001; Udom *et al.*, 2008; Edwin-Wosu y Albert, 2010; Vázquez-Luna *et al.*, 2010).

Esta leguminosa tiene la capacidad de formar doble simbiosis con *Rhizobium* (Figura 2.6A) y *G. intraradices* (Figura 2.6B y C) por lo que se plantea su utilización en la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo, particularmente en HPAs como el FEN. Además cada organismo, por sí mismo, es capaz de desarrollarse en la presencia de hidrocarburos del petróleo (Radwan *et al.*, 2007; Liu y Dalpé, 2009), por lo que es importante estudiar su desarrollo en simbiosis con planta y evaluar su capacidad en la degradación de hidrocarburos del petróleo.

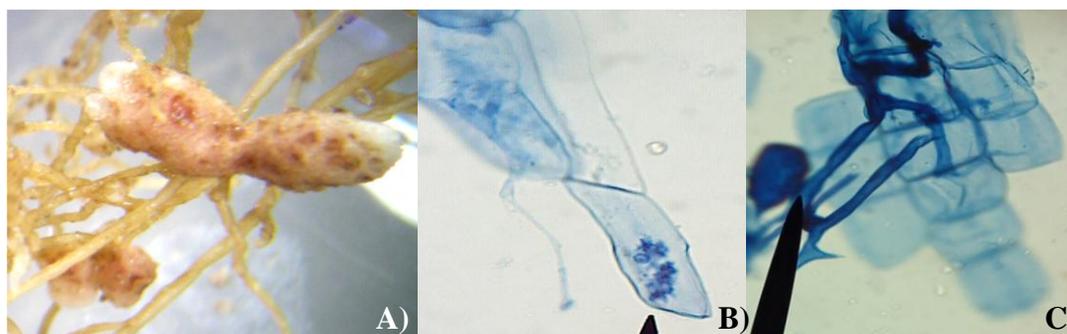


Figura 2.6. *Leucaena leucocephala* en asociación con *Rhizobium tropici* y *Glomus intraradices*.

A) Aspecto de los nódulos en raíces de *Leucaena* con *Rhizobium* observados a través de un estereoscopio. Aspecto de células corticales de *Leucaena* colonizadas por *G. intraradices* observadas a 40X de magnificaciones en un microscopio óptico, teñidas con azul tripano, B) Arbúsculos, y C) Hifas.

Conclusión de la revisión de literatura

La contaminación con hidrocarburos del petróleo es un problema mundial, y debido a sus características físico-químicas son compuestos recalcitrantes y tóxicos. Existen varias técnicas de remediación de suelos, siendo una de las más importantes la biorremediación debido a su bajo costo y buenos resultados. La fitorremediación es una técnica útil que engloba varias técnicas de

la biorremediación por lo que es importante explotarla al máximo, destacando el uso de leguminosas en la limpieza de sistemas contaminados con hidrocarburos del petróleo.

Leucaena leucocephala es una leguminosa con potencial para la fitorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos del petróleo; sin embargo, sus habilidades de formar simbiosis con microorganismos no han sido explotadas para esta finalidad. *Rhizobium tropici* y *Glomus intraradices* son microorganismos que a su vez han sido estudiados para la biorremediación de suelos contaminados por HPAs. Por lo anterior, esta investigación propone evaluar el papel que desempeña *Leucaena leucocephala* en interacción con *Rhizobium tropici* y/o *Glomus intraradices* para la degradación de los HPAs utilizando como modelo inicial el FEN.

CAPÍTULO IV

GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y DESARROLLO DE PLÁNTULAS DE *Leucaena leucocephala* INOCULADAS CON *Rhizobium tropici* ANTE FENANTRENO

RESUMEN

En este estudio se evaluó el efecto de tres dosis de fenantreno (FEN, 60, 80 y 100 mg L⁻¹) y la inoculación de *Rhizobium tropici* CIAT 899 en la germinación de semillas y desarrollo temprano de plántulas de *Leucaena leucocephala*. A las 24 h, la conductividad eléctrica de las semillas ante 60 mg L⁻¹ aumentó 15%, pero disminuyó 23.9% ante 100 mg L⁻¹, con respecto al tratamiento sin FEN. Los porcentajes de humedad y de germinación de las semillas a las 136 h, no presentaron diferencias significativas por la inoculación ni por la contaminación con FEN; sin embargo, a las 32 h, las semillas con *Rhizobium* y sin FEN presentaron el mayor porcentaje de germinación (>40%). Después de 10 días de desarrollo de las plántulas, el FEN inhibió el desarrollo de pelos radicales y causó necrosis en los cotiledones ante 80 y 100 mg L⁻¹. El FEN a 60 mg L⁻¹ incrementó 47.3% la longitud de la raíz, mientras que la longitud del tallo disminuyó al incrementar la concentración de FEN. La mayor actividad antioxidante total (AOX) se obtuvo en epicótilos de plántulas no inoculadas, y disminuyó 27.4% al incrementar el FEN. El contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) en raíz disminuyó ante FEN, pero en hipocótilos causó incrementos significativos. *Rhizobium* mantuvo similar longitud y peso de materia seca de raíz y tallo, aunque estimuló el desarrollo de pelos radicales y redujo los daños necróticos causados por el FEN. Además, *Rhizobium* mantuvo mejor balance de la AOX y el CFT en los diferentes órganos de las plántulas a pesar de la aplicación del FEN.

Palabras clave: Conductividad eléctrica, crecimiento de plántulas, actividad antioxidante, compuestos fenólicos totales.

SEED GERMINATION AND DEVELOPMENT OF SEEDLINGS OF *Leucaena leucocephala* INOCULATED WITH *Rhizobium tropici* UNDER PHENANTHRENE

ABSTRACT

In this study we evaluated the effect of three doses of phenanthrene (PHE; 60, 80, and 100 mg L⁻¹) and the inoculation of *Rhizobium tropici* CIAT 899 on seed germination and development of seedlings of *Leucaena leucocephala*. After 24 h, seed electrical conductivity under 60 mg L⁻¹ increased 15% but at 100 mg L⁻¹ caused 23.9% decrease with respect to seeds without PHE. At 136 h, either inoculation or PHE contamination did not exert significant differences on seed germination and humidity percentage, however, at 32 h, the seeds inoculated with *Rhizobium* and without PHE had the greatest germination percentage (>40%). Ten days after germination, the application of 80 and 100 mg PHE L⁻¹ resulted in significant inhibition of root hairs, and caused necroses on cotyledons. PHE at 100 mg L⁻¹ increased in 47.3% the root length, whereas the stem length diminished when the dose of PHE increased. The high total antioxidant activity (AOX) was observed at epicotyls of inoculated seedlings, but it decreased 27.4% as PHE increased. The total content of phenolic compounds (CFT) in roots diminished under PHE contamination, but on hypocotyls this contaminant caused a significant increase. *Rhizobium* maintained similar length and dry weight of root and stems, although it stimulated the proliferation of root hairs and attenuated the necrotic damage due to PHE. In addition, *Rhizobium* kept a better balance on AOX and CFT on the seedling tissues in spite of the PHE contamination.

Key words: *Electrical conductivity, seedling growth, antioxidant activity, phenolic compounds.*

INTRODUCCIÓN

La contaminación de suelos por hidrocarburos del petróleo es un problema común debido a su alta demanda como principal fuente de energía y al aprovechamiento de sus derivados; ante tal problema la fitorremediación es una técnica utilizada para limpiar estos suelos (Hall *et al.*, 2010). Pastos, leguminosas, plantas herbáceas, por mencionar algunas, se han utilizado para recuperar suelos contaminados con hidrocarburos, obteniéndose buenos resultados en la atenuación de los contaminantes (Kirkpatrick *et al.*, 2006; Hall *et al.*, 2010). Las leguminosas han sido utilizadas en la fitorremediación debido a que forman simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno, por lo cual ayudan a la fertilidad del suelo e incrementan la población de otros microorganismos, incluso aquellos capaces de degradar y/o tolerar hidrocarburos (Dashti *et al.*, 2008; Awadhi *et al.*, 2009).

Leucaena leucocephala Lam. es una leguminosa que genera abundantes cantidades de materia orgánica y tolera condiciones de acidez y alcalinidad, y ha sido utilizada para reforestar y biorremediar suelos contaminados con tricloroetileno y con hidrocarburos de petróleo (Udom *et al.*, 2008; Edwin-Wosu y Albert, 2010; Vázquez-Luna *et al.*, 2010).

El porcentaje de germinación de semillas de especies como *Festuca arundinacea* L., *Agropyron smithii* R., *Trifolium repens* L., *Brassica napus* L., *Helianthus annuus* L., *Bouteloua curtipendula* M., *Cenchrus ciliaris* L. y *Rhynchelytrum repens* W., ha sido utilizado como criterio para determinar la tolerancia que podrían tener dichas plantas ante diferentes hidrocarburos (Besalatpour *et al.*, 2008; Reynoso-Cuevas *et al.*, 2008). La inoculación de las semillas con bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno estimula la síntesis de compuestos que favorecen la germinación y proliferación de pelos radicales, y el desarrollo de la plántula. Por ejemplo, la inoculación de *Glycine max* con *Bradyrhizobium japonicum*, incrementó 2.25 veces el porcentaje de germinación (Prithiviraj *et al.*, 2003), mientras que en el caso de *Medicago truncatula*

inoculada con *Sinorhizobium meliloti*, y en *Glycine max* inoculada con *B. japonicum*, se observó mayor estimulación del desarrollo de pelos radicales, la formación de nódulos y el crecimiento de las plántulas (Macchiavelli y Brelles-Mariño, 2004; Miransari y Smith, 2009). Sin embargo, los efectos de la inoculación de *Rhizobium* en la tolerancia y germinación de semillas ante hidrocarburos poliaromáticos (HPAs) aún no se ha evaluado, así como su efecto en la disminución de los efectos tóxicos de estos hidrocarburos en el desarrollo de las plántulas emergidas.

El proceso de germinación se divide en tres fases. La fase I (fase de imbibición) consiste en un proceso físico en el que la semilla seca absorbe agua incrementando aceleradamente el porcentaje de humedad, en esta fase ocurre la pérdida de solutos (aminoácidos, azúcares, compuestos fenólicos) debido a la inhabilidad de la membrana celular puesto que esta debe estar bien hidratada para funcionar adecuadamente. La fase II (fase Lag) se caracteriza por la estabilización en la absorción de agua, la elongación celular, la digestión de los compuestos de almacenamiento de las semillas, y la activación de los sistemas celulares para la producción de nuevas enzimas y materiales de crecimiento, por lo que la absorción de agua es continua. Una vez que ocurre la división celular se da la expansión de los puntos de crecimiento, por lo cual se reconoce la fase III (Fase de división celular) (Hartmann *et al.*, 2002).

Con base a la información mencionada, el objetivo de este trabajo fue evaluar si la inoculación con *Rhizobium tropici* favorece la germinación de semillas y el desarrollo temprano de las plántulas de *Leucaena leucocephala* ante tres concentraciones de FEN (60, 80 y 100 mg L⁻¹) bajo condiciones controladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se establecieron nueve tratamientos en total, considerando ocho tratamientos con escarificación con aplicación de cuatro concentraciones de fenantreno (FEN; 0, 60, 80 y 100 mg L⁻¹) con y sin la inoculación de *Rhizobium*, además de un testigo sin escarificar sin FEN y sin inoculación –TS. La escarificación de las semillas se realizó con ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado por 15 min (Sánchez *et al.*, 2003; González *et al.*, 2008), en todos los tratamientos, con excepción del tratamiento TS.

Fase I. Evaluación de la conductividad eléctrica de las semillas de *Leucaena leucocephala* por efecto de la aplicación de fenantreno y/o *Rhizobium tropici* CIAT 899.

Las semillas sin FEN (0 mg L⁻¹) y TS se desinfectaron con alcohol etílico por 30 s. Para aquellos tratamientos contaminados, el FEN se diluyó en alcohol etílico a concentraciones de 60, 80 y 100 mg L⁻¹ y estas soluciones se utilizaron para desinfectar e impregnar las semillas con el contaminante. Una vez sumergidas las semillas en las soluciones mencionadas, éstas se secaron sobre papel absorbente. Posteriormente, para los tratamientos inoculados, las semillas se colocaron en una solución de inoculante de *Rhizobium* (30 x 10⁹ rizobios mL⁻¹) por 5 minutos.

Cada tratamiento consistió en cuatro repeticiones con 25 semillas cada una, que se colocaron en frascos de vidrio con 25 mL de agua desionizada durante 24 h para proceder a tomar la lectura de la conductividad eléctrica con un conductímetro (OAKTON PC 300).

Este experimento tuvo un diseño completamente al azar y los datos se analizaron mediante el sistema de análisis estadístico SAS y prueba de comparación de medias Tukey ($\alpha = 0.05$) (SAS Institute, Inc., 1999).

Fase II. Evaluación del porcentaje de humedad y germinación de semillas, longitud del tallo y raíz, peso de materia seca de la parte aérea y raíz, contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante total de plántulas de *Leucaena leucocephala*.

Las semillas de los tratamientos correspondientes, se desinfectaron con alcohol etílico por 30 s, se enjuagaron con tres lavados de agua estéril, se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 2%, e inmediatamente, se lavaron cinco veces con agua estéril. Cada tratamiento consistió de cuatro repeticiones y cada una de ellas con 25 semillas.

Paralelamente, la contaminación del papel absorbente utilizado para la germinación, se realizó con soluciones de acetona adicionada con FEN a 60, 80 y 100 mg L⁻¹, respectivamente. A cada papel absorbente se le aplicaron 6 mL de cada solución y se dejaron secar a temperatura ambiente en condiciones de campana de flujo laminar.

Las 25 semillas por repetición de cada tratamiento se colocaron sobre el papel absorbente previamente esterilizado con y sin la aplicación de la correspondiente concentración de FEN. La mitad de los tratamientos se inocularon con 5 mL de una suspensión bacteriana de *Rhizobium tropici* CIAT 899 (30 x 10⁹ rizobios mL⁻¹); mientras que los demás tratamientos se hidrataron únicamente con 5 mL de agua estéril.

Para la evaluación del porcentaje de humedad se utilizaron 12 semillas de las 25 consideradas para cada repetición, las cuales se pesaron antes de ser colocadas en el papel absorbente (tiempo 0), y se continuaron pesando cada ocho horas hasta que la mayoría de los tratamientos alcanzaron un porcentaje de germinación mayor al 50%. Una vez pesadas en cada tiempo de evaluación las semillas se regresaron a su respectivo tratamiento.

Después de 10 días de establecidas las semillas para su germinación, a partir de las plántulas emergidas se realizaron las evaluaciones de la longitud del tallo y raíz, peso de materia seca de la parte aérea y raíz, contenido de compuestos fenólicos totales, y la actividad

antioxidante total. Cabe hacer la aclaración que en estas evaluaciones no se consideró el tratamiento TS.

Para evaluar la longitud del tallo y parte aérea (cm) se tomaron 15 plántulas al azar por repetición de cada tratamiento, y también a partir de estas 15 plántulas, se utilizaron 10 de ellas para evaluar el peso de materia seca de la parte aérea y del tallo a 70 °C durante tres días (ISTA, 2005).

Para la evaluación del contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) y de la actividad antioxidante total (AOX) se utilizaron 5 de las plántulas restantes por tratamiento. Cada plántula se disectó en raíz, hipocótilo, cotiledones y epicótilo, los cuales fueron pesados individualmente y macerados con 1.5 mL de metanol al 80%, colocando los extractos en tubos eppendorf a 4 °C para su posterior análisis de la AOX, y de CFT.

La AOX se determinó mediante el método propuesto por Re *et al.* (1999) y Matthäus (2002), utilizando una solución con 24 mg de DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) disuelto en 100 mL de metanol, misma que fue diluida en metanol (1:4 v/v). De esta solución se tomaron 270 µL que fueron adicionados con 15 µL de cada extracto, obteniendo un volumen final de 285 µL; el cual se dejó reaccionar por 15 min. Se tomaron lecturas de absorbancia, al inicio y al final de la reacción, a 515 nm en un espectrofotómetro (Synergy 2, Biotech® instruments). Se utilizó Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico) para la curva estándar y los resultados se expresaron finalmente en mM de equivalentes de Trolox g⁻¹ de tejido fresco.

La determinación del CFT fue realizada mediante la técnica modificada de Swain y Hillis (1959). A 30 µL de cada extracto, se adicionaron 150 µL de Folin-Ciocalteau 0.25 N y 90 µL de Na₂CO₃ 1 N, obteniendo un volumen final de 270 µL, el cual se dejó reaccionar por 30 min, para tomar lecturas de absorbancia a 725 nm en espectrofotómetro (Synergy 2, Biotech® instruments).

Se utilizó ácido gálico para la curva estándar y los resultados se expresaron en mg de equivalentes de ácido gálico g^{-1} de tejido fresco.

El experimento fue un factorial 2 x 4 (dos niveles de inoculación y cuatro niveles de contaminación) que incluyó ocho tratamientos distribuidos en un diseño completamente al azar. Para la evaluación del porcentaje de humedad de las semillas se consideraron cuatro repeticiones ($n = 4$, con 12 semillas por repetición) y para el porcentaje de germinación se consideraron cuatro repeticiones ($n = 4$, 25 plántulas por repetición) por tratamiento. Para la longitud de tallo y raíz se consideraron cuatro repeticiones ($n = 4$, con 15 plántulas por repetición); para el peso de materia seca de parte aérea y raíz se consideraron cuatro repeticiones ($n = 4$, con 10 plántulas por repetición); mientras que para AOX y CFT se consideraron cinco repeticiones ($n = 5$), por tratamiento. Los datos se analizaron mediante el sistema de análisis estadístico SAS y prueba de comparación de medias Tukey ($\alpha = 0.05$) (SAS Institute, Inc., 1999).

RESULTADOS

Conductividad eléctrica de las semillas de *Leucaena leucocephala* por efecto de la aplicación de fenantreno e inoculación de *Rhizobium tropici* CIAT 899.

No se observaron diferencias significativas en la conductividad eléctrica por la aplicación de FEN en comparación con el tratamiento sin contaminación; sin embargo, el FEN a 80 y 100 mg L^{-1} dificultó la entrada de agua a las semillas, ya que disminuyó la conductividad eléctrica en 7.2% y 9.2%, respectivamente (Figura 4.1). La inoculación con *Rhizobium* no afectó la entrada de agua a las semillas; sin embargo, *Rhizobium* en combinación con FEN a 60 mg L^{-1} , incrementó la conductividad eléctrica en 13.3%, mientras que a 100 mg L^{-1} disminuyó 24.6%, con respecto al tratamiento no inoculado y sin FEN (Figura 4.1).

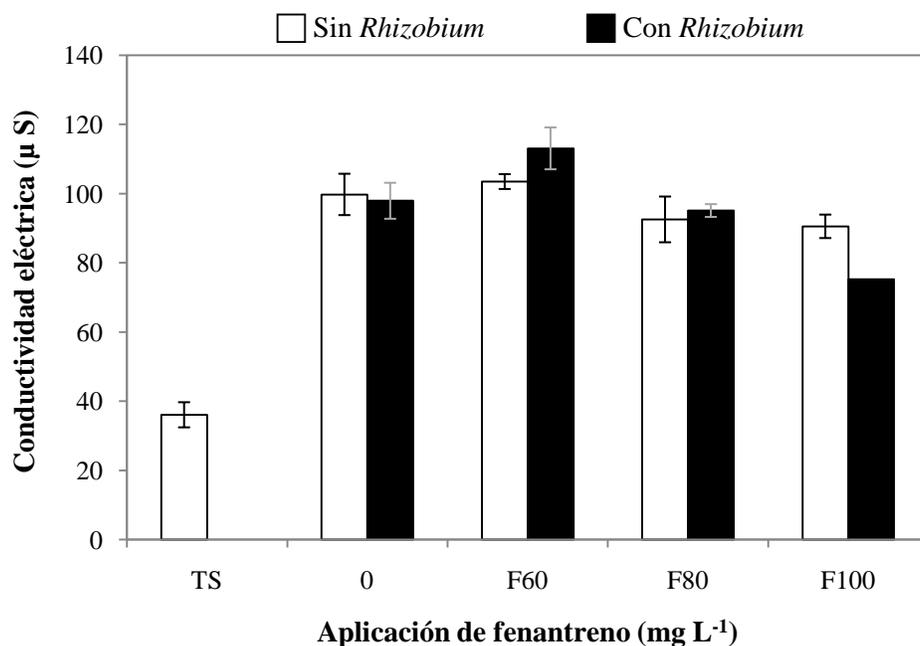


Figura 4.1. Conductividad eléctrica de semillas de *Leucaena leucocephala* inoculadas o no con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y con aplicación de tres concentraciones de fenantreno, a las 24 h. n = 4. Abreviaciones: TS = sin escarificar, 0 = sin fenantreno (0 mg L⁻¹), F60, F80 y F100 = aplicación de fenantreno a 60, 80 y 100 mg L⁻¹. Promedios ± error estándar.

Porcentaje de humedad y germinación de semillas, longitud del tallo y raíz, peso de materia seca de la parte aérea y raíz, contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante total de plántulas de *Leucaena leucocephala*.

Las semillas de *Leucaena* mostraron una acelerada absorción de agua en las primeras 8 h, y a partir de ese tiempo la absorción fue gradual, en la que el FEN y la inoculación con *Rhizobium* no modificaron los porcentajes de humedad. Las semillas de todos los tratamientos que fueron escarificados, presentaron una germinación uniforme que inició a las 32 h y terminó a las 136 h, alcanzando 81% de germinación en promedio (Figura 4.2). En contraste, las semillas del tratamiento TS tuvieron una cinética de absorción de agua muy lenta, y comenzaron a germinar a

partir de las 48 h, alcanzando una germinación del 53% a las 136 h. Debido a este bajo porcentaje de germinación, el tratamiento TS no fue considerado para las siguientes evaluaciones.

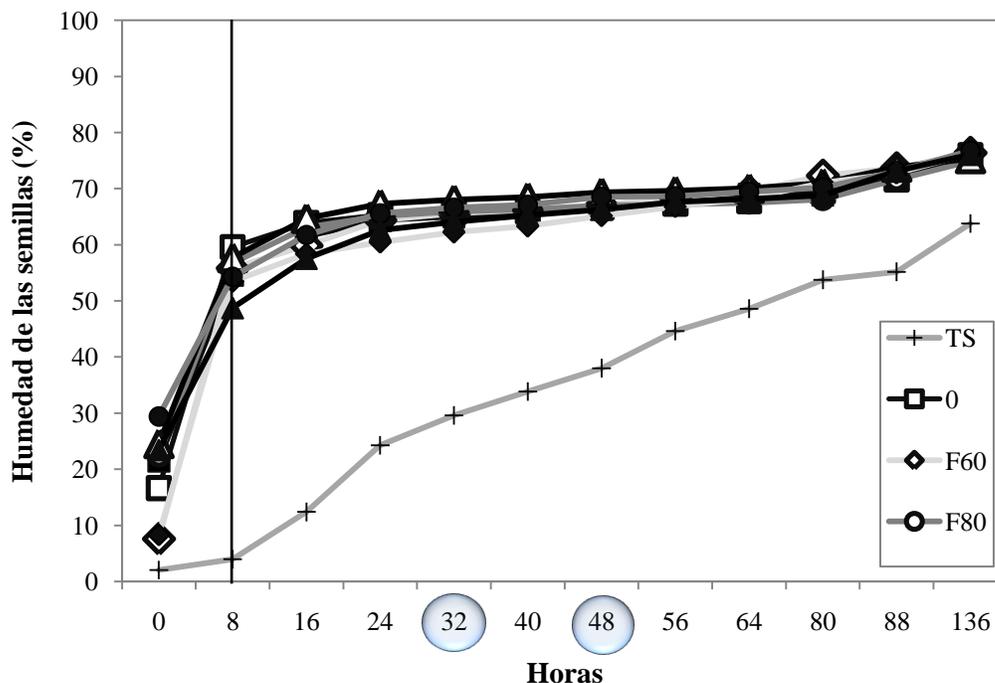


Figura 4.2. Curva de hidratación de semillas de *Leucaena leucocephala* por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y/o por la aplicación de tres concentraciones de fenantreno. La línea transversal indica la Fase I (absorción de agua acelerada). A las 32 h inició la germinación de las semillas escarificadas y las 48 h las semillas sin escarificar (TS), n = 4. Abreviaciones: TS = Sin escarificar; 0 = sin fenantreno (0 mg L^{-1}), F60, F80 y F100 = aplicación de fenantreno 60, 80 y 100 mg L^{-1} respectivamente. Las figuras rellenas de negro indican tratamientos con *Rhizobium*, figuras rellenas de blanco indican tratamientos sin *Rhizobium*.

A las 32 h, la aplicación de FEN redujo significativamente ($p < 0.01$) el porcentaje de germinación especialmente con la aplicación de 80 mg L^{-1} , en comparación con las semillas sin contaminar. En contraste la inoculación con *Rhizobium* independientemente de la aplicación de

FEN no produjo efectos significativos en la germinación de las semillas (Figura 4.3A). En los tratamientos sin contaminar la inoculación con *Rhizobium* mostró un incremento del 527.7% en el porcentaje de germinación en comparación con las semillas sin inocular (Figura 4.3A).

Los mayores porcentajes de germinación fueron obtenidos a las 136 h (Figura 4.3B). Independientemente de la contaminación, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de germinación entre los tratamientos inoculados (80.5%) con los no inoculados (81.6%) (Figura 4.3B). Por otra parte, el porcentaje de germinación obtenido en semillas expuestas a FEN con 80 ó 100 mg L⁻¹ sin *Rhizobium*, fue del 80%, mientras que en presencia de la bacteria, los porcentajes fueron del 77.7 y 76 %, respectivamente (Figura 4.3B).

Después de 10 días de germinación, la aplicación de FEN incrementó significativamente ($p < 0.01$) la longitud de la raíz pivotante especialmente a 60 mg L⁻¹, en comparación con las plántulas sin FEN. Independientemente de la contaminación, la inoculación de *Rhizobium* disminuyó significativamente ($p < 0.05$) la longitud de raíz de las plántulas. En cuanto a los tratamientos, la aplicación de FEN (60 mg L⁻¹) en las plántulas no inoculadas, estimuló significativamente la elongación de la raíz en 47.3% en comparación con las plántulas sin FEN y sin *Rhizobium*. En las plantas no inoculadas, al aumentar la concentración de FEN, la elongación de la raíz no mostró diferencias significativas (Figura 4.4A y 4.5). Los tratamientos inoculados con *Rhizobium* no mostraron resultados significativos en la elongación de la raíz, aunque esta elongación fue mayor en los tratamientos con la aplicación de FEN (Figura 4.4A y 4.5).

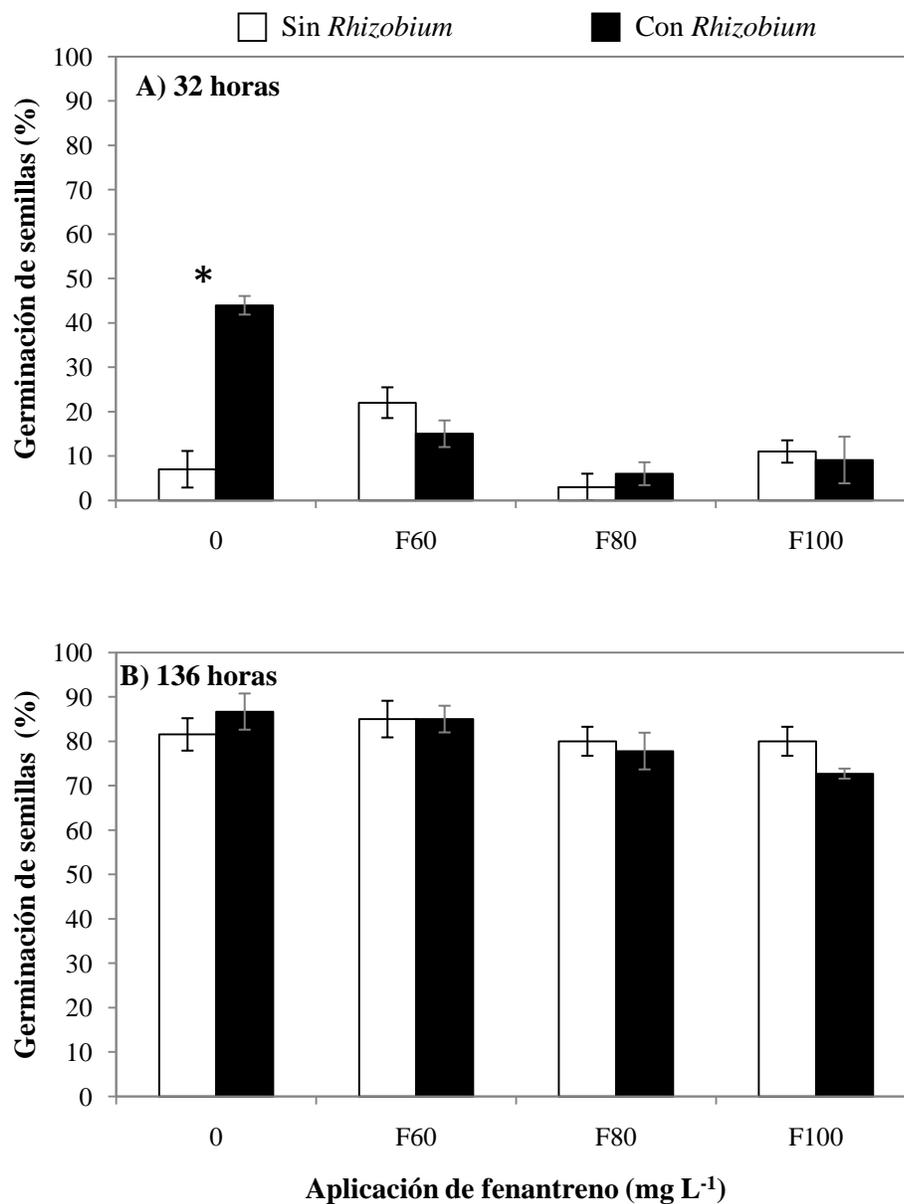


Figura 4.3. Porcentaje de germinación de semillas de *Leucaena leucocephala* inoculadas o no con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y/o por la aplicación de tres concentraciones de fenantro. El asterisco (*) indica que existen diferencias significativas en el porcentaje de germinación entre tratamientos con y sin inoculación. (Tukey, $\alpha = 0.05$), $n = 4$. Abreviaciones: TS = testigo sin escarificar, 0 = sin fenantro (0 mg L⁻¹), F60, F80 y F100 = aplicación de fenantro 60, 80 y 100 mg L⁻¹. Promedios \pm error estándar.

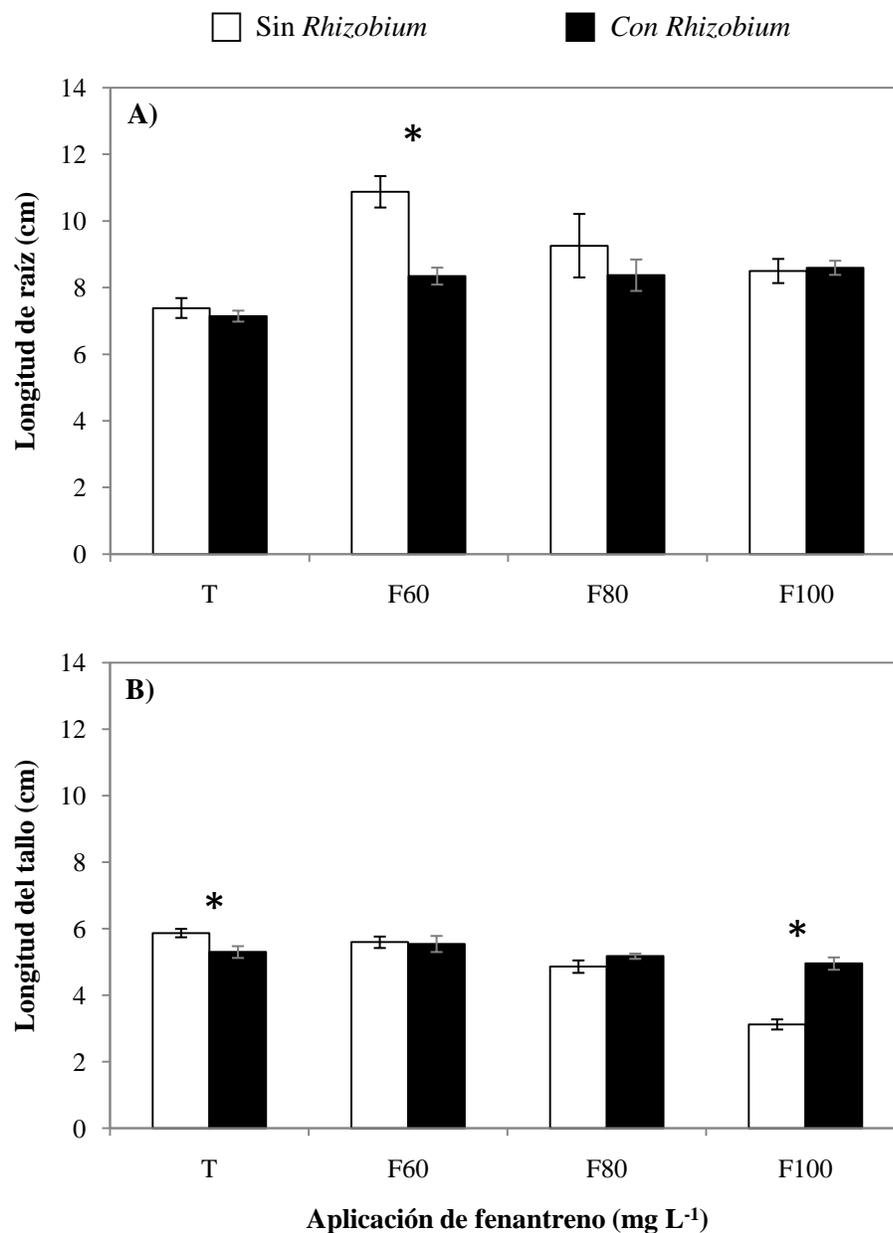


Figura 4.4. Longitud de raíz (a) y tallo (B) de *Leucaena leucocephala* inoculadas o no con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y/o por la aplicación de tres concentraciones de fenantreno, a los 10 días de desarrollo. El asterisco (*) sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos con y sin *Rhizobium*. (Tukey, $\alpha = 0.05$), n = 4. Abreviaciones: T = sin fenantreno (0 mg L⁻¹), F60, F80 y F100 = aplicación de fenantreno 60, 80 y 100 mg L⁻¹.



Figura 4.5. Aspecto de las raíces de *Leucaena leucocephala* por la aplicación de fenantreno a diferentes concentraciones y/o la inoculación con *Rhizobium tropici* CIAT 899 después de los 10 días de la germinación.

La longitud del tallo de las plántulas disminuyó significativamente ($p < 0.001$) por la aplicación de FEN, especialmente a 100 mg L^{-1} en comparación con las plántulas sin el contaminante. En contraste, la inoculación con *Rhizobium* no produjo diferencias significativas. En cuanto a los tratamientos, las plántulas no inoculadas sin FEN tuvieron significativamente menor longitud del tallo en comparación con las plántulas inoculadas (Figura 4.4B). Ante 100 mg L^{-1} de FEN la inoculación con *Rhizobium* incrementó 59% la longitud del tallo con respecto a las plántulas sin inocular (Figura 4.4B).

En el peso de materia seca de la parte aérea ni de la raíz se observaron diferencias significativas por efecto de la inoculación. Sin embargo, la aplicación de FEN incrementó significativamente ($p < 0.01$) el peso de materia seca de la parte aérea, con excepción de la dosis de 60 mg L^{-1} . En contraste la aplicación de FEN no modificó significativamente el peso de materia seca de la raíz. En cuanto a los tratamientos, en las plántulas no inoculadas se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) del 20% en el peso de materia seca de la parte aérea por la aplicación de FEN (100 mg L^{-1}) con respecto al peso de materia seca de las plántulas expuestas a 60 mg L^{-1} (Figura 4.6B).

En los tratamientos con *Rhizobium* en presencia de FEN no se observaron efectos significativos en la elongación del tallo ni en el peso de materia seca de la parte aérea de *Leucaena*, en comparación con el tratamiento testigo inoculado (Figura 4.4B y 4.6B). Lo anterior indica que la inoculación ayudó a mantener constantes la longitud y el peso de materia seca de las plántulas, independientemente de la concentración de FEN (Figura 4.4 y 4.6), además se estimuló el desarrollo de pelos radicales, mismos que fueron inhibidos por el FEN (Figura 4.5).

Las evaluaciones a los 10 días de desarrollo se llevaron a cabo en plántulas que formaron hojas verdaderas. Ante concentraciones de 80 y 100 mg L^{-1} se observaron daños necróticos en los cotiledones de algunas plántulas lo cual dificultó su desarrollo; sin embargo, estos daños fueron

menos frecuentes en las plántulas con *Rhizobium* (Figura 4.7). Es importante señalar que a pesar de los daños necróticos causados por el FEN sobre los cotiledones, la inoculación estimuló el desarrollo de los pelos radicales (Figura 4.7).

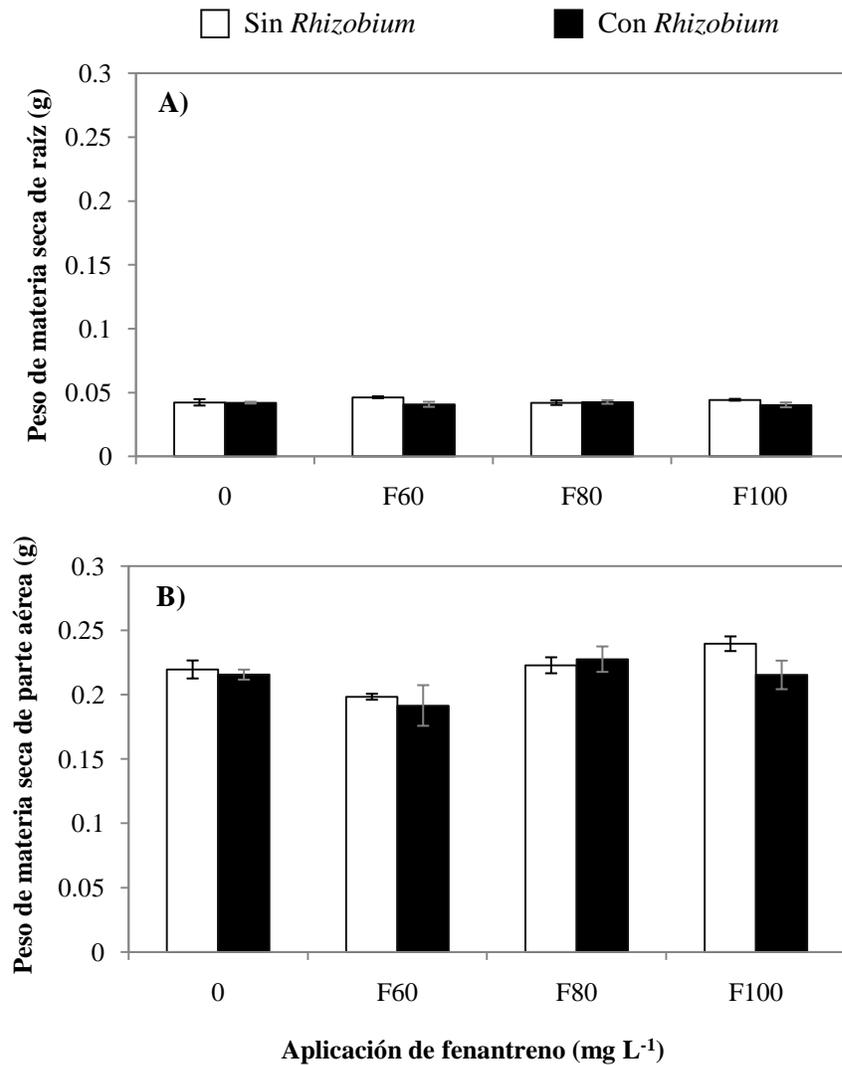


Figura 4.6. Peso de materia seca de raíz (A) y parte aérea (B) de *Leucaena leucocephala* inoculadas o no con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y/o por la aplicación de tres concentraciones de fenantreno, a los 10 días de desarrollo. Abreviaciones: 0 = sin fenantreno (0 mg L⁻¹), F60 = fenantreno 60 mg L⁻¹, F80 = fenantreno 80 mg L⁻¹, F100 = fenantreno 100 mg L⁻¹. Promedios ± error estándar.

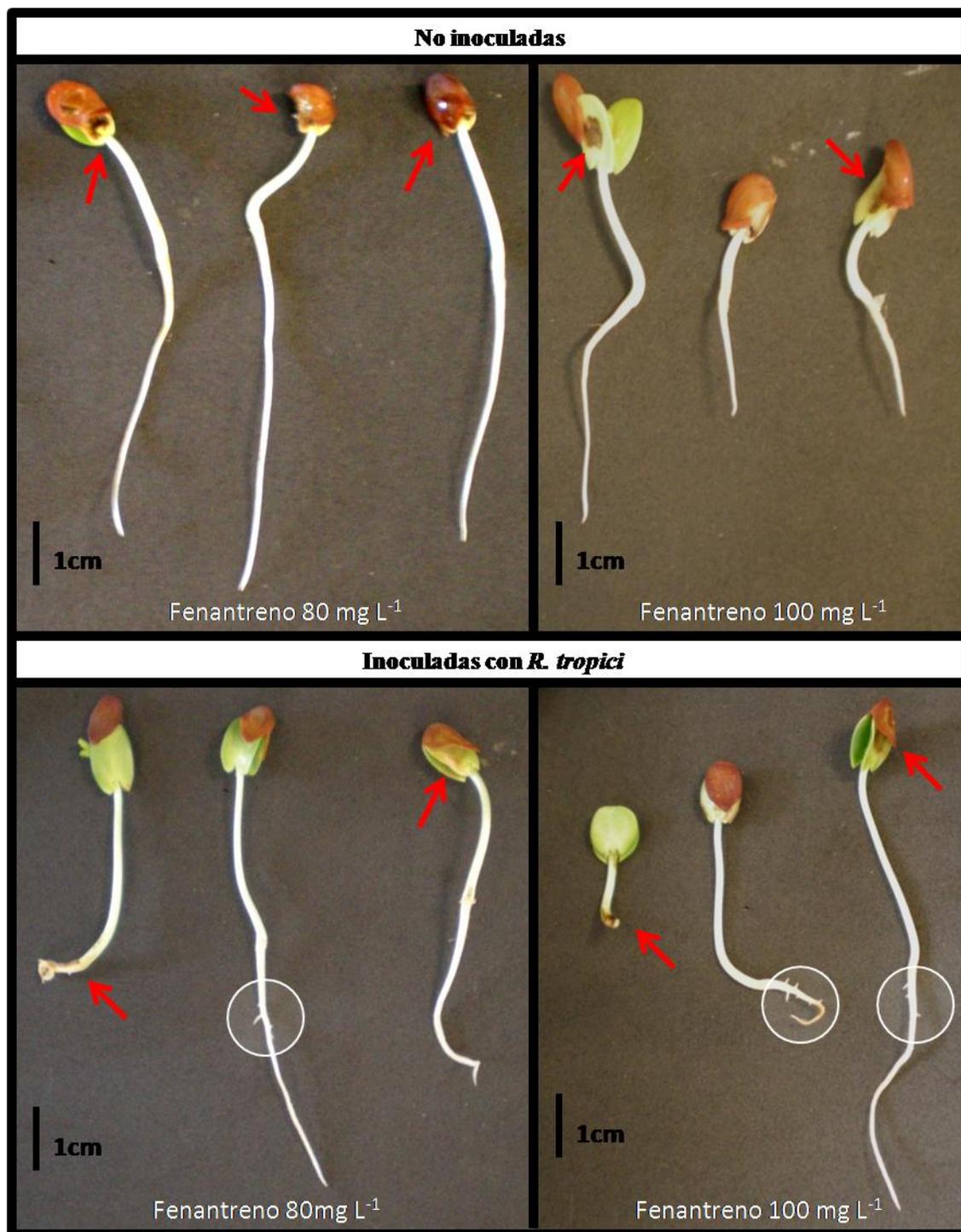


Figura 4.7. Aspecto de las plántulas de *Leucaena leucocephala* a los 10 días de desarrollo, en las que se observan daños por la aplicación de fenantreno (80 y 100 mg L⁻¹) con o sin la inoculación de *Rhizobium tropici* CIAT 899.

La aplicación de FEN a 60 y 100 mg L⁻¹ incrementó significativamente la AOX de la raíz ($p < 0.05$), mientras que a 80 mg L⁻¹ se mantuvo similar a las plántulas sin FEN (0 mg L⁻¹). En los cotiledones y en el epicótilo la AOX disminuyó significativamente ($p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente) por el FEN; mientras que en el hipocótilo no se observaron diferencias significativas. En contraste, la inoculación de *Rhizobium* no modificó significativamente la AOX en ninguno de los órganos de las plántulas (Figura 4.8).

En cuanto a los tratamientos, la AOX de las plántulas fue mayor en el epicótilo mientras que los menores valores se observaron en la raíz, hipocótilo y cotiledones (Figura 4.8). La AOX determinada en la raíz no se vio alterada por el FEN en cualquiera de sus concentraciones; en contraste, la inoculación con *Rhizobium* ante FEN a 60 mgL⁻¹ produjo un incremento significativo del 35.9% en comparación con su respectivo tratamiento sin inocular (Figura 4.8A). La AOX determinada tanto en hipocótilo como en cotiledones no presentó diferencias significativas en ninguno de los tratamientos (Figura 4.8B y C).

En los epicótilos de las plántulas inoculadas y no inoculadas se observó una disminución de la AOX por la aplicación del FEN; sin embargo, esta disminución fue menor en los tratamientos inoculados con *Rhizobium* (Figura 4.8D). En las plántulas no inoculadas, la AOX disminuyó 27.4% al incrementar la concentración de FEN, llegando a su máxima reducción a 80 mg L⁻¹, a partir de esta concentración la AOX se estabilizó obteniendo 13.8 μM de Trolox ante 100 mg L⁻¹ (Figura 4.8D). En las plántulas no contaminadas la AOX disminuyó 18% por la inoculación de *Rhizobium*, esta reducción continuó por la aplicación de FEN a 60 y 80 mg L⁻¹; sin embargo, a 100 mg L⁻¹, la inoculación produjo un incremento del 23.2% en comparación con su respectivo tratamiento sin *Rhizobium* (Figura 4.8D).

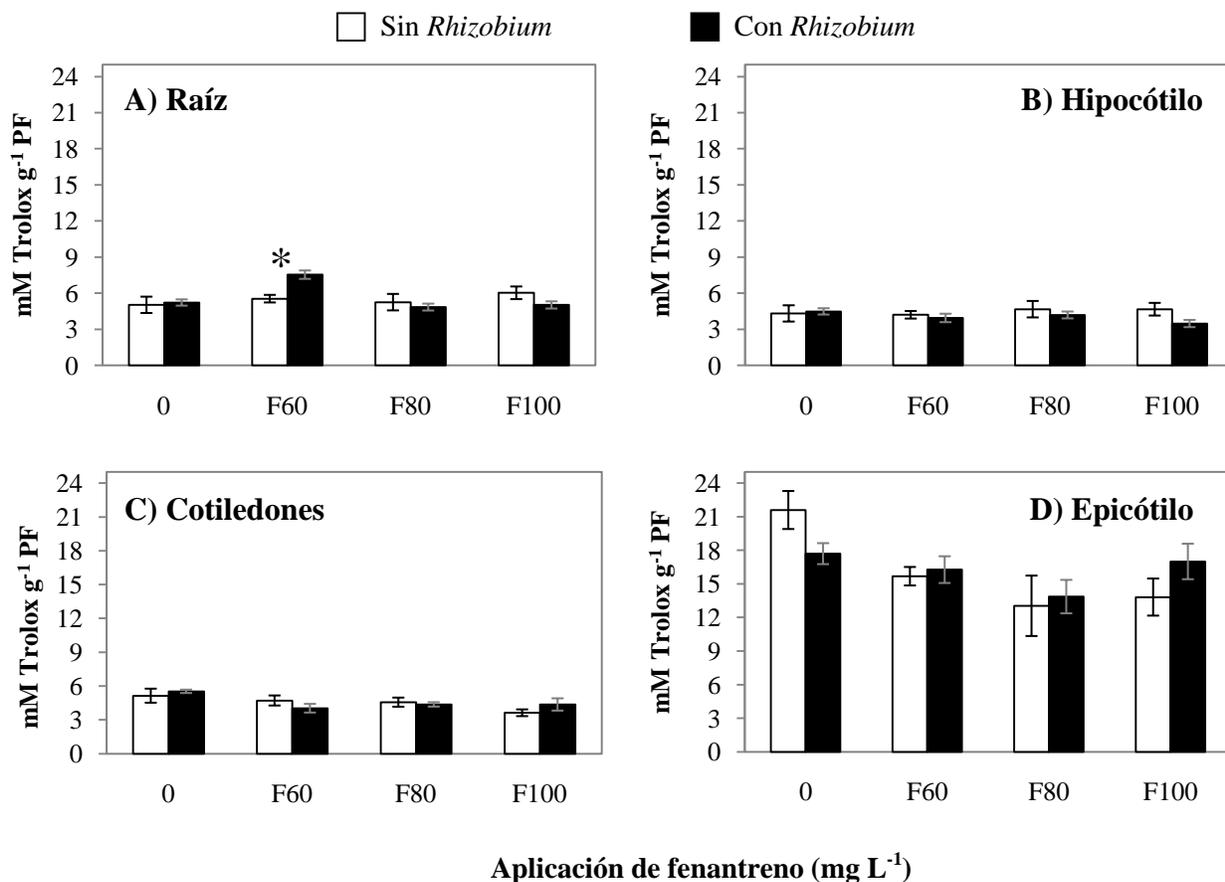


Figura 4.8. Actividad antioxidante total de diferentes órganos de *Leucaena leucocephala* por la aplicación de tres concentraciones de fenantreno con o sin *Rhizobium tropici* CIAT 899, a los 10 días de desarrollo. El asterisco (*) sobre las barras indica que existen diferencias significativas entre tratamientos con y sin inoculación. (Tukey, $\alpha = 0.05$), $n = 5$. Abreviaciones: 0 = sin fenantreno (0 mg L⁻¹), F60 = fenantreno 60 mg L⁻¹, F80 = fenantreno 80 mg L⁻¹, F100 = fenantreno 100 mg L⁻¹. Promedios \pm de error estándar.

El contenido de CFT en cotiledones y en epicótilos fue menor a $0.0001 \pm 9.9 \text{ e}^{-5} \text{ mg g}^{-1}$, sin presentar diferencias significativas entre tratamientos (datos no presentados). Los mayores contenidos de CFT se encontraron en raíz y en hipocótilo, sin presentar diferencias significativas por el FEN ni por la inoculación con *Rhizobium* (Figura 4.9). En la raíz sin *Rhizobium* se observó

una disminución del CFT al incrementar la concentración de FEN, mientras que las plántulas inoculadas mostraron valores similares (Figura 4.9A).

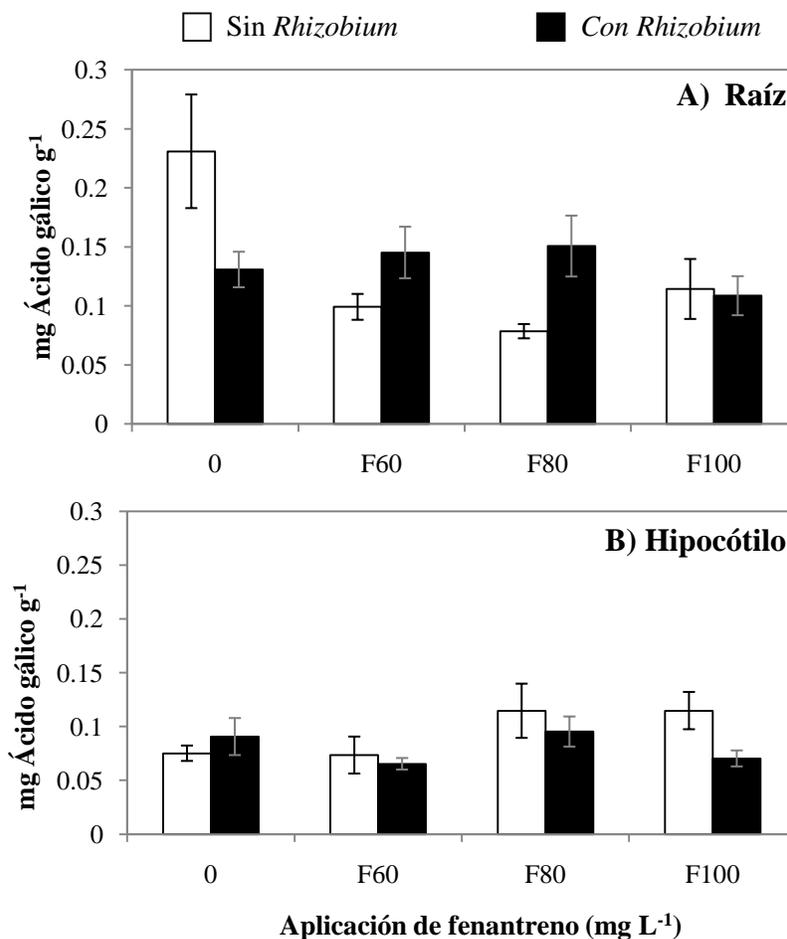


Figura 4.9. Contenido de compuestos fenólicos totales de diferentes órganos de *Leucaena leucocephala* por la aplicación de tres concentraciones de fenantreno con/sin *Rhizobium tropici* CIAT 899, a los 10 días de desarrollo. Abreviaciones: 0 = sin fenantreno (0 mg L⁻¹), F60 = fenantreno 60 mg L⁻¹, F80 = fenantreno 80 mg L⁻¹, F100 = fenantreno 100 mg L⁻¹. Promedios ± de error estándar.

La inoculación de *Rhizobium* redujo 43.5% el CFT en las raíces de los tratamientos no contaminados, en tanto que con la aplicación de FEN a 60 y 80 mg L⁻¹, la inoculación incrementó la CFT 46.5% y 92%, respectivamente, en comparación con las raíces de sus respectivos

tratamientos sin inocular. Ante, 100 mg L^{-1} , el contenido de CFT se mantuvo similar con y sin la inoculación (Figura 4.9A).

En los hipocótilos sin inocular el contenido de CFT aumentó al incrementar la concentración de FEN (Figura 4.9B); especialmente ante 80 y 100 mg L^{-1} , dicho aumento fue de 37.5% en promedio, comparado con el tratamiento sin inocular y sin FEN (Figura 4.9). Aunque no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos no contaminados la inoculación incrementó el contenido de CFT 20.6% ; mientras que, en los tratamientos con la aplicación de FEN, independientemente de la concentración, la inoculación mantuvo este contenido similar o menor a sus respectivos tratamientos sin inocular (Figura 4.9B).

DISCUSIÓN

Conductividad eléctrica de las semillas de *Leucaena leucocephala* por efecto de la aplicación de fenantreno y/o *Rhizobium tropici* CIAT 899.

A pesar de no mostrar diferencias significativas, la aplicación de 100 mg L^{-1} de FEN redujo la conductividad eléctrica, lo cual indica posiblemente que a el FEN genera una capa alrededor de la semilla que dificulta la entrada de agua afectando los procesos de absorción desde la primera fase de germinación. La conductividad eléctrica se relaciona con la permeabilidad de la membrana (pérdida de electrolitos), por lo que es un parámetro utilizado para medir su integridad y relacionarlo con el vigor de las semillas (Krishna y Chandra, 1994; Ferguson, 1995; Aparecida *et al.*, 2006). La conductividad eléctrica puede ser un indicador para evaluar los efectos que los HPAs tienen sobre la absorción de agua y en el vigor de las semillas. Una de las principales características del FEN es su hidrofobicidad y poca solubilidad en agua, por lo que su presencia dificulta el acceso de agua a las plantas o semillas y limita su desarrollo (ATSDR 1995), lo cual se puede relacionar con la disminución de la permeabilidad de la membrana de las

semillas ante FEN, resultando una menor pérdida de electrolitos. Por otra parte, la inoculación con *Rhizobium* no modificó los procesos de absorción de agua por las semillas sin contaminar ya que no se observaron diferencias en la conductividad eléctrica entre los tratamientos sin contaminar; sin embargo, la aplicación de FEN a 80 y 100 mg L⁻¹ más la inoculación de la bacteria, causó mayor reducción de la conductividad eléctrica. Estos resultados indican que a pesar de observarse la disminución de la conductividad eléctrica de las semillas ante concentraciones de FEN hasta 100 mg L⁻¹, este contaminante no afectó el vigor de las semillas las cuales alcanzaron altos porcentajes de germinación (Figura 4.3).

Porcentaje de humedad y germinación de semillas, longitud del tallo y raíz, peso de materia seca de la parte aérea y raíz, contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante total de plántulas de *Leucaena leucocephala*.

Las semillas recién cosechadas de *Leucaena* cv. *Cunningham* presentan un patrón trifásico de germinación, en el que con base en el porcentaje de humedad, la Fase I (fase de imbibición) se alcanza a las 8 h, la Fase II (fase Lag) a las 25 h, y la Fase III (proceso de división celular) a las 30 h, mientras que las semillas envejecidas presentan una fuerte absorción de agua durante las primeras 10 h, seguida de una absorción gradual (Reino, 2005). Un bajo porcentaje y poca uniformidad de germinación son reflejo del envejecimiento, por lo que estos parámetros son indicadores del vigor de las semillas (Salinas *et al.*, 2001). A pesar de que en este estudio se obtuvo una germinación desfasada 4 días, las semillas escarificadas alcanzaron un porcentaje de germinación mayor al 76%, indicando que eran útiles para la siguiente fase experimental dirigida a la evaluación de los efectos del FEN y/o la inoculación con *Rhizobium* sobre *Leucaena*.

El incremento en el porcentaje de germinación que se observó a las 32 h en las semillas inoculadas con *Rhizobium tropici* es probable que se deba a los lipo-quitto-oligosacáridos (LOCs)

producidos por la bacteria. Al respecto, las semillas de *M. truncatula* tienen receptores (NFBS1, NFBS2 y LYK) afines a los LOCs los cuales parecen intervenir también en el proceso de la nodulación (Macchiavelli y Brelles-Mariño, 2004). Se ha postulado que estos LOCs intervienen en el incremento en la germinación de semillas de especies no leguminosas y leguminosas, entre las que destacan *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Beta vulgaris*, *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, *Medicago truncatula*, *Hordeum vulgare* y *Gossypium hirsutum*, (Prithiviraj *et al.*, 2003; Macchiavelli y Brelles-Mariño, 2004; Miransari y Smith, 2009).

Al concluir la fase de germinación (136 h) no se observaron efectos tóxicos por la aplicación de FEN en las concentraciones utilizadas, y los principales efectos por la inoculación de *Rhizobium* se observaron en el desarrollo de las plántulas. Bajo condiciones de contaminación artificial, la presencia de altas concentraciones de HPAs reduce los porcentajes de germinación; sin embargo, pueden ser bien tolerados por diversas especies vegetales como *Trifolium pratense* L., *Lactuca sativa* L., *Rapahanus* L., *Triticum aestivum* L., *Festuca arundinacea* S., *Bouteloua curtipendula* M., *Cenchrus ciliaris* L., *Echinochloa crusgalli* L., *Rhynchelytrum repens* W. (Banks y Schultz, 2005; Reynoso-Cuevas, 2008). Este fenómeno de tolerancia de las semillas a la presencia de HPAs en condiciones de laboratorio puede atribuirse a que la disipación de los HPAs ocurre con mayor facilidad cuando la contaminación es artificial en comparación con un suelo crónicamente contaminado (Maila y Cloete, 2002; Chiapusio *et al.*, 2007). A pesar de que los HPAs sean tolerados por diversas especies vegetales, sus efectos tóxicos sobre el desarrollo de las plantas han sido evidentes en diferentes estudios (Alkio *et al.*, 2005; Muratova *et al.* 2009), por lo que fue necesaria la evaluación del desarrollo inmediato de las plántulas de *Leucaena*.

En el presente trabajo, la aplicación de FEN incrementó significativamente la elongación de la raíz pero no modificó su peso de materia seca. Este resultado concuerda con lo observado por Muratova *et al.* (2009) en donde la biomasa de la raíz de *Medicago sativa* no se modificó por

la aplicación de FEN (10 y 100 mg L⁻¹). Lo anterior denota que la presencia de FEN no modifica la biomasa de la raíz, aunque existe evidencia de que el FEN (9 a 45 mg L⁻¹) altera la expresión del gen EXP8 en *Arabidopsis thaliana*, gen que está relacionado con la pérdida de la pared celular y el alargamiento, pero no modifica la expresión del gen *Cyclin B1;1::GUS* que se relaciona con la división celular (Colón-Carmona *et al.*, 1999; Alkio *et al.*, 2005).

Los efectos del FEN sobre la longitud del tallo y peso de materia seca de la parte aérea difieren dependiendo de la especie vegetal y concentración de este (Alkio *et al.*, 2005; Muratova *et al.*, 2009). Probablemente estos efectos sean más evidentes porque la raíz tiene contacto directo con el contaminante, mientras que en la parte aérea el contaminante debe ser absorbido y transportado, para así expresar su toxicidad en la planta. Debido a que el mecanismo mediante el cual la planta reacciona ante el estrés oxidativo depende de la etapa de desarrollo de la planta y la exposición a los factores de estrés, es posible que estos factores también influyan en los efectos tóxicos del FEN (Glyan'ko y Vasil'eva, 2010). No obstante, se requieren estudios más específicos sobre lo que ocurre en el metabolismo vegetal por la presencia del FEN.

Rhizobium tropici atenuó los efectos del FEN en las plántulas al mantener menores variaciones en la longitud del tallo y raíz en comparación con su correspondiente tratamiento sin FEN. Además, la inoculación estimuló el desarrollo de pelos radicales en presencia de FEN. Existen evidencias de que la inoculación de *Rhizobium* favorece la división celular de la raíz y la proliferación de los pelos radicales en *Medicago truncatula* y en *Glycine max* bajo condiciones controladas de laboratorio (Macchiavelli y Brelles-Mariño, 2004; Miransari y Smith, 2009).

La presencia de necrosis en los cotiledones de plántulas de *Leucaena* ocasionadas por el FEN pueden relacionarse con la muerte celular causada por la acumulación de FEN en este punto específico. Este efecto dañino ha sido descrito para *A. thaliana* expuesta a FEN (9 a 45 mg L⁻¹), y cuya acumulación en hojas como en cotiledones está relacionada con la inducción de estrés

oxidativo que se refleja en la producción de H₂O₂ y que desencadena la muerte celular (necrosis) en los puntos de su acumulación (Alkio *et al.*, 2005). La inducción del estrés oxidativo en plantas expuestas a HPAs ha sido documentada (Roy *et al.*, 1996; Alkio *et al.*, 2005; Paskova *et al.*, 2006); sin embargo, en el presente estudio no se observó de manera clara este fenómeno en ninguno de los órganos evaluados por la aplicación de FEN.

Es un hecho que aún no está claro el mecanismo antioxidante de defensa que tienen las plantas ante la presencia de estos compuestos. La producción excesiva de especies reactivas de oxígeno durante un proceso de estrés puede ser dañina para la célula debido a que degradan proteínas; sin embargo, en concentraciones necesarias sirven también como señales para la activación de mecanismos de respuesta de defensa (Mittler, 2002). La aplicación de FEN no modificó la AOX en ninguno de los órganos evaluados con respecto al tratamiento sin contaminar, lo que indica que el FEN no modificó la producción de especies reactivas de oxígeno al menos en las plántulas que lograron completar su desarrollo a los 10 días de germinación.

La inoculación con *Rhizobium* ayudó a activar el sistema antioxidante en la raíz de las plántulas de *Leucaena* expuestas a FEN (60 mg L⁻¹); por lo que es posible que la activación de este sistema contrarrestara los efectos ocasionados por el FEN en la elongación de la raíz manteniendo un tamaño similar al tratamiento inoculado sin FEN (Figuras 4A y 5). Por otra parte, las alteraciones en la longitud del tallo, en el peso de materia seca de la parte aérea y puntos necróticos en los cotiledones causados por el FEN no fueron tan severas en los tratamientos con *Rhizobium*. Esto puede explicarse debido que a pesar de no ser significativo, la inoculación de esta bacteria mantuvo mayor balance de la AOX como se observó en los epicótilos de plántulas expuestas al FEN, en comparación con el tratamiento sin *Rhizobium* (Figuras 4.7 y 4.8D).

En los procesos fotosintéticos se activa la AOX debido a la abundante producción de especies reactivas de oxígeno que se producen durante este proceso fisiológico (Mittler *et al.*,

2004), por lo que es predecible que la mayor AOX se encontrara en el epicótilo de las plántulas no contaminadas sin inocular. Sin embargo, la presencia del FEN disminuyó significativamente la AOX, lo cual indica que este contaminante influye en la reducción del mecanismo antioxidante que se lleva normalmente en esta parte de la plántula.

El FEN redujo el contenido de CFT en la raíz pero incrementó en el hipocótilo. A causa de la etapa del desarrollo en el que las plántulas de *Leucaena* fueron evaluadas, es posible que la función de los compuestos fenólicos no sea del tipo antioxidante, ya que la concentración que se obtuvo de AOX fue mayor que el contenido de CFT (Figuras 4.8 y 4.9). Lo anterior indica que los efectos del FEN son dependientes del órgano de la plántula; además, estas alteraciones en el contenido de CFT indican que la aplicación de FEN está influyendo en alguna de las funciones biológicas que llevan a cabo los compuestos fenólicos tales como el desarrollo vascular de la planta y de la pared celular, actuando como moléculas de señalización, de pigmentos y de soporte que dan rigidez a las células (Hutzler *et al.*, 1998; Vermerris y Nicholson, 2008).

Debido a que uno de los mecanismos del reconocimiento planta-*Rhizobium* es la liberación de flavonoides por parte de la planta (Cohn *et al.*, 1998), la inoculación con *Rhizobium* en *Leucaena* debería presentar mayor contenido de CFT en las raíces, sin embargo, el mayor contenido se obtuvo en las raíces de plántulas sin contaminar y sin la bacteria (Figura 9A). Es probable que por el periodo de exposición al inoculante y por la etapa de desarrollo de las plántulas (10 días), el reconocimiento con la bacteria aún no ocurriera.

Es un hecho el FEN y otros HPAs, tiene efectos sobre el desarrollo vegetal. Este estudio es uno de los primeros en su tipo para identificar algunos de los efectos que tiene el FEN y la inoculación con *Rhizobium tropici* sobre la germinación de semillas y el desarrollo inmediato de plántulas de *Leucaena leucocephala*. Además, permitió conocer que *Leucaena* tolera concentraciones de FEN de hasta 100 mg L⁻¹, y que la inoculación con *Rhizobium* es una buena

alternativa para mejorar la tolerancia de las plántulas hacia este contaminante, al menos en estadios tempranos. Sin embargo, aún queda mucho que investigar sobre el papel de este simbionte con *Leucaena* ante contaminantes orgánicos como los HPAs.

CONCLUSIONES

La aplicación de FEN y la inoculación con *Rhizobium tropici* no influyeron en los procesos de germinación de las semillas de *Leucaena* (conductividad eléctrica, porcentajes de humedad y germinación); aunque, la bacteria adelantó la germinación a 32 h. Los efectos del FEN y la inoculación con *Rhizobium* se expresaron durante el desarrollo inmediato de la plántula. El FEN estimuló el alargamiento de la raíz sin modificar su peso de materia seca, incrementó el peso de materia seca de la parte aérea al aumentar la concentración del contaminante e inhibió el crecimiento de los pelos radicales.

La inoculación con *Rhizobium* mantuvo un balance en la elongación de la raíz y del tallo, así como en el peso de materia seca de la raíz y de la parte aérea, aun en presencia de FEN. El contaminante disminuyó la AOX únicamente en los epicótilos de las plántulas en comparación con los tratamientos no contaminados, mientras que en los otros órganos vegetales (hipocótilo, cotiledones y raíz) no se observó modificación de esta actividad antioxidante. El FEN disminuyó el contenido de CFT en raíz, pero lo incrementó en los hipocótilos. La inoculación con *Rhizobium tropici* no tuvo efectos significativos en la AOX ni en el contenido de CFT de las plántulas.

CAPÍTULO V
BIODEGRADACIÓN DE FENANTRENO POR LA SIMBIOSIS TRIPARTITA *Rhizobium tropici* – *Leucaena leucocephala* – *Glomus intraradices*

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la simbiosis tripartita de la leguminosa *Leucaena leucocephala* con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y/o *Glomus intraradices* como modelo para la fitorremediación de fenantreno (60 mg kg⁻¹). Se realizó un experimento factorial 2 x 4 considerando los tratamientos de *Leucaena* sin inocular testigo (T), inoculada con *G. intraradices* (G), inoculada con *Rhizobium* (R), y con la doble inoculación (GR), en arena sin contaminar o contaminada, durante 60 días en condiciones controladas. *Rhizobium tropici* presentó mayor tolerancia que *G. intraradices* ante fenantreno. La aplicación de fenantreno estimuló el número de nódulos blancos y rojos en 585.6% y 13.2%, respectivamente; y redujo la colonización micorrízica en 76%. La doble inoculación (GR) incrementó el número y peso de materia seca de los nódulos, la actividad de nitrogenasa, el contenido de nitrógeno y de fósforo en la planta, el volumen radical y número de hojas bipinnadas. La inoculación con G estimuló la actividad antioxidante (AOX), mientras que el fenantreno la redujo en 59%. El contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) incrementó por la inoculación G > R > GR > Testigo, mientras que por la aplicación de fenantreno ocurrió un efecto inverso: GR > R > G ≈ Testigo. Los tratamientos GR y G degradaron fenantreno de manera similar (99.73% y 99.83%, respectivamente), alcanzando mayor porcentaje de degradación que el tratamiento Testigo. La simbiosis tripartita de *Leucaena* - *Rhizobium* - *G. intraradices* es un modelo útil para la fitorremediación de suelos contaminados con fenantreno.

Palabras clave: nódulos, colonización micorrízica, actividad antioxidante, compuestos fenólicos.

PHENANTHRENE BIODEGRADATION BY THE TRIPARTITE SYMBIOSIS *Rhizobium tropici* – *Leucaena leucocephala* – *Glomus intraradices*

ABSTRACT

In this study we evaluated the tripartite symbiosis between *Leucaena leucocephala* inoculated with *Rhizobium tropici* CIAT 899 and/or *Glomus intraradices* as a phytoremediation model of phenanthrene (60 mg kg⁻¹). A 2 x 4 factorial experiment was established by considering the following treatments with *Leucaena*: non-inoculated control (T), inoculated with *G. intraradices* (G), inoculated with *Rhizobium* (R), and with the double inoculation (GR), grown in contaminated or non-contaminated sand, during 60 days under controlled conditions. *Rhizobium tropici* showed greater tolerance to phenanthrene than *G. intraradices*. Phenanthrene stimulated the number of white and red nodules in 585.6% and 13.2%, respectively; and diminished the mycorrhizal colonization in 76%. The double inoculation (GR) increased the number and the dry weight of nodules, the nitrogenase activity, N and P content, root volume, and number of bipinnate leaves. Inoculation with G stimulated the total antioxidant activity (AOX), whereas phenanthrene caused a 59% of decrease. The total content of phenolic compounds (CFT) increased due to the inoculation: G > R > GR > Control, whereas an inverse effect was observed due to phenanthrene: GR > R > G ≈ Control. Inoculation with GR and G had similar degradation of phenanthrene (99.73% y 99.83%, respectively) which was greater than that observed at the Control. The tripartite symbiosis between *Leucaena* - *Rhizobium* - *G. intraradices* represents a useful model for the phytoremediation of contaminated soils with phenanthrene.

Key words: nodules, mycorrhizal colonization, antioxidant activity, phenolic compounds.

INTRODUCCIÓN

La fitorremediación es una de las tecnologías utilizadas dentro de la biorremediación en la que algunas plantas son capaces de degradar y/o acumular contaminantes orgánicos, como los hidrocarburos del petróleo, y a la vez modifica las condiciones físicas y químicas del suelo (Jones *et al.*, 2004; Parrish *et al.*, 2005). Es una técnica que abarca varios procesos ya que promueve la volatilización, la solubilización de contaminantes orgánicos, y en los últimos años ha tomado mayor importancia debido a que también promueve la bioestimulación de microorganismos capaces de degradar contaminantes (Gerhardt *et al.*, 2009).

El éxito de la fitorremediación consiste en la selección de las especies vegetales para la degradación de hidrocarburos del petróleo, tales como *Phaseolus coccineus* L., *Medicago sativa* L., *Phaseolus vulgaris* L., *Lolium multiflorum* L., *Sorghum* spp., *Zea mays* L., *Cynodon dactylon* L., *Leucaena leucocephala* L., entre otras (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2007; Kaimi *et al.*, 2007; Nwoko *et al.*, 2007; Vázquez-Luna *et al.*, 2010); sin embargo, es importante apostarle a la selección de especies vegetales en relación con la estimulación de microorganismos para acelerar el proceso de remediación.

Leucaena leucocephala es una leguminosa tropical arbórea útil para la reforestación y mejoramiento de suelo debido al aporte de materia orgánica y de nitrógeno, fija de 100-600 kg N ha⁻¹ año⁻¹. Además, es tolerante a suelos alcalinos y ligeramente ácidos (pH 5.2), y a periodos largos de sequía y exceso de luz (Zárate, 1987; Sethi y Kulkarni, 1995; Shelton y Brewbaker, 1999); tolera altas concentraciones de hidrocarburos del petróleo (562 mg kg⁻¹), y es capaz de incrementar la disipación de petróleo crudo (Udom *et al.*, 2008; Vázquez-Luna *et al.*, 2010).

La función de los microorganismos simbióticos como rizobios o los hongos micorrízicos arbusculares en la degradación de hidrocarburos del petróleo, ha recibido poca atención. En ciertos estudios las bacterias del género *Rhizobium* son capaces de tolerar y degradar

hidrocarburos aromáticos, mientras que los hongos del género *Glomus* toleran fenantreno y petróleo crudo (Cabello, 1997; Criquet *et al.*, 2000; Gaspar *et al.*, 2002; Radwan *et al.*, 2007; Robertson *et al.*, 2007; Alarcón *et al.*, 2008; Dashti *et al.*, 2008; Muratova *et al.*, 2008; Awadhi *et al.*, 2009).

Las leguminosas, debido a su capacidad de formar simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno y con hongos micorrízicos arbusculares, han sido poco estudiadas durante la degradación de hidrocarburos del petróleo (Hall *et al.*, 2010). Por lo anterior, en este estudio se propuso la simbiosis de la leguminosa *Leucaena* con *Rhizobium tropici* y/o *Glomus intraradices* como modelo para evaluar su capacidad de fitorremediación de fenantreno bajo condiciones controladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estableció un experimento factorial 2 x 4, en el que se consideraron los tratamientos de *Leucaena leucocephala*: 1) Testigo sin inocular (T), 2) inoculada con *Glomus intraradices* (G), 3) inoculada con *Rhizobium tropici* CIAT 899 (R), y 4) inoculada con *G. intraradices* + *Rhizobium* CIAT 899 (GR) en arena sin contaminar o con arena contaminada con fenantreno (60 mg kg⁻¹). Cada tratamiento estaba integrado por nueve repeticiones. Además se colocaron 14 tubos con arena contaminada bajo las mismas condiciones que los otros tratamientos para evaluar la atenuación natural del fenantreno (cinco tubos sin inocular – sin planta (SP) y cinco inoculados con *Rhizobium* – sin planta (SPR), y cuatro tubos con arena contaminada sin aplicación de riego (AR)).

El sustrato que se utilizó fue arena esterilizada a 18 lb por 3 h durante 3 días, y posteriormente la arena se secó a 110 °C por 4 días. Para la contaminación de la arena se pesaron 60 mg de fenantreno por cada kilo, y se diluyeron con diclorometano. La dilución se aplicó en la

arena, mezclándola intensamente y secándola a temperatura ambiente en condiciones de campana de flujo laminar. La arena (65 g) contaminada o no, se colocó en 86 tubos tipo Falcon de 50 mL.

Las semillas de *Leucaena* fueron escarificadas con ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) por 15 min (Sánchez *et al.*, 2003; González *et al.*, 2008). Posteriormente, se desinfectaron con alcohol por 30 s, se enjuagaron tres veces con agua estéril, se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante 15 min, e inmediatamente, se lavaron cinco veces con agua estéril. Las semillas se colocaron a germinar en agar agua al 1% durante 4 días, una vez germinadas fueron transplantadas a tubos tipo Falcon con la arena contaminada o sin contaminar, respectivamente.

Una vez que las plántulas fueron trasplantadas, éstas fueron inoculadas con raicillas provenientes de un cultivo monoxénico de raíces transformadas de *Daucus carota* micorrizadas ($71.6\% \pm 7.3$) con *G. intraradices* (proporcionadas por el Dr. Ignacio E. Maldonado Mendoza, CIIDIR-IPN, Guasave, Sinaloa). Posteriormente, se realizó la inoculación con 3 mL de inóculo de *Rhizobium* (30×10^9 rizobios mL^{-1}). Las plantas se mantuvieron durante 60 días en condiciones controladas (25 ± 1.5 °C, $36.8 \pm 14.5\%$ HR, y fotoperiodo de 12h); y con riego cada tercer día. Una vez por semana las plantas fueron fertilizadas con solución Jensen sin nitrógeno y con $16 \mu g$ de fósforo mL^{-1} .

Nodulación y colonización micorrízica

A los 60 días, las plantas se extrajeron de la arena y se contabilizaron los nódulos clasificándolos en rojos o blancos. Además, los nódulos de cinco plantas se separaron de la raíz y se colocaron a 70 °C durante tres días para evaluar su peso de materia seca.

La colonización micorrízica se evaluó con base en el método de clareo y tinción con azul de tripano (Phillips y Hayman, 1970) a partir de 4 plantas por tratamiento. Para el clareo, las

raíces se colocaron en una solución de hidróxido de potasio (KOH-10%) durante una semana, y después, las raíces se enjuagaron con abundante agua y se colocaron durante 15 min en peróxido de hidrógeno (H₂O₂) comercial. Posteriormente, se lavaron con abundante agua y se colocaron en una solución de ácido clorhídrico (HCl-10%) durante 15 min y se colocaron en azul de tripano (0.05% en lactoglicerol). Al tercer día se sacaron y se enjuagaron con lactoglicerol (1:1). Se disectaron 25 raicillas de 1 cm de largo y se colocaron en portaobjetos (cuatro repeticiones por planta). Las preparaciones fueron observadas a 40X en un microscopio óptico (Reichert, Microstar IV, modelo 410), para evaluar la frecuencia de las estructuras fúngicas en las células corticales y con ello estimar el porcentaje de colonización para cada tratamiento (Biermann y Linderman, 1981).

Actividad nitrogenasa y contenido de nitrógeno y fósforo.

La determinación de la actividad nitrogenasa se realizó con la prueba de reducción de acetileno (Hardy *et al.*, 1968). Tres raíces por tratamiento se colocaron individualmente en tubos de ensaye de 7 mL, se taparon herméticamente y se retiró el 10% del volumen de aire con una jeringa de 1 mL, el cual se reemplazó con acetileno, y se incubaron durante 1 h. Posteriormente, se tomaron 3 mL de cada muestra y se colocaron en tubos al vacío (Vacutainer®) de 7 mL. A partir de estas muestras, se inyectaron 0.6 mL en un cromatógrafo de gases Varian (3300 Gas Chromatograph), con detector de ionización de flama (FID), para medir la reducción de acetileno a etileno. La temperatura del inyector fue de 95 °C y la del detector de 105 °C. Los resultados se expresaron en nM de etileno h⁻¹ vial⁻¹. Este análisis se llevó a cabo en el Laboratorio de Ecología Genómica y Microbiana del Centro de Ciencias Genómicas, UNAM-Cuernavaca.

Para la determinación del contenido de nitrógeno (N), se tomaron 0.1 g de material vegetal seco molido (parte aérea y raíz) de cinco plantas por tratamiento, a los que se agregaron 4

mL de una mezcla de ácido sulfúrico (H_2SO_4) con ácido salicílico ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$), y se dejó reposar por una noche. Posteriormente, se adicionaron 5 mg de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), se calentó la reacción 15 min, se dejó enfriar, y se agregó 1.1 g de una mezcla de 1g de sulfato de potasio (K_2SO_4), 0.1g de sulfato cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y 0.01 g de Selenio metálico. Esta mezcla se sometió a una digestión húmeda colocándola a 360°C durante 5 h; posteriormente, se dejó enfriar y se colocaron 7 mL de agua destilada por muestra. Para la determinación del porcentaje de nitrógeno se realizó la destilación de las muestras digeridas con 10 mL de NaOH (10 N), cada muestra se recolectó en un frasco con 10 mL de una solución de ácido bórico con indicadores a pH 5 (H_3BO_3 más verde de bromocresol y rojo de metilo), hasta obtener un volumen final de 50 mL. El producto de la destilación se tituló con una solución de H_2SO_4 (0.01N) observando el cambio de coloración de verde a rosa. Los resultados se expresaron en porcentaje total de nitrógeno por planta.

Para la determinación de fósforo (P) se tomaron 0.25 g de material vegetal seco molido (parte aérea y raíz) de cinco plantas por tratamiento, a los que se agregaron 4 mL de ácido nítrico (65%), 2 mL de ácido perclórico (72%), y se dejaron reposar toda una noche. Posteriormente, el material se colocó a 150°C durante 1 h y a 210°C por 1 h, se dejó enfriar y se diluyó con 50 mL de agua destilada. Se tomaron 20 mL de la solución por muestra, a los que se adicionaron 7.5 mL de molibdato de amonio (5%) y se aforó a 50 mL. De esta solución se tomó un alícuota de 290 μL por muestra y se tomaron lecturas de absorbancia a 470 nm en un espectrofotómetro ultravioleta visible (UV-VIS) (Synergy 2, Biotech® Instruments). Se utilizó fosfato dihidrógeno de potasio (KH_2PO_4) para preparar la curva estándar. Los resultados se expresaron en porcentaje de fósforo por planta.

Variables de crecimiento

En nueve plantas, se contaron las hojas bipinnadas del tallo, se midió la longitud total de la planta (cm), el diámetro del tallo (mm), y volumen radical (cm³). Para la determinación del peso de materia seca (g), se tomaron cinco plantas al azar por tratamiento, y se colocaron a 70 °C durante tres días y se determinó su peso de materia seca total.

Actividad antioxidante total y contenido de compuestos fenólicos totales en raíz

Se utilizaron cuatro raíces secas por tratamiento, cada una se maceró (aproximadamente 0.1g) con 1.5 mL de metanol al 80%, y se colocó en tubos Eppendorf de 2 mL a 4 °C para el posterior análisis de actividad antioxidante total (AOX) y compuestos fenólicos totales (CFT).

La AOX se determinó mediante el método propuesto por Matthäus (2002) y Re *et al.* (1999); utilizando una solución con 24 mg de DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) disuelto en 100 mL de metanol, misma que fue diluida en metanol (1:4 v/v). De esta solución se tomaron alícuotas de 270 µL a las que se adicionaron 15 µL de cada extracto vegetal, obteniendo un volumen final de 285 µL que se dejó reaccionar por 15 min. Se tomaron lecturas de absorbancia, antes y después de la reacción, a 515 nm en un espectrofotómetro ultravioleta visible (UV-VIS) (Synergy 2, Biotech® Instruments). Se utilizó Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico) para la curva estándar, y los resultados se expresaron en mM de equivalentes de Trolox g⁻¹ de tejido seco.

La determinación del CFT se realizó mediante la técnica modificada de Swain y Hillis (1959). A 30 µL de cada extracto, se adicionaron 150 µL de Folin-Ciocalteau 0.25 N y 90 µL de carbonato de sodio (Na₂CO₃) 1 N, obteniendo un volumen final de 270 µL, el cual se dejó reaccionar por 30 min, para después tomar lecturas de absorbancia a 725 nm en

espectrofotómetro (Synergy 2, Biotech® Instruments). Se utilizó ácido gálico para la preparación de la curva estándar, y los resultados se expresaron en mg de equivalentes de ácido gálico g⁻¹ de tejido seco.

Biodegradación de fenantreno

Dos muestras de arena recién contaminadas se mantuvieron a -20 °C durante 150 días para determinar la concentración inicial de fenantreno. Las muestras de suelo obtenidas al finalizar el experimento (60 días de desarrollo) se almacenaron a -20 °C durante 90 días, para analizar posteriormente la degradación del fenantreno en el laboratorio de la Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica (SARA) de la Universidad Veracruzana en Xalapa, Veracruz.

Para la determinación de la degradación de fenantreno se utilizaron 20 g de arena por muestra, obteniendo un total de 5 muestras por tratamiento. Se realizaron 5 lavados con 12 mL de acetona (grado analítico), se agitaron vigorosamente por 10 minutos con la ayuda de un vortex, se esperó la sedimentación de la arena, se retiró el sobrenadante en cada lavado, y se obtuvo volumen final aproximado de 50 mL por muestra. Posteriormente, los sobrenadantes recolectados se evaporaron con la ayuda de un rotavapor (Büchi B-480) a una temperatura de 58 °C. Finalmente, las muestras se resuspendieron en 1 mL de acetona (grado HPLC) y se filtraron empleando acrodiscos (0.45 µm).

Las muestras se analizaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS), utilizando un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890 y un espectrómetro de masas Agilent Technologies 5975 con una columna capilar DB-5 (5%-fenilmetilpolisiloxano, 60 m, 250 µm i.d., 0.25 µm de grosor). La temperatura del inyector fue de 250 °C y la del detector de 280 °C, se utilizó Helio como gas acarreador (1 mL min⁻¹). La temperatura

de inicio fue de 70 °C (5 min) e incrementó 40 °C min⁻¹ hasta alcanzar 280 °C, temperatura que se mantuvo por 35 min. El fenantreno se identificó con base en su tiempo de retención y por la comparación de su espectro de masas a 70 eV con la biblioteca del HP CHEMSTATION-NIST MS, versión A.00.00-1995. Además, se realizó la comparación con un estándar de fenantreno (Sigma-Aldrich con 98% de pureza) analizado bajo las mismas condiciones. Los resultados se expresaron en porcentaje de degradación de fenantreno.

Diseño experimental y análisis de los datos

El diseño experimental fue un factorial 2 x 4, que incluyó 8 tratamientos con nueve repeticiones, distribuidos en un diseño experimental completamente al azar. Los datos obtenidos se analizaron mediante análisis de varianza y prueba de comparación de medias Tukey ($\alpha = 0.05$) mediante el sistema de análisis estadístico SAS (SAS Institute, Inc., 1999).

RESULTADOS

Efectos en la nodulación y la colonización micorrízica

A pesar de que la inoculación con *Rhizobium* CIAT899 se realizó únicamente en los tratamientos R y GR, se obtuvieron nódulos en todos los tratamientos, posiblemente por la gran afinidad que existe entre leguminosas y rizobios, así como al manejo de los tratamientos. Los tratamientos inoculados y no inoculados se colocaron dentro de una incubadora con flujo de aire, lo que posiblemente permitió el movimiento de las bacterias y debido a que las condiciones de los tratamientos eran estériles lograron un fácil establecimiento.

La contaminación con fenantreno (60 mg kg⁻¹) incrementó significativamente ($p < 0.001$) el número de nódulos blancos (585.6%) y nódulos rojos (13.2%), aunque este último no fue significativo con respecto a la nodulación en las plantas sin contaminar (Figura 5.1A). En cuanto

al factor inoculación, no se observaron diferencias significativas en el número de nódulos rojos o blancos; sin embargo, se observó mayor número de nódulos rojos (Figura 5.1B). En el número de nódulos rojos fue mayor en los tratamientos T y GR en comparación con los tratamientos G o R, mientras que los nódulos blancos se encontraron en mayor número en los tratamientos R y GR (Figura 5.1B). En el análisis por tratamiento, la aplicación de fenantreno incrementó el número de nódulos rojos en los tratamientos T (53.9%) y GR (50.7%) en comparación con sus respectivos tratamientos sin contaminante, mientras que en los tratamientos G y R el número de nódulos rojos disminuyó (31.7 y 151.6%, respectivamente). Cabe aclarar que ninguna de estas diferencias fue estadísticamente significativa entre los diferentes tratamientos (Figura 5.1C).

En cuanto a los nódulos blancos, la aplicación de fenantreno en los tratamientos R y GR incrementó significativamente ($p < 0.001$) el número de nódulos (776.6% y 1101% respectivamente) en comparación con sus respectivos tratamientos sin contaminar (Figura 5.1C). En los tratamientos T y G, la aplicación de fenantreno también incrementó el número de nódulos blancos pero sin mostrar diferencias significativas entre sus tratamientos sin contaminar (Figura 5.1C).

El peso de materia seca de los nódulos disminuyó significativamente ($p < 0.001$) por la aplicación de fenantreno en 68.6%, en comparación con el peso de materia seca de los nódulos de los tratamientos sin el contaminante (Figura 5.2A). En el caso del efecto de la inoculación de los microorganismos no se observaron diferencias en el peso de materia seca de los nódulos (Figura 5.2B). Para el análisis del efecto del tratamiento, se observó un incremento gradual en el peso de materia seca de los nódulos en los tratamientos inoculados ($T < G < R < GR$) sin el contaminante, aunque las diferencias no fueron significativas (Figura 5.2C). En contraste, con la aplicación de fenantreno, el peso de materia seca de los nódulos disminuyó significativamente ($p < 0.001$) en

comparación con sus tratamientos sin contaminar; en especial en los tratamientos G y R cuya reducción fue del 88% y 97.9% respectivamente (Figura 5.2C).

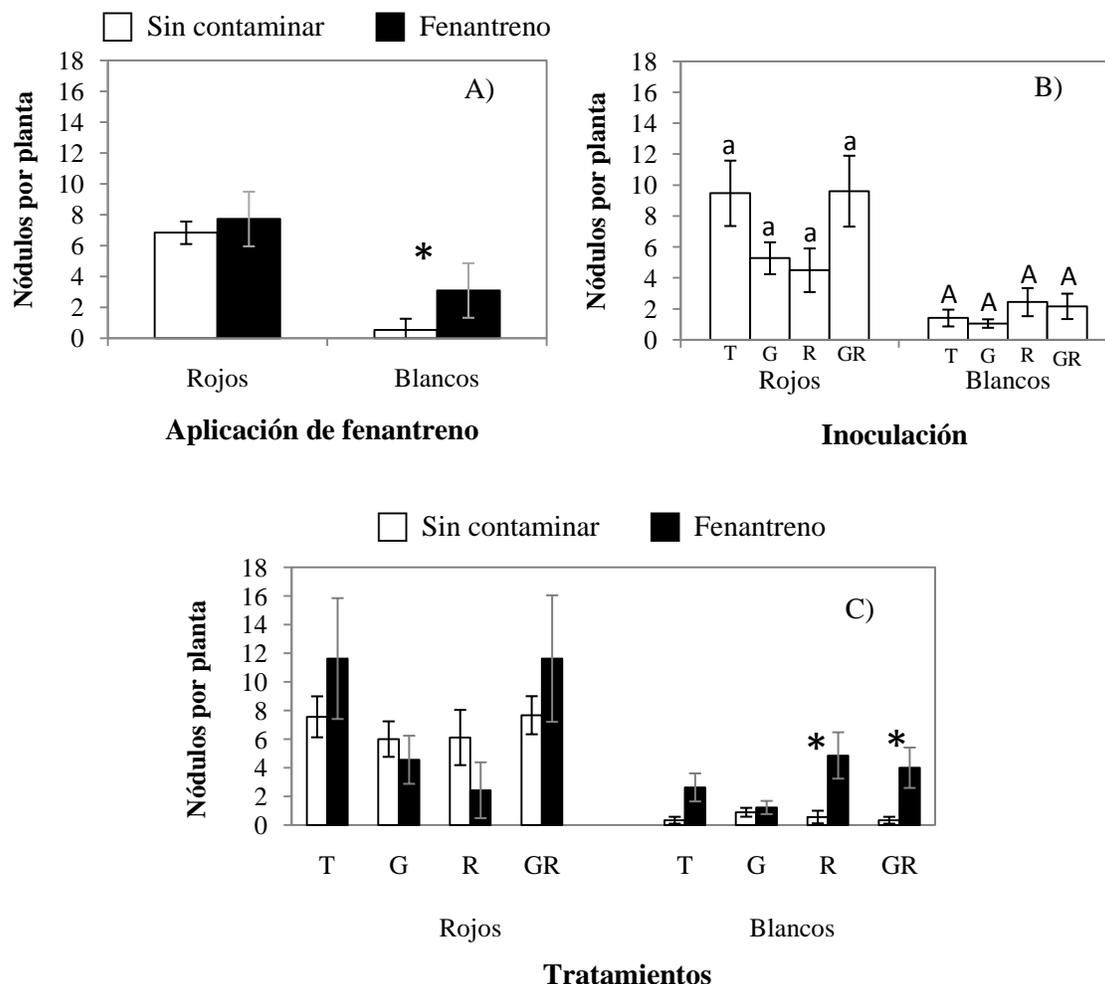


Figura 5.1. Número de nódulos rojos y blancos en raíces de *Leucaena leucocephala* por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y *Glomus intraradices*, y/o por la aplicación de fenanthreno (60 mg kg⁻¹). A) Efecto por la aplicación de fenanthreno, n = 36. B) Efecto por la inoculación de los microorganismos, n = 18. C) Efecto por tratamiento, n = 9. Abreviaciones 0 = Sin fenanthreno, F60 = aplicación de fenanthreno; T = Testigo (sin inocular), G = *G. intraradices*, R = *Rhizobium*, GR = *G. intraradices* y *Rhizobium*. Promedios ± error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos sin y con fenanthreno. Letras diferentes indican diferencias entre la inoculación de los microorganismos (Tukey $\alpha = 0.05$).

Se observó colonización micorrízica únicamente en las raíces de los tratamientos en los que se inoculó con *G. intraradices*. La colonización micorrízica disminuyó significativamente ($p < 0.001$) en 76% por la aplicación de fenantreno, en comparación con las plantas sin aplicación del contaminante (Figura 5.3A). Por otra parte, la inoculación con *Rhizobium* redujo significativamente ($p < 0.001$) la colonización micorrízica en 93% en comparación con el tratamiento inoculado únicamente con *G. intraradices* (Figura 5.3B). En el análisis por tratamiento, la aplicación de fenantreno redujo significativamente la colonización micorrízica en 69% en las plantas con la sola inoculación de G en comparación con su respectivo tratamiento sin contaminar (Figura 5.3C); en contraste, en el tratamiento GR no se obtuvieron efectos significativos por la aplicación del contaminante, cuya colonización micorrízica fue de 2.54%, en promedio (Figura 5.3C).

Efecto en la actividad nitrogenasa y en el contenido de nitrógeno y fósforo

La aplicación de fenantreno redujo significativamente ($p < 0.001$) la actividad de la nitrogenasa en 52% en comparación con aquellos tratamientos sin contaminar (Figura 5.4A). Por otra parte, la inoculación de los microorganismos produjo diferencias significativas ($p < 0.01$) en la actividad nitrogenasa, donde la doble inoculación (GR) incrementó 56.5% esta actividad enzimática en comparación con la sola inoculación de R (Figura 5.4B). En cuanto al análisis por efecto de tratamiento, la actividad nitrogenasa de los tratamientos sin fenantreno disminuyó 17.5% con la inoculación de G, mientras que incrementó 5.6% y 40% por la inoculación de R y GR, respectivamente, en comparación con el T. La aplicación de fenantreno redujo significativamente esta actividad enzimática en los tratamientos R y GR (89.4% y 48.4%, respectivamente) en comparación con sus correspondientes tratamientos sin contaminar (Figura 5.4C).

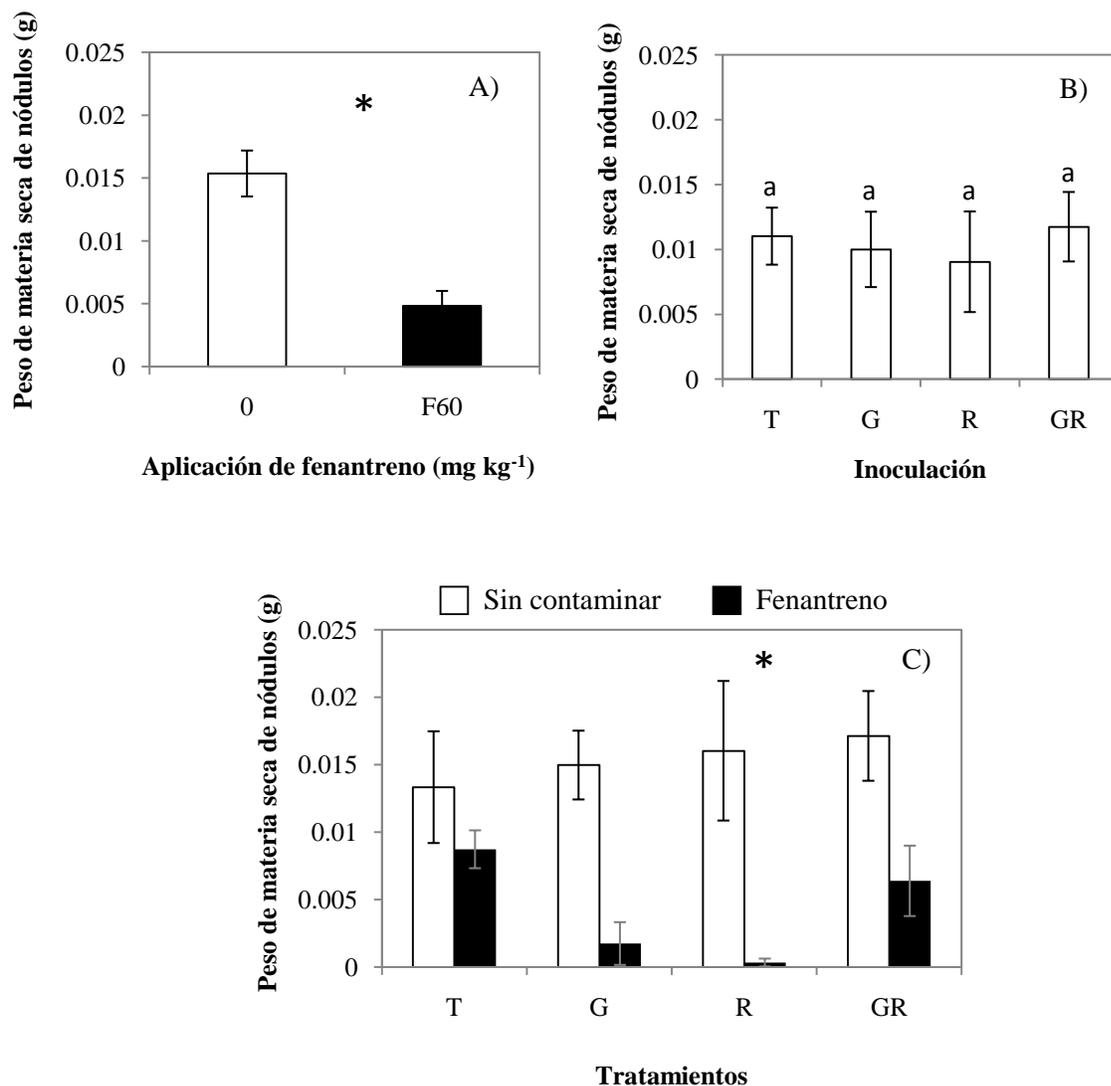


Figura 5.2. Peso de materia seca de nódulos de *Leucaena leucocephala* por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y *Glomus intraradices*, y/o por la aplicación de fenantreno (60 mg kg⁻¹). A) Efecto por la aplicación de fenantreno, n = 20. B) Efecto por la inoculación de los microorganismos, n = 10. C) Efecto por tratamiento, n = 5. Abreviaciones 0 = Sin fenantreno, F60 = aplicación de fenantreno; T = Testigo (sin inocular), G = *G. intraradices*, R = *Rhizobium*, GR = *G. intraradices* y *Rhizobium*. Promedios ± error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos sin y con fenantreno. Letras diferentes indican diferencias entre la inoculación de los microorganismos (Tukey $\alpha = 0.05$).

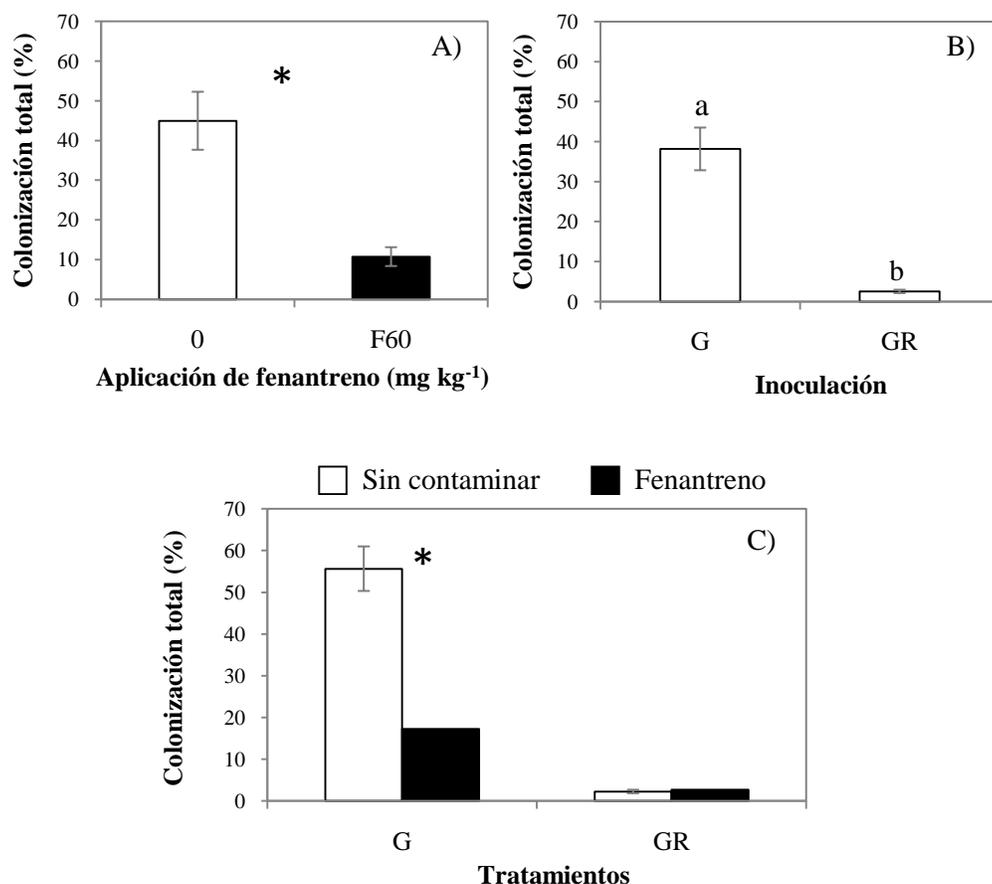


Figura 5.3. Colonización micorrízica total en raíces de *Leucaena leucocephala* por efecto de la inoculación con *Glomus intraradices* y *Rhizobium tropici* CIAT 899, y/o por la aplicación de fenantreno (60 mg kg⁻¹). A) Efecto por la aplicación de fenantreno, n = 48. B) Efecto por la inoculación de los microorganismos, n = 24. C) Efecto por tratamiento, n = 12. Abreviaciones 0= Sin fenantreno, F60= aplicación de fenantreno; T = Testigo (sin inocular), G = *G. intraradices*, R = *Rhizobium*, GR = *G. intraradices* y *Rhizobium*. Promedios ± error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos sin y con fenantreno. Letras diferentes indican diferencias entre la inoculación de los microorganismos (Tukey $\alpha = 0.05$).

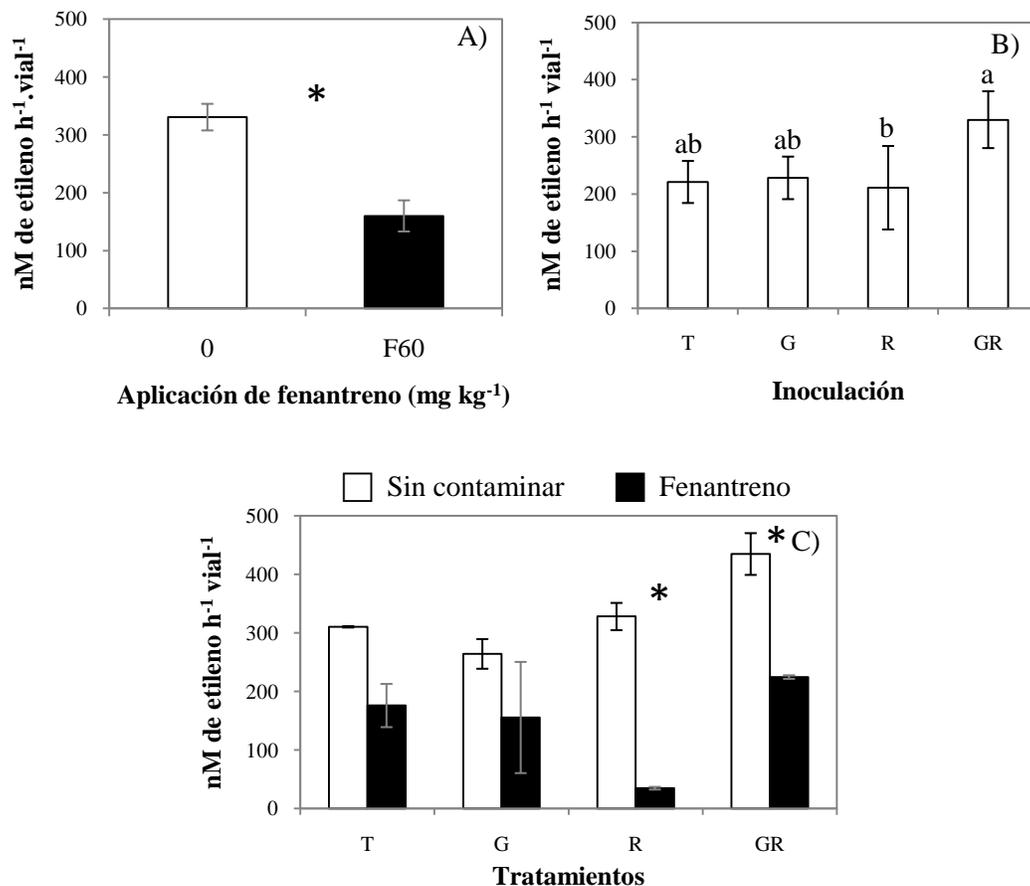


Figura 5.4. Actividad de nitrogenasa de nódulos de *Leucaena leucocephala* por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y *Glomus intraradices* y/o por la aplicación de fenantreno (60 mg kg⁻¹). A) Efecto por la aplicación de fenantreno, n = 12. B) Efecto por la inoculación de los microorganismos, n = 6. C) Efecto por tratamiento, n = 3. Abreviaciones 0 = Sin fenantreno, F60 = aplicación de fenantreno; T = Testigo (sin inocular), G = *G. intraradices*, R = *Rhizobium*, GR = *G. intraradices* y *Rhizobium*. Promedios ± error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos sin y con fenantreno. Letras diferentes indican diferencias entre la inoculación de los microorganismos (Tukey $\alpha = 0.05$).

El nitrógeno total de las plantas de *Leucaena* disminuyó significativamente ($p < 0.001$) en 44.5% por la aplicación de fenantreno (Figura 5.5A). En contraste, no se observaron diferencias significativas, por efecto de la inoculación; sin embargo, la doble inoculación (GR) alcanzó el mayor contenido de N (Figura 5.5B). Con respecto al análisis por tratamiento, en los tratamientos sin contaminar el contenido de N total disminuyó 28% con G; incrementó 27.6% y 81% con la inoculación de R y GR, respectivamente, en comparación con el tratamiento T (Figura 5.5C). El fenantreno redujo el contenido de N total (51.9% en promedio) en comparación con sus correspondientes tratamientos sin contaminar, excepto el tratamiento inoculado con G, el cual mostró un incremento del 17.2% comparado con su respectivo tratamiento sin contaminar (Figura 5.5C). La reducción del contenido de N por la contaminación fue significativa en los tratamientos R y GR, los cuales mostraron menos contenido de N (72.8 y 66.8 %, respectivamente) en comparación con sus tratamientos sin contaminar (Figura 5.5C).

El contenido de fósforo no presentó diferencias significativas por la aplicación de fenantreno ni por la inoculación; sin embargo, este contenido fue mayor en las plántulas sin contaminar, y en las plantas con la doble inoculación (GR) (Figuras 5.6A y B). En el caso del análisis por efecto del tratamiento, el contenido de P total de las plantas sin fenantreno se redujo 34.9% con la inoculación de G pero incrementó 16% y 73.5% con la inoculación de R y GR, respectivamente, en comparación con el tratamiento T (Figura 5.6C). En presencia de fenantreno, el contenido de P incrementó 7% y 95% en las plantas T y con la inoculación de G, respectivamente, en comparación con sus respectivos tratamientos sin contaminar; en contraste, los tratamientos R y GR presentaron una reducción en el contenido de P del 29% y 59%, respectivamente, comparado con sus respectivos tratamientos sin contaminar (Figura 5.6C).

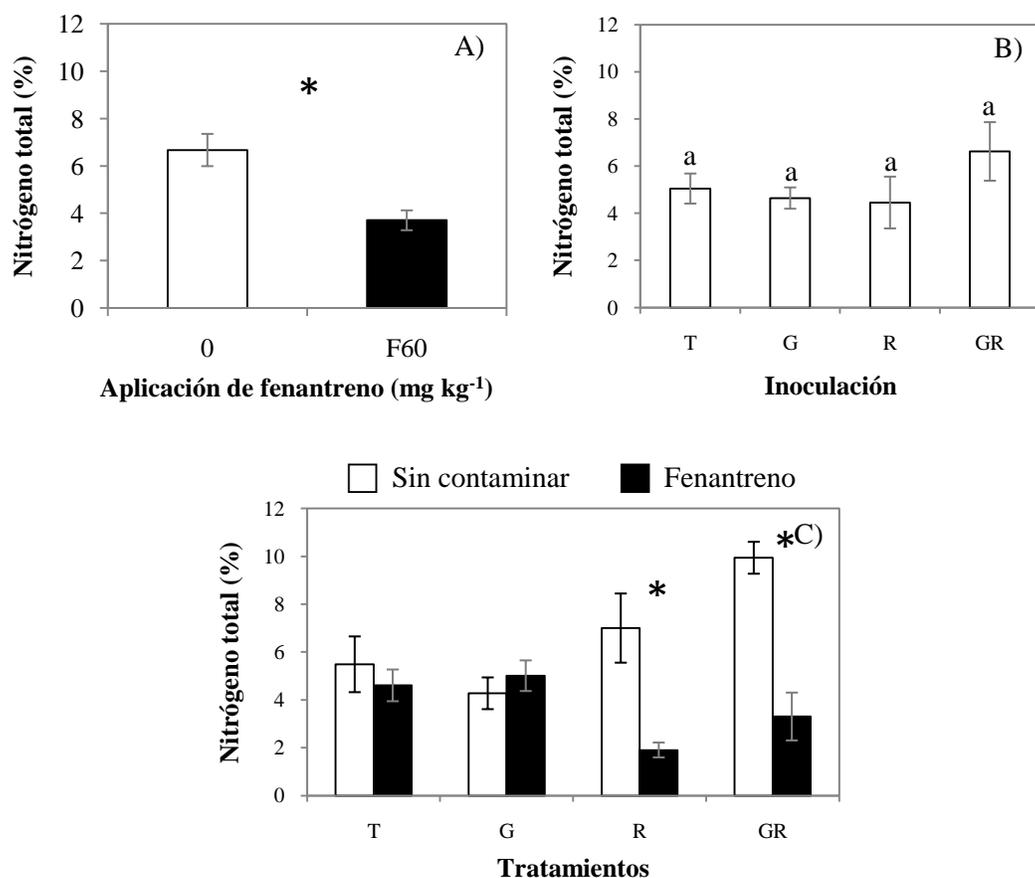


Figura 5.5. Porcentaje de nitrógeno total en las plantas de *Leucaena leucocephala* por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y *Glomus intraradices* y/o por la aplicación de fenantreno (60 mg kg⁻¹). A) Efecto por la aplicación de fenantreno, n = 20. B) Efecto por la inoculación de los microorganismos, n = 10. C) Efecto por tratamiento, n = 5. Abreviaciones 0 = Sin fenantreno, F60 = aplicación de fenantreno; T = Testigo (sin inocular), G = *G. intraradices*, R = *Rhizobium*, GR = *G. intraradices* y *Rhizobium*. Promedios ± error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos sin y con fenantreno. Letras diferentes indican diferencias entre la inoculación de los microorganismos (Tukey $\alpha = 0.05$).

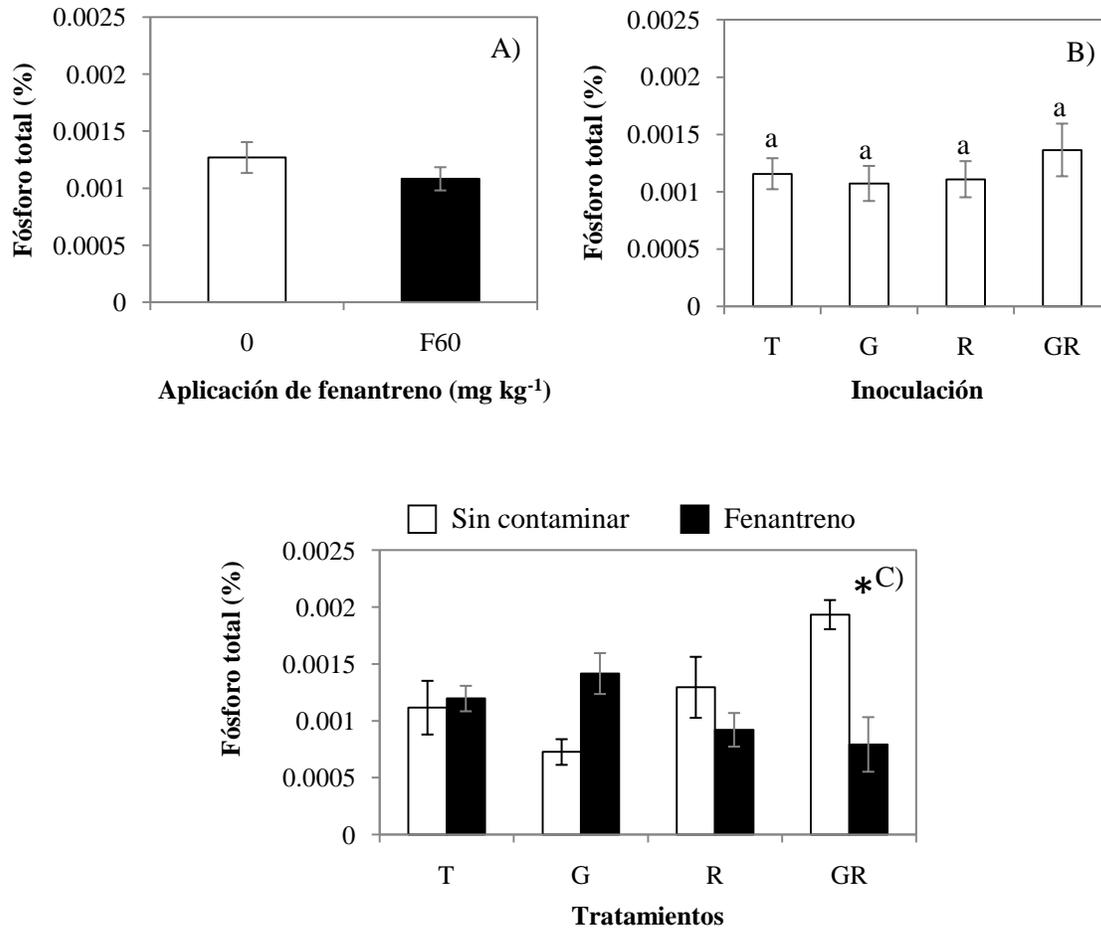


Figura 5.6. Fósforo total en plantas de *Leucaena leucocephala* por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y *Glomus intraradices* y/o por la aplicación de fenantreno (60 mg kg⁻¹). A) Efecto por la aplicación de fenantreno, n = 20. B) Efecto por la inoculación de los microorganismos, n = 10. C) Efecto por tratamiento, n = 5. Abreviaciones 0 = Sin fenantreno, F60 = aplicación de fenantreno; T = Testigo (sin inocular), G = *G. intraradices*, R = *Rhizobium*, GR = *G. intraradices* y *Rhizobium*. Promedios ± error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos sin y con fenantreno. Letras diferentes indican diferencias entre la inoculación de los microorganismos (Tukey $\alpha = 0.05$).

Efecto sobre las variables de crecimiento

El fenantreno redujo ($p < 0.001$) significativamente el crecimiento de las plantas (hojas bipinnadas, diámetro del tallo y volumen radical), mientras que el factor inoculación no tuvo efectos significativos (Cuadro 5.1). En cuanto al análisis por tratamiento, sin contaminante, la inoculación doble (GR) incrementó significativamente ($> 51\%$) el número de hojas bipinnadas en comparación con el tratamiento T. La contaminación con fenantreno disminuyó significativamente (44%) el volumen radical del tratamiento GR, en comparación con su tratamiento sin contaminar. La aplicación del fenantreno disminuyó significativamente las hojas bipinnadas en los tratamientos G, R y GR, (31.8%, 20.7% y 44.9%, respectivamente) y redujo la longitud total de las plantas en 36% en comparación con las plantas sin contaminar (Cuadro 5.1). Por otra parte, la inoculación con G y R redujo la longitud total en 15.8% y 24.5%, respectivamente; mientras que la doble inoculación (GR) mantuvo una longitud similar, en comparación con el tratamiento T (Cuadro 5.1). Por efecto de tratamiento, ante la contaminación con fenantreno, la longitud total de las plantas disminuyó significativamente, mostrando la siguiente tendencia en los tratamientos: $R > G > GR > T$ (48%, 41%, 35.9% y 23.9%, respectivamente), en comparación con sus tratamientos sin contaminar (Cuadro 5.1).

El fenantreno redujo significativamente ($p < 0.01$) el peso de materia seca de las plantas en 34% en comparación con el tratamiento sin contaminar (Figura 5.7A). Por otra parte, no se observaron cambios significativos por efecto de la inoculación, a pesar de que el mayor peso de materia seca se observó en las plantas con doble inoculación (GR) (Figura 5.7B). En el caso del efecto por tratamiento, la aplicación de fenantreno redujo el peso de materia seca excepto en el tratamiento G. La disminución en el peso de materia seca fue significativa únicamente en el tratamiento GR al presentar una reducción del 58.9% con respecto a su tratamiento sin contaminar (Figura 5.7C).

Cuadro 5.1. Variables de crecimiento (diámetro del tallo, volumen radical, hojas bipinnadas y longitud total) de plantas de *Leucaena leucocephala* por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y/o *Glomus intraradices* y la aplicación de fenantreno (60 mg kg⁻¹), a los 60 días de desarrollo.

Contaminación con fenantreno (mg kg ⁻¹)	Inoculación microbiana	Diámetro tallo (mm)	Volumen radical (ml)	Número de hojas bipinnadas	Longitud total (cm)
0	T	1.97 ± 0.13 ab	0.19 ± 0.03 ab	11.6 ± 1.06 bc	12.38 ± 0.70 a
	G	2.29 ± 0.16 a	0.20 ± 0.02 ab	14.67 ± 1.43 ab	11.64 ± 0.69 ab
	R	2.02 ± 0.11 ab	0.19 ± 0.02 ab	12.44 ± 0.69 b	10.51 ± 0.89 ab
	G+R	2.20 ± 0.09 ab	0.25 ± 0.01	17.56 ± 0.99 a	11.79 ± 0.72 ab
60	T	1.81 ± 0.11 ab	0.18 ± 0.01 ab	10.88 ± 0.74 bc	9.43 ± 0.55 bc
	G	1.85 ± 0.14 ab	0.13 ± 0.02 b	10 ± 0.83 c	6.85 ± 0.58 cd
	R	1.77 ± 0.04 ab	0.14 ± 0.02 b	9.86 ± 0.86 c	5.43 ± 0.41 d
	G+R	1.69 ± 0.12 b	0.14 ± 0.01 b	9.67 ± 0.62 c	7.56 ± 0.38 cd
DMS (Tukey α=0.05)		0.54	0.08	4.23	2.89
Significancia	Contaminación	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	Inoculación	NS	NS	NS	<0.001
	Tratamientos	<0.01	<0.001	<0.001	<0.001

Abreviaciones: DMS = Diferencia mínima significativa; 0 = Sin fenantreno, F60 = aplicación de fenantreno; T = Testigo (sin inocular), G = *G. intraradices*, R = *Rhizobium*, GR = *G. intraradices* y *Rhizobium*. Promedios ± error estándar. Contaminación (n = 36), Inoculación (n = 18) y Tratamiento (n = 9). Letras diferentes indican diferencias entre la inoculación de los microorganismos (Tukey α = 0.05).

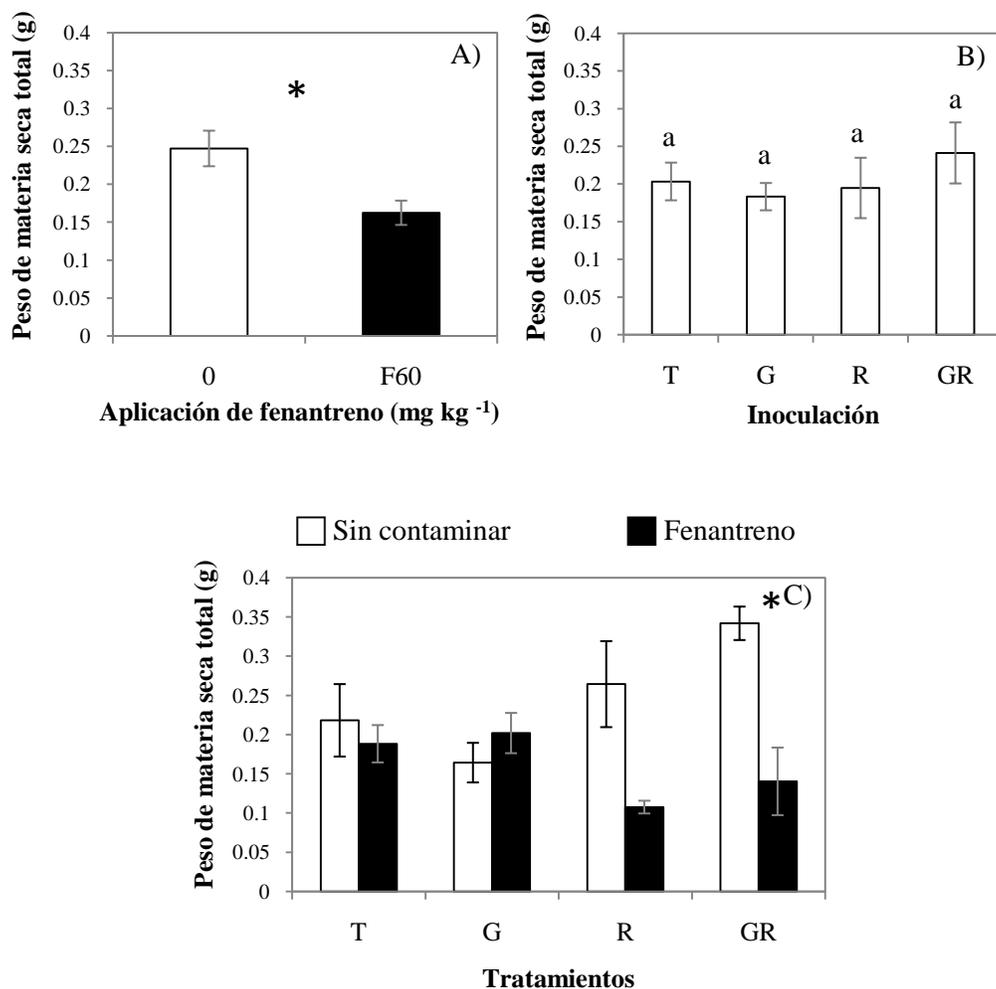


Figura 5.7. Peso de materia seca total de plantas de *Leucaena leucocephala* por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y *Glomus intraradices* y/o por la aplicación de fenantreno (60 mg kg⁻¹). A) Efecto por la aplicación de fenantreno, n = 20. B) Efecto por la inoculación de los microorganismos, n = 10. C) Efecto por tratamiento, n = 5. Abreviaciones 0 = Sin fenantreno, F60 = aplicación de fenantreno; T = Testigo (sin inocular), G = *G. intraradices*, R = *Rhizobium*, GR = *G. intraradices* y *Rhizobium*. Promedios ± error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos sin y con fenantreno. Letras diferentes indican diferencias entre la inoculación de los microorganismos (Tukey $\alpha = 0.05$).

Efecto en la AOX y en el contenido de CFT

La aplicación del fenantreno y el factor inoculación no causaron modificaciones significativas en la AOX de las raíces (Figura 5.8A y B); sin embargo, las plantas inoculadas con G presentaron la mayor actividad AOX (Figura 5.8B). En el análisis por tratamiento, se observaron diferencias significativas ($p < 0.001$), en las que la mayor actividad AOX en las plantas sin fenantreno, la presentó el tratamiento G (Figura 5.8C). Por otra parte, la aplicación de fenantreno redujo significativamente en 59% la AOX en el tratamiento G (Figura 5.8C), mientras que en los demás tratamientos generó un incremento que no fue significativo (Figura 5.8C).

La aplicación del factor fenantreno y el factor inoculación no causaron diferencias significativas en el contenido de CFT (Figuras 5.9A y B); sin embargo, el mayor contenido de CFT se obtuvo en las plantas inoculadas G (Figura 5.9B). En el análisis por efecto de tratamiento, se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$), en las que el mayor contenido de CFT se observó en el tratamiento G sin contaminar, mientras que la inoculación con R y GR se obtuvo una reducción del 44.7% y 74% respectivamente, en comparación con el tratamiento T (Figura 5.9C). Por otra parte, la aplicación de fenantreno redujo el contenido de CFT en 26.9% y 85% en los tratamientos T y G, respectivamente, mientras que en los tratamientos R y GR se obtuvo un incremento del 103% y 990%, respectivamente, por la presencia de fenantreno (Figura 5.9C).

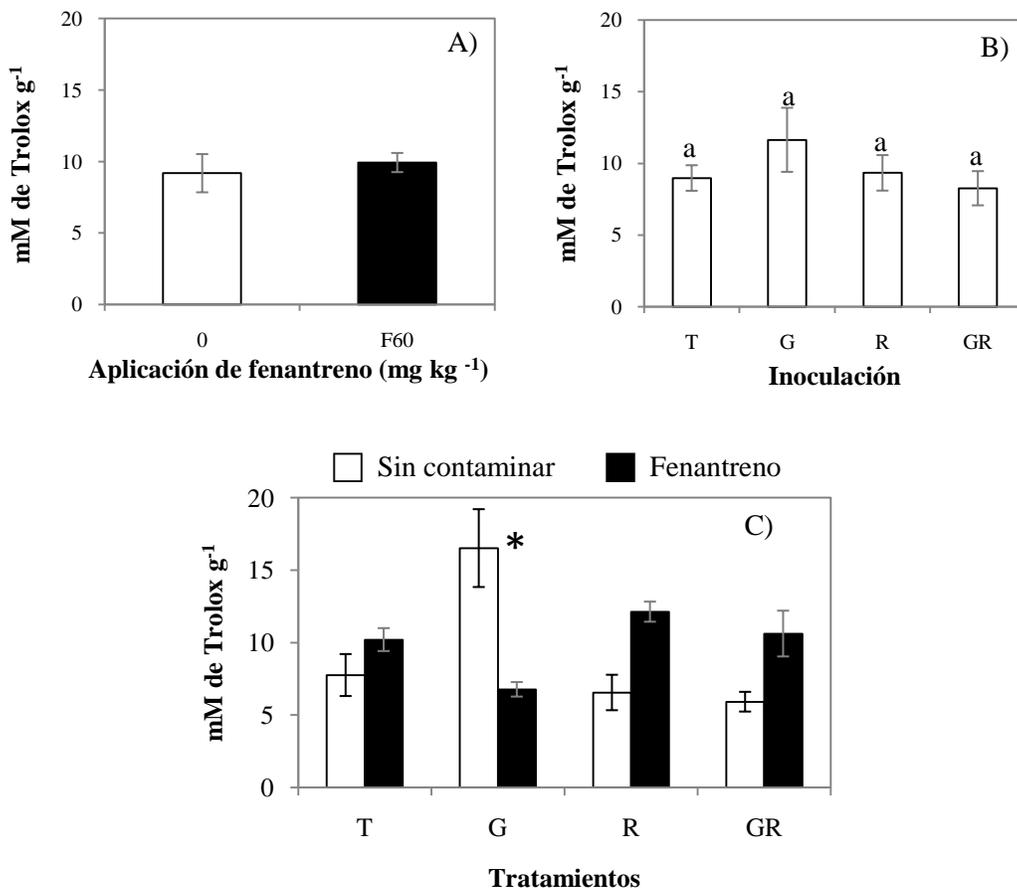


Figura 5.8. Actividad antioxidante de la raíz de *Leucaena leucocephala* por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y *Glomus intraradices* y/o por la aplicación de fenantreno (60 mg kg⁻¹). A) Efecto por la aplicación de fenantreno, n = 16. B) Efecto por la inoculación de los microorganismos, n = 8. C) Efecto por tratamiento, n = 4. Abreviaciones 0 = Sin fenantreno, F60 = aplicación de fenantreno; T = Testigo (sin inocular), G = *G. intraradices*, R = *Rhizobium*, GR = *G. intraradices* y *Rhizobium*. Promedios ± error estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos sin y con fenantreno. Letras diferentes indican diferencias entre la inoculación de los microorganismos (Tukey $\alpha = 0.05$).

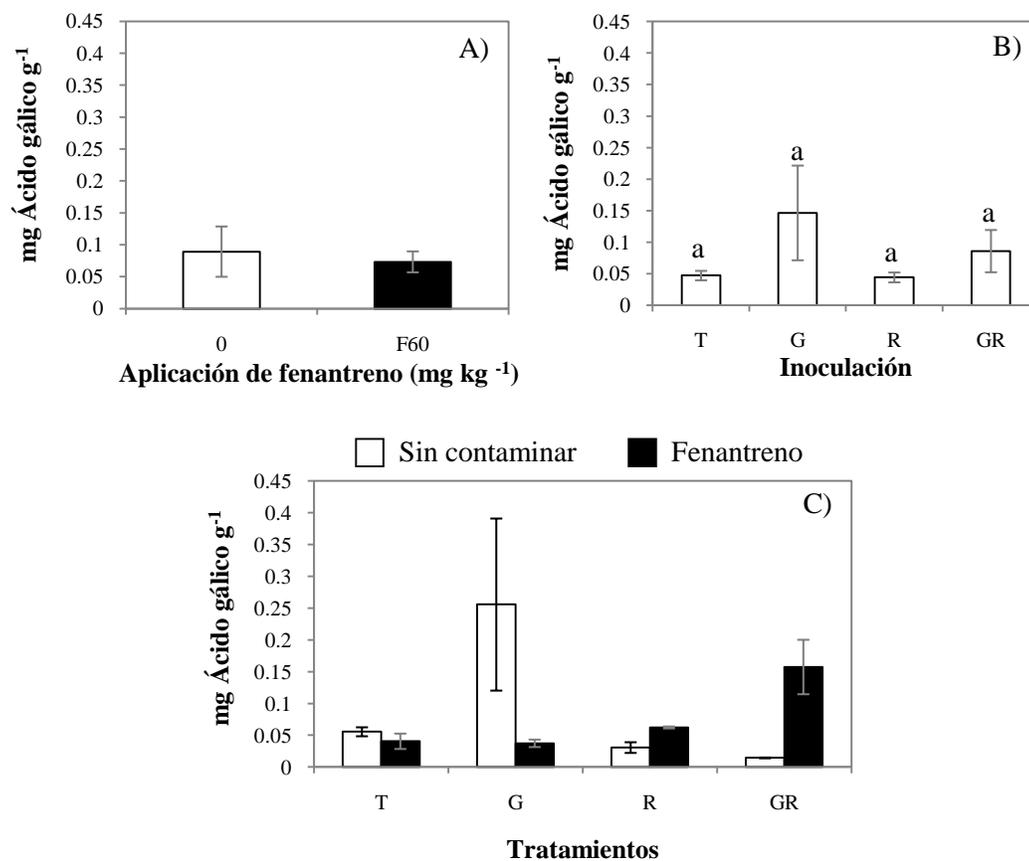


Figura 5.9. Contenido de compuestos fenólicos totales de la raíz de *Leucaena leucocephala* por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y *Glomus intraradices* y/o por la aplicación de fenantreno (60 mg kg^{-1}). A) Efecto por la aplicación de fenantreno (mg kg^{-1}), $n = 16$. B) Efecto por la inoculación de microorganismos, $n = 8$. C) Efecto por tratamiento, $n = 4$. Abreviaciones 0 = Sin fenantreno, F60 = aplicación de fenantreno; T = Testigo (sin inocular), G = *G. intraradices*, R = *Rhizobium*, GR = *G. intraradices* y *Rhizobium*. Promedios \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias entre la inoculación de los microorganismos (Tukey $\alpha = 0.05$).

Biodegradación de fenantreno

Los porcentajes de degradación de fenantreno obtenidos en los diferentes tratamientos se aprecian en la Figura 5.10. En general, todos los tratamientos alcanzaron en promedio 99.8% de degradación del fenantreno, aunque el tratamiento G presentó mayor porcentaje de degradación de fenantreno (Figura 5.10). Lo anterior se hace más evidente en los cromatogramas incluidos en la Figura 5.12, en los que se indican los picos de fenantreno encontrados en las muestras rizosféricas, observándose que el menor pico se encontró en el tratamiento inoculado con *G. intraradices*.

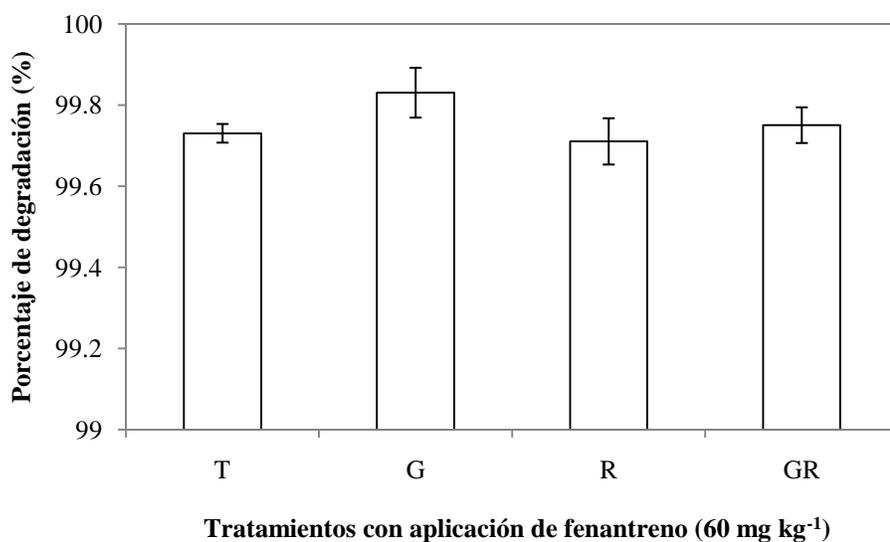


Figura 5.10. Porcentaje de biodegradación del fenantreno (60 mg kg^{-1}) por *Leucaena leucocephala* en simbiosis con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y *Glomus intraradices*. ($n = 5$). Abreviaciones T = Testigo (sin inocular), G = *G. intraradices*, R = *Rhizobium*, GR = *G. intraradices* y *Rhizobium*. Promedios \pm error estándar.

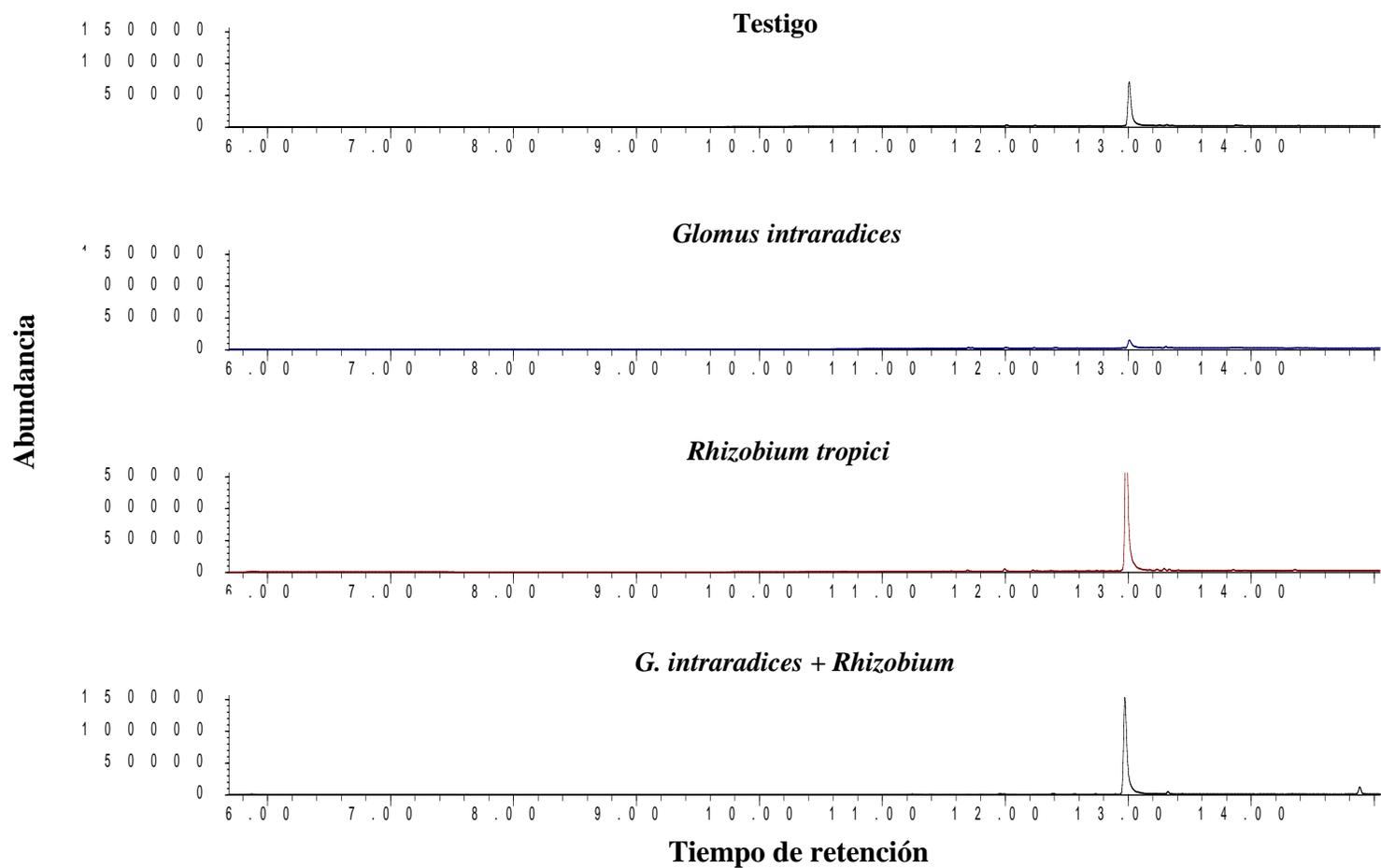


Figura 5.11. Cromatogramas que muestran la desaparición del fenantreno en muestras rizosféricas de *Leucaena leucocephala* en simbiosis con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y/o *Glomus intraradices* expuestas a fenantreno (60 mg kg^{-1}), durante 60 días.

DISCUSIÓN

El incremento en el número de nódulos por la aplicación de fenantreno observado en este trabajo, había sido reportado por Chiapusio *et al.* (2007) en *Trifolium pratense* L. Sin embargo, en el presente estudio el fenantreno redujo significativamente el peso de materia seca y la actividad nitrogenasa de los nódulos. Estos resultados indican que la aplicación de fenantreno no afecta el reconocimiento entre *Leucaena* y *Rhizobium*, pero provoca alteraciones en el metabolismo de la simbiosis. La leghemoglobina es una proteína sintetizada por las leguminosas en los nódulos durante la simbiosis con *Rhizobium* (Madigan *et al.*, 2004). Esta proteína sirve de protección a las bacterias ya que controla el flujo de oxígeno promoviendo la respiración, disminuyendo la cantidad de oxígeno que pasa hacia los bacteroides, y evitando la formación de especies reactivas de oxígeno (Dakora, 1995). La reducción de la leghemoglobina tiene relación directa con la disminución en la actividad nitrogenasa por lo que es probable que el fenantreno reduzca la síntesis de leghemoglobina (Sassi *et al.*, 2008; Scherer *et al.*, 2008). Lo anterior sugiere que el incremento en la cantidad de nódulos blancos (indicando la ausencia de leghemoglobina) por efecto de la aplicación de fenantreno es debido a la reducción o inhibición de la síntesis de esta proteína y por consiguiente, la reducción en la actividad nitrogenasa (Figura 5.1 y 5.4).

La simbiosis tripartita entre leguminosas - *Rhizobium* - Micorriza arbuscular en sistemas no contaminados proporciona ventajas a todos los microorganismos que interaccionan, y que se relacionan con el incremento del porcentaje de colonización, el número y biomasa de nódulos, biomasa de la raíz y tallo, además de estimular la actividad nitrogenasa (Geneva *et al.*, 2006; Tajini *et al.*, 2011). En el presente estudio, la doble inoculación (GR) incrementó el número y el peso de materia seca de nódulos, la actividad nitrogenasa, y contenido de N total y de P total observado en las plantas; y a pesar de no ser significativo, se observó mayor volumen radical,

hojas bipinnadas y peso de materia seca de la planta, lo que es un indicador del estímulo de la doble simbiosis en el desarrollo de *Leucaena* bajo condiciones sin contaminación.

Los trabajos enfocados a la doble simbiosis en leguminosas bajo condiciones de contaminación son escasos. Teng *et al.* (2010) observó que en suelos contaminados con bifenilos policlorados la inoculación de *Rhizobium meliloti* y *Glomus caledonium* incrementó el establecimiento de *Medicago sativa*. En el presente estudio, en presencia del fenantreno, la doble inoculación con GR incrementó el número de nódulos, la actividad nitrogenasa y el peso de materia seca de la planta en comparación con los tratamientos con la inoculación simple (G o R). Lo anterior sugiere que la doble inoculación con GR es conveniente para favorecer el establecimiento de *L. leucephala* en la condición de contaminación.

Glomus intraradices es una especie de hongo micorrízico arbuscular tolerante a fenantreno (Liu y Dalpé, 2009); sin embargo, se ha reconocido que la presencia de hidrocarburos del petróleo afecta notablemente la colonización micorrízica (arbúsculos, vesículas e hifas), y la germinación de esporas (Gaspar *et al.*, 2002; Verdin *et al.*, 2006). En esta investigación se observó que *Rhizobium* y *G intraradices* toleran el fenantreno a 60 mg kg⁻¹; sin embargo, *Rhizobium* logra un mayor establecimiento en el sistema radical (expresado en el número de nódulos), mientras que el porcentaje de colonización micorrízica disminuyó significativamente ante el fenantreno. Estos resultados concuerdan con lo observado por Chiapusio *et al.* (2007) en donde observaron la estimulación y mejor establecimiento de *Rhizobium* en comparación con la colonización de los hongos micorrízicos arbusculares en un suelo contaminado con fenantreno (1000 mg kg⁻¹).

La doble inoculación (GR) incrementa el porcentaje de colonización micorrízica ante situaciones relacionadas con la limitación de P, en suelos sin contaminar, o en suelos contaminados con bifenilos policlorados (Geneva *et al.*, 2006; Teng *et al.*, 2010; Tajini *et al.*,

2011). Por otra parte, Ide *et al.* (2010) observó que la colonización micorrízica se redujo notablemente por la inoculación de *Rhizobium* bajo condiciones de estrés hídrico, aun cuando la actividad nitrogenasa mostró incrementos en la doble simbiosis. En el presente estudio se observó una reducción significativa en la colonización micorrízica en presencia de la doble inoculación en ausencia del contaminante; en contraste, en presencia de fenantreno, la doble inoculación (GR) estimuló la colonización micorrízica.

La presencia de hidrocarburos del petróleo reduce el desarrollo de raíces transformadas *in vitro* y de plantas bajo condiciones controladas de laboratorio, y estos efectos se reducen por la inoculación de *Rhizobium* y/o *Glomus* sp. favoreciendo así el establecimiento y desarrollo vegetal (Debiane *et al.*, 2009; Muratova *et al.*, 2009; Hernández-Ortega *et al.*, 2011). En el presente estudio también se observó que la aplicación de fenantreno redujo significativamente el contenido de N total, el diámetro del tallo y el volumen radical, las hojas bipinnadas, la longitud y el peso de materia seca total de la planta; sin embargo, no se observaron efectos benéficos por las inoculaciones en estas variables, en la presencia de fenantreno.

Existe la posibilidad de que la infección de *Rhizobium* en los tratamientos T y G haya ocurrido desde la semilla, ya que existe evidencia de que semillas de *Phaseolus vulgaris* contienen diversos microorganismos como *Rhizobium etli* (Pérez-Ramírez *et al.*, 1998; López-López *et al.*, 2010). Debido a esta infección posiblemente no se observaron diferencias en el número y peso de materia seca de nódulos entre los tratamientos inoculados con el tratamiento T (sin inocular). Sin embargo, como ya se mencionó, la doble inoculación en presencia del fenantreno incrementó el número de nódulos, la colonización micorrízica, la actividad nitrogenasa, la actividad AOX, y el contenido de CFT.

Por otra parte, es probable que la infección de *Rhizobium* en los tratamientos T y G ocurriera cuando la concentración de fenantreno había disminuido, logrando mayor

establecimiento en estos tratamientos. Los tratamientos T y GR presentaron similar número y peso de materia seca de nódulos, los tratamientos T y G tuvieron mayor contenido de N y P en comparación con los tratamientos R y GR, sin mostrar diferencias significativas. Por lo anterior, se puede inferir que es conveniente realizar la inoculación días después a la contaminación con fenantreno con el fin de incrementar el metabolismo de la asociación, lo cual se reflejaría en la estimulación del desarrollo de la planta y la simbiosis.

La inducción del estrés oxidativo en plantas por efecto de los HPAs ha sido documentada, reflejándose en un incremento por ejemplo, de la glutatión reductasa, del peróxido de hidrógeno, de la AOX, y del malondialdehído (Roy *et al.*, 1996; Alkio *et al.*, 2005; Paskova *et al.*, 2006; Debiane *et al.*, 2009; Hernández-Ortega *et al.*, 2011). Sin embargo, en este estudio no se observaron incrementos significativos en la actividad AOX; posiblemente debido a que la evaluación de la AOX se realizó (a los 60 días) cuando las plantas estaban expuestas a una concentración baja de fenantreno, debido a su posible degradación.

La inoculación con HMA incrementa la actividad antioxidante de las raíces en presencia de la contaminación por hidrocarburos (Criquet *et al.*, 2000; Debiane *et al.*, 2009; Hernández-Ortega *et al.*, 2011). En este estudio el tratamiento sin contaminación que fue inoculado con G, alcanzó la mayor actividad AOX y contenido de CFT con respecto a los demás tratamientos, aunque no presentó diferencias significativas; sin embargo, ante la aplicación de fenantreno, se redujo significativamente la AOX y el CFT posiblemente debido a la disminución en el porcentaje de colonización micorrízica causado por la presencia del contaminante. Estos resultados indican que la colonización micorrízica de *G. intraradices* en *Leucaena* incrementa en mayor proporción la AOX y el contenido de CFT en comparación con la inoculación con *Rhizobium*.

La actividad AOX fue mayor que el contenido CFT, pero se observó una tendencia similar en los tratamientos sin contaminar, por lo que es probable que los compuestos fenólicos estén participando como agentes antioxidantes por su habilidad de donar átomos de hidrógeno a radicales libres (Mittler, 2002; Zainol *et al.*, 2003). Por otra parte, la aplicación de fenantreno incrementó la actividad AOX en los tratamientos T, R y GR, y el contenido CFT en el tratamiento GR en comparación con sus respectivos tratamientos sin contaminar.

La degradación del fenantreno que se determinó en los tratamientos para evaluar la atenuación natural (SP-sin planta, y SPR-sin planta con *Rhizobium*) fue de 99.85% en promedio. Mientras que la degradación en AR (tubos con arena contaminada sin riego) fue del 67.2%; por lo que es posible asumir que el 32.7% de la degradación del fenantreno bajo estas condiciones experimentales fue atribuida posiblemente por la aplicación de agua de riego al incorporar oxígeno al sistema contaminado. Al respecto, el oxígeno promueve el desarrollo de microorganismos aeróbicos que degradan el fenantreno (Garrett *et al.*, 1998; Prince *et al.*, 2003). Es probable que debido a que la arena es un sustrato poroso permite la entrada de oxígeno y en combinación con el agua puede favorecer el desarrollo de microorganismos que estimularon la degradación del fenantreno.

A pesar de lo anterior, en el presente estudio la inoculación con microorganismos incrementó la degradación de fenantreno, especialmente con la inoculación de *G. intraradices* a pesar de mostrar bajo porcentaje de colonización micorrízica, lo que se puede relacionar con la menor actividad AOX observada en el tratamiento G en comparación con su correspondiente tratamiento sin contaminar. Lo anterior puede ser indicador de que el fenantreno en simbiosis con *G. intraradices* controla el sistema antioxidante estimulando posiblemente la actividad peroxidasa, lacasa, dioxigenasa, y monofenol monooxidasa las cuales intervienen en la biodegradación de hidrocarburos del petróleo (Salzer *et al.*, 1999; Criquet *et al.*, 2000; Joner y

Leyval, 2001; Corgié *et al.*, 2006). Para corroborar esta hipótesis es necesario realizar estudios más específicos sobre el sistema oxidativo y las enzimas que podrían estar actuando en la degradación del fenantreno, así como la interacción de otros microorganismos que se pudieron haber presentado durante el experimento.

Este estudio sobre la interacción de *Leucaena* - *Rhizobium* - *G. intraradices* en la degradación de fenantreno, sirvió como modelo preliminar para determinar el efecto benéfico de sistemas biológicos funcionales que pueden ser dirigidos a la fitorremediación. Sin embargo, aun falta considerar varios aspectos en estas interacciones simbióticas para explotar al máximo sus capacidades durante la biodegradación de compuestos orgánicos contaminantes.

CONCLUSIONES

Rhizobium tropici presentó mayor tolerancia que *G. intraradices* ante fenantreno (60 mg kg⁻¹); sin embargo, ambos microorganismos son capaces de crecer ante este contaminante. La aplicación de fenantreno estimuló la nodulación pero redujo el metabolismo de la simbiosis con *Rhizobium* al desarrollar mayor número de nódulos blancos (no fijadores de N), además que redujo la colonización micorrízica.

La doble inoculación con *Rhizobium* y *G. intraradices* en general, estimuló el desarrollo de la planta incrementando el número y el peso de materia seca de los nódulos, además de la actividad de la nitrogenasa, el contenido de N y de P en la planta, y producir mayor volumen radical y hojas bipinnadas.

La inoculación con *G. intraradices* produjo mayor AOX en las plantas, mientras que la aplicación de fenantreno la redujo. En el contenido de CFT los resultados no fueron significativos; sin embargo, se observó la tendencia de que la inoculación incrementó el contenido de CFT en el siguiente orden de magnitud: *G. intraradices* > *Rhizobium* > *G.*

intraradices + *Rhizobium* > Testigo. En contraste, la contaminación con fenantreno mostró una tendencia inversa *G. intraradices* + *Rhizobium* > *Rhizobium* > *G. intraradices* \approx Testigo.

La simbiosis tripartita alcanzó un porcentaje de degradación de fenantreno similar al tratamiento inoculado con *G. intraradices*, tratamiento en el que se alcanzó mayor porcentaje de degradación. La simbiosis tripartita de *L. leucocephala* - *Rhizobium* - *G. intraradices* es un modelo útil para utilizarlo en sistemas de la fitorremediación de suelos contaminados con fenantreno.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES GENERALES

- Las semillas de *Leucaena* toleran la contaminación de FEN al mantener la conductividad eléctrica y la germinación de manera similar a las semillas sin contaminar.
- *Rhizobium* ante FEN favoreció el desarrollo de las plántulas al incrementar los pelos radicales y mantener en balance la longitud y peso de materia seca de la raíz y parte aérea.
- El FEN no alteró significativamente los niveles de la AOX y el contenido de CFT en ningún órgano de las plántulas, mientras que *Rhizobium* incrementó la AOX ante 60 mg FEN L⁻¹.
- La simbiosis tripartita (*Leucaena-Rhizobium-Glomus*) estimuló el crecimiento de las plantas ante la presencia de FEN (60 mg kg⁻¹).
- La aplicación de FEN redujo la AOX de las plantas, mientras que *Glomus* produjo su estimulación.
- A pesar de no presentar diferencias significativas, el contenido de CFT fue estimulado por los microorganismos con base en este comportamiento: *Glomus* > *Rhizobium* > *Glomus+Rhizobium* > Testigo. En contraste, ante FEN se observó la siguiente tendencia: *Glomus+Rhizobium* > *Rhizobium* > *Glomus* ≈ Testigo.
- El porcentaje de degradación de FEN fue similar en las plantas inoculadas con *Glomus* y por la doble simbiosis (*Glomus+Rhizobium*).
- La simbiosis tripartita *Leucaena – Rhizobium - Glomus* es un modelo que puede ser útil durante la fitorremediación de suelos contaminados con fenantreno.

LITERATURA CITADA

- Alarcón A., Davies F.T., Autenrieth R.L., Zuberer D.A. 2008. Arbuscular mycorrhiza and petroleum-degrading microorganisms enhance phytoremediation of petroleum-contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation*. 10:251-263.
- Alkio M., Tabuchi T.M., Wang X., Colón-Carmona A. 2005. Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in *Arabidopsis* include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms. *Journal of Experimental Botany*. 56:2983-2994.
- Aparecida F.S., Daiton V.R, Pessoa C.M.C., Cesar P.R., Panobianco M. 2006. Electrical conductivity testing of corn seeds as influenced by temperature and periods of storage. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 41:1551-1559.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 1995. U.S. Department of health and human services, Public Health Service. Toxicological Profile For Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Atlanta, Georgia, USA.
- Awadhi H.A., El-Nemr I., Mahmoud H., Sorkhoh N.A., Radwan S.S. 2009. Plant-associated bacteria as tools for the phytoremediation of oily nitrogen-poor soils. *International Journal of Phytoremediation*. 11:11-27.
- Banks M.K., Schultz K.E. 2005. Comparison of plants for germination toxicity tests in petroleum contaminated soils. *Water, Air, and Soil Pollution*. 167:211-219.
- Barea J.M., Pozo J.M., Azcón R., Azcón-Aguilar C. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*. 56:1761-1778.
- Basis H.P., Weir L.T., Perry L.G., Gilroy S., Vivanco J.M. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*. 57:233-266.

- Besalatpour A., Khoshgoftarmanes H., Hajabbasi M.A., Afyuni M. 2008. Germination and growth of selected plants in a petroleum contaminated calcareous soil. *Soil and Sediment Contamination*. 17:665-676.
- Bianciotto V., Bonfante P. 2002. Arbuscular mycorrhizal fungi: A specialized niche for rhizospheric and endocellular bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 81:365-371.
- Biermann B., Liderman R.G. 1981. Quantifying vesicular arbuscular mycorrhizae: A proposed method towards standardization. *New Phytologist*. 87:423-432.
- Blumer M. 1976. Polycyclic aromatic hydrocarbon in nature. *Scientific American*. 234:34-44.
- Boszczyk M. H., Przestrzelska A., Bieszkiewicz E., Horoch M. 2004. Biodegradation of petroleum products by microorganisms adapted to high crude oil concentration in presence of easy assimilated carbon source. *Polish Journal of Microbiology*. 53:183-187.
- Bracho M., Díaz L., Soto L.M. 2004. Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y heterocíclicos por *Pseudomonas* spp. *Ciencia*. 12:269-275.
- Cabello M.N. 1997. Hydrocarbon pollution: its effect on native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). *FEMS Microbiology Ecology*. 22:233-236.
- Cervantes V., Carabias J., Vázquez-Yanes C. 1996. Seed germination of woody legumes from deciduous tropical forest of southern Mexico. *Forest Ecology and Management*. 82:171-184.
- Chiapusio G., Pujol S., Toussaint M.L., Badot P.M., Binet P. 2007. Phenanthrene toxicity and dissipation in rhizosphere of grassland plants (*Lolium perenne* L. and *Trifolium pretense* L.) in three spiked soils. *Plant Soil*. 294:103-112.
- Cohn J., Bradley D.R., Stacey G. 1998. Legume nodule organogenesis. *Trends in Plant Science*. 103:105-110.

- Colón-Carmona A., You R., Haimovitch-Gal T., Doerner P. 1999. Spatio – temporal analysis of mitotic activity with a labile *cyclin* – *GUS* fusion protein. *The Plant Journal* 20:503-508.
- Corgié S.C., Fons F., Beguiristain T., Leyval C. 2006. Biodegradation of phenanthrene, spatial distribution of bacterial populations and dioxygenase expression in the mycorrhizosphere of *Lolium perenne* inoculated with *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza*. 16:207-212.
- Criquet S., Joner E., Leglize P., Leyval C. 2000. Anthracene and mycorrhiza affect the activity of oxydoreductases in the roots and the rhizosphere of Lucerne (*Medicago sativa* L.) *Biotechnology Letters*. 22:1733-1737.
- Dakora F.D. 1995. A functional relationship between leghaemoglobin and nitrogenase based on novel measurements of the two proteins in legume root nodules. *Annals of Botany*. 75:49-45.
- Dashti N., Khanafer M., El-Nemr I., Sorkhoh N., Ali N., Radwan S. 2008. The potential of oil-utilizing bacterial consortia associated with legume root nodules for cleaning oily soils. *Chemosphere*. 74:1354-1359.
- Debiane D., Garcon G, Verdin A., Fontaine J., Durand R., Shirali P., Grandmougin-Ferjin A., Lounès-Hadl S.A. 2009. Mycorrhization alleviates benzo[a]pyrene-induced oxidative stress in an *in vitro* chicory root model. *Phytochemistry*. 70: 1421-1427.
- Edwin-Wosu N.L., Albert E. 2010. Total petroleum hydrocarbon content (TPH) as an index assessment of macrophytic remediation process of a crude oil contaminated soil environment. *Journal of Applied Sciences Environmental Management*. 14:39-42.
- Ferguson J. 1995. Seed vigour testing seminar. Copenhagen. Zurich: International Seed Testing Association. pp 1-9.

- Ferrera-Cerrato R., Alarcón A., Mendoza-López M.R., Sangabriel W., Trejo-Aguilar D., Cruz-Sanchez J.S., López-Ortiz C., Delgadillo-Martínez J. 2007. Phytoremediation of a fuel oil-polluted soil with *Phaseolus coccineus* using organic or inorganic fertilization. *Agrociencia*. 41:817-826.
- Finlay R.D. 2008. Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *Journal of experimental botany*. 59:1115-1126.
- Fu-Min M., Applegate M.B., Sayler G.S. 1993. NAH plasmid-mediated catabolism of anthracene and phenanthrene to naphthoic acids. *Applied and Environmental Microbiology*. 59:1938-1942.
- Garbisu C., Amézaga I., Alkorta I. 2002. Biorremediación y Ecología. *Ecosistemas* 11(3). <<http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?Id=261>> Consulta Marzo 2011.
- Garrett M.R., Pickering J.I., Haith C., Prince C.R. 1998. Photooxidation of crude oils. *Environmental Science Technology*. 32:3719-3723.
- Gaspar M.L., Cabello M.N., Cazau M.C., Pollero R.J. 2002. Effect of phenanthrene and *Rhodotorula glutinis* on arbuscular mycorrhizal fungus colonization of maize roots. *Mycorrhiza*. 12:55-59.
- Geneva M., Zehirov G., Djonova E., Kaloyanova N., Georgiev G., Stancheva I. 2006. The effect of inoculation of pea plants with mycorrhizal fungi and *Rhizobium* on nitrogen and phosphorus assimilation. *Plant Soil Environment*. 52:435-440.
- Gerhardt E.K., Huang X.D., Glick R.B., Greenberg M.B. 2009. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Science*. 176:20-30.

- Glyan'ko A.K., Vasil'eva G.G. 2010. Reactive oxygen and nitrogen species in legume-Rhizobial symbiosis: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 46: 15-22.
- González Y., Sánchez J.A., Reino J., Muñoz B., Montejo L. 2008. Efectos combinados de escarificación y de hidratación parcial en la germinación de semillas frescas de leguminosas. *Pastos y Forrajes, Matanzas* 31:1-1.
- Gradova N. B., Gornova I.B., Eddaudi R., Salina R.N. 2002. Use of Bacteria of the genus *Azotobacter* for bioremediation of oil-contaminated soil. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 39:279-281.
- Guerrero-Zuñiga L.A., Rodríguez-Dorantes A.M. 2009. Efecto de la presencia de fenantreno sobre la expresión de proteínas y la actividad enzimática radical de *Cyperus hermaphroditus*. *Polibotánica*. 27:103-130.
- Hall J., Soole K., Bentham R. 2010. Hydrocarbon phytoremediation in the family Fabaceae – A review. *International Journal of Phytoremediation*. 13:317-332.
- Hardy R.W.F., Holsten R.D., Jackson E.K., Burna R.C. 1968. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology*. 43:1185-1207.
- Hartmann H.T., Kester D.E., Davies F.J, Geneve R.L. 2002. Plant propagation. Principles of propagation from seed. Séptima edición. Prentice Hall. USA. pp 199-205.
- Hernández A.E., Rubiños P.J.E., Alvarado L.J. 1994. Biorremediación y fitorremediación: alternativas para la limpieza de los suelos. En: Restauración de suelos contaminados con hidrocarburos: conceptos básicos. Primera edición. Colegio de Postgraduados. Edo de México, México. pp 13-17.
- Hernández-Ortega H.A., Alarcón A., Ferrera-Cerrato R., Zavaleta-Mancera H., López-Delgado H.A., Mendoza-López M.R. 2011. Arbuscular mycorrhizal fungi on growth, nutrient status, and total antioxidant activity of *Melilotus albus* during phytoremediation of a

- diesel-contaminated substrate. *Journal of Environmental Management*. 1-6.
Doi:10.1016/j.jenvman.2011.02.015.
- Hogan M., Saundry P. 2011. Deepwater Horizon oil spill. *The Encyclopedia of Earth*
http://www.eoearth.org/article/Deepwater_Horizon_oil_spill?topic=50364. Consulta Abril 2011.
- Holmes J. 2009. Imagen de *Leucaena leucocephala* L.
<http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Leucaena_leucocephala.htm>
Consulta Noviembre del 2009.
- Hughes C. 1998. Monograph of *Leucaena* (Leguminosae-Mimosoideae). *Systematic Botany Monographs*. 55:1-244.
- Hungria M., Campo R.J., Mendes I.C. 2003. Benefits of inoculation of common vean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. *Biology and Fertility of Soils*. 39:88-93.
- Hutzler P., Fischbach R., Heller W., Jungblut T.P., Reuber S., Schmitz R., Veit M., Weisenböck G., Schnitzler J.P. 1998. Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Experimental Botany*. 49:953-965.
- Ide F.V., Azcón R., Latanze M.F., Aroca R. 2010. Interactions between *Glomus* species and *Rhizobium* strains affect the nutritional physiology of drought-stressed legume hosts. *Journal of Plant Physiology*. 167: 614-619.
- Irastorza T. I., González V.D., Barbosa J.I.N., Gutiérrez L.G.G. 2008. Prospectiva de Petróleo Crudo 2008 - 2017. Secretaría de Energía. Gobierno Federal de México. pp 12-17, 143-145.
- ISTA (The international seed testing association). 2005. *International Rules for Seed Testing*. Edition 2005. Bassersdorf, CH-Switzerland.

- Jiao X.C., Xu F.L., Dawson R., Chen S.H., Tao S. 2007. Adsorption and absorption of polycyclic aromatic hydrocarbons to rice roots. *Environmental Pollution*. 148:230-235.
- Johnsen R.A., Wick Y.L., Harms H. 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*. 133:7184
- Joner E.J., Leyval C. 2001. Influence of arbuscular mycorrhiza on clover and ryegrass grown together in a soil spiked with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mycorrhiza*. 10:155-159.
- Jones R. K., Sun W.H., Tang C.S., Robert F.M. 2004. Phytoremediation of petroleum hydrocarbons in tropical coastal soils II. Microbial response to plant roots and contaminant. *Environmental Science and Pollution Research*. 11:340-346.
- Kaimi E., Mukaidani T., Tamaki M. 2007. Screening of twelve plant species for phytoremediation of petroleum hydrocarbon-contaminants soil. *Plant Production Science*. 10:211-218.
- Kirkpatrick W.D., White P.M. Jr, Wolf D.C., Thoma G.J., Reynolds C.M. 2006. Selecting plants and nitrogen rates to vegetate crude-oil-contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation*. 8:285-297.
- Krishna C.K.S. Chandra N.S. 1994. Role of superoxide, lipid peroxidation and superoxide dismutase in membrane perturbation during loss of viability in seeds of *Shorea robusta* Gaertn.f. *New Phytology*. 126:623-627.
- Lefrancois E., Quoreshi A., Khasa D., Fung M., Whyte L.G., Roy S., Greer C.W. 2008. Alder-Frankia Symbionts enhance the remediation and revegetation of oil sands tailings.<<http://www.remtech2008.com/remtech/2007/pdf/Paper1.pdf>> Consulta Abril 2009.

- Liu A., Dalpé Y. 2009. Reduction in soil polycyclic aromatic hydrocarbons by arbuscular mycorrhizal leek plants. *International Journal of Phytoremediation*. 11:39-52.
- López-López A., Rogel M.A., Ormeño-Orrillo E., Martínez-Romero J., Martínez-Romero E. 2010. *Phaseolus vulgaris* seed-borne endophytic community with novel bacterial species such as *Rhizobium endophyticum* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*. 33:322-327.
- López-Martínez S., Gallegos-Martínez M.E., Pérez F.L.J., Gutiérrez R.M. 2005. Mecanismos de fitorremediación de suelos contaminados con moléculas orgánicas xenobióticas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 21:91-100.
- Macchiavelli R.E., Brelles-Mariño G. 2004. Nod factor-treated *Medicago truncatula* roots and seeds show an increased number of nodules when inoculated with a limiting population of *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Experimental Botany*. 408:2635-2640.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2004. *Biología de los Microorganismos*. 3ra reimpresión. Prentice Hall. Madrid, España. pp 69.
- Maila M.P., Cloete T.E. 2002. Germination of *Lepidium sativum* as a method to evaluate polycyclic hydrocarbons (PAHs) removal from contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* 50:107-113.
- Margesin R., Shinner F. 1997. Efficiency of indigenous and inoculated cold-adapted soil microorganisms for biodegradation of diesel oil in alpine soils. *Applied Environmental Microbiology*. 63:2660-2664.
- Martín M.C., González B.A., Blanco S.M.J. 2004. Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. *Revista Iberoamericana de Micología*. 21:103-120.

- Matthäus, M. 2002. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 50:3444-3452.
- Miransari M., D. Smith. 2009. Rhizobial lipo-chitoooligosaccharides and gibberellins enhance barley (*Hordeum vulgare L.*) seed germination. *Biotechnology* 8:270-275.
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*. 7:405- 410.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Breusegem F.V. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*. 9:490-498.
- Muratova A.Y., Kapitonova V.V., Chernyshova M.P., Turkovskaya O.V. 2009. Enzymatic activity of alfalfa in a phenanthrene-contaminated environment. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 58:569-574.
- Muratova Y.A., Golubev S.N., Merbach W., Turkovskaya O.V. 2008. Biochemical and physiological peculiarities of the interactions between *Sinorhizobium meliloti* and *Sorghum bicolor* in the presence of phenanthrene. *Microbiology*. 78:347-354.
- Narro M.L., Cerniglia C.E., Van Baalen C., Gibson D.T. 1992. Metabolism of phenanthrene by marine cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6. *Applied and Environmental Microbiology*. 58:1351-1359.
- Naya A.D.L. 2007. Respuesta fisiológica, bioquímica y molecular de las leguminosas a estrés abióticos. CSIC. Zaragoza. pp. 3-6.
- Nwoko C.O., Okeke P.N., Agwu O.O., Akpan I.E. 2007. Performance of *Phaseolus vulgaris L.* in a soil contaminated with spent-engine oil. *African Journal of Biotechnology*. 6:1922-1925.
- Ortínez B.O., Lema I.I., García B.G. 2003. La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México. *Gaceta ecológica*. 69:83-92.

- Ortiz-López A.I. 2004. Biodegradación de hidrocarburos en suelos: Efecto de la adición de cosubstratos gaseosos. UAM-Iztapalapa. pp 33.
- Parikh J.S., Chorover J., Burgos D.W. 2004. Interaction of phenanthrene and its primary metabolite (1-hydroxy-2-naphthoic acid) with estuarine sediments and humic fractions. *Journal of Contaminant Hydrology*. 72:1-22.
- Parrish Z.D., Banks M.K., Schwab A.P. 2005. Bioremediation and biodegradation. Effect of root death and decay on dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of yellow sweet clover and tall fescue. *Journal of Environmental Quality*. 34: 207-216.
- Paskova V., Hilscherova K., Feldmannova M., Blaha L. 2006. Toxic effects and oxidative stress in higher plants exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons and their *N*-heterocyclic derivatives. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 25:3238-3245.
- PEMEX. 2011. Anuario estadístico 2010. En informes y publicaciones, acerca de PEMEX. <<http://www.pemex.com/index.cfm>> Consulta Mayo del 2011.
- Peressutti S. R., Alvarez H.M., Pucci O.H. 2003. Dynamics of hydrocarbon-degrading bacteriocenosis of an experimental oil pollution in Patagonian soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* 52:21-30.
- Pérez-Ramírez N.O., Rogel M.A., Wang E., Catellanos J.Z., Martínez-Romero E. 1998. Seeds of *Phaseolus vulgaris* bean carry *Rhizobium etli*. *Microbiology Ecology*. 26:289-296.
- Phillips J.M., Hayman D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions British Mycological Society*. 55:158-161.
- Prince C.R., Garrett R.M., Bare E.R., Grossman J.M., Townsend T., Suflita M.J., Lee K., Owens H.E., Sergy A.G., Braddock F.J., Lindstrom E.J., Lessard R.R. 2003. The roles of

- photooxidation and biodegradation in long-term weathering of crude and heavy fuel oils. *Spill Science and Technology Bulletin*. 8:145-156.
- Prithiviraj B., Zhou X., Souleimanov A., Kahn W.M., Smith D.L. 2003. A host-specific bacteria-to plant signal molecule (Nod factor) enhances germination and early growth of diverse crop plants. *Planta* 216:437-445.
- Provorov A.N., Borisov Y.A., Tikhonovich I.A. 2002. Developmental genetics and evolution of symbiotic structures in nitrogen-fixing nodules and arbuscular mycorrhiza. *Journal Theoretical Biology*. 214:215-232
- Radwan S.S., Dashti N., El-Nemr I., Khanafer M. 2007. Hydrocarbon utilization by nodule bacteria and plant growth-promoting rhizobacteria. *International Journal of Phytoremediation*. 9:475-486.
- Ravindra K., Sokhi R., Van G.R. 2008. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmospheric Environment*. 42:2895-2921.
- Re, R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decoloration assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26:1231-1237.
- Reino M.J. 2005. Efectos de tratamientos de hidratación-deshidratación y de choque ácido sobre la germinación y emergencia de *Leucaena leucocephala*. *Biblioteca Hatuey*. pp 48.
- Reynoso-Cuevas L., Gallegos-Martínez M.E., Cruz-Sosa F., Gutiérrez-Rojas M. 2008. In vitro evaluation of germination and growth of five plant species on medium supplemented with hydrocarbons associated with contaminated soils. *Bioresource Technology*. 99:6379-6385.

- Ri-He P., Ai-Sheng X., Yong X., Xiao-Yan F., Feng G., Wei Z., Yong-Sheng T., Quan-Hong Y. 2008. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews*. 32:928-955
- Robertson S.J., McGill W.B., Massicotte H.B., Rutherford P.M. 2007. Petroleum hydrocarbon contamination in boreal soils: a mycorrhizal ecosystems perspective. *Biological Reviews*. 82:213-240.
- Rodrigues D.F., Sakata S.K., Comasseto J.V., Bicego M.C., Pellizari V.H. 2008. Diversity of hydrocarbon-degrading *Klebsiella* strains isolated from hydrocarbon – contaminated estuaries. *Journal of Applied Microbiology*. pp 1-11.
- Romaniuk R., Brant J.F., Rios P.R., Giuffré L. 2007. Atenuación natural y remediación inducida en suelos contaminados con hidrocarburos. *Ciencia del Suelo*. 25: 139-149.
- Roy S., Sen C.K., Hänninen O. 1996. Monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons using “moss bags”: Bioaccumulation and responses of antioxidant enzymes in *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Chemosphere*. 32:2305, 2315.
- Saier M.H., Trevors J.T. 2010. Phytoremediation. *Water, Air, and Soil Pollution*. 205:S61-S63. DOI 10.1007/s11270-008-9673-4.
- Salazar-Coria L., Schifter I., González-Macías C. 2010. Weighing the evidence of ecological risk from PAHs contamination in the estuarine environment of Salina Cruz Bay, México. *Environmental Monitoring Asses*. 162:387-406.
- Salinas A. R., Yoldjian A.M, Craviotto R.M., Bisaro V. 2001. Pruebas de vigor y calidad fisiológica de semillas de soja. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*., Brasilia, 36: 371-379.
- Salzer P., Corbiere H., Boller T. 1999. Hydrogen peroxide accumulation in *Medicago truncatula* roots colonized by the arbuscular mycorrhiza-forming fungus *Glomus intraradices*. *Planta*. 208:319-325.

- Sánchez J.A., Muñoz B., Reino J., Montejo L. 2003. Efectos combinados de escarificación y de hidratación parcial en la germinación de semillas envejecidas de leguminosas. *Pastos y Forrajes*. 26:27-33.
- Sangabriel W., Ferrera-Cerrato R., Trejo A.D., Mendoza L.M.R., Cruz S.J.S., López O.C., Delgadillo M.J., Alarcón A. 2006. Tolerancia y capacidad de fitorremediación de combustóleo en el suelo por seis especies vegetales. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 22:63-73.
- SAS Institute Inc (1999). The SAS system for windows, ver. 9.0 SAS Institute Inc, Car, North Carolina. EUA.
- Sassi A.S., Aydi S., Gonzalez E., Abdely C. 2008. Osmotic stress affects water relations, growth, and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* plants. *Acta Physiologiae Plantarum*. 30:441-449.
- Saul D.J., Aislabie J.M., Brown C.E., Harris L., Foght J.M.. 2005. Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around Scott Base, Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology* 53:141-155.
- Scherer W.H., Pacyna S., Spoth R.K., Schulz M. 2008. Low levels of ferredoxin, ATP, and leghemoglobin contribute to limited N₂ fixation of peas (*Pisum sativum* L.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.) under S deficiency conditions. *Biology and Fertility Soils*. 44:909-916.
- Serrato-Valenti G., L. Cornara, P. Ghisellini, M. Ferrando. 1994. Testa structure and histochemistry related to water uptake in *Leucaena leucocephala* Lam. (De Wit). *Annals of Botany*. 73:531-537.
- Sethi P., Kulkarni P.P. 1995. *Leucaena leucocephala*: A nutrition profile. *Food and Nutrition Bulletin*. 16: 94.

- Shelton H.M., Brewbaker J.L. 1999. *Leucaena leucocephala*- the Most Widely used forage tree legume. <<http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/Publicat/Gutt-shel/x5556e06.htm>>
Consulta Octubre 2009
- Siddiqui Z.A., Pichtel J. 2008. Mycorrhizae: an overview. In: Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry. Eds. Siddiqui Z.A. Springer Science. pp 1-35.
- Swain T., Hillis W.E. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica* I. The quantitative analysis of phenolic constituents. Journal of the Science of Food and Agriculture, 10:63-68.
- Tajini F., Mustapha T., Jean-Jacques D. 2011. Co-inoculation with *Glomus intraradices* and *Rhizobium tropici* CIAT 899 increases P use efficiency for N₂ fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under P deficiency in hydroaerobic culture. Symbiosis. DOI 10.1007/s13199-011-0117-3
- Teng Y., Luo Y., Sun X., Tu C., Xu L., Liu W., Li Z., Christie P. 2010. Influence of arbuscular mycorrhiza and *Rhizobium* on phytoremediation by alfalfa of an agricultural soil contaminated with weathered PCBs: A field study. International Journal of Phytoremediation. 12: 516-533.
- Tobin K. M., O'Connor K.E. 2005. Polyhydroxyalkanoate accumulating diversity of *Pseudomonas* species utilizing aromatic hydrocarbons. FEMS Microbiology Letters. 253:118-118.
- Trevors J.T., Saier Jr M.H. 2010. The legacy of oil spills. Water, Air and Soil Pollution. 211:1-3
- Udom B.E., Mbagwu J.S.C., Willie E.S. 2008. Physical properties and maize production in a spent oil contaminants soil bioremediated with legumes and organic nutrients. Journal of Tropical Agriculture, Food, Environment and Extension. 7:33-40.

- Van H.J.D., A. Singh, O. Ward. 2003. Recent Advances in Petroleum Microbiology. Microbiology and Molecular Biology Reviews. pp 503-549.
- Vázquez-Luna D., Catelan-Estrada M., Rivera-Cruz M.C., Ortiz-Ceballos A.I., Izquierdo R.F. 2010. *Crotalaria incana* L. y *Leucaena leucocephala* Lam (Leguminosae). Especies indicadoras de toxicidad por hidrocarburos de petróleo en el suelo. Revista Internacional de Contaminación Ambiental. 26:183-191.
- Velasco J.T., Volke T. 2008 a. El composteo: alternativa tecnológica para la biorremediación de suelos en México. Instituto nacional de Ecología. <http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/gacetas/381/volke.html?id_pub=381> Consulta Marzo 2009.
- Velasco J.T., Volke T. 2008 b. Tecnologías de remediación. Instituto nacional de Ecología. <<http://www.ine.gob.mx/publicaciones/libros/372/tecnolog.html#top>> Consulta Marzo 2009.
- Verdin A., Lounnés-Hadj A., Fontaine J., Grandmougin-Ferjani A., Durand R. 2006. Effects of anthracene on development of an arbuscular mycorrhizal fungus and contribution of the symbiotic association to pollutants dissipation. Mycorrhiza. 16:397-405.
- Vermerris W., Nicholson R. 2008. Phenolic compound biochemistry. Springer. USA. Pp 1-3
- Vives I., Grimalt J.O., Guitart R. 2001. Los hidrocarburos aromáticos y la salud humana. Apuntes de Ciencia y Tecnología. 3:45-52.
- von Hippel A.F., von Hippel T. 2003. Disasters: Oil spills. Pollution Issues. <<http://www.pollutionissues.com/Co-Ea/Disasters-Oil-Spills.html>> Consulta Abril 2011.

- West L. 2005. Worst Oil Spills in History. Environmental issues.
<<http://environment.about.com/od/environmentalevents/tp/worst-oil-spills.htm>>
Consulta Abril 2011.
- Wilson S.C., Jones K.C. 1993. Bioremediation of soils contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PHAs): a review. *Environmental Pollution* 88:229-249.
- Wyszkowska J., Kucharski J. 2000. Biochemical properties of soil contaminated by petrol. *Polish Journal of Environmental Studies*. 9:479-485
- Wyszkowska J., Kucharski J. 2001. Correlation between number of microbes and degree of soil contamination by petrol. *Polish Journal of Environmental Studies*. 10:175-181.
- Yang Y., Chen F.R, Shiaris P.M. 1994. Metabolism of Naphthalene, Fluorene, and Phenanthrene: Preliminary characterization of a cloned gene cluster from *Pseudomonas putida* NCIB 9816. *Journal of Bacteriology*. 176:2158-2164.
- Yano K., Yoshida S., Müller J., Singh S., Banba M., Vickers K., Markmann K., White C., Schuller B., Sato S., Asamizu E., Tabata S., Murooka Y., Perry J., Wang T.L., Kawaguchi M., Imaizumi-Anraku H., Hayashi M., Parniske M. 2008. CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105:20540-20545.
- Young-Soo K., Jong-Su S., Yuting H., Quing X.L. 2006. Degradation pathways of phenanthrene by *Sinorhizobium* sp. C4. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71:935-941.
- Zafar I.M., Shafiq M., Ali S.A. 2001. Toxic effects of lead and cadmium individually and in combination on germination and growth of *Leucaena leucocephala* (Lam. De Wit). *Pakistan Journal Botany*. 33:551-557.

- Zainol M.K., Abd-Hamid A., Yusof S., Muse R. 2003. Antioxidant activity and total phenolic compounds of leaf, root and petiole of four accessions of *Centella asiatica* (L.) Urban Food Chemistry. 81:575-581.
- Zárate S. 1987. *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit subsp. Glarata (Rose). Phytology. 63:304-306.
- Zhu K., Chen H., Nan Z. 2010. Phytoremediation of loess soil contaminated by organic compounds. Application of Phytotechnologies for Cleanup of Industrial, Agricultural, and Wastewater Contamination. 159-176