



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA

RESPUESTA DE LA SIMBIOSIS TRIPARTITA
***Rhizobium*-LEGUMINOSA-MICORRIZA ARBUSCULAR**
ANTE VANADIO Y NÍQUEL

Judith Estela Vidal Fernández

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2012

La presente tesis titulada: **Respuesta de la simbiosis tripartita *Rhizobium*-leguminosa-micorriza arbuscular ante vanadio y níquel**, realizada por el alumno: **Judith Estela Vidal Fernández**, 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

EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



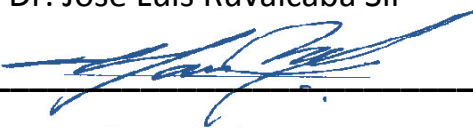
Dr. Ronald Ferrera-Cerrato

ASESOR



Dr. José Luis Ruvalcaba Sil

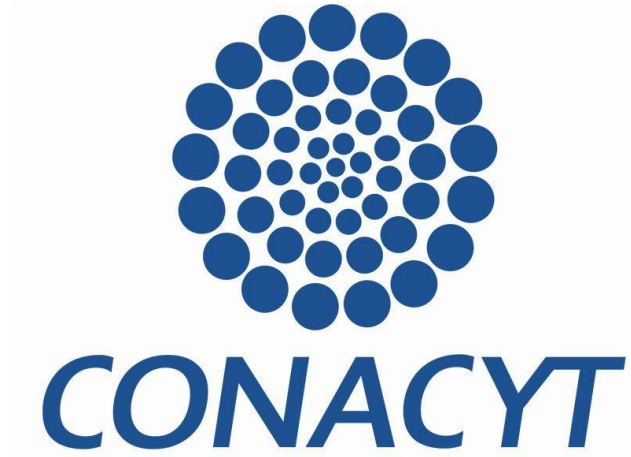
ASESOR



Dra. María Remedios Mendoza López

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Junio 2012

La tesis “**Respuesta de la simbiosis tripartita *Rhizobium*-leguminosa-micorriza arbuscular ante vanadio y níquel**”, forma parte del Proyecto: **SEP-CONACYT 79456 “Simbiosis tripartita *Rhizobium*-leguminosa-micorriza arbuscular y su respuesta a los hidrocarburos del petróleo”**. Judith Estela Vidal Fernández agradece a CONACYT el apoyo brindado durante sus estudios de postgrado.



RESPUESTA DE LA SIMBIOSIS TRIPARTITA *Rhizobium*-LEGUMINOSA-MICORRIZA ARBUSCULAR ANTE VANADIO Y NÍQUEL

Judith Estela Vidal Fernández, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2012

RESUMEN

Este trabajo evaluó la respuesta de la simbiosis tripartita *Rhizobium*-leguminosa-micorriza arbuscular en presencia de vanadio (V) y níquel (Ni). El trabajo se dividió en dos fases experimentales; la primera fase estudió el comportamiento de la simbiosis *Rhizobium tropici*-*Phaseolus vulgaris* ante concentraciones de V o Ni (0, 25, 50, 75, 100 y 120 mg L⁻¹) y su efecto en el contenido elemental en nódulos, en un sistema de bolsa de crecimiento bajo condiciones controladas (25°C, 70% HR y 12h de fotoperiodo) durante 30 días. En las plantas con V, la nodulación inició al cuarto día después de la inoculación y tuvo un máximo de 40 nódulos por planta en el testigo y 6 nódulos en las concentraciones de 50 y 100 mg L⁻¹. La mayor actividad nitrogenasa (AN) se presentó ante de 75 mg V L⁻¹. En las plantas contaminadas con Ni se cuantificó un máximo de 25 nódulos por planta ante 0, 25 y 50 mg L⁻¹. Las plantas inoculadas presentaron mayor peso seco total pero menor contenido de clorofila total en comparación con aquellas sin inocular. A mayor concentración de Ni se redujo la actividad nitrogenasa. El V presentó el límite más bajo de detección en nódulos ante 0, 25 y 50 mg V L⁻¹, mientras que ante 75, 100 y 120 mg L⁻¹, el V se acumuló en los nódulos. En los nódulos de plantas contaminadas con Ni, el contenido elemental de P, K, y Cu fue disminuido, mientras que el contenido de Fe y Mn fue estimulado. La segunda fase experimental evaluó las respuestas de la simbiosis tripartita *Rhizobium tropici*-*Phaseolus vulgaris*-*Rhizophagus intraradices* en suelo contaminado con V o Ni (0 y 120 mg L⁻¹) bajo condiciones de invernadero (temperatura mínima 12 °C y máxima 39°C, y la humedad relativa media máxima 80% y mínima 23%) durante 60 días. Las plantas en presencia de V no mostraron diferencias en el peso seco total y en la tasa absoluta de crecimiento, y presentaron un máximo de 12 nódulos. El porcentaje de colonización micorrízica en V fue del 28% en promedio. El V no afectó el contenido de clorofila (*a*, *b*, y total) y de carotenoides, además del intercambio gaseoso y la AN. En presencia de Ni las plantas presentaron en promedio, 13 nódulos y 40 % de colonización micorrízica. Las plantas con *Rhizobium* sin contaminar presentaron mayor contenido de clorofila total, mientras que el testigo presentó el mayor valor de fotosíntesis. La AN fue mayor en las plantas con *Rhizobium* sin Ni. El V se acumuló en el tejido foliar, superando el límite crítico para frijol; mientras que el Ni se encontró dentro de las concentraciones establecidas como no tóxicas.

Palabras clave: nodulación, metales, fitorremediación, simbiosis, *Phaseolus*, *Rhizophagus*.

RESPONSES OF THE TRIPARTITE SYMBIOSIS *Rhizobium*-LEGUME- ARBUSCULAR MYCORRHIZA TO VANADIUM AND NICKEL

Judith Estela Vidal Fernández, M. Sc.

Colegio de Postgraduados, 2012

ABSTRACT

This study evaluated the response of the tripartite symbiosis *Rhizobium*-legume- arbuscular mycorrhizal in presence to vanadium (V) and nickel (Ni). This work was split in two experimental stages. First experimental stage evaluated the behavior of the symbiosis between *Rhizobium tropici*-*Phaseolus vulgaris* to vanadium and nickel concentrations (0, 25, 50, 75, 100 and 120 mg L⁻¹), and their effects on the elemental content in nodules at growth pouch system under controlled conditions (25°C, 70% RH and 12h of light) during 30 days. In plants under V-contamination, nodulation started at the fourth day after inoculation, and after 30 days the maximum number of nodules was achieved in the control (40 nodules), and 6 nodules at the concentrations of 50 y 100 mg L⁻¹. The highest nitrogenase activity (NA) was found at 75 mg V L⁻¹. For plants contaminated with Ni the maximum number of nodules was observed at 0, 25 and 50 mg Ni L⁻¹. Inoculated plants had greater total dry mass but lower chlorophyll content when compared to those plants without bacterial inoculation. High concentrations of Ni resulted in low NA. The lowest detection limit for V was observed at 0, 25 and 50 mg L⁻¹, whereas at 75, 100 and 120 mg L⁻¹, the V showed greater accumulation in nodules. The accumulation of Ni in nodules resulted in reduced elemental content of P, K, Cu, but a stimulated Fe and Mn content. The second experimental stage evaluated the responses of the tripartite symbiosis *Rhizobium tropici*-*Phaseolus vulgaris*-*Rhizophagus intraradices* established at contaminated soil with V or Ni (0 y 120 mg L⁻¹) under greenhouse conditions (minimum and maximum temperature of 12°C and 39°C, respectively, and maximum and minimum relative humidity of 80% and 23%) during 60 days. Plants under V-contamination did not show significant differences on total dry weight, absolute growth rate, and had a maximum number of nodules of 12. The mycorrhizal colonization in presence of V was 28% in average. Vanadium had no effects on the content of *a*, *b* and total chlorophyll and carotenoids, and on plant gas exchange or NA. In presence of Ni, plants had in averaged 13 nodules, and 60% of mycorrhizal colonization. Plants with *Rhizobium* without contamination had greater total content of chlorophyll, whereas control plants showed greater photosynthesis; The NA was greater in plants with *Rhizobium* without Ni. Vanadium was accumulated on foliar tissue overpassing the critical limits for bean plants; in contrast, Ni accumulation was in non-toxic concentrations.

Key words: nodulation, metals, phytoremediation, symbiosis, *Phaseolus*, *Rhizophagus*.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas por brindarme el apoyo y las herramientas necesarias para mi desarrollo personal y profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento brindado para realizar mis estudios de Maestría.

Al Dr. Ronald Ferrera-Cerrato por permitirme ser parte del equipo de trabajo del Área de Microbiología de Suelos.

Al Dr. Alejandro Alarcón por el apoyo constante, conocimientos, tiempo y paciencia para la realización de esta investigación.

Al Dr. José Luis Ruvalcaba Sil por facilitarme el apoyo, colaboración y las herramientas necesarias para realizar la primera fase experimental.

A la Dra. Ma. Remedios Mendoza López por el apoyo y colaboración para el análisis de diesel en suelo.

Al personal del Área de Microbiología: Rosario Galicia López, Manuel Solano Díaz, Lorenzo Viana Monsalvo, Edmundo García Galán y Fernando López Santillán, por la incondicional ayuda que me brindaron durante mi estancia en el Laboratorio de Fijación de Nitrógeno y hacer más amenas las horas de trabajo.

A mis compañeros del Área de Microbiología de Suelos, gracias por hacer más fáciles las horas en el laboratorio.

A los amigos que encontré en el Colegio de Postgraduados, especialmente a Esther, Mario, Miguel Ángel, Monserrat, Esmeralda, Alicia, Nadia, Arturo, Mariela, Alejandra, Anel. Gracias por escucharme, ayudarme en los momentos difíciles, darme aliento cuando ya no podía seguir, acompañarme en este largo camino, seguirme en algunas de mis múltiples locuras y regañarme cuando la locura me rebasaba.

DEDICATORIA

A mis papás Bertha y Manuel, por su confianza, apoyo incondicional, e inmenso amor hacía mí. Por brindarme la oportunidad de crecer como ser humano y profesionalista, entender que aunque físicamente no estemos juntos, lo estamos de corazón. Los amo.

A Ana Fabiola, por ser esa persona que me enseñó la importancia de recuperarse de los fracasos, luchar hasta el cansancio por los sueños, por ser ese rayo de luz que llegó a mi vida desde muy pequeña y que me enseñó a compartir todo lo que tengo. Sin ti mi vida sería aburrida y monótona. Gracias hermana.

A mi amiga Natalith por enseñarme a ser fuerte, que la vida no te da más pruebas de las que puedas superar y que nada en esta vida es gratis. Por acompañarme en los momentos más complicados y brindarme tu amistad incondicional. Pero sobre todo permitirme estar al lado de tu pequeña Zaira.

A Noe, por acompañarme en estos meses tan complicados, ayudarme sin pedirme nada a cambio y enseñarme que nunca es tarde para volver a empezar. Gracias por mostrarme la maravillosa persona que eres.

A todos mis amigos y personas que de una u otra manera contribuyeron a que este sueño culminara satisfactoriamente.

“La única lucha que se pierde es la que se abandona”

Ernesto *Le* Guevara

Contenido

RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE CUADROS.....	xiv
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	3
Objetivo general	3
Objetivos particulares.....	3
Hipótesis general.....	4
Hipótesis particulares	4
CAPÍTULO III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA. SIMBIOSIS <i>Rhizobium</i> -LEGUMINOSA Y SIMBIOSIS MICORRÍZICA ARBUSCULAR, Y SU RELACIÓN CON CONTAMINANTES INORGÁNICOS: VANADIO Y NÍQUEL.....	5
3.1 Fijación biológica de nitrógeno en la simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa	5
3.1.1 La planta hospedera y los rizobios	8
3.1.2 El proceso de infección y la organogénesis nodular	9
3.1.3 Fisiología del nódulo.....	10
3.1.4 Especificidad y eficacia de las cepas de rizobios	12
3.2 La simbiosis micorrízica arbuscular.....	15
3.2.1 Taxonomía y morfología de los hongos micorrízicos arbusculares	16
3.2.2 Función de los HMA.....	20
3.2.3 Establecimiento de la micorriza arbuscular.....	21
3.3 Fitorremediación	22
3.4 El petróleo crudo	33
3.5 Vanadio y níquel: Formas químicas y función en las plantas	38
3.6 Los microorganismos simbióticos en la fitorremediación de suelos contaminados por metales e hidrocarburos.....	45
CAPÍTULO IV. TOLERANCIA DE <i>Phaseolus vulgaris</i> Y <i>Rhizobium tropici</i> HACIA VANADIO Y NÍQUEL, Y EFECTOS EN EL CONTENIDO ELEMENTAL DE NÓDULOS	53
RESUMEN.....	53
ABSTRACT.....	54
INTRODUCCIÓN	55

MATERIALES Y MÉTODOS	57
Fase I. Evaluación del efecto de vanadio y níquel en la simbiosis <i>Rhizobium</i> - leguminosa en bolsa de crecimiento.....	57
Fase II. Determinación de la composición elemental de los nódulos radicales	61
RESULTADOS.....	64
Efecto de las concentraciones de vanadio en la formación de nódulos y crecimiento de las plantas	64
Efecto de las concentraciones de níquel en la formación de nódulos y crecimiento de las plantas	69
Acumulación de V y Ni en nódulos y su efecto en el contenido elemental	73
DISCUSIÓN	81
CONCLUSIONES	89
CAPÍTULO V. RESPUESTAS DE LA SIMBIOSIS TRIPARTITA <i>Rhizobium tropici-Phaseolus</i> <i>vulgaris-Rhizophagus intraradices</i> EN SUELO CONTAMINADO CON VANADIO Y NÍQUEL	90
RESUMEN.....	90
ABSTRACT.....	91
INTRODUCCIÓN	92
MATERIALES Y MÉTODOS	94
Nodulación y colonización micorrízica.....	96
Estimación de la tasa absoluta de crecimiento, contenido de clorofila total, intercambio gaseoso y actividad nitrogenasa	97
Contenido de vanadio y níquel en tejido foliar y en el suelo	99
Diseño experimental.....	99
RESULTADOS.....	100
Respuesta de la simbiosis tripartita ante vanadio	100
Respuesta de la simbiosis tripartita ante níquel.....	108
DISCUSIÓN	117
CONCLUSIONES	123
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES GENERALES	124
CAPÍTULO VII. LITERATURA CITADA	125
ANEXO.....	152

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1	Complejo enzimático de la nitrogenasa y reacciones catalizadas.....	7
Figura 3.2	Proceso de la formación del nódulo.....	11
Figura 3.3	Transporte de NH_4^+ desde el nódulo hacia la parte aérea de la planta.	12
Figura 3.4	Estructura morfológica de los hongos micorrízicos arbusculares.....	19
Figura 3.5	Tipos de fitorremediación.....	25
Figura 3.6	Tipos de fitorremediación y lugares en donde se puede aplicar.....	27
Figura 3.7	Mecanismos de toxicidad de algunos metales pesados en los microorganismos.....	31
Figura 3.8	Interacciones metal-microorganismos que afectan a la biorremediación.....	33
Figura 3.9	Metaloporfirinas de Níquel (A) y Vanadio (B) presentes en el petróleo crudo.....	38
Figura 4.1	Componentes del sistema de análisis no destructivo por rayos X (SANDRA).....	63
Figura 4.2	Espectro electromagnético típico.....	63
Figura 4.3	Dinámica de nodulación en las raíces contaminadas con vanadio de plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> inoculadas con <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899.....	65
Figura 4.4	Número total de nódulos en plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> contaminadas con vanadio e inoculadas con <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899.....	65
Figura 4.5	Peso seco total de plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> contaminadas con vanadio por efecto de la inoculación con <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899.	66
Figura 4.6	Clorofila total de plantas <i>Phaseolus vulgaris</i> contaminadas con vanadio por efecto de la inoculación con <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899.	67
Figura 4.7	Actividad nitrogenasa de plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> contaminadas con vanadio por efecto de la inoculación con <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899.....	68

Figura 4.8	Dinámica de nodulación en las raíces contaminadas con níquel de plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> inoculadas con <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899.....	69
Figura 4.9	Número total de nódulos en plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> contaminadas con níquel e inoculadas con <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899.....	70
Figura 4.10	Peso seco total de plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> contaminadas con níquel por efecto de la inoculación con <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899...	71
Figura 4.11	Clorofila total de plantas <i>Phaseolus vulgaris</i> contaminadas con níquel por efecto de la inoculación con <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899.....	72
Figura 4.12	Actividad nitrogenasa de plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> contaminadas con níquel por efecto de la inoculación con <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899.....	74
Figura 4.13	Contenido elemental de los nódulos de plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> inoculadas con <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899, contaminadas con diferentes concentraciones de vanadio.....	76
Figura 4.14	Contenido elemental de los nódulos de plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> inoculadas con <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899, contaminadas con diferentes concentraciones de vanadio.....	77
Figura 4.15	Contenido elemental de los nódulos de plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> inoculadas con <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899, contaminadas con diferentes concentraciones de vanadio.....	79
Figura 4.16	Contenido elemental de los nódulos de plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> inoculadas con <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899, contaminadas con diferentes concentraciones de vanadio.....	80
Figura 5.1	Peso seco total de plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> contaminadas con vanadio por efecto de la inoculación con <i>Rhizobium tropici</i> y <i>Rhizophagus intraradices</i>	100
Figura 5.2	Tasa absoluta de crecimiento de plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> contaminadas con vanadio por efecto de la inoculación con <i>Rhizobium tropici</i> y <i>Rhizophagus intraradices</i>	101

Figura 5.3	Número de nódulos en plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> contaminadas con vanadio por efecto de la inoculación con <i>Rhizobium tropici</i>	102
Figura 5.4	Porcentaje de colonización micorrízica de plantas <i>Phaseolus vulgaris</i> contaminadas con vanadio por efecto de la inoculación con <i>Rhizobium tropici</i> y <i>Rhizophagus intraradices</i>	103
Figura 5.5	Contenido de clorofila de plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> contaminadas con vanadio por efecto de la inoculación con <i>Rhizobium tropici</i> y <i>Rhizophagus intraradices</i>	104
Figura 5.6	Intercambio gaseoso de plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> contaminadas con vanadio por efecto de la inoculación <i>Rhizobium tropici</i> y <i>Rhizophagus intraradices</i>	106
Figura 5.7	Actividad nitrogenasa de plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> contaminadas con vanadio por efecto de la inoculación con <i>Rhizobium tropici</i> y <i>Rhizophagus intraradices</i>	107
Figura 5.8	Contenido elemental de vanadio en tejido foliar de plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> por efecto de la inoculación con <i>Rhizobium tropici</i> y <i>Rhizophagus intraradices</i>	108
Figura 5.9	Contenido elemental de vanadio en suelo rizosférico de plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> por efecto de la inoculación con <i>Rhizobium tropici</i> y <i>Rhizophagus intraradices</i>	108
Figura 5.10	Peso seco total de plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> contaminadas con níquel por efecto de la inoculación con <i>Rhizobium tropici</i> y <i>Rhizophagus intraradices</i>	109
Figura 5.11	Tasa absoluta de crecimiento de plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> contaminadas con níquel por efecto de la inoculación con <i>Rhizobium tropici</i> y <i>Rhizophagus intraradices</i>	110
Figura 5.12	Número de nódulos en plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> contaminadas con níquel por efecto de la inoculación con <i>Rhizobium tropici</i>	111
Figura 5.13	Porcentaje de colonización micorrízica de plantas <i>Phaseolus vulgaris</i> contaminadas con níquel por efecto de la inoculación con <i>Rhizobium tropici</i> y <i>Rhizophagus intraradices</i>	112

Figura 5.14	Contenido de clorofila de plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> contaminadas con níquel por efecto de la inoculación con <i>Rhizobium tropici</i> y <i>Rhizophagus intraradices</i>	113
Figura 5.15	Intercambio gaseoso de plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> contaminadas con níquel por efecto de la inoculación <i>Rhizobium tropici</i> y <i>Rhizophagus intraradices</i>	114
Figura 5.16	Actividad nitrogenasa de plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> contaminadas con níquel por efecto de la inoculación con <i>Rhizobium tropici</i> y <i>Rhizophagus intraradices</i>	115
Figura 5.17	Contenido elemental de níquel en tejido foliar de plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> por efecto de la inoculación con <i>Rhizobium tropici</i> y <i>Rhizophagus intraradices</i>	116
Figura 5.18	Contenido elemental de níquel en suelo rizosférico de plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> por efecto de la inoculación con <i>Rhizobium tropici</i> y <i>Rhizophagus intraradices</i>	116

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 3.1	Géneros reconocidos de rizobios que establecen simbiosis con leguminosas.....	14
Cuadro 3.1	Clasificación taxonómica y géneros de hongos micorrízicos arbusculares.....	17
Cuadro 3.3	Ventajas y desventajas de la fitorremediación.....	23
Cuadro 3.4	Clasificación de los tipos de petróleo crudo de acuerdo a los grados API.....	34
Cuadro 3.5	Intervalo de composición del petróleo crudo a nivel mundial.....	36
Cuadro 3.6	Comparación de propiedades químicas de tres petróleos de origen Mexicano Olmeca, Istmo y Maya.....	37
Cuadro 3.7	Características de las diferentes fracciones del petróleo crudo a 250°C.	39
Cuadro 5.1	Origen, características físicas y químicas del suelo.....	95

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de las diferentes actividades industriales ha contribuido que se generen residuos contaminantes que alteran los ecosistemas y sus componentes. Estas alteraciones causan la degradación del ambiente debido a la contaminación del suelo, aire y mantos freáticos. En las últimas décadas la sobreexplotación de los recursos naturales no renovables ha ocasionado un aumento progresivo de los residuos y una contaminación exagerada. Tal es el caso de la explotación y procesamiento del petróleo el cual está compuesto principalmente por hidrocarburos que pueden ser degradados mediante métodos físicos, químicos y biológicos; sin embargo también hay elementos que no pueden ser degradados y causan contaminación, por ejemplo los metales como vanadio y níquel que son componentes de las metaloporfirinas del petróleo crudo. Ambos elementos en bajas concentraciones participan en diversos procesos biológicos indispensables para los seres vivos. Cuando los niveles de estos metales se incrementan se convierten en contaminantes que pueden llegar a ser tóxicos, dependiendo de las condiciones ambientales, la concentración, la forma química de elemento, etc.

Los metales no pueden ser degradados, sin embargo se pueden emplear estrategias para minimizar su efecto tóxico. Tal es el caso de la fitorremediación, la cual consiste en el uso de ciertas plantas para descontaminar sitios problema, aunque la mayoría de los casos el uso de estas plantas no es suficiente, por lo que también se aprovechan los microorganismos asociados a la rizosfera para aumentar la eficiencia en la remoción de contaminante y de esta forma disminuir la contaminación. Una de las simbiosis más estudiadas desde el punto de vista agronómico es la que se forma entre las leguminosas y los rizobios para fijar nitrógeno atmosférico, además de esta ventaja también se ha

estudiado el potencial de esta interacción en la fitorremediación de contaminantes orgánicos e inorgánicos, como los metales.

De la misma manera, las micorrizas han sido ampliamente estudiadas en estos procesos de fitorremediación de suelos contaminados con metales, ya que las hifas de los hongos micorrizicos funcionan como una extensión de la raíz de la planta que le confiere una mayor capacidad de exploración, ayudando a la adaptación y supervivencia de las plantas que crecen en sitios contaminados.

La mayoría de las investigaciones en los que se ha utilizado la fitorremediación como mecanismo para descontaminar suelos, se basa en el uso de plantas y algunos microorganismos, ya sean hongos o bacterias. Sin embargo, son pocos los trabajos en los que se asocian a dos microorganismos diferentes para llevar a cabo el proceso de remediación. Además de que no se tiene conocimiento previo del efecto del vanadio y níquel en sistemas simbióticos.

El frijol ha sido estudiado como planta modelo para la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Los microorganismos rizosféricos juegan un papel importante en dicha remoción porque incrementan la disponibilidad del contaminante debido a su capacidad para desarrollarse utilizando los exudados radicales, además de poseer un sistema radical poco ramificado pero profundo que le permite actuar sobre los contaminantes en las capas profundas del suelo.

De esta manera nace la inquietud de conocer si la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa cuando hay presencia de vanadio y níquel, en concentraciones que pudieran resultar tóxicas para las plantas, además de su efecto en la asociación tripartita de *Rhizobium*-leguminosa-micorriza arbuscular como sistema modelo de fitorremediación de suelos contaminados con estos dos metales.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo general

- Analizar el efecto que tiene el vanadio y el níquel en la fitorremediación mediante la simbiosis tripartita *Rhizobium*-leguminosa-micorriza arbuscular.

Objetivos particulares

- Conocer la posible toxicidad del vanadio y del níquel en el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa mediante el uso de un sistema de bolsa de crecimiento.
- Evaluar el contenido elemental en los nódulos de *Rhizobium tropici* cuando son sometidos a contaminación por vanadio y níquel en un sistema de bolsa de crecimiento.
- Estudiar las alteraciones fisiológicas y nutrimentales que provocan el vanadio y el níquel en *Phaseolus vulgaris* en simbiosis con *Rhizobium tropici* y *Rhizophagus intraradices*.
- Evaluar la capacidad de fitorremediación de suelo contaminado con vanadio y níquel mediante el uso de la simbiosis tripartita *Rhizobium*-leguminosa-micorriza arbuscular.

Hipótesis general

- El vanadio y el níquel afectan el proceso de fitorremediación suelo y el establecimiento de la simbiosis tripartita *Rhizobium*-leguminosa- micorriza arbuscular.

Hipótesis particulares

- Tanto el vanadio como el níquel afectan el crecimiento de *Phaseolus vulgaris* y la capacidad de nodulación de *Rhizobium tropici* CIAT899 en un sistema de bolsa de crecimiento.
- La presencia de vanadio y de níquel no alteran el contenido elemental de los nódulos de *Rhizobium tropici*.
- El vanadio y el níquel no alteran el contenido nutrimental y la fisiología vegetal en la simbiosis tripartita *Rhizobium*-leguminosa-micorriza arbuscular.
- El vanadio y el níquel no afectan la capacidad de fitorremediación de un suelo contaminado mediante la simbiosis tripartita *Rhizobium*-leguminosa-micorriza arbuscular.

CAPÍTULO III
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA
SIMBIOSIS *Rhizobium*-LEGUMINOSA Y SIMBIOSIS MICORRÍZICA
ARBUSCULAR, Y SU RELACIÓN CON CONTAMINANTES INORGÁNICOS:
VANADIO Y NÍQUEL

3.1 Fijación biológica de nitrógeno en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa

El nitrógeno (N) es un elemento que se encuentra incorporado a moléculas orgánicas que desempeñan funciones vitales para todas las células ya que es un constituyente básico de aminoácidos, ácidos nucleicos, azúcares aminadas y polímeros (Hirel *et al.*, 2007). En la atmósfera se encuentra el 78% de nitrógeno diatómico (N₂), lo que hace a la molécula casi inerte y no puede ser aprovechado por la mayoría de los organismos vivos; en forma natural presenta diferentes formas químicas, y por lo tanto en distintos estados de oxidación (Eugenia-Baca *et al.*, 2000). En términos termodinámicos, el N₂ es la forma más estable del nitrógeno, las otras formas químicas (NH₃, NO₃⁻, NH₄⁺) revierten a N₂ bajo condiciones de equilibrio para los organismos vivos. Así, el reciclaje del N depende entonces de las transformaciones químicas de compuestos nitrogenados más disponibles a través de reacciones de óxido-reducción (Mayz-Figueroa, 2004). La importancia agronómica del nitrógeno radica, en que es uno de los elementos que las plantas cultivadas demandan en mayor cantidad, por lo que es necesario abastecer el nitrógeno que es extraído del suelo; sin embargo, el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados ha conducido a problemas de contaminación ambiental, bajos rendimientos y la reducción de la fertilidad del suelo. Una de las formas de suministrar el nitrógeno

necesario a los cultivos agrícolas es a través de la fijación biológica (Almaráz-Suárez y Ferrera-Cerrato, 2007).

Para que el nitrógeno atmosférico pueda ser aprovechado por las plantas se tiene que romper el triple enlace de la molécula y después ser fijado a NH_4^+ o NO_3^- . Este proceso lo llevan a cabo algunos organismos procarióticos, mediante la fijación biológica de nitrógeno. Las bacterias diazotróficas tienen la capacidad de llevar a cabo este proceso y presentan una amplia diversidad taxonómica (*Rhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*), con diferentes estilos de vida y tipos de asociación. Las bacterias más eficaces son aquellas que forman una simbiosis mutualista con las plantas, especialmente leguminosas, desarrollando nódulos radicales producidas por la planta (Graham *et al.*, 2008). La conversión enzimática del nitrógeno molecular a amonio es catalizada por la nitrogenasa, que representa un complejo enzimático oxígeno-lábil altamente conservado en los organismos diazotróficos, la forma común de la nitrogenasa tiene un grupo prostético con molibdeno, este complejo está separado en dos componentes: la Fe-proteína y la FeMo- proteína (Figura 3.1).

La Fe-proteína (dinitrogenasa reductasa) es la más pequeña de los dos componentes y tiene dos subunidades idénticas de 32 a 72 kDa dependiendo del organismo, cada subunidad cuenta con un cluster metálico hierro-azufre (4 Fe y 4 S^{2-}) que participa en las reacciones de óxido-reducción implicadas en la conversión de N_2 a NH_3 . Por otro lado, la FeMo-proteína (dinitrogenasa) tiene cuatro subunidades, con una masa molecular total de 180 a 235 kDa, y cada subunidad tienen dos cluster Fe-Mo-S (Newton, 2007; Sprent, 2007).

La reducción del nitrógeno atmosférico es un mecanismo muy complejo que se presenta en diversas reacciones y para que se lleven a cabo, se requieren grandes cantidades de energía (ATP) y la reducción obligada de protones con un mínimo de 1 mol de H_2

producida por cada mol de N_2 reducido (Halbleib y Luden, 2000). En condiciones naturales, la reducción de H^+ compite con la reducción de N_2 por los electrones de la nitrogenasa; en los rizobios del 30 al 60% de la energía suministrada por la nitrogenasa se pierde como H_2 , disminuyendo con ello la eficiencia de la fijación de nitrógeno, por lo que algunos géneros de rizobios contienen la enzima hidrogenasa que divide al H_2 generando electrones requeridos para la reducción de N_2 (Kneip *et al.*, 2007).

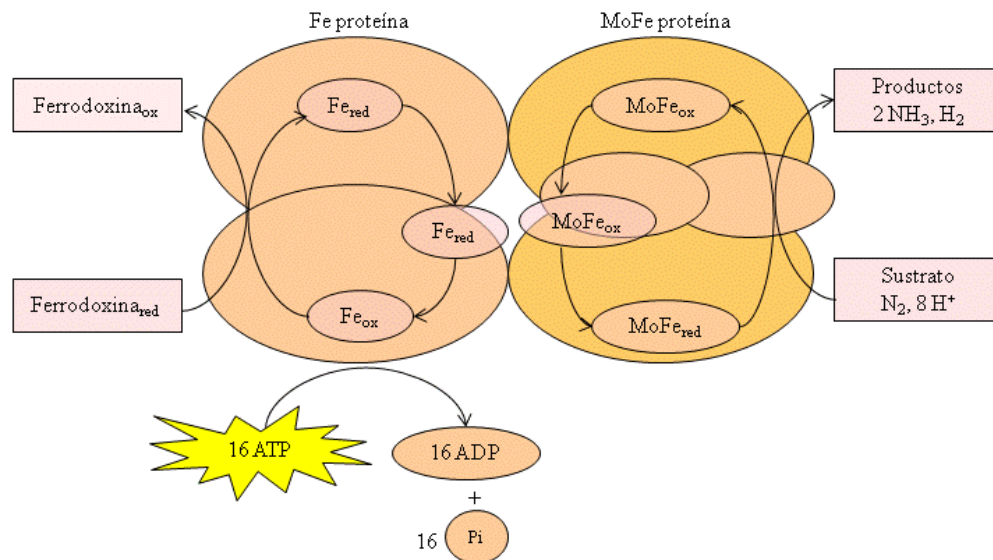


Figura 3.1. Complejo enzimático de la nitrogenasa y reacciones catalizadas (Taiz y Zeiger, 2002). La ferredoxina reduce la Fe proteína, la hidrólisis del ATP y su unión a la Fe proteína causa un cambio conformacional que facilita las reacciones de óxido-reducción. La Fe proteína se reduce a la proteína MoFe y ésta a su vez en NH_3 .

La reducción del nitrógeno atmosférico en un mecanismo muy complejo que se presenta en diversas reacciones y para que se lleven a cabo, se requieren grandes cantidades de energía (ATP) y la reducción obligada de protones con un mínimo de 1 mol de H_2 producida por cada mol de N_2 reducido (Halbleib y Luden, 2000). En condiciones naturales, la reducción de H^+ compite con la reducción de N_2 por los electrones de la nitrogenasa; en los rizobios del 30 al 60% de la energía suministrada por la nitrogenasa se

pierde como H₂, disminuyendo con ello la eficiencia de la fijación de nitrógeno, por lo que algunos géneros de rizobios contienen la enzima hidrogenasa que divide al H₂ generando electrones requeridos para la reducción de N₂ (Kneip *et al.*, 2007).

La nitrogenasa se inactiva en presencia de concentraciones elevadas de oxígeno, aunque este elemento es esencial para el metabolismo de los organismos involucrados en la fijación de nitrógeno. Dentro de los nódulos, la concentración de oxígeno es regulada por barreras físicas y la leghemoglobina, la cual es una proteína que participa en el transporte y difusión del oxígeno desde la periferia de las células infectadas hasta el bacterioide, esta proteína le confiere el color rojo a los nódulos y puede alcanzar hasta 30% de la proteína soluble (Kiers *et al.*, 2008).

3.1.1 La planta hospedera y los rizobios

Muchas especies de leguminosas establecen relaciones simbióticas con los rizobios, que son las bacterias que crecen dentro de los nódulos radicales, para llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno. Las leguminosas pertenecen al orden Fabales y tradicionalmente se distinguen tres subfamilias: Caesalpinoideae, Mimosoideae y Papilionideae. Los miembros de la familia Fabaceae pueden presentar consistencia leñosa o herbácea, con hojas alternadas, de división diversa y con estípulas muy llamativas. Las raíces presentan nódulos cuando se establece la simbiosis con los rizobios (Strasburger *et al.*, 2004).

La subfamilia Caesalpinoidae está representada por plantas leñosas subtropicales o tropicales que presentan pocas especies formadoras de nódulos (*Ceratonia siliqua* L.); mientras que en la Papilionidae se ubican la mayoría de los cultivos de importancia agrícola y forestal, por ejemplo, *Trifolium* sp. L., *Medicago sativa* L., *Vicia faba* L., *Phaseolus vulgaris* L., *Glycine max* L., (alimenticias), *Lupinus* sp. L. (forrajera), *Robinia*

pseudoacacia L. (forestal), y *Laburnum anagyroides* Medik (ornamental) (Strasburger *et al.*, 2004). Por último, las plantas tropicales de la subfamilia Mimosoideae son de consistencia leñosa y herbácea, las cuales en los últimos años han tomado importancia económica, ya que ciertas especies se utilizan para fines forestales (*Acacia* sp., *Prosopis* sp.) (Strasburger *et al.*, 2004).

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es una planta anual, cultivada desde el trópico hasta las zonas templadas, y se cultiva para obtener las semillas, las cuales contienen un alto contenido de proteína (22% con base seca). Es una planta herbácea, con hojas simples insertadas en los nudos del tallo y en ramas. Las hojas simples aparecen en el primer estado de crecimiento de la planta y se acomodan en el segundo nudo del tallo, mientras que las hojas compuestas son trifoliadas. La raíz es típica y ligeramente fibrosa con nódulos abundantes. La flor es hermafrodita, zigomorfa y de colores variados. El fruto es largo, cilíndrico y la semilla presenta diversos tamaños, formas y colores, lo cual sirve para establecer las diferencias entre cultivares (Meneses *et al.*, 1996).

3.1.2 El proceso de infección y la organogénesis nodular

Durante la formación del nódulo ocurren dos procesos simultáneos, la infección y la organogénesis nodular (Figura 3.2). Durante la preinfección se da un reconocimiento específico raíz-rizobio mediante señales bioquímicas (flavonoides). Los rizobios activan una serie de genes implicados en la nodulación, y que corresponden a sustancias que estimulan la multiplicación de la población bacteriana en la rizosfera y la adhesión a los pelos radicales (Gage, 2004). Al momento de la infección, los rizobios se unen a los pelos radicales liberando los factores *Nod* e inducen el curvamiento de los pelos radicales. Durante la deformación del pelo radical, se reciben señales emitidas por los rizobios, e inicia el desarrollo para la formación del nódulo en donde se llevará a cabo la fijación de

nitrógeno; además un conjunto de genes de las plantas (nodulinas) se activan en respuesta a la percepción de los factores de nodulación (Franche *et al.*, 2009). Las oscilaciones de la concentración de calcio observados durante el inicio de la infección de los pelos radicales indican que este elemento desempeña un papel importante como mensajero secundario en el proceso de infección (Oldroyd y Downie, 2008). Los rizobios entran a través del hilo de infección formado por la planta para facilitar su entrada. Los nódulos pueden ser determinados, lo que significa que el meristemo deja de funcionar después de completar la función del nódulo, y también pueden ser indeterminados los cuales tienen un meristemo apical (Figura 3.2) (Foucher y Kondorosi, 2000).

Un factor común entre los rizobios es que codifican genes para la nodulación y la fijación de nitrógeno (*nod*, *nif*, *nol*, *noe* y *fix*). Estos genes a menudo se trasladan en los plásmidos y las propiedades codificadas pueden perderse o ganarse fácilmente (MacLean *et al.*, 2007). Los productos de los genes *nod*, *nol* y *noe* están implicados en la señalización de la nodulación. Para la formación del nódulo debe existir compatibilidad entre la bacteria y la planta hospedera lo que responde a un diálogo molecular entre ambos (Perret *et al.*, 2000).

3.1.3 Fisiología del nódulo

La reducción de N₂ en el nódulo requiere de energía que es proporcionada por la planta. Los fotosintatos en forma de glucosa, son transportados al nódulo, donde los bacteroides disponen de carbono y energía a través de la membrana del simbiosoma. Para la generación de energía mediante la respiración se tiene una concentración baja de oxígeno que es regulada por la leghemoglobina (Franche *et al.*, 2009).

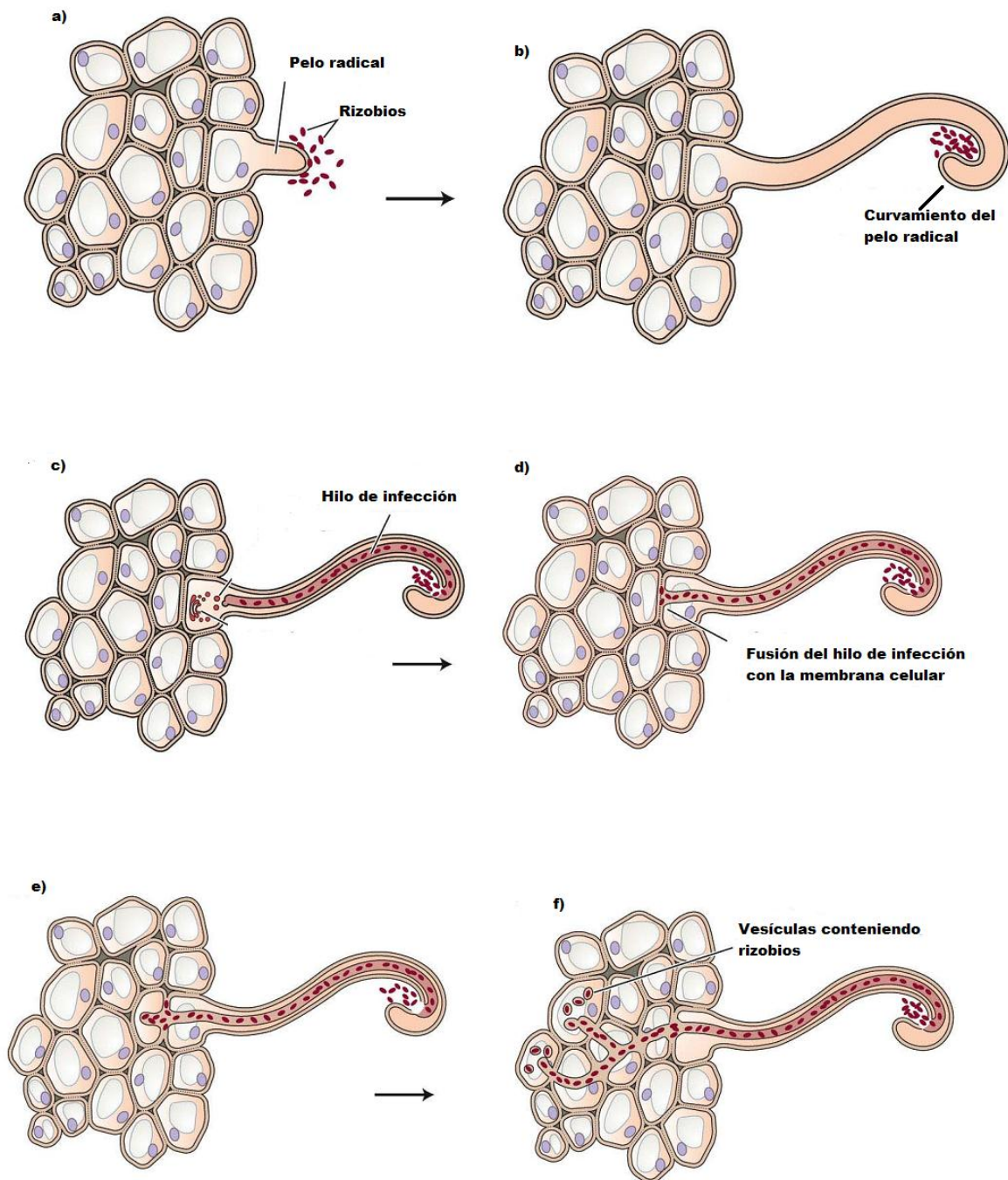


Figura 3.2. Proceso de la formación del nódulo. a) Preinfección, b) Adsorción y deformación de los pelos radicales, c) Infección, d) Hilo de infección, e) Los rizobios son liberados en el apoplasto y penetran la lamela media, f) El hilo de infección se ramifica y las bacterias se liberan en el citosol (Taiz y Zeiger, 2002).

El amoníaco producido por los bacteroides necesita ser transportado hacia la planta a través de la membrana del simbiosoma mediante el flujo de aminoácidos, donde es asimilado como glutamina y asparagina dentro del citosol (Figura 3.3).

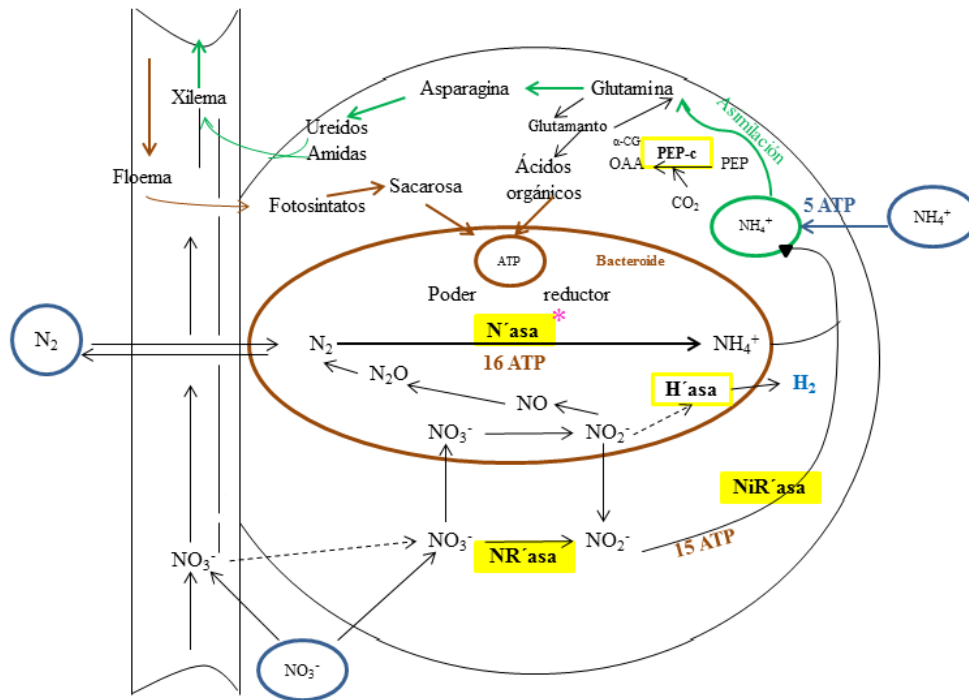


Figura 3.3. Transporte de NH_4^+ desde el nódulo hacia la parte aérea de la planta (Bacana y Sprent, 1987).

3.1.4 Especificidad y eficacia de las cepas de rizobios

Algunas leguminosas son infectadas por diferentes géneros de rizobios y otras especies vegetales son altamente restrictivas y aceptan pocas cepas de estos simbiosomas (Cuadro 3.1). La composición de los exudados radicales y la estructura de los factores Nod confieren especificidad al hospedero hacia la interacción simbiótica (Perret *et al.*, 2000). La especificidad del microorganismo, se refleja en la tasa de nitrógeno fijado; por ejemplo, las cepas fijadoras de nitrógeno en *Galega orientalis* L. no fijan nitrógeno cuando se inoculan

en *Galega officinalis* L. y viceversa (Tas *et al.*, 1996). La expresión de los genes que intervienen en el establecimiento de la simbiosis es consecuencia de la liberación de flavonoides que interaccionan con el factor de transcripción Nod D (proteína Nod D), el cual regula operones inducibles y estimula la transcripción de los genes *nod*. Para que se produzca la infección, la proteína Nod D se activa por la interacción con un flavonoide específico, debido a este fenómeno los factores Nod D son determinantes en la especificidad de la bacteria (Lohrke *et al.*, 1995).

Los biovars confieren especificidad en la nodulación; por ejemplo, *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* nodula en chícharo (*Pisum* sp.) y en vezas (*Vicia* sp.), mientras que el biovar *phaseoli* nodula en frijol (*Phaseolus* sp.), y el biovar *trifolii* en trébol (*Trifolium* sp.). En los biovars, el genoma central es similar y los genes que involucran la simbiosis pueden ser intercambiados a través de los plásmidos (Young *et al.*, 2006). Las cepas de *Sinorhizobium* sp. representan otro extremo, ya que estas cepas establecen simbiosis con 112 géneros de plantas. Esto se debe a que la proteína NodD es muy versátil ya que es inducida por una gran variedad de exudados radicales (Franche *et al.*, 2009). En otro estudio se aislaron 293 cepas de rizobios de las raíces de *Calliandra calothyrsus* Meins., colectadas en diferentes partes del mundo, encontrando que diversos géneros y especies de rizobios pueden nodular a esta planta, ya que los genes *nodA* en 70 de estos aislamientos bacterianos están relacionados con los genes *nodA* de *Rhizobium tropici*, por lo que se considera a *Calliandra* como una planta promiscua, cuyo carbono y energía atraen a bacterias que forman nódulos pero que no fijan nitrógeno atmosférico (Bala y Guiller, 2001). Tas *et al.* (1996) reportaron que una leguminosa inoculada con *Rhizobium galegae*, no parecía reconocer entre rizobios efectivos y no efectivos, y la competencia entre estas bacterias ocasionó la muerte de la planta debido a la ausencia de nitrógeno.

Cuadro 3.1. Géneros reconocidos de rizobios que establecen simbiosis con leguminosas (Graham *et al.*, 2008).

Géneros/especies	Principales hospederos reportados
<i>Allorhizobium undicola</i>	<i>Neptunia natans</i> , <i>Acacia</i> , <i>Faidherbia</i> , <i>Lotus</i>
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
<i>Azorhizobium doebereineriae</i>	<i>Sesbania virgata</i>
<i>Bradyrhizobium canariense</i>	<i>Chamaecytisus</i> , <i>Lupinus</i>
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Glycine max</i>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Glycine max</i>
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	<i>Glycine max</i>
<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>	<i>Lespedeza</i> , <i>Medicago</i> , <i>Melilotus</i>
<i>Mesorhizobium amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>
<i>Mesorhizobium chacoense</i>	<i>Prosopis alba</i>
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>Mesorhizobium huahuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i> , <i>Acacia</i>
<i>Mesorhizobium lotti</i>	<i>Lotus corniculatus</i>
<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>Mesorhizobium plurifarum</i>	<i>Acacia senegal</i> , <i>Prosopis juriflora</i> , <i>Leucaena</i>
<i>Mesorhizobium seprentriionale</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>
<i>Mesorhizobium temperatum</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>
<i>Mesorhizobium tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i> , <i>Glycine</i> , <i>Caragana</i> , <i>Sophora</i>
<i>Rhizobium etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Mimosa affinis</i>
<i>Rhizobium galegae</i>	<i>Galega orientalis</i> , <i>G. officinalis</i>
<i>Rhizobium gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Leucaena</i> , <i>Macropitilium</i> , <i>Onobrychis</i>
<i>Rhizobium guardinni</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Leucaena</i> , <i>Macropitilium</i> , <i>Desmanthus</i>
<i>Rhizobium hainanese</i>	<i>Desmodium sinuatum</i> , <i>Stylosanthes</i> , <i>Vigna</i> , <i>Arachis</i> , <i>Centrosema</i>
<i>Rhizobium huatlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>
<i>Rhizobium indigoferae</i>	<i>Ingoferea</i>
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	
bv. <i>trifoli</i>	<i>Trifolium</i>
bv. <i>viciae</i>	<i>Lathyrus</i> , <i>Lens</i> , <i>Pisum</i> , <i>Vicia</i>
bv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Rhizobium loessense</i>	<i>Astragalus</i> , <i>Lespedeza</i>
<i>Rhizobium mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Rhizobium sullae</i>	<i>Hedysarum coronarium</i>
<i>Rhizobium tropici</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Dalea</i> , <i>Leucaena</i> , <i>Macroptilium</i> , <i>Onobrychis</i>
<i>Rhizobium yanglingense</i>	<i>Amphicarpaea</i> , <i>Coronilla</i> , <i>Gueldenstaedtia</i>
<i>Sinorhizobium abri</i>	<i>Abrus precatorius</i>
<i>Sinorhizobium americanus</i>	<i>Acacia</i> spp.
<i>Sinorhizobium arboris</i>	<i>Acacia senegal</i> , <i>Prosopis chilensis</i>
<i>Sinorhizobium fredii</i>	<i>Glycine max</i>
<i>Sinorhizobium indiaense</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
<i>Sinorhizobium kostiensis</i>	<i>Acacia senegal</i> , <i>Prosopis chilensis</i>
<i>Sinorhizobium kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulacea</i>
<i>Sinorhizobium medicae</i>	<i>Medicago trunculata</i> , <i>Medicago polymorpha</i> , <i>Medicago orbicularis</i>
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	<i>Medicago</i> , <i>Melilotus</i> , <i>Trigonella</i>
<i>Sinorhizobium morelense</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>
<i>Sinorhizobium saheli</i>	<i>Acacia</i> , <i>Sesbania</i>
<i>Sinorhizobium terangae</i>	<i>Acacia</i> , <i>Sesbania</i>

3.2 La simbiosis micorrízica arbuscular

El término micorriza, proviene del griego *Mykes=hongo* y *Rhiza=raíz*, que literalmente significa “hongo de la raíz”, este término fue acuñado Albert B. Frank en 1885, para describir la unión de dos organismos que forman un solo órgano morfológico en donde existe una retroalimentación de los simbioses (Agarwal y Sah, 2009). Inicialmente se creía que la asociación micorrízica se presentaba únicamente en especies arbóreas, pero a través del tiempo y con los resultados de diversas investigaciones se demostró que existe una amplia diversidad de asociaciones que están presentes en la mayoría de las plantas superiores (Aguilera-Gómez *et al.*, 2008). La asociación micorrízica confiere beneficios a la planta, como la estimulación del crecimiento debido al incremento en la absorción de nutrientes, la tolerancia de la planta a estrés biótico y abiótico, además de contribuir en el biocontrol de enfermedades de la raíz (Molina *et al.*, 1992).

Durante el establecimiento de la asociación micorrízica existen cambios estructurales en el hongo y la planta; por ejemplo, la formación de la interfase arbuscular que es el lugar en donde se da el intercambio bidireccional de nutrientes; así, la micorriza representa una parte fisiológicamente fundamental de la raíz (Pereira *et al.*, 2001).

Tradicionalmente se reconocen cinco grupos de micorrizas basándose en criterios morfológicos, anatómicos y sistemáticos tanto de las plantas como de los hongos. Tales grupos son micorriza arbutoide, monotrofoide, ericoide, orquidioide, arbuscular y ectomicorriza (Read, 1998).

La micorriza arbuscular no presenta manto externo que pueda verse a simple vista; estructuralmente las hifas de los hongos se introducen entre las células corticales de la raíz, hasta que penetran en el interior de éstas formando vesículas y arbusculos. Esta simbiosis

es una de las asociaciones benéficas más antiguas entre plantas y microorganismos del suelo (Remy *et al.*, 1994).

Los hongos que forman esta asociación mutualista pertenecen a la división *Glomeromycota* y se pueden encontrar en todo tipo de plantas, y abundan en suelos pobres como los de las praderas y estepas, la alta montaña y selvas tropicales (Selosse *et al.*, 2006).

3.2.1 Taxonomía y morfología de los hongos micorrízicos arbusculares

Los hongos formadores de la micorriza arbuscular (HMA) pertenecen a la clase de los Glomeromycetes que se caracterizan por formar filamentos llamados hifas, en cuyo interior viajan muchos núcleos por un citoplasma común, debido a que no hay paredes celulares, es decir son cenocíticos (Kiers y van der Heijden, 2006), y se conocen más de 150 especies de hongos micorrízicos arbusculares. Basándose en los resultados obtenidos mediante el empleo de técnicas moleculares y su relación con la morfología de las esporas, se creó una nueva clasificación en la que se describen las características filogenéticas (Alarcón, 2007) (Cuadro 3.2).

La micorriza arbuscular se reporta en más de 200 familias botánicas y más de 1000 géneros de plantas, distribuidas en el grupo de Briofitas, Pteridofitas, Angiospermas y Gimnospermas, dentro de las cuales se incluyen muchas especies de cultivos importantes en la agricultura, principalmente en gramíneas y leguminosas (Daniell *et al.*, 2001).

Durante su ciclo de vida, los HMA producen esporas que al germinar forman un micelio vegetativo y al hacer contacto con la superficie de la raíz se modifica en una protuberancia similar a una ventosa (apresorio), de donde surge la hifa que inicia la infección de los tejidos radicales (Reyes-Jaramillo, 2002).

Cuadro 3.2. Clasificación taxonómica y géneros de hongos micorrízicos arbusculares (Schüßler y Walker, 2010; Stürmer, 2012).

Phylum	Clase	Orden	Familia	Género
G L O M R O M Y C O T A	G L O M R O M Y C O T E S	Glomerales	<i>Claroideoglomeraceae</i>	<i>Claroideoglomerus</i>
			<i>Glomeraceae</i>	<i>Funneliformis</i> <i>Glomus</i> <i>Rhizophagus</i> <i>Sclerocystis</i>
		Paraglomerales	<i>Paraglomeraceae</i>	<i>Paraglomerus</i>
		Archaeosporales	<i>Archaeosporaceae</i>	<i>Archaeospora</i>
			<i>Geosiphonaceae</i>	<i>Geosiphon</i>
			<i>Ambisporaceae</i>	<i>Ambispora</i>
		Diversisporales	<i>Gigasporaceae</i>	<i>Gigaspora</i> <i>Racocetra</i> <i>Scutellospora</i>
			<i>Acaulosporaceae</i>	<i>Acaulospora</i>
			<i>Entrophosporaceae</i>	<i>Entrophospora</i>
			<i>Pacisporaceae</i>	<i>Pacispora</i>
			<i>Diversisporaceae</i>	<i>Diversispora</i> <i>Redeckera</i> <i>Otospora</i>

Posteriormente, se forman hifas inter e intracelularmente en las células corticales, que se van ramificando probablemente para introducir los carbohidratos procedentes de la planta y dan el aspecto de diminutos árboles llamados arbusculos (Aguilera-Gómez *et al.*, 2008). Básicamente la morfología de los HMA se resume de la siguiente manera (Figura 3.4):

- Arbusculos: los HMA al ponerse en contacto con la raíz forman una estructura sobre las células epidérmicas vegetales conocida como “apresorio” y a partir de esta

estructura se producen las hifas que penetran la epidermis radicular hasta llegar a la endodermis sin atravesarla, allí comienza su ramificación para formar los arbusculos, cuya vida aproximada es de 1 a 3 semanas, después de lo cual se colapsa, y parte de él se reabsorbe hacia el citoplasma hifal y el resto de componentes permanecen en la célula rodeados por el plasmalema.

- Vesículas: son las estructuras de almacenamiento de los hongos, cuya formación de sustancias como lípidos es posterior a la de los arbusculos y tiene lugar a partir del hinchamiento de una hifa generalmente terminal. Esta estructura principalmente en las especies del género *Glomus* puede llegar a engrosar sus paredes y convertirse en esporas.
- Micelio externo o extramatricial: este micelio es componente importante en la simbiosis, y está formado por las hifas principales, gruesas y ramificadas dicotomicamente, así como por hifas también ramificadas, siendo las encargadas de la absorción del fósforo y otros nutrientes al proliferar en lugares donde las raíces no pueden acceder por sí mismas. Cuando el sustrato se agota, el citoplasma de las hifas finas se retrae hacia la hifa principal donde se forman septos. Este fenómeno puede ser un indicador de deficiente aireación y/o agotamiento de nutrientes del suelo, entre otros factores adversos.
- Esporas: Estas estructuras se forman sobre el micelio extramatricial y son órganos de reproducción asexual de los HMA, que presentan características propias constituyendo una estructura externa que permite el reconocimiento morfológico de las especies de estos hongos, y miden de 20 a 1000 μm , las cuales se pueden aislar del suelo cercano a raíces colonizadas (Varela y Trejo, 2001). Como criterios

morfológicos de la espora se incluyen: color, textura, superficie, tamaño, forma, hifa que sostiene a la espora, contenidos y capas de la pared; así como procesos de germinación y formación de esporas, principalmente (Aguilera-Gómez *et al.*, 2008).

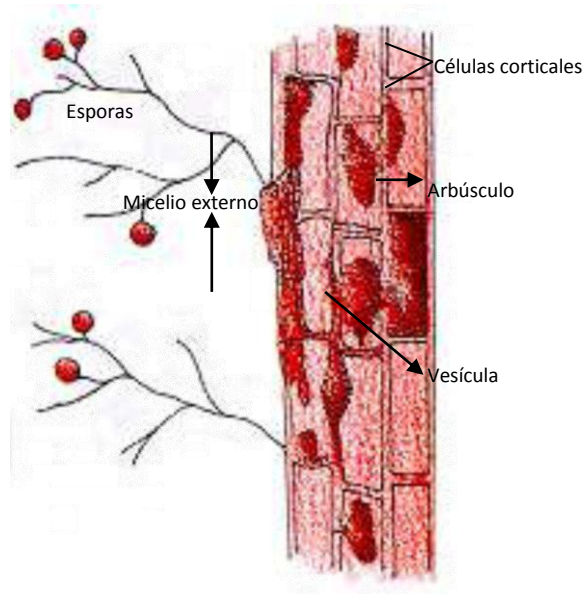


Figura 3.4. Estructura morfológica de los hongos micorrízicos arbusculares (Escobar-Acevedo *et al.*, 2007).

En algunos casos las hifas se hinchan y forman vesículas ovoides que contienen lípidos o sustancias de reserva. Los tejidos de la raíz colonizados por el hongo son la epidermis y las células corticales, mientras que los meristemos y tejidos vasculares son resistentes a la colonización micorrízica (Reyes-Jaramillo, 2002). Estos hongos se han especializado en introducirse en las células corticales de la planta y en formar estructuras singulares para poder llevar a cabo su metabolismo. En cambio, en la rizosfera, las demás hifas se ramifican en la matriz del suelo (fase extraradical) explorando y adquiriendo macronutrientes y micronutrientes que son absorbidos y aprovechados por la planta hospedante (Aguilera-Gómez *et al.*, 2008). Se conoce muy poco sobre el micelio

extraradical de los HMA, en gran parte debido a la falta de transparencia (opacidad) del suelo y a la dificultad de diseñar experimentos que permitan estudiar su desarrollo sin tener que destruirlo (Mirabal *et al.*, 2002).

3.2.2 Función de los HMA

Los HMA son heterótrofos, no fotosintéticos y establecen una relación muy estrecha con la raíz de la planta hospedera ya que son incapaces de completar su ciclo de vida sin colonizarla. Entre la planta y el hongo se establece un intercambio en el cual ambos se benefician, la planta proporciona al micobionte carbohidratos y el hongo micorrízico la abastece de fósforo, nitrógeno, potasio, calcio, magnesio e incrementa la absorción de micronutrientes como cobre y zinc. Además, el hongo confiere a la planta protección contra patógenos e incrementa la solubilidad de minerales del suelo. De esta manera, la planta incrementa su crecimiento en respuesta al transporte de nutrimentos que el hongo obtiene del suelo (Xoconostle-Cázares y Ruiz-Medrano, 2002).

El HMA utiliza del 10 al 20% del CO₂ asimilado por las plantas (Harris-Valle *et al.*, 2009). Por otra parte, el micelio extraradical del HMA beneficia a la estructura del suelo debido a su abundante crecimiento en la rizósfera y a los exudados de las hifas (glicoproteínas) que actúan como agentes cementantes, favoreciendo la agregación de las partículas del suelo (Kling y Jakobsen, 1998). A pesar de haber obtenido el crecimiento del hongo micorrízico *in vitro*, no se ha tenido un desarrollo satisfactorio del hongo para compensar las necesidades para su aplicación tecnológica (Karandashov *et al.*, 2000; Guzmán-González y Farías-Larios, 2005).

A pesar de la importancia de la interacción planta-hongo, no todas las plantas cultivadas llegan a establecer la simbiosis con los HMA. Una de las causas principales son las diversas labores agrícolas que se practican durante el ciclo de cultivo, ya que alteran la

disponibilidad de inoculo compatible. Otra causa es la introducción de hongos comerciales, que están en desventaja competitiva con el resto de microorganismos del suelo (Xoconostle-Cázares y Ruiz-Medrano, 2002).

3.2.3 Establecimiento de la micorriza arbuscular

La selección natural ha favorecido atributos especializados de la simbiosis que conducen a la dominancia de un tipo de micorriza en un bioma definido. La micorriza arbuscular domina comunidades vegetales de herbáceas y leñosas (Read, 1991). Los requisitos ambientales trascienden sus necesidades por una planta específica, por lo que la estructura de la comunidad de estos hongos se explica por las condiciones edafoclimáticas de la zona, y su distribución está más influenciada por variables ambientales que por la asociación específica hongo-planta, aunque localmente las plantas influyen en su distribución (Shalamuk *et al.*, 2006).

No todas las plantas que componen la comunidad vegetal dependen en igual medida de los HMA para su crecimiento; en función del grado de dependencia micorrízica de la planta dominante y de la abundancia de HMA, la diversidad de la comunidad vegetal tenderá a aumentar o disminuir (Kiers y van der Heijden, 2006). La diversidad genética de los HMA está asociada a una elevada diversidad funcional causando efecto en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Varela y Trejo, 2001; Martínez y Pugnaire, 2009).

El inicio de la colonización fúngica en la planta y en consecuencia el establecimiento de la simbiosis, inicia con la germinación de las esporas en el suelo cuando las condiciones de temperatura y humedad son favorables o bien, mediante el crecimiento de hifas a partir de propágulos que se encuentran cerca del sistema radical a colonizar (Miransari, 2011). El crecimiento del micelio aumenta por los exudados radicales, ya que éstos proporcionan sustratos para el desarrollo de las hifas después de que las reservas de

nutrimentos en las esporas se han agotado (Aguilera-Gómez *et al.*, 2008). Cuando la hifa tiene contacto con la célula epidérmica o un pelo radical se produce un apresorio ligeramente engrosado, a partir del cual se desarrollan ramificaciones infectivas. Posteriormente, inicia la penetración mediante la presión ejercida por la hifa sobre la pared celular, la cual hace que esta última se curve alrededor de la hifa y se vuelva mucho más delgada en las células corticales, en donde ocurre una alta actividad hidrolítica, y la entrada de la hifa a la raíz se facilita por la presencia de pectinasas (Bonfante *et al.*, 2004).

3.3 Fitorremediación

En los últimos años del siglo XX surgieron tecnologías basadas en el uso de organismos vivos para descontaminar suelos o lugares contaminados, y recuperar los ecosistemas afectados. La fitorremediación se definió como el uso de plantas verdes para eliminar los contaminantes del entorno o reducir su peligrosidad (Salt *et al.*, 1998). La fitorremediación de suelos contaminados utiliza plantas en las que se aplican enmiendas y técnicas agronómicas para eliminar, retener o disminuir la toxicidad de los contaminantes en el suelo. Este grupo de fitotecnologías tiene la ventaja de ser limpia y económica (Cuadro 3.3), ya que no utilizan reactivos químicos ni afectan negativamente la estructura del suelo (Carpena y Bernal, 2007).

Cuadro 3.3. Ventajas y desventajas de la fitorremediación (Núñez-López *et al.*, 2004)

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> • Tecnología sustentable • Eficiente para tratar diversos tipos de contaminantes <i>in situ</i> • Bajos costos, no requiere personal especializado para su manejo ni consumo de energía • Poco perjudicial para el ambiente • No produce contaminantes secundarios y por lo mismo no existe la necesidad de lugares de desecho • Tiene una alta probabilidad de ser aceptada • Tiene un versatilidad potencial para tratar una gama de diversos materiales peligrosos • Se pueden reciclar recursos (agua, biomasa, etc.) 	<ul style="list-style-type: none"> • En un proceso relativamente lento • Dependiente de las estaciones del año • El crecimiento de la vegetación puede estar limitado por extrema toxicidad ambiental • Los contaminantes acumulados en las hojas pueden ser nuevamente liberados al ambiente • Los contaminantes pueden acumularse en la madera de las especies leñosas • La solubilidad de algunos contaminantes pueden incrementarse, resultando en un mayor daño ambiental o migración de los contaminantes • Se requieren de áreas relativamente grandes

La fitorremediación puede ser aplicada *in situ* o *ex situ*, para limpiar diferentes compuestos orgánicos como los hidrocarburos del petróleo, gases (óxidos de nitrógeno y azufre), plaguicidas, compuestos clorados, compuestos explosivos, así como también sustancias inorgánicas tóxicas como metales pesados, metaloides y radionucleidos La desintoxicación de contaminantes mediante fitorremediación se realiza empleando al menos uno de los siguientes mecanismos (Morikawa y Takahashi, 2000) (Figura 3.5):

- *Fitoextracción* o *fitoacumulación*: implica el uso de plantas que acumulan los contaminantes en las raíces, tallos o follaje, los cuales pueden ser fácilmente cosechados. Los contaminantes extraídos son principalmente metales pesados,

aunque también puede extraerse cierto tipo de contaminantes orgánicos, elementos e isótopos radiactivos.

- *Fitoestimulación:* los exudados radiculares estimulan el crecimiento de microorganismos capaces de degradar contaminantes orgánicos. Las plantas liberan a la rizosfera azúcares simples, aminoácidos, nutrientes, enzimas y oxígeno, favoreciendo el desarrollo de comunidades microbianas cuyas actividades metabólicas ayudan a la mineralización de los contaminantes.
- *Fitodegradación:* se basa en el uso de plantas para degradar o transformar sustancias tóxicas de diferentes tipos de contaminantes orgánicos como hidrocarburos poliaromáticos, hidrocarburos totales del petróleo, plaguicidas, compuestos clorados y explosivos. A través de reacciones enzimáticas que llevan a cabo plantas y microorganismos en la rizosfera, los contaminantes son parcial o completamente degradados o transformados. En determinadas ocasiones los productos de la degradación sirven a la planta para acelerar su crecimiento.
- *Fitovolatilización:* algunas plantas son capaces de volatilizar ciertos contaminantes, como el mercurio y el selenio contenidos en suelos, sedimentos o agua. Tales contaminantes son absorbidos, metabolizados y liberados a la atmósfera en formas volátiles, relativamente menos tóxicas. La transformación de estos elementos se lleva a cabo en la raíz y se liberan durante la transpiración.
- *Fitoestabilización:* en esta estrategia se utilizan plantas que desarrollan un sistema radical denso, para reducir la biodisponibilidad de metales y otros contaminantes en el ambiente mediante secuestro, lignificación o formación de humus. La inmovilización de los metales ocurre a través de reacciones químicas como la

precipitación o formación de compuestos insolubles, los metales se adsorben fuertemente en las raíces o en la materia orgánica del suelo, limitando su biodisponibilidad y su migración vertical hacia los mantos freáticos.

- *Rizofiltración*: se basa en hacer crecer raíces de plantas terrestres y/o acuáticas con una alta tasa de crecimiento y área superficial para absorber, concentrar y precipitar metales pesados de aguas residuales contaminadas.

Las estrategias de fitorremediación hacen referencia a los mecanismos biológicos predominantes en las plantas y en algunos casos, indican el papel de las comunidades microbianas asociadas a estos procesos, lo que denota que la fitorremediación es un proceso complejo que involucra tanto microorganismos y plantas.

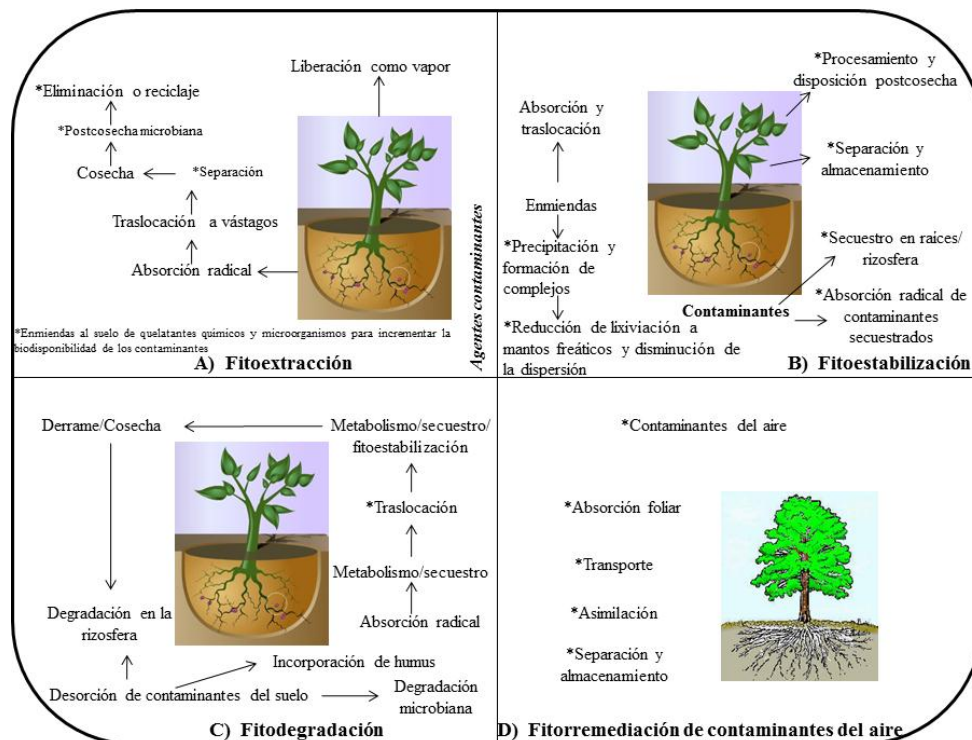


Figura 3.5. Tipos de fitorremediación. **A)** Fitoextracción. **B)** Fitoestabilización. **C)** Fitodegradación. **D)** Fitorremediación de contaminantes del aire (Singh *et al.*, 2007).

La eficiencia de remoción de los contaminantes durante el proceso de fitorremediación dependerá de la especie vegetal utilizada, su estado de crecimiento, la estacionalidad y el tipo de contaminante que se pretende remover. Este tipo de plantas sobreviven en ambientes adversos por lo que poseen sistemas metabólicos flexibles que involucran adaptaciones genéticas y fisiológicas para evitar la separación, degradación, el almacenamiento o la exclusión de diversas sustancias tóxicas no deseadas, desarrollando mecanismos de adaptación generales y específicos que las protegen del estrés generado por los contaminantes. El uso de la fitorremediación se basa en explotar el potencial de las plantas para asociarlas con diferentes tipos microorganismos (Singh *et al.*, 2007) (Figura 3.6).

Diversas plantas acumulan naturalmente diferentes contaminantes como metales pesados y contaminantes orgánicos (Morikiwa *et al.*, 2005). Para la descontaminación de suelos con metales pesados, las plantas deben ser tolerantes a las altas concentraciones de estos contaminantes, además de acumularlos, tener una rápida tasa de crecimiento, alta productividad y de preferencia, pertenecer a la zona que se pretende descontaminar. Además, deben poseer mecanismos de tolerancia para resistir y sobrevivir a la exposición de los metales, como por ejemplo: exclusión, reducción, solubilización, quelación, redistribución y acumulación (Khan *et al.*, 2010). La producción de ácidos orgánicos, (malo, citrato y oxalato), metalotioneínas y fitoquelatatinas son mecanismos desarrollados por las plantas para favorecer su supervivencia en suelos contaminados (Núñez-López *et al.*, 2004).

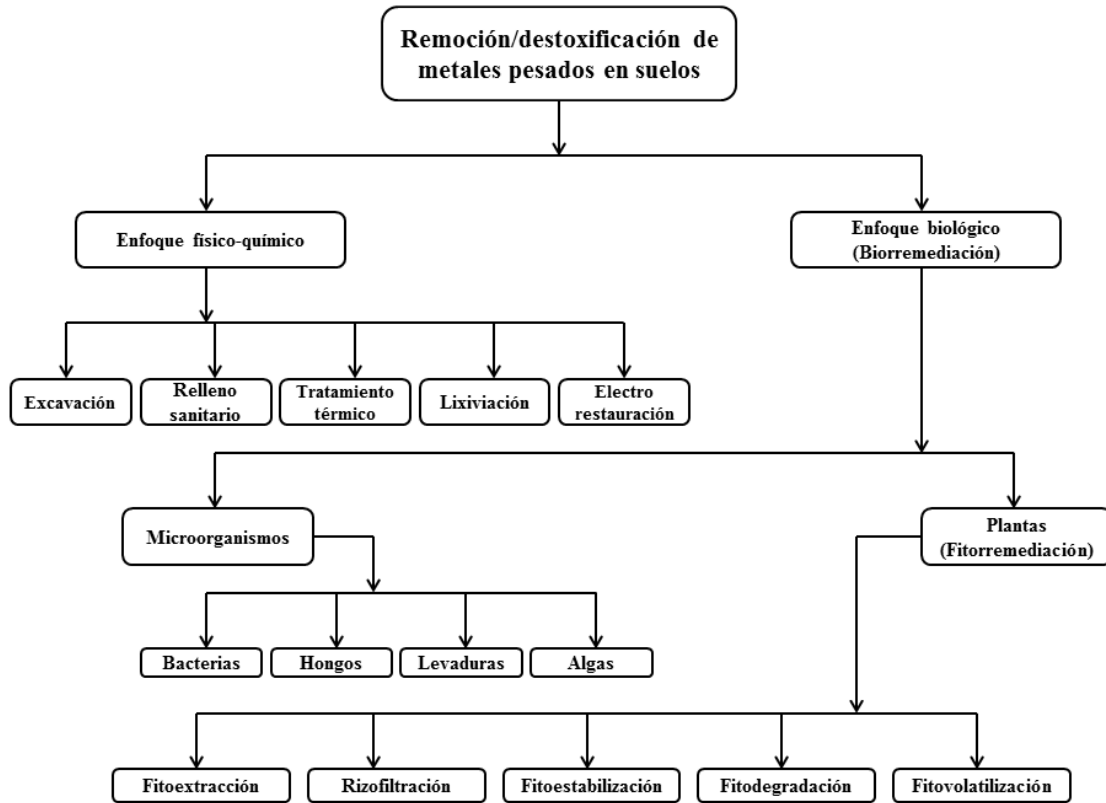


Figura 3.6. Estrategias de remediación de metales pesados aplicados a suelos contaminados (Khan *et al.*, 2010).

Químicamente los metales pesados tienen una densidad mayor o igual a 5 g cm^{-3} , y constituyen un grupo de 65 elementos con características físicas, químicas y biológicas heterogéneas. Se clasifican en esenciales y no esenciales, estos últimos no tienen una función biológica y su presencia en el ambiente puede considerarse como tóxica. Por otra parte, los esenciales se consideran elementos traza y desempeñan una función biológica (Prieto-Méndez *et al.*, 2009). Los metales pesados pueden convertirse en contaminantes si su distribución en el ambiente se altera mediante las actividades humanas. Las principales fuentes de contaminación de ecosistemas acuáticos, aéreos y terrestres son los efluentes industriales, las emisiones vehiculares, las actividades agrícolas, la extracción de minerales

y el refinamiento de productos mineros. A diferencia de los contaminantes orgánicos, su impacto ambiental se acentúa porque no son biodegradables, provocando diversos efectos tóxicos en la biota (Alcalá *et al.*, 2009).

Cuando los metales pesados en el suelo alcanzan niveles que rebasan los límites máximos permitidos causan efectos inmediatos en las comunidades vegetales asociadas a estos sitios; por ejemplo, hay una inhibición del crecimiento y desarrollo normal del vegetal, además de una disminución en las comunidades microbianas dando como resultado un disturbio funcional en los componentes ambientales (Yang *et al.*, 2005). En el suelo, los metales pesados están presentes como iones libres, compuestos metálicos solubles, óxidos, carbonatos y como hidróxidos. Estos metales actúan directamente en los seres vivos a través del bloqueo de las actividades biológicas, es decir la inactivación enzimática como en el caso de la formación de enlaces metal-grupos sulfhidrilos de las proteínas, causando daños irreversibles en los diferentes organismos (Memon y Schröder, 2009).

La remediación de suelos contaminados es necesaria para eliminar los riesgos ambientales debido a la presencia de metales tóxicos. Por ejemplo, diversas enfermedades en los seres humanos son causadas por las concentraciones elevadas de cadmio y plomo en el suelo (Rajkumar *et al.*, 2009). Además, la contaminación provocada por residuos de zinc, cobre y níquel provenientes de minas y fundidoras, provoca fitotoxicidad en especies cultivadas y forestales (Kiikkilä, 2003). Una de las mayores preocupaciones para la salud humana es la causada por la contaminación por plomo. La exposición al plomo puede ocurrir a través de múltiples vías, incluyendo la inhalación y la ingestión alimentaria. El peligro de la exposición al plomo radica en su lenta movilidad en el ambiente (Neugschwandtner *et al.*, 2008).

Los metales pesados son considerados como los contaminantes industriales más significativos debido a que son selectivamente tóxicos, persistentes y no biodegradables (Singh *et al.*, 2005). Los mecanismos de unión de los metales son complejos y varían de acuerdo a la composición, la acidez y las condiciones redox del suelo. La biodisponibilidad y movilidad de estos contaminantes dependen de los procesos de redistribución entre la solución del suelo y los componentes de la fase sólida (Thangavel y Subburaam, 2004). Una de las limitantes para la utilización de la fitoextracción de metales es su lenta desorción, generalmente solo una pequeña fracción de los metales que hay en el suelo están disponibles para las plantas; sin embargo, su biodisponibilidad puede cambiar por ciertas propiedades de la rizosfera como el pH, la adición de agentes quelantes, fertilizantes amoniacados, alteración de la composición iónica del suelo (Datta y Sarkar, 2004). Por ejemplo, la capacidad de retención en un suelo varía en función de las fracciones orgánicas y minerales, por lo que las arenas y gravas finas son más fáciles de tratar (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005). El pH afecta la solubilidad y la disponibilidad de los macro y micronutrientes, y la movilidad de los metales y la reactividad de los minerales. Los metales son móviles a pH bajo, si el pH es alcalino forman carbonatos o fosfatos minerales insolubles. La actividad y el crecimiento microbiano es fuertemente afectado por el pH, la mayoría de las bacterias tienen un rango óptimo de crecimiento de 6.5 a 8.5 (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005).

Un factor importante dentro de la fitorremediación es el uso de los microorganismos del suelo, los cuales tienen características que los hacen útiles en estos procesos (exudación de compuestos orgánicos, tolerancia a las concentraciones elevadas de contaminantes). Los microorganismos del suelo exudan compuestos orgánicos que estimulan la biodisponibilidad de una gran variedad de iones metálicos (Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , etc.)

favoreciendo la absorción por la raíz (Vivas *et al.*, 2006a). Las bacterias quimiolitotróficas poseen mecanismos de transferencia y movilización de metales, pudiendo modificar ciertas propiedades químicas de la rizosfera que estimulan la movilidad de los metales (Jing *et al.*, 2007).

La elevada concentración de metales en los suelos, y por lo tanto su absorción de éstos por las plantas, afecta el crecimiento, el establecimiento de simbiosis mutualistas y por lo tanto, el rendimiento de los cultivos (Wani *et al.*, 2008). La concentración elevada de metales actúa como sustancias genotóxicas provocando la desintegración de los organelos celulares y la disrupción de las membranas, afectando procesos fisiológicos como la fotosíntesis, la respiración celular, la síntesis de proteínas y el metabolismo de los carbohidratos (Shakolnik, 1984).

Para evitar el estrés debido a la presencia de metales, los microorganismos han desarrollado mecanismos que incluyen: el bombeo de los iones fuera de la célula, acumulación y secuestro de iones metálicos dentro de la célula, la acidificación del suelo, cambios en la solubilidad de los complejos metálicos a través de exudados orgánicos (fitosideróforos), y la adsorción y desorción de los compuestos metálicos (Wani *et al.*, 2008).

Los metales no pueden ser degradados y se consideran indestructibles, la especiación química y la biodisponibilidad de los metales puede cambiar debido a factores ambientales. Por ejemplo, el Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} y Cd^{2+} son considerados micronutrientes para las plantas, animales y microorganismos, mientras que otros como el cadmio, el mercurio y el plomo no tienen alguna función biológica o fisiológica (Olson *et al.*, 2001). No obstante, en altas concentraciones, estos metales pueden reducir la biomasa microbiana, disminuir el número de poblaciones específicas, como es el caso de *Rhizobium*

leguminosarum bv. *trifoli* cuya población disminuyó de 4.2×10^2 células por gramo de suelo seco a 20 células por gramo de suelo debido a la aplicación de lodos residuales que contenían sales de Cr, Zn, Cd, Ni y Pb en una concentración aproximada de 600 mg kg^{-1} (Chaudri *et al.*, 1993). Además algunos metales pueden cambiar por completo la estructura de la comunidad microbiana de un sitio contaminado (Pilon-Smits, 2005). De la misma manera se pueden inhibir diferentes actividades metabólicas, la actividad enzimática, la respiración celular, etc. (Figura 3.7) y los microorganismos pueden desarrollar resistencia a las elevadas concentraciones de los metales (Gray y Smith, 2005).

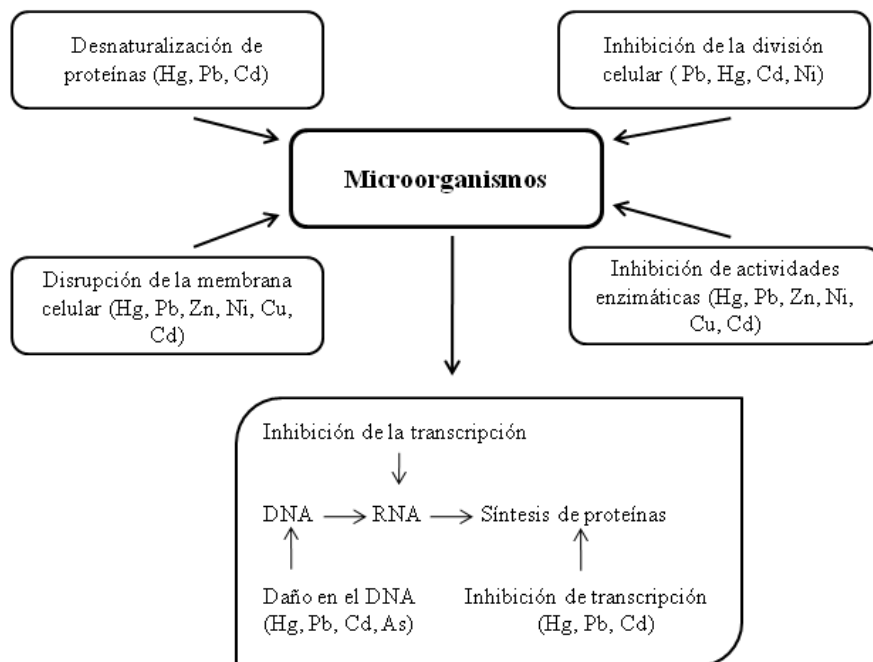


Figura 3.7. Mecanismos de toxicidad de algunos metales pesados en los microorganismos (Khan *et al.*, 2010).

La habilidad de crecer en concentraciones de metales por encima de las normas establecidas, ha sido reportada para diferentes microorganismos rizosféricos, y esta habilidad se atribuye a mecanismos intrínsecos o inducidos (Rahmanian *et al.*, 2011). Para

sobrevivir al estrés ambiental inducido por la presencia de metales, las bacterias pueden inmovilizar, movilizar o transformar a los metales, mediante los siguientes procesos (Khan *et al.*, 2010):

- *Exclusión*: los iones metálicos se mantienen alejados del sitio objetivo.
- *Extrusión*: los metales son sacados fuera de la célula a través de diferentes eventos que son regulados por cromosomas/plásmidos.
- *Adaptación*: los metales forman complejos con las metaloproteínas u otros componentes celulares.
- *Biotransformación*: los metales tóxicos son reducidos a formas químicas menos tóxicas.
- *Metilación y desmetilación*

Los mecanismos de resistencia de las bacterias se codifican en los plásmidos y transposones, y es probable que estos mecanismos se activen por transferencia de genes o mutaciones espontáneas. Los plásmidos codificantes dependen de la energía de salida de los sistemas metálicos, que incluyen ATPasas y bombas de protones quimiostáticas. Los límites de la toxicidad por metales para los microorganismos del suelo no son concluyentes, las interacciones entre metales y microorganismos ocurren de forma natural; además, estos microorganismos interactúan con los metales a través de diferentes mecanismos (Figura 3.8) y son usados en diversas estrategias para aumentar el potencial de la fitorremediación (Lloyd y Lovley, 2001).

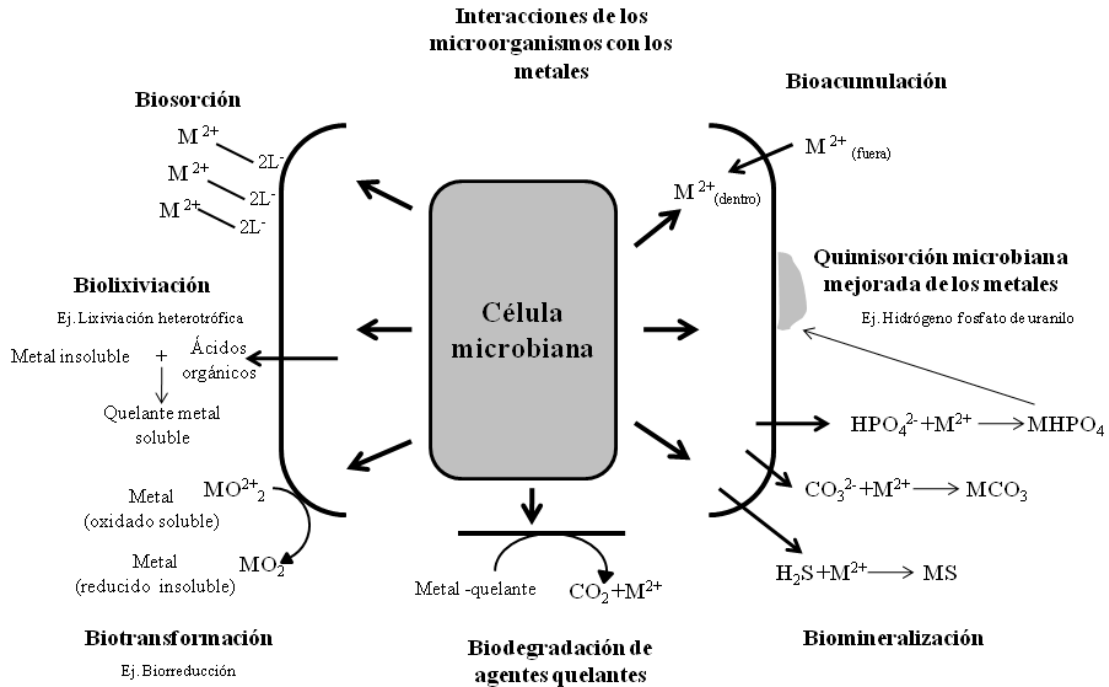


Figura 3.8. Interacciones metal-microorganismo que influyen en la biorremediación.

M= metal; M^{2+} = metal (Tabak *et al.*, 2005).

3.4 El petróleo crudo

El petróleo es una mezcla de compuestos orgánicos de origen fósil, insoluble en agua, producto de la descomposición de la materia orgánica procedente de restos de animales y vegetales, depositados en grandes cantidades en fondos anóxicos (Ayotamuno *et al.*, 2010). La transformación química debida al calor y a la presión durante la diagénesis (proceso de formación de roca a partir de sedimentos sueltos que sufren un proceso de consolidación), produce en etapas sucesivas los hidrocarburos ya sean líquidos o gases (Meléndez, 1982). Estos productos ascienden a la superficie debido a la porosidad de las rocas sedimentarias, y cuando se dan las circunstancias geológicas que impiden dicho ascenso se forman entonces los yacimientos petrolíferos (López de Mesa *et al.*, 2006).

Existen diferentes tipos de petróleo crudo dependiendo de sus propiedades físicas y químicas; sin embargo, para clasificar a un petróleo crudo generalmente se expresa en una escala normalizada por el Instituto Americano de Petróleo (API, por sus siglas en inglés) denominada gravedad API (Van-Epps, 2006). Con base en este parámetro el petróleo crudo se clasifica en diferentes tipos (Cuadro 3.4), mientras menor sean los grados API el crudo es más pesado. Los crudos pesados son de color oscuro a negro y no pueden ser producidos, transportados y refinados por los procesos establecidos para crudos ligeros. Un crudo ligero es usualmente rico en fracciones ligeras con baja concentración de heteroátomos (S, N, O y metales) y asfaltenos. Los crudos extrapesados son materiales que se encuentran en estado sólido o semisólido por lo que son incapaces de fluir en condiciones ambientales (Gómez *et al.*, 2003).

Cuadro 3.4. Clasificación de los tipos de petróleo crudo de acuerdo a los Grados API (Speight, 1999).

Petróleo crudo	Densidad (g mL⁻¹)	Grados API
Extrapesado	≥1.0	≤10.0
Pesado	0.92-1.01	10.1-22.3
Mediano	0.87-0.91	22.4-22.1
Ligero	0.83-0.86	31.2-39.0
Extraligero	≤0.83	≥39.0

El petróleo que se extrae en México corresponde en 60% a crudo pesado, teniendo como resultado una alta producción de residuos que empobrecen la calidad y la cantidad de los productos petroquímicos, lo cual se debe a las altas concentraciones de asfaltenos que

contiene; por ejemplo, el crudo Maya (14.5% del total del residuo), además de cenizas y residuos de carbón (17.2%) (IMP, 2011).

El petróleo es esencialmente una mezcla de hidrocarburos; pero contiene pequeñas cantidades de oxígeno, azufre, nitrógeno, vanadio, níquel y cromo, son primordialmente parafinas, anillos aromáticos, naftenos, resinas y asfaltenos (Gómez *et al.*, 2003). Cada uno es una familia individual de moléculas de hidrocarburo que comparten una característica estructural común, pero difieren en el número de átomos de carbono. Los hidrocarburos son los constituyentes más importantes del petróleo y están formados principalmente por carbono (76-87%) e hidrógeno (13-24%), mismos que se dividen en varias familias químicas según su estructura (Wauquier, 2004). Los hidrocarburos pueden ser alifáticos cuyos compuestos tienen cadenas abiertas, saturados si la molécula posee un enlace entre los átomos de carbono, e insaturados si tienen cuando menos un doble o triple enlace. Los alifáticos saturados son químicamente más estables que los insaturados (Freedman, 1989). En los hidrocarburos alicíclicos algunos o todos sus átomos de carbono están arreglados en una estructura de anillos y pueden ser saturados e insaturados (Botello, 2005). Los hidrocarburos aromáticos están presentes en una gran proporción en los crudos siendo su base elemental el anillo bencénico (Wauquier, 2004). Además de los hidrocarburos existen moléculas que contienen átomos diferentes al carbono e hidrógeno, por ejemplo los compuestos orgánicos con heteroátomos y los organometálicos (Melo y Cuamatzi, 2007). Los átomos de oxígeno, nitrógeno, azufre y metales como vanadio y níquel, son considerados los constituyentes polares del petróleo (Cuadro 3.5).

Cuadro 3.5. Intervalo de la composición del petróleo crudo a nivel mundial (Speight, 1999)

Composición	Intervalo de concentración (% peso)
Carbón	83.0-87.0
Hidrógeno	10.0-14.0
Nitrógeno	0.1-2.0
Oxígeno	0.05-1.5
Azufre	0.04-6.0
Asfaltenos	0.1-12
Residuos de carbón	0.2-10
Metales (Ni+V)	<1000 ppm

Las mayores reservas de petróleo en el mundo se concentran en los crudos pesados, presentando baja gravedad API y alta concentración de azufre. La cantidad de azufre, asfaltenos y metales contenidos en los crudos depende de su origen. México es un país petrolero, cuyos crudos de exportación son el Maya, el Istmo y el Olmeca (IIE, 1998). En el cuadro 3.6 se observa que el petróleo Maya sería considerado ligero de acuerdo con sus grados API pero es considerado como pesado debido a la gran cantidad de heteroátomos (S, N, O) y metales (Ni, V) que contiene. Los heteroátomos de azufre, nitrógeno y oxígeno, así como los metales no se encuentran en forma elemental en el petróleo, sino formando compuestos cuya complejidad varía con la estructura química del hidrocarburo y del número de carbonos. De esta manera los crudos pueden tener diferentes propiedades que los caracterizan y determinan su comportamiento para la elaboración de combustibles, lubricantes, ceras o solventes (Speight, 1999).

Cuadro 3.6. Comparación de propiedades químicas de tres petróleos de origen Mexicano Olmeca, Istmo y Maya (IIE, 1998).

	Maya	Istmo	Olmeca
Gravedad API	21.3	33.1	38.7
Análisis elemental (% wt)			
Carbón	83.96	85.4	85.91
Hidrógeno	11.8	12.68	12.8
Oxígeno	0.35	0.33	0.23
Nitrógeno	0.32	0.14	0.07
Azufre	3.57	1.45	0.99
Relación H/C	1.687	1.782	1.788
Metales (ppm)			
Níquel	53.4	10.2	1.6
Vanadio	298.1	52.7	8.0
Asfaltenos (% peso)			
nC5	14.10	3.63	1.05
nC7	11.32	3.34	0.75

Los metales contenidos en el petróleo crudo están presentes como metaloporfirinas y los más abundantes son las porfirinas de níquel y vanadio (Figura 3.9). Todos los petróleos crudos contienen metales y generalmente su concentración se incrementa en los crudos pesados; estos mismos compuestos pueden estar presentes en la molécula de asfalteno. Una característica importante del vanadio en la porfirina es que está unido a un átomo de oxígeno, mientras que el níquel no presenta esta particularidad (Speight, 2001; Gómez *et al.*, 2003).

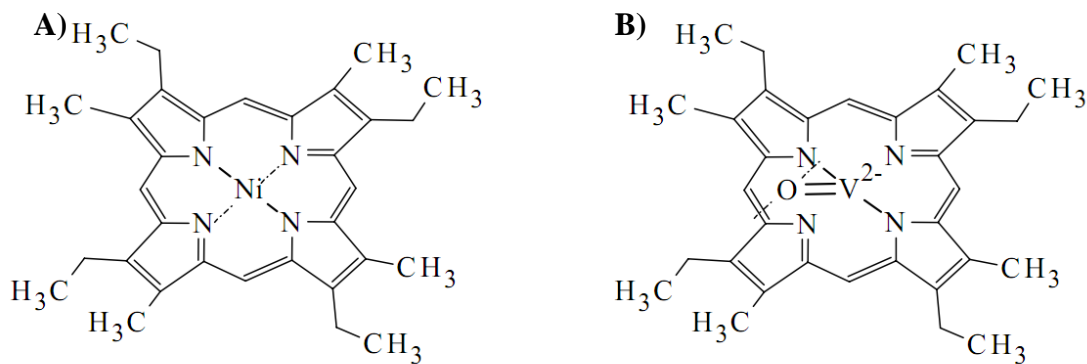


Figura 3.9. Metaloporfirinas de níquel (A) y vanadio (B) presentes en el petróleo crudo (Speight, 2001).

El contenido de los heteroátomos (S, N, O y metales) del petróleo y de los distintos tipos de hidrocarburos (parafinas, naftenos y aromáticos) incrementa conforme el crudo es más pesado y al aumentar el intervalo de ebullición (0-500 °C). El contenido de estos compuestos también depende del lugar de origen (cuadro 3.7); los petróleos de América son los que contienen más vanadio, mientras que en crudos provenientes de Venezuela las concentraciones van de 282 a 1,180 $\mu\text{g g}^{-1}$, en la variedad Athabasca de Canadá y la Maya de México el contenido es de 640 y 243 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente (Crans *et al.*, 2004).

3.5 Vanadio y níquel: Formas químicas y función en las plantas

El vanadio (V; Número atómico: 23; Masa atómica: 50.9415 u) es un metal de transición que a pH neutro puede existir en dos estados de oxidación: V(IV) (ión vanadil, especie catódica VO^{2+}) y V(V) (ión vanadato especie iónica H_2VO_4^-) (Rehder, 1992) y puede afectar diversos procesos biológicos. El vanadato es parecido al ión fosfato (HPO_4^{2-}) por lo que puede usar enzimas que metabolizan el mismo grupo funcional. Otra función

importante de estos iones de vanadio es la de formar complejos con grupos carboxilato, catecolato e hidroxamato que están presentes en diferentes sideróforos (Keller *et al.*, 1991

Cuadro 3.7. Características de las diferentes fracciones del petróleo crudo a 250 °C (Wauquier, 2004; Centeno *et al.*, 2004).

Crudo	Origen	Viscosidad	Asfáltenos	O	N	S	Ni	V
		(mm ² s ⁻¹)	(% p)	(*%p)	(*%p)	(*%p)	(**ppm)	(**ppm)
Batiraman	Turquía	1.180	22.1	0.53	0.49	7.04	99	153
Boscan	Venezuela	595	14.1	0.79	0.74	5.46	125	1.2
Lacq superior	Francia	81.1	13.2	0.57	0.42	4.94	19	29
Chauvin Source	Canadá	28	6.0	0.48	0.66	2.80	35	67
Bellshill Lake	Canadá	7.9	2.2	0.34	<0.3	1.97	11	18
Esmeralda	Congo	113	1.7	1.10	0.65	0.57	64	9
Anguila	Gabón	14.1	1.2	0.92	0.26	0.82	115	14
Duri	Sumatra	51	0.7	0.65	0.47	<0.1	39	1.5
Permatang	Sumatra	10.2	0.1	0.51	0.26	<0.1	15	0.6
Edjeleh	Argelia	5.3	0.1	0.73	0.34	<0.1	1.5	2.3
Hassi Messaoud	Argelia	2.32	0.1	1.93	0.38	<0.1	<0.2	<0.2
Maya	México	ns	11	0.34	0.36	3.51	53	252

*%p= porcentaje en peso **ppm= partes por millón ns= no se mencionan datos referenciales

El vanadio se encuentra en bajas concentraciones en todas las plantas y su absorción se da mediante procesos pasivos (Welch, 1973). Dentro de una misma especie vegetal, la variación en la concentración de vanadio es afectada por los niveles de este elemento en el suelo, la acidez del suelo y las condiciones de crecimiento de la especie, aunque el intervalo de variación no es muy grande. Para la mayoría de las plantas los niveles de vanadio son menores en la parte aérea que en las raíces y no están relacionadas con los niveles de este elemento en el suelo, la concentración media en plantas (hoja y tallo) es de 0.12 mg kg⁻¹ de peso fresco, 1 mg kg⁻¹ de peso seco, y 7 mg kg⁻¹ en cenizas (Trejo-Téllez *et al.*, 2007).

El vanadio puede actuar como catalizador redox en el transporte de electrones en los fotosistemas I y II; por ejemplo, en *Chlorella fusca* las concentraciones moderadamente

altas (0.1 mM) de vanadato y citrato de vanadyl incrementan la producción fotosintética de O₂. A una concentración de 20 mM de V la reacción del fotosistema I es máxima, mientras que a menores concentraciones (0.2 mM) solo en ión vanadato estimula la fotosíntesis. En la mayoría de los organismos cuando las células se exponen a concentraciones mayores a 50 μM de sulfato de vanadil a un pH mayor a 4.0 se observan pérdidas en los niveles de potasio sugiriendo daño en la membrana plasmática ocasionado por la presencia de vanadio (Bode *et al.*, 1990). También se ha encontrado que este metal puede alterar los flujos de Ca²⁺ en las células inhibiendo el sistema de transporte de ATPasas (Delfert y McDonald, 1985); además, puede causar efectos tóxicos en soya, arroz, trigo y cebada en presencia de VCl₃ (2.5 μg V mL⁻¹) (Tham *et al.*, 2001). No obstante se necesita profundizar más en cuanto a estudios relacionados con los mecanismos de absorción y transporte y en las rutas de señalización que regulan la expresión genética dependientes de este elemento, así como en el tipo de proteínas y metabolitos relacionados en los procesos mencionados.

Una de las funciones del vanadio se relaciona con la V-nitrogenasa. La nitrogenasa es la enzima responsable de la fijación biológica de nitrógeno, desde su descubrimiento se ha aceptado que el molibdeno (Mo) tiene un papel fundamental para el funcionamiento de la nitrogenasa; sin embargo, algunas cepas de *Azotobacter* son incapaces de sintetizar Mo-nitrogenasa y en su lugar producen V-nitrogenasa (Hales *et al.*, 1986). A pesar de que todos los organismos que fijan nitrógeno tienen una Mo-nitrogenasa, estudios genéticos y fisiológicos demostraron que la V-nitrogenasa se encuentra ampliamente distribuida, pero se sintetiza cuando el Mo es un factor limitante (Eady, 2003).

El vanadio no se encuentra en forma pura en la naturaleza, por sus propiedades intrínsecas es propenso a reaccionar con otros elementos y su liberación a la atmósfera es ocasionada, en la mayoría de las veces por la actividad humana por lo que es considerado

un contaminante ambiental. De las 64 mil toneladas de vanadio descargadas anualmente, alrededor del 91% son producidas por la combustión del petróleo, carbón, aceites pesados y el 9% restante deriva de la erosión del suelo, las emisiones volcánicas, incendios forestales, entre otros procesos (IPCS, 2001).

Los niveles de vanadio en el ambiente dependen de las condiciones climáticas, la posición geográfica y la urbanización. Para la Ciudad de México se han reportado valores de vanadio que alcanzan $0.114 \mu\text{g m}^{-3}$ en partículas aéreas de $10 \mu\text{m}$, y $0.093 \mu\text{g m}^{-3}$ en las partículas de $2.5 \mu\text{m}$ (Gutiérrez-Castillo *et al.*, 2006). En el agua potable se reportan valores por debajo de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, con un promedio de $4.3 \mu\text{g L}^{-1}$, mientras que en ríos cercanos a minas y mantos acuíferos ubicados cerca de zonas industriales se han encontrado cantidades que van de 49.2 a $70 \mu\text{g L}^{-1}$ (Gutiérrez-Castillo *et al.*, 2006). La concentración promedio de este metal en el suelo es alrededor de $100 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco, pero en suelos cercanos a plantas metalúrgicas los valores superan los $400 \mu\text{g g}^{-1}$ (IPCS, 2001).

El níquel (Ni; Número atómico: 28, Masa atómica: 50.71 u) puro es un metal duro, blanco-plateado, que tiene propiedades que lo hacen muy deseable para formar aleaciones con otros metales, como hierro, cobre, cromo y zinc (ATSDR, 2005). El níquel ocupa el lugar número 24 en la lista de elementos más abundantes en la corteza terrestre. En el ambiente se encuentra principalmente combinado con oxígeno o azufre en forma de óxidos o sulfuros. También se encuentra en meteoritos y en el fondo del océano formando masas de minerales llamadas nódulos del fondo del mar. El centro de la tierra está compuesto de 6% de níquel (Kerr, 2005). La liberación de Ni a la atmósfera se propicia cuando se extrae de minas y por industrias que fabrican o usan níquel, aleaciones o compuestos de este elemento. Estas industrias también pueden desecharlo a través de las aguas residuales y por plantas de energía que queman petróleo o carbón (Oyarzún, 2009).

El níquel es el elemento más recientemente reconocido como esencial (Salisbury y Ross, 2004), cuyo contenido en plantas cultivadas varía de 0.1 a 1.0 mg kg⁻¹ de peso seco y su forma aprovechable es como ión Ni²⁺. El Ni es componente de la enzima ureasa, (responsable de la hidrólisis de la urea) por lo que las plantas deficientes de este elemento acumulan niveles tóxicos de urea en los ápices de las hojas (Chen *et al.*, 2009).

El riego con aguas negras industriales puede provocar niveles elevados de Ni en las plantas, lo que puede inducir deficiencia de Fe o Zn por competencia de absorción catiónica (Núñez-Escobar, 2007). Además, la deficiencia de níquel perturba el metabolismo de los ureidos, aminoácidos y ácidos orgánicos, además de propiciar la acumulación de los ácidos oxálico y láctico (Bai *et al.*, 2006). Las manchas necróticas asociadas con la deficiencia de Ni corresponden a los sitios de acumulación de urea o de los ácidos oxálico y láctico, lo que indica también que existen cambios en el metabolismo del carbono, en particular una disminución en la respiración (Wood *et al.*, 2006). Estos efectos sugieren que el Ni cumple diferentes funciones importantes en las plantas superiores.

Este metal también está involucrado en la fijación simbiótica de nitrógeno, ya que incrementa la actividad hidrogenasa en los bacteroides aislados de los nódulos radicales. Algunos experimentos en campo han encontrado que la adición de hasta 40 g de Ni ha⁻¹ aumenta la nodulación y el rendimiento en grano de *Phaseolus vulgaris* L. (Singh *et al.*, 2005). También se ha encontrado que la forma de transporte del amonio fijado en los nódulos de la raíz en *Glycine max* son ureidos cuyo metabolismo implica la formación de urea la cual sólo puede hidrolizarse en presencia de ureasa (Walker *et al.*, 1985). Además los niveles bajos de Ni en los suelos agrícolas pueden limitar la actividad simbiótica de *Rhizobium leguminosarum* (Klucas *et al.*, 1983).

Las plantas cultivadas en suelos no contaminados por níquel tienen concentraciones de Ni que van de 0.05 a 5 g kg⁻¹ de peso seco, y esta variación es causada por la disponibilidad de Ni en el suelo y por las especies vegetales que se encuentren en ese lugar. Los diferentes órganos o partes de las plantas pueden tener diferentes contenidos de Ni; por ejemplo, el contenido de Ni en el borde de la hoja de frijol es alto durante el crecimiento vegetativo, pero al momento de la cosecha, los granos contienen más Ni que la paja (Gerendas *et al.*, 2000). El aumento en los niveles de NH₃ en las hojas puede inducir la floración (Lovatt *et al.*, 1988). Esto sugiere que altos niveles de Ni en las flores incrementa la actividad ureasa y genera NH₃ lo que puede estimular la floración y el porcentaje de amarre del fruto en frijol (Malavolta, 2006). Los síntomas de toxicidad se originan cuando se absorben niveles excesivos de Ni, presentándose clorosis por la reducción de la absorción de hierro, poco crecimiento de la raíz y de la parte aérea, la deformación de varias partes de la planta, y la presencia de manchas inusuales de las hojas (Mishra y Kar, 1974). Las plantas varían en su sensibilidad o tolerancia para el exceso de Ni. Los niveles tóxicos en las plantas están comúnmente en el rango de 25 a 50 mg kg⁻¹. Sin embargo, existen especies que soportan altos niveles de Ni en el sustrato y en el tejido. Estas plantas (hiperacumuladoras) logran prosperar en suelos ricos en Ni, usualmente de origen ultramáfico (baja disponibilidad de nutrientes y altas concentraciones de Mg y metales pesados) o suelos contaminados por la actividad minera e industrial (Kidd *et al.*, 2007).

La absorción del Ni se lleva a cabo en el sistema radicular a través de difusión pasiva y mediante transporte activo (Seregin y Kozhevnikova, 2006). La proporción de absorción entre los dos mecanismos, varía según la especie vegetal, la forma química y la concentración de Ni en el suelo. Los compuestos solubles del Ni²⁺ también pueden ser absorbidos a través del sistema de transporte de iones Mg²⁺, debido a la relación similar

carga/tamaño de estos dos iones metálicos (Oller *et al.*, 1997). La absorción depende de la concentración de Ni^{2+} , el metabolismo de la planta, la acidez del suelo o solución nutritiva, la presencia de otros metales y la composición de la materia orgánica (Chen *et al.*, 2009). El transporte de Ni ocurre desde las raíces a los brotes y hojas a través del xilema. Este elemento esencial es suministrado a zonas meristemáticas de las plantas mediante retranslocación de las hojas viejas a las jóvenes, yemas, frutos y semillas, a través del floema, aunque más del 50% del Ni absorbido se conserva en raíces debido a la retención en los sitios de intercambio catiónico de la pared celular del parénquima y a la inmovilización en vacuolas (Seregin y Kozhevnikova, 2006).

Las fuentes de contaminación ambiental en las ciudades están determinadas por las emisiones generadas por las actividades vinculadas a la producción de energía. Las formas químicas predominantes en el aire son el sulfato de níquel (NiSO_4), los óxidos complejos del níquel y otros metales (hierro principalmente), y en menor escala el sulfuro de níquel (NiS) y níquel metálico (Ni^{2+}). Las principales fuentes primarias de emisión de este metal al aire son la combustión de los productos del petróleo (quema de carbón y aceite para la generación de energía y/o calor), la industria minera (fundición y refinación), incineración de desechos municipales, industria intermedia (manufactura de acero y galvanoplastia), y por la combustión de vehículos automotores (Kiikkilä, 2003). Para las zonas rurales se tienen concentraciones de Ni en un rango de 1-20 ng m^{-3} , mientras que en las zonas urbanas hay de 10-60 ng m^{-3} (Parida *et al.*, 2003).

En suelo agrícolas la concentración típica de Ni fluctúa en un rango que va de 5 a 500 $\mu\text{g g}^{-1}$, y para tierras no agrícolas el rango va de 4 a 80 $\mu\text{g g}^{-1}$. Además se han encontrado niveles tan altos como 24 000 $\mu\text{g g}^{-1}$ en suelos cercanos a refinerías (Giordani *et al.*, 2005).

En México, existen zonas contaminadas debido a la actividad petrolera, en las que se evaluó el contenido de metales pesados (Cd, Cu, Cr, Ni, V, Pb, Zn) en suelo del campo petrolero Samaria, Tabasco. A partir del análisis de cuatro perfiles de suelo en un transecto definido de acuerdo con las densidades de instalaciones petroleras (alta, media, baja y nula), se encontró que la concentración de los metales se ubica por encima de los niveles que se consideran como críticos, el vanadio se concentra en los horizontes superficiales, mientras que el níquel presentó concentraciones elevadas en todos los horizontes de los perfiles. La presencia de Ni y V en los diferentes perfiles posiblemente se debió a los aportes de la explotación petrolera, además de la contaminación derivada de la quema de gases, y por los contenidos naturales en los sedimentos aluviales (Zavala-Cruz *et al.*, 2003).

3.6 Los microorganismos simbióticos en la fitorremediación de suelos contaminados por metales e hidrocarburos

El uso de procesos biológicos ha sido propuesto para destoxificar residuos y remediar sitios afectados por las diferentes actividades antropogénicas, debido a que son más prácticos y económicamente factibles para el manejo y tratamiento de los diferentes tipos de residuos, por ejemplo aquellos que son producto de la explotación petrolera (Peña-Castro *et al.*, 2006). Los métodos biológicos dependen de la capacidad de los microorganismos para degradar residuos orgánicos tóxicos a productos inocuos (dióxido de carbono, agua y biomasa) a través de reacciones bioquímicas. Una alternativa para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos, metales, metaloides, etc., es el uso de plantas asociadas a microorganismos, cuyos exudados radicales contribuyen a la precipitación de los contaminantes reduciendo su biodisponibilidad a través de la liberación

de enzimas específicas o cofactores enzimáticos que propician la transformación del contaminante (Kucerová *et al.*, 2001).

Algunas especies de plantas probadas con éxito en la fitorremediación de hidrocarburos del petróleo y metales son *Zea mays* L., *Panicum maximum* Jacq., *Paspalum virgatum* L., *Echinochloa polystachya* H.B.K., *Sorghum vulgare* L., *Phaseolus vulgaris* L., *Phaseolus coccineus* L., entre otras (Pérez-Vargas *et al.*, 2002). En lo que respecta a microorganismos de vida libre, los estudios realizados se han enfocado al aislamiento de bacterias y hongos filamentosos de zonas contaminadas y con capacidad de degradar petróleo crudo y fracciones específicas, así como bacterias heterotróficas y bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico de vida libre, algunas cianobacterias, y hongos filamentosos de los géneros *Penicillium*, *Trichoderma* o *Aspergillus* han sido caracterizados como degradadores de hidrocarburos (George-Okafor *et al.*, 2009). En contraste, los microorganismos simbióticos han recibido poca atención como elementos biológicos dirigidos para estimular la fitorremediación (Agudelo-Betancour, 2005).

El establecimiento de diferentes simbiosis entre plantas y microorganismos ha sido estudiado para la descontaminación de suelos, en especial aquellas simbiosis que tienen algún interés agronómico, como la que se da entre las leguminosas y los rizobios. Algunas estrategias que se han implementado para tener mayor eficiencia de la fitorremediación de contaminantes es la combinación de estos procesos biológicos con la bioaumentación, ya que la liberación de nutrientes por las raíces de las plantas crea un ambiente rico en fuentes de carbono que incrementa la actividad microbiana (Zhuang *et al.*, 2007). Las poblaciones de rizobios desarrollan resistencia cuando se inoculan en suelos contaminados por metales, aunque todavía se desconocen los mecanismos a nivel celular y molecular (Khan *et al.*, 2010). A pesar de estas características, se ha reportado que la elevada concentración de

metales en el suelo afecta la nodulación y la fijación de nitrógeno en *Vicia faba*, *Glycine max* y *Lupinus*, y afecta la sobrevivencia de *Rhizobium*, ya que su población se reduce en altas concentraciones de Zn y Cd, además disminuye el número de nódulos (Younis, 2007). En los últimos años, el interés por los rizobios para utilizarlos en la remediación de suelos contaminados por metales ha aumentado debido a la influencia que ejercen en la solubilidad, la biodisponibilidad y la movilidad de los metales entre la rizosfera y el hospedero, además de ayudar a mantener el N en los suelos (Pereira *et al.*, 2006).

Los rizobios crecen lentamente por largos periodos en el suelo hasta que encuentran una leguminosa compatible, y se da la formación de nódulos con capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. Una vez establecida la simbiosis, los metales [NiCl₂, CdSO₄, CuSO₄ y Pb(NO₃)₂] pueden acumularse en los nódulos radicales de *Vigna radiata* (Nie *et al.*, 2002). La investigación actual se ha centrado en el mejoramiento genético de diferentes cepas de rizobios para aprovechar sus capacidades como bacterias promotoras del crecimiento vegetal y posteriormente, introducirlas al ambiente. Por ejemplo, el gen que codifica la metaloproteína arabidopsis fitoquelatina sintasa (PCS) se introdujo en *Mesorhizobium huakuii* Rengei B3, la cual expresa un promotor específico del bacteroide (nifH o nolB) dando como resultando cepas acumuladoras de cadmio (Perret *et al.*, 1999). La fitorremediación también depende de factores como la presencia o liberación de metabolitos primarios y secundarios además del establecimiento y colonización de los rizobios, la supervivencia y las interacciones ecológicas con los demás organismos de la rizosfera (Khan *et al.*, 2009). Por ejemplo, al inocular *Vigna radiata* con cepas de *Bradyrhizobium* en diferentes concentraciones de Ni y de Zn, se encontró que la inoculación mejoró significativamente el crecimiento de la planta, además la simbiosis

redujo la absorción de Ni y de Zn por los tejidos de la planta y estimuló una mayor disponibilidad de nitrógeno (Wani *et al.*, 2007).

El estrés ambiental producido por la exposición de elevadas concentraciones de metales pesados, puede afectar la homeostasis celular reflejándose en un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno tales como el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) principalmente, que causan oxidación en proteínas y lípidos de la membrana, daños en el ADN y en consecuencia, los tejidos dañados por este estrés oxidativo presentan un aumento en la producción de etileno (Schützendübel y Polle, 2002). Los nódulos tienen una alta capacidad para sintetizar productos químicos perjudiciales debido a las altas tasas de respiración, las condiciones necesarias para la reducción del N_2 y la tendencia de la leghemoglobina para autooxidarse (Dalton, 1995). Debido a estas características las leguminosas y los rizobios tienen un sistema de defensa eficaz para eliminar las especies reactivas de oxígeno. La enzima glutatión reductasa, desintoxica de H_2O_2 a través del ciclo ascorbato-glutation, y su actividad ha sido identificada en raíces y nódulos de plantas de chícharo cultivadas en suelos contaminados con níquel y zinc. Las plantas inoculadas con rizobios tuvieron mayor actividad de esta enzima, sugiriendo que a mayor concentración de estos metales se induce la actividad de la glutatión reductasa por el estrés oxidativo inducido por la generación de especies reactivas de oxígeno (Lima *et al.*, 2006).

Las diversas actividades humanas han ocasionado que toneladas de residuos tóxicos orgánicos e inorgánicos se movilicen, dando como resultado un impacto negativo directo en la salud humana y en la diversidad biológica. Por el ejemplo, el petróleo y sus derivados representan la fuente de energía básica que sustentan las actividades económicas, aunque también contribuyen ampliamente al calentamiento global y a la liberación de moléculas

tóxicas (Hall *et al.*, 2003). En diversos estudios se ha demostrado que la degradación de los hidrocarburos es más rápida en suelos con vegetación, debido a que la planta y los microorganismos asociados a su rizosfera participan activamente en los diferentes procesos para llegar a la degradación de compuestos orgánicos.

Además de las bacterias, también los hongos micorrízicos tienen importancia en los procesos de fitorremediación, lo que puede deberse a que las plantas asociadas a los HMA presentan un aumento en la absorción de nutrientes, y agua, además de estimular las poblaciones de bacterias, y proteger a la raíz del ataque de patógenos y del estrés (sequía, heladas, etc.) (Peña *et al.*, 2006). En este sentido la inoculación de *Funneliformis mosseae* en *Triticum aestivum*, *Vigna radiata* y *Solanum melongena* en presencia de hidrocarburos policíclicos aromáticos (500 mg kg⁻¹ de antraceno, criseno y pireno), mejoró la disposición de estos hidrocarburos en el suelo, además de que estas plantas presentaron mayor supervivencia y crecimiento, aunque se redujo el porcentaje de colonización con respecto a las plantas establecidas en suelo no contaminado (Rabie, 2005). Las investigaciones sobre la fitorremediación de hidrocarburos y sus derivados se han enfocado en el uso de modelos en los que se aplican compuestos simples o algunas mezclas de hidrocarburos en concentraciones bajas. Binet *et al.* (2000) probaron una mezcla de hidrocarburos policíclicos aromáticos (1000 mg kg⁻¹) de suelo con plantas y sin plantas inoculadas con *Funneliformis mosseae*, con lo que obtuvieron una eliminación de hidrocarburos del 65% y 39%, respectivamente.

Los mecanismos involucrados en los HMA aplicados a la fitorremediación de hidrocarburos no se han estudiado ampliamente (Davis *et al.*, 2002). Se cree que el beneficio de los HMA se debe a efectos directos en la actividad enzimática de la raíz y a efectos indirectos como la aireación, el consumo de agua, la actividad y la composición

microbiana derivada de la entrada de carbono, y la exudación de compuestos fenólicos que inducen la actividad enzimática y las rutas metabólicas que ayudan a degradar los contaminantes orgánicos, además de influir en el pH, en el potencial de óxido-reducción, en el potencial osmótico, etc. (Joner y Leyval, 2003).

Por otro lado, las investigaciones realizadas sobre el papel de los HMA en la fitorremediación de metales pesados, demuestran la participación activa de estos microsimbiontes. La contaminación del suelo debida a elementos potencialmente tóxicos como los metales, es uno de los problemas ambientales más importantes en muchas regiones del mundo. La mayoría de las plantas que crecen en suelos contaminados con elementos potencialmente tóxicos están asociadas a los HMA (Becerril *et al.*, 2006). La micorriza sirve como interfase entre el suelo y las raíces de las plantas hospederas, sugiriendo que los HMA desempeñan un papel relevante en la protección contra elementos tóxicos porque influyen en la utilización de nutrimentos, al afectar su movimiento, transporte y traslocación del suelo hacia la planta y al estimular mecanismos de tolerancia a altas concentraciones a ciertos elementos del suelo (Gianinazzi-Pearson, 1996; González-Chávez, 2007).

Los HMA han coevolucionado con ciertas especies de plantas que crecen en suelos contaminados (Hildebrandt *et al.*, 2007), es posible que los HMA contribuyan en la resistencia de las plantas hacia los metales y fomentar su coexistencia con dichas plantas (González-Chávez, 2007). Diferentes especies de HMA han sido aisladas de suelos contaminados con lodos que tienen un alto contenido de Cd y de Pb (del Val *et al.*, 1999). En condiciones naturales se ha observado que el desarrollo de la micorriza arbuscular es afectado en algunos suelos contaminados con metales, pero en otros no hay un efecto aparente (Karimi *et al.*, 2011).

Se han propuesto diferentes estrategias para explicar el efecto protector de la micorriza arbuscular en plantas contra los metales, entre las que se destaca el mejor estado nutricional favorecido por las redes hifales que proveen nutrimentos hacia la planta, la restricción de la absorción del metal mediante la síntesis de glicoproteínas insolubles como la glomalina (González-Chávez *et al.*, 2004). Sin embargo, la micorrización permite la traslocación de los metales de las raíces a los brotes de plantas hiperacumuladoras favoreciendo con ello la fitoextracción de metal. Asimismo, las células fúngicas tienen una alta capacidad de adsorción de metales por la presencia de grupos carboxilo, amino, hidroxilo, fosfato y sulfhidrilo, así como por los componentes de la pared celular (quitina), aunque las cepas de HMA tolerantes parecen tener una alta capacidad de adsorción (Joner *et al.*, 2000). La quelación de los metales pesados en el citoplasma fúngico y vegetal es favorecido mediante la síntesis de metalotioneínas y fitoquelatinas, lo cual se ha propuesto como otro mecanismo de tolerancia hacia los metales (Caballero-Mellado y Rivera-Becerril, 2006).

La interacción entre las diferentes poblaciones de bacterias, los HMA y las plantas favorecen los procesos de desintoxicación en el suelo. La inoculación de un consorcio de bacterias promotoras del crecimiento vegetal y *Rhizophagus intraradices* aumentó significativamente la absorción y la acumulación de Cd^{2+} y Zn^{2+} en *Zea mays* (Gharemaleki *et al.*, 2010). La resistencia al metal generada por los microorganismos induce también cierta resistencia en aquellas plantas sensibles a concentraciones elevadas de metales pesados. En un experimento con plantas de *Trifolium repens* ante diferentes concentraciones de NiSO_4 (30, 90 y 270 mg kg^{-1}) e inoculadas con *Funneliformis mosseae* y *Brevibacillus brevis*, se encontró mayor crecimiento por efecto de los microorganismos, resultado que se atribuye a la capacidad de *B. brevis* para tolerar la presencia de níquel y a

la tolerancia de *Funneliformis mosseae* para crecer bajo estas condiciones, y con ello favorecer la capacidad de fitorremediación (Vivas *et al.*, 2006b).

El uso de la fitorremediación con plantas en simbiosis con rizobios y HMA, no se encuentra altamente difundido para el caso de metales como el níquel y el vanadio. Para el caso de metales, las investigaciones se han enfocado, en adicionar quelantes como el EDTA y el ácido cítrico para ayudar a la planta a acumular el metal (Turgut *et al.*, 2004). Lo anterior ha dejado de lado la evaluación del efecto que puede tener la simbiosis tripartita (*Rhizobium*-leguminosa-micorriza arbuscular) (January *et al.*, 2008).

CAPÍTULO IV

TOLERANCIA DE *Phaseolus vulgaris* Y *Rhizobium tropici* HACIA VANADIO Y NÍQUEL, Y EFECTOS EN EL CONTENIDO ELEMENTAL DE NÓDULOS

RESUMEN

Este trabajo evaluó la tolerancia de la simbiosis entre *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo y *Rhizobium tropici* CIAT899 ante concentraciones (0, 25, 50, 75, 100 y 120 mg L⁻¹), de V (O₅SV·H₂O) y/o Ni (NiSO₄·6H₂O). Las plántulas de *P. vulgaris* sin inocular e inoculadas con *R. tropici* (4.24 x 10⁹ UFC mL⁻¹) fueron crecidas en bolsas de crecimiento (growth pouch) con 40 mL de solución nutritiva de Jensen, con y sin la aplicación de los metales, durante 30 días bajo condiciones controladas. Se evaluó la dinámica de nodulación a partir del cuarto día después de la inoculación, hasta los 30 días, para determinar el peso seco total, el contenido de clorofila total, y la actividad nitrogenasa. Para ambos metales, la mayor nodulación se presentó en el testigo (sin metal), y la formación de nódulos fue visible a partir del séptimo día para la mayoría de las concentraciones, a excepción de la concentración de 50 mg V L⁻¹. Las concentraciones de V a 25 y 120 mg L⁻¹, estimularon la formación de nódulos. El peso seco total mostró diferencias significativas ante 0, 50 y 120 mg V L⁻¹, mientras que para Ni se encontraron diferencias significativas por efecto de la inoculación y de su concentración. El contenido total de clorofilas y la actividad nitrogenasa no mostraron diferencias significativas entre tratamientos en ambos metales. Las plantas en las concentraciones de 0, 25 y 50 mg V L⁻¹ no mostraron acumulación de este elemento, mientras que ante 75, 100 y 120 mg V L⁻¹, se acumuló principalmente en los nódulos. El contenido de S, Mn, Fe y Zn en nódulos fue estimulado ante 25 mg V L⁻¹, mientras que concentraciones mayores a 50 mg V L⁻¹ redujeron el contenido de S, Fe y Cu en comparación con el testigo sin V. Ante Ni, el contenido de P, S, Mn y Zn no fue alterado; mientras que para Cl, Ca y Cu, su contenido disminuyó, especialmente ante 100 y 120 mg Ni. En contraste, el contenido de K y Fe fue estimulado con la aplicación de 25 y 50 mg Ni L⁻¹.

Palabras clave: Metales, nodulación, peso seco, clorofilas, actividad nitrogenasa, rayos X.

CHAPTER IV

TOLERANCE OF *Phaseolus vulgaris* AND *Rhizobium tropici* TO VANADIUM AND NICKEL, AND EFFECTS ON THE ELEMENTAL CONTENT OF NODULES

ABSTRACT

This study evaluated the tolerance of the symbiosis between *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo and *Rhizobium tropici* CIAT899 to concentrations (0, 25, 50, 75, 100 and 120 mg L⁻¹), of V (O₅SV·H₂O) or Ni (NiSO₄·6H₂O). Seedlings of *P. vulgaris* without or with the inoculation of *R. tropici* (4.24 x 10⁹ UFC mL⁻¹) were grown in a growth pouch system with 40 mL of Jensen nutrient solution either contaminated or not with the metals, during 30 days under controlled conditions. The nodulation kinetic was evaluated since the fourth day after the inoculation during 30 days. After 30 days, the total dry weight (TDW), the total chlorophyll content (TCC), and the nitrogenase activity (AN) were determined. For both metals, the higher nodulation was observed at controls, and the nodule formation was visible after the seventh day for most treatments, excepting at 50 mg V L⁻¹. Concentrations of 25 and 120 mg V L⁻¹ stimulated nodule formation. The TDW showed significant differences at 0, 50 and 120 mg V L⁻¹; meanwhile, Ni had significant effects due to bacterial inoculation and to Ni-concentrations. The TCC and NA had no significant effects among treatments for both metals. Plants at 0, 25 and 50 mg V L⁻¹ had no accumulation of this metal in root nodules, but it was significantly accumulated at 75, 100 and 120 mg V L⁻¹. The content of S, Mn, Fe and Zn was stimulated at 25 mg V L⁻¹, whereas concentrations higher than 50 mg V L⁻¹ resulted in diminished content of S, Fe, and Cu when compared to the control without V. For Ni, the content of P, S, Mn, and Zn was unaltered; however, content of Cl, Ca and Cu was reduced, especially at concentrations of 100 and 120 mg Ni L⁻¹. In contrast, the content of K and Fe was stimulated with the application of 25 and 50 mg Ni L⁻¹.

Key words: *Metals, nodulation, plant dry mass, chlorophyll, nitrogenase activity, X-ray*

INTRODUCCIÓN

La fitorremediación es una vertiente de la biorremediación que se considera una alternativa tecnológica rentable y sostenible para la degradación y/o disminución de la peligrosidad de contaminantes orgánicos e inorgánicos (Robinson *et al.*, 2006). En la fitorremediación se usan plantas (Vassilev *et al.*, 2004) e interacciones con microorganismos asociados a la rizosfera (Kirk y Cain, 1996) para acumular, degradar o excluir sustancias tóxicas mediante procesos metabólicos (Le Duc y Terry, 2005). Esta técnica incluye varios procesos que involucran la exclusión, la mineralización, la reducción química, la solubilización, la quelación, la redistribución, y la acumulación de los metales contaminantes (Khan *et al.*, 2010). No obstante, la eficiencia de la remoción de los contaminantes dependerá de la planta utilizada, de su etapa fenológica, el tipo de contaminantes, y la capacidad de interactuar con los microorganismos (Singh *et al.*, 2007).

Los metales pesados son los contaminantes industriales más significativos ya que son selectivamente tóxicos, persistentes y no biodegradables (Singh *et al.*, 2005). Los mecanismos de unión de las sustancias orgánicas a los metales son complejos y cambian de acuerdo a la composición, la acidez y las condiciones redox del suelo (Thangavel y Subburaam, 2004). Además, una pequeña fracción de los metales que están presentes en el suelo se encuentran disponibles para las plantas (Vassilev *et al.*, 2004). Ciertos microorganismos del suelo han desarrollado mecanismos para disminuir el estrés inducido por la presencia de metales, que incluyen el bombeo de iones fuera de la célula, la acumulación y el secuestro de los iones metálicos dentro de la célula, la adsorción y la desorción de los compuestos (Wani *et al.*, 2008).

Los metales contenidos en el petróleo crudo están presentes como metaloporfirinas y las más abundantes son las porfirinas de vanadio y níquel, y cambian de acuerdo al

origen; por ejemplo, en los crudos provenientes de Venezuela las concentraciones de vanadio van de 282 a 1180 $\mu\text{g g}^{-1}$, mientras que el crudo Maya (México) contiene de 640 a 243 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Crans *et al.*, 2004).

El vanadio y el níquel son metales de transición que cumplen una función biológica. El vanadio puede actuar como catalizador redox en el transporte de electrones en los fotosistemas I y II, dependiendo de las condiciones del cultivo y de la intensidad lumínica (Bode *et al.*, 1990); y puede alterar los flujos de Ca^{2+} en las células inhibiendo el sistema de transporte de ATPasas (Delfert y McDonald, 1985). Una de las funciones del vanadio se relaciona con la actividad V-nitrogenasa; enzima responsable de la fijación biológica de nitrógeno (Newton, 2007). Desde el descubrimiento de esta enzima, el molibdeno (Mo) tiene un papel fundamental para el funcionamiento de la nitrogenasa; sin embargo, algunas cepas de *Azotobacter* son incapaces de sintetizar Mo-nitrogenasa y en su lugar producen V-nitrogenasa (Hales *et al.*, 1986). A pesar de que todos los organismos que fijan nitrógeno tienen una Mo-nitrogenasa, estudios genéticos y fisiológicos demostraron que la V-nitrogenasa se encuentra ampliamente distribuida, la cual se sintetiza cuando el Mo es un factor limitante (Eady, 2003).

El níquel es un elemento esencial cuyo contenido en las plantas cultivadas varía de 0.1 a 1.0 mg kg^{-1} (Eskew *et al.*, 1984; Seregin y Kozhevnikova, 2006). Este elemento es componente de la enzima ureasa (responsable de la hidrólisis de la urea); cuando hay deficiencia de níquel, la urea se acumula en los ápices de las hojas (Wood *et al.*, 2006). Además, el níquel tiene un papel importante en la fijación biológica de nitrógeno, ya que incrementa la actividad hidrogenasa de los bacteroides (Zobiolo *et al.*, 2010).

Las leguminosas establecen simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico, y esta simbiosis ha sido poco estudiada durante la fitorremediación de metales,

como el vanadio y el níquel (Robinson *et al.*, 2006). La simbiosis entre las leguminosas y las bacterias fijadoras de nitrógeno, ha recibido cierta atención debido al interés agronómico que se deriva de esta simbiosis (Giordani *et al.*, 2005). Algunas especies de leguminosas probadas con éxito en la fitorremediación son *Phaseolus vulgaris* L., *P. coccineus* L., *Leucaena leucocephala* L., *Medicago sativa* L., *Glycine max* L., entre otras (Kaimi *et al.*, 2007). En cuanto a los microorganismos, la mayor atención se ha centrado en aquellos de vida libre, en contraste las bacterias simbióticas han recibido poca atención (Khan *et al.*, 2010). Las poblaciones de rizobios desarrollan resistencia cuando son inoculadas en suelos contaminados con metales, y pueden influir en la solubilidad, la biodisponibilidad y la movilidad de los metales en la rizosfera, y favorecer la incorporación del nitrógeno en el suelo (Zhuang *et al.*, 2007).

Por lo anterior, este estudio propuso el uso de la simbiosis entre *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo y *Rhizobium tropici* CIAT899, como modelo para evaluar su tolerancia ante vanadio y níquel bajo condiciones controladas, así como analizar la dinámica de nodulación y el contenido elemental en los nódulos radicales, por efecto de ambos metales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fase I. Evaluación del efecto de vanadio y níquel en la simbiosis *Rhizobium* - leguminosa en bolsa de crecimiento

La cepa de *Rhizobium tropici* CIAT899 fue reactivada en medio de cultivo ELMARC (Extracto de levadura manitol rojo congo) (Anexo Cuadro 1A) en cajas de petri, incubadas a 28 °C durante 72 h. Una vez reactivada, se tomó una asada de la colonia bacteriana y se transfirió a tubos con agar con medio ELMA (Anexo Cuadro 1A) inclinado para su conservación y posterior uso.

El inóculo bacteriano fue preparado en CELM (Caldo de extracto levadura manitol) (Anexo Cuadro 2A), inoculado con una asada de la cepa de *Rhizobium* con crecimiento activo, y se incubaron a 28 °C en agitación orbital a 180 rpm por 48 h. Transcurrido ese tiempo, el inóculo fue centrifugado a 7500 rpm durante 10 minutos y el pellet bacteriano fue recuperado en tubos para centrifuga de 50 mL con 35 mL de agua destilada estéril. A partir de esta suspensión se cuantificó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de inóculo.

En un sistema de bolsas de crecimiento con tres compartimientos, que contiene papel absorbente como soporte para la semilla, y que permite apreciar el crecimiento de la raíz y el proceso de nodulación, se evaluó el efecto del vanadio (O_5SVH_2O Sigma-Aldrich®) y/o níquel ($NiSO_4 \cdot 6H_2O$ Sigma-Aldrich®) en la simbiosis *Rhizobium-Phaseolus*. La contaminación de las bolsas de crecimiento, se realizó al aplicar por separado, cinco concentraciones de vanadio y/o cinco de níquel con base en las siguientes dosis: 25, 50, 75, 100 y 120 mg L⁻¹. Cada una de las bolsas fue suministrada con 40 mL de solución nutritiva de Jensen (Anexo Cuadro 3A) con seis repeticiones, además de la cantidad correspondiente de vanadio y/o de níquel de acuerdo a cada tratamiento. También se incluyeron sistemas con tres repeticiones con y sin la aplicación de los metales (V y Ni) como testigos; las bolsas una vez contaminadas se esterilizaron a 121 °C durante 18 minutos.

Las semillas de frijol (Flor de mayo de origen comercial) fueron desinfectadas con alcohol etílico al 95% durante 1 minuto y aplicando tres lavados con agua destilada estéril. Posteriormente, las semillas se transfirieron a una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 20 minutos y enjuagadas siete veces con agua destilada estéril. Finalmente, las semillas fueron colocadas en una solución de gentamicina (500 mg L⁻¹) a la que se le

añadió una gota de Tween 80, durante 30 minutos en agitación constante. Transcurrido ese tiempo la solución fue decantada, y las semillas fueron colocadas sobre papel absorbente estéril para su secado en condiciones de campana de flujo laminar. Una vez secas, las semillas fueron sembradas en frascos con 35 mL de medio agar-agua al 1% (5 semillas por frasco) para facilitar la pregerminación a temperatura ambiente (22 °C). Una vez germinadas, las semillas fueron transferidas a las bolsas de crecimientos previamente esterilizadas, y mantenidas en cámara de crecimiento (25±1.5 °C, 70% HR y 12 h fotoperiodo), durante 30 días. Las plantas fueron irrigadas cada tercer día con solución nutritiva de Jensen estéril aplicándola a través de una pipeta Pasteur estéril, con el fin de mantener aproximadamente los 40 mL de solución nutritiva en cada bolsa.

La inoculación de los rizobios se llevó a cabo en las seis repeticiones de su correspondiente tratamiento, al tercer día después del trasplante de las semillas pregerminadas en las bolsas de crecimiento. Las unidades experimentales se inocularon con 3 mL del inóculo de *Rhizobium tropici* CIAT899 con una carga bacteriana de 4.24×10^9 UFC mL⁻¹. El inóculo fue homogeneizado en toda la solución nutritiva de cada bolsa de crecimiento.

Una vez realizada la inoculación, cada tratamiento fue revisado a partir del cuarto día, para cuantificar el número de nódulos que se formaban en las plántulas y con ello, estimar la dinámica de nodulación durante 30 días.

A los 30 días después del trasplante se determinó el contenido de clorofila total y actividad nitrogenasa. Para la determinación de clorofila total se prepararon tubos con 3 mL de metanol al 80% en los que se colocó un fragmento de hoja fresca (0.4 mm²) y se realizó por triplicado para cada tratamiento. A partir de esta muestra se tomó 1 mL y se traspasó a tubos eppendorf (1.5 mL de capacidad), para centrifugarlos a 3000 rpm durante 5 minutos.

A partir del sobrenadante, 200 μL se transfirieron a microplacas de 96 pozos para la lectura en el espectrofotómetro (BIOTEK, modelo Synergy 2), para tener lecturas de absorbancia de 470, 653 y 666 nm y aplicar las ecuaciones propuestas por Dere *et al.*, (1998).

La determinación de la actividad nitrogenasa se realizó mediante la prueba de reducción de acetileno. Se colocó todo el sistema radical recién cortado por cada uno de los tratamientos con tres repeticiones, en frascos de vidrio de 210 mL de capacidad, se taparon herméticamente y se retiró el 10% del volumen de aire con una jeringa de 50 mL, remplazándolo con acetileno y se incubaron durante 1h (Hardy *et al.*, 1968). Posteriormente, se tomaron 3 mL de cada muestra y se colocaron en tubos Vacutainer® al vacío de 7 mL. A partir de estas muestras se inyectó 1 mL en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard (5890 Series II Gas Chromatograph), con detector de ionización de flama, para medir la reducción de acetileno a etileno. Los resultados se expresaron en nM de etileno (C_2H_4) $\text{h}^{-1} \text{mL}^{-1}$.

Además, se determinó el peso total de la materia seca (g), de raíz, tallo, hoja y nódulos (tratamientos inoculados con *Rhizobium*), y secados a 70 °C durante 48 h.

El diseño experimental para cada metal (V y Ni) consistió de un factorial, que incluyó seis niveles de concentración del metal (0, 25, 50, 75, 100 y 120 mg mL^{-1}) y dos niveles de inoculación de *Rhizobium* (con y sin), con 12 tratamientos y seis repeticiones cada uno, distribuidos en un diseño experimental completamente al azar. Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias LSD ($\alpha= 0.05$) utilizando el paquete estadístico SAS 9.0 (SAS Institute Inc., 1999).

Fase II. Determinación de la composición elemental de los nódulos radicales

Los nódulos fueron analizados con fluorescencia de rayos X, mediante el sistema de análisis no destructivo por rayos X (SANDRA) (Figura 4.1), que es una técnica que se basa en la detección de rayos X característicos prácticamente cualquier material, incluyendo metales y minerales, y proporciona concentraciones de elementos mayores, menores y traza. El equipo consta de tubos de molibdeno y wolframio que se pueden combinar con detectores Si-PIN y Cd-Te para analizar regiones de 0.5 a 4 mm de diámetro. Los rayos X generados en el tubo irradian la región seleccionada de la muestra, la coincidencia de dos rayos láser determina la región de análisis de tal manera que, los elementos químicos presentes en la muestra emiten rayos X característicos que son captados por un detector especial conectado a una computadora, en donde se almacena y procesa la información en forma de gráficos o espectros (Ruvalcaba-Sil *et al.*, 2010). La fluorescencia de rayos X ha sido utilizada en diversos estudios que requieren la caracterización no destructiva de diversos materiales, ya que determinada la concentración multielemental de una muestra biológica (Gunes *et al.*, 2009). El uso de estos dispositivos permiten estudiar la distribución de los elementos en los tejidos, con el fin de estudiar las alteraciones en algunos elementos vinculados a procesos fisiológicos y metabólicos (Ruvalcaba-Sil *et al.*, 2010). Por ejemplo; Sánchez-Viveros, (2012) utilizó el SANDRA para evaluar la capacidad de *Azolla filiculoides* en la tolerancia a altas concentraciones de arsénico en sus frondas.

Después de 30 días en el sistema de bolsa de crecimiento (experimento de la Fase I), los nódulos fueron disectados de la raíz, y secados por separado en sobres de papel a 70 °C durante 48 h. A partir de los nódulos secos, se determinó el contenido elemental para evaluar sus interacciones por efecto del vanadio y níquel. Los nódulos fueron colocados en un portamuestras de plástico para su lectura con un tubo de rayos X de molibdeno durante

450 segundos a 600 mA y 35 kV. Se realizaron tres mediciones por cada concentración de vanadio y níquel. El análisis consistió en hacer coincidir el haz de rayos X sobre la superficie de los nódulos de frijol, provocando que los átomos capaces de absorber los rayos X pasen del estado fundamental a estado excitado debido a la salida de electrones de las capas internas del átomo. El estado excitado es inestable por lo que el átomo tiende a volver al estado fundamental, produciéndose la transición de electrones desde los niveles externos hacia los niveles internos y ocupar los huecos producidos en las capas electrónicas. Desencadenando la emisión de energía en forma de radiación de rayos X secundaria (Fluorescencia de rayos X) característica de cada elemento (Ruvalcaba-Sil *et al.*, 2010).

Las intensidades de rayos X son proporcionales a la concentración del elemento en los nódulos. Las señales del detector se procesaron en un amplificador PX4 de Amptek conectado a una computadora. Los espectros fueron analizados con el programa AXIL para determinar las intensidades de los picos de rayos X (Vekemans *et al.*, 1994). Se analizó el contenido elemental de P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Cu y Zn, en relación a las diferentes concentraciones de vanadio y níquel. Esta determinación fue realizada en las instalaciones del Instituto de Física de la UNAM.

Los datos obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias LSD ($\alpha=0.05$) con el paquete estadístico SAS 9.0 (SAS Institute Inc., 1999).

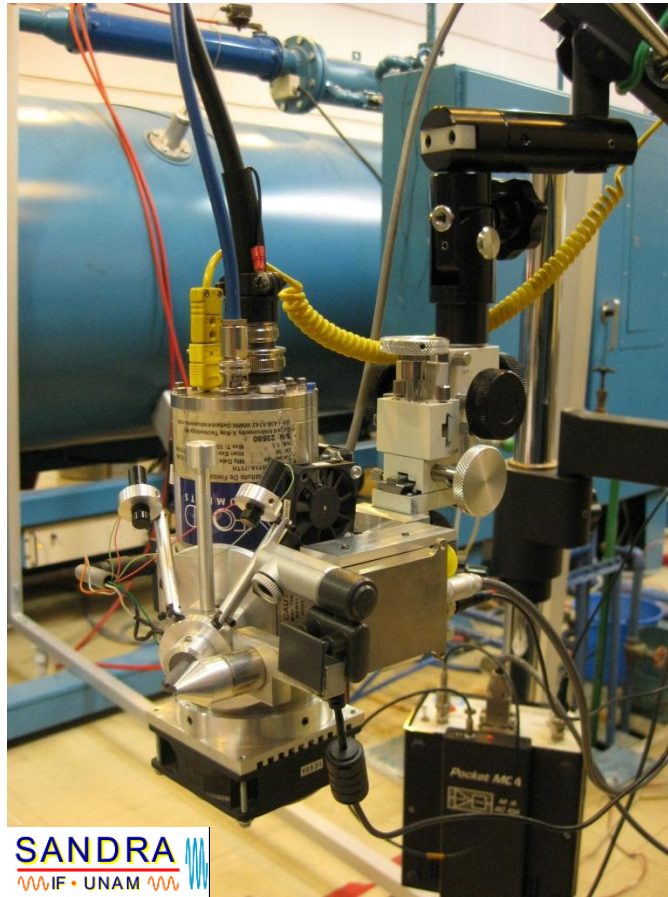


Figura 4.1. Componentes del sistema de análisis no destructivo por rayos X (SANDRA). Instituto de Física UNAM (Ruvalcaba-Sil *et al.*, 2010), con el cual fue determinado el contenido de elementos en nódulos por efecto de vanadio y níquel.

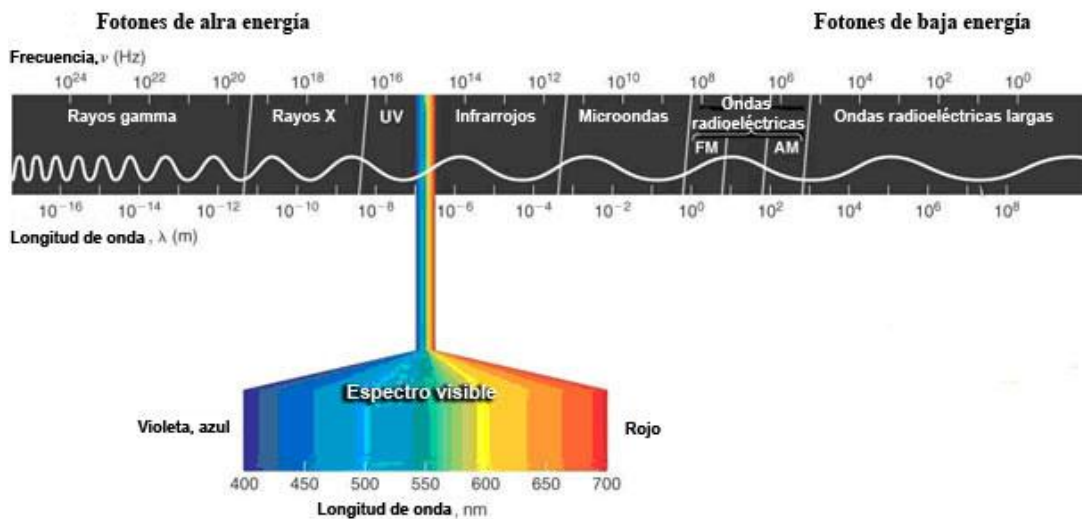


Figura 4.2. Espectro electromagnético típico (Tippens, 2008).

RESULTADOS

Los resultados de esta fase experimental se muestran para cada metal analizado por separado.

a) Efecto de las concentraciones de vanadio en la formación de nódulos y crecimiento de las plantas

El conteo de nódulos se inició al cuarto día después de la inoculación de *Rhizobium* y concluyó 30 días después. En la figura 4.3 se observa el comportamiento de la nodulación, en la cual se observan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en los tratamientos correspondientes a 0, 25 y 120 mg L⁻¹, además de una estimulación de la nodulación, principalmente en las concentraciones de 25 y 120 mg V L⁻¹. La aparición de los primeros nódulos se observó a partir del séptimo día para los tratamientos con 0, 25, 75, 100 y 120 mg V L⁻¹; en contraste, el tratamiento correspondiente a la concentración de 50 mg L⁻¹ la nodulación se inició hasta el día 17 (Figura 4.4). El mayor número significativo de nódulos por tratamiento se obtuvo en las concentraciones de 0, 25 y 120 mg V L⁻¹, con un máximo de 40 nódulos para el testigo, 20 y 30 nódulos para las concentraciones de 25 y 120 mg V L⁻¹, respectivamente, y un mínimo de 6 nódulos en las concentraciones de 50 y 100 mg V L⁻¹ (Figura 4.4).

Para el peso seco total de las plantas no se encontraron diferencias estadísticas significativas, por efecto de la inoculación (Figura 4.5A) y/o por efecto de tratamiento (Figura 4.5C). En contraste, se observaron efectos significativos (LSD, $\alpha=0.05$) por efecto de la concentración de vanadio, especialmente en la aplicación de 50 mg L⁻¹ la cual produjo el menor peso seco (Figura 4.5B).

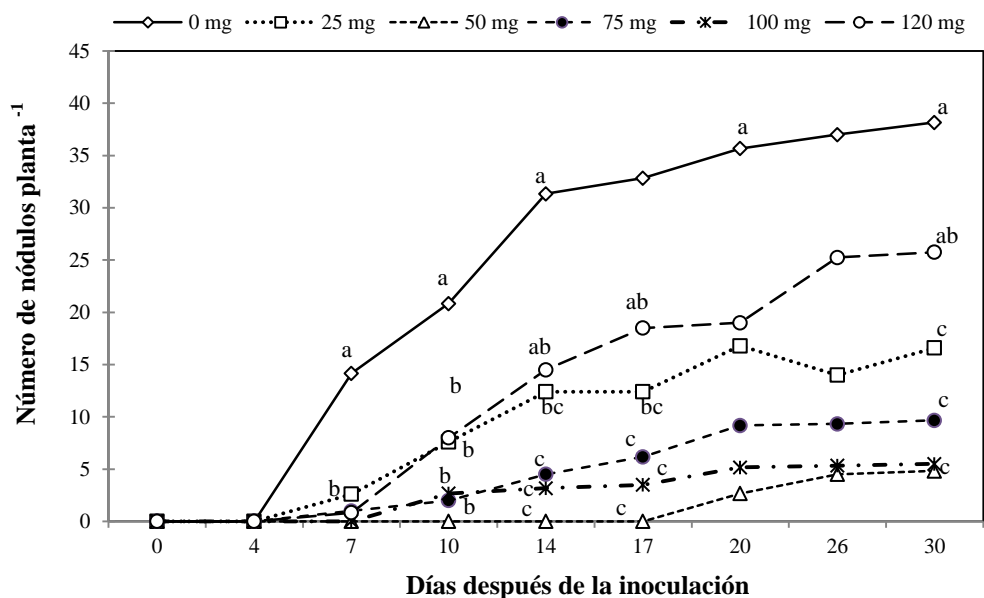


Figura 4.3. Dinámica de nodulación en raíces de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899 y crecidas en solución nutritiva de Jensen contaminada con diferentes concentraciones de vanadio (mg L^{-1}). $n=6$. Letras idénticas para la misma fecha de muestreo son estadísticamente iguales (LSD, $\alpha=0.05$).

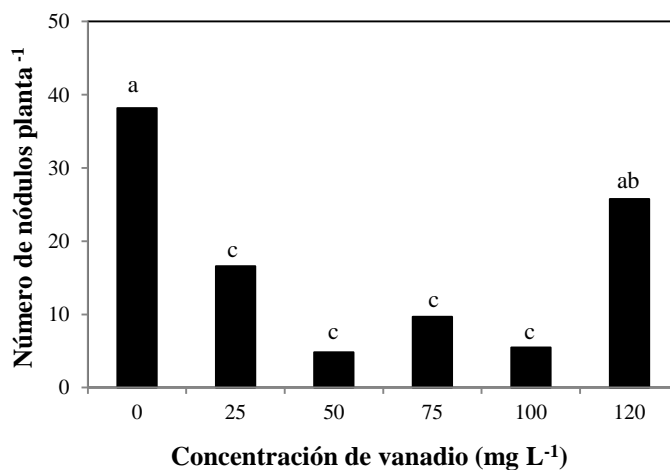


Figura 4.4. Número total de nódulos en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, contaminadas con diferentes concentraciones de vanadio a los 30 días. $n=6$. Letras idénticas sobre las barras son estadísticamente iguales (LSD, $\alpha=0.05$). Medias \pm Error estándar.

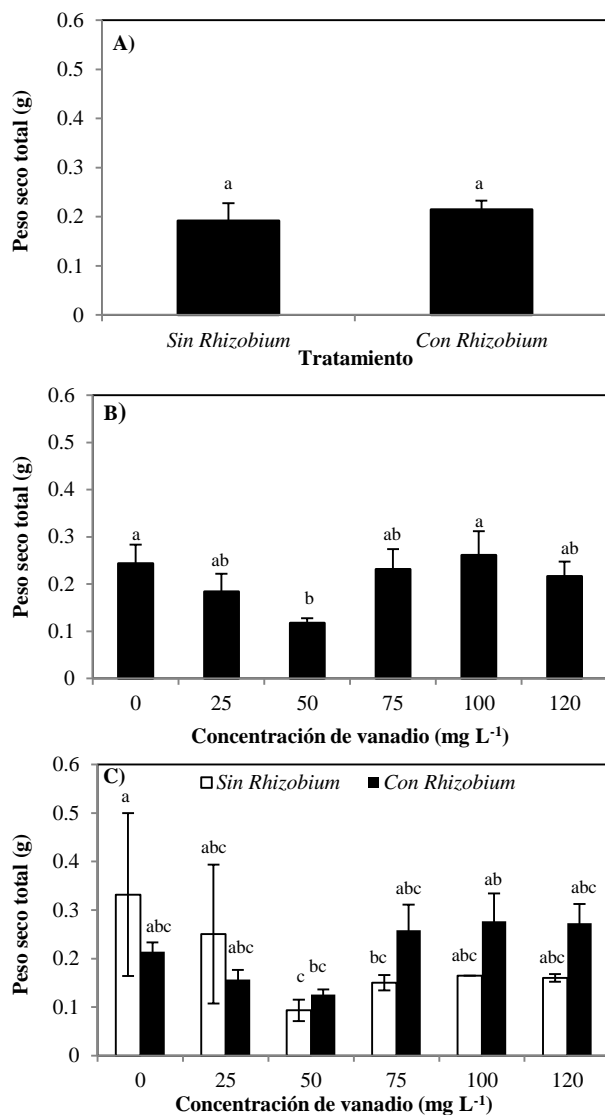


Figura 4.5. Peso seco total de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* CIAT899 y aplicación de diferentes concentraciones de vanadio, después de 30 días. (A) Efecto de la inoculación con rizobios, (B) Efecto de la concentración de vanadio, (C) Efecto del tratamiento. n=6. Letras idénticas sobre las barras para cada gráfica son estadísticamente iguales (LSD, $\alpha=0.05$). Medias \pm Error estándar.

En el contenido de clorofila total se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) por efecto de la concentración y por efecto del tratamiento; sin embargo no se encontraron diferencias significativas por efecto de la inoculación (Figura 4.6). El mayor contenido de clorofila se encontró en la concentración de 25 mg V L⁻¹ y el menor contenido en el

tratamiento con 50 mg V L⁻¹ (Figura 4.6B). En las concentraciones de 25 y 75 mg V L⁻¹, el mayor contenido de clorofila se encontró en las plantas con *Rhizobium*, mientras que en los tratamientos sin *Rhizobium* el mayor contenido se obtuvo en el testigo (Figura 4.6C).

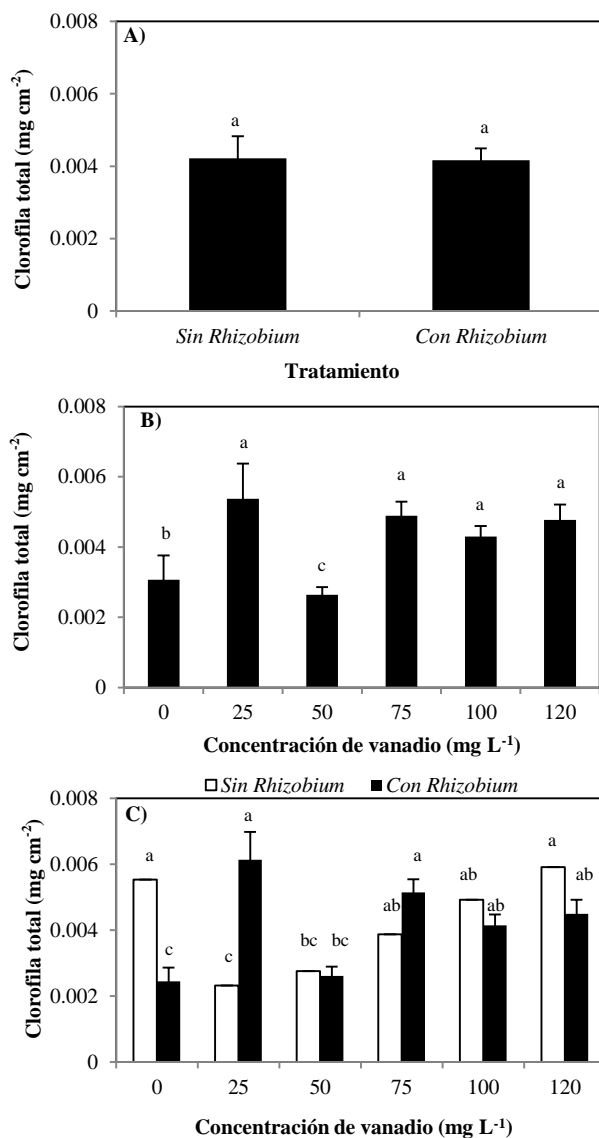


Figura 4.6. Clorofila total de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y aplicación de diferentes concentraciones de vanadio, después de 30 días. (A) Efecto de la inoculación con rizobios, (B) Efecto de la concentración de vanadio, (C) Efecto del tratamiento. n=6. Letras idénticas sobre las barras de cada gráfica son estadísticamente iguales (LSD, $\alpha=0.05$). Medias \pm Error Estándar.

La actividad nitrogenasa de las plantas con *Rhizobium* o sin *Rhizobium* no presentó diferencias significativas; sin embargo, las diferentes concentraciones de vanadio tuvieron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en la nitrogenasa entre los tratamientos de 25 y 100 mg V L⁻¹ (Figura 4.7B). Por efectos de tratamientos, se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en los tratamientos sin *Rhizobium* con 50 y 75 mg V L⁻¹; mientras que en las plantas con *Rhizobium* la mayor nitrogenasa se observó con 25 mg V L⁻¹ y la menor con 100 mg V L⁻¹ (Figura 4.7C).

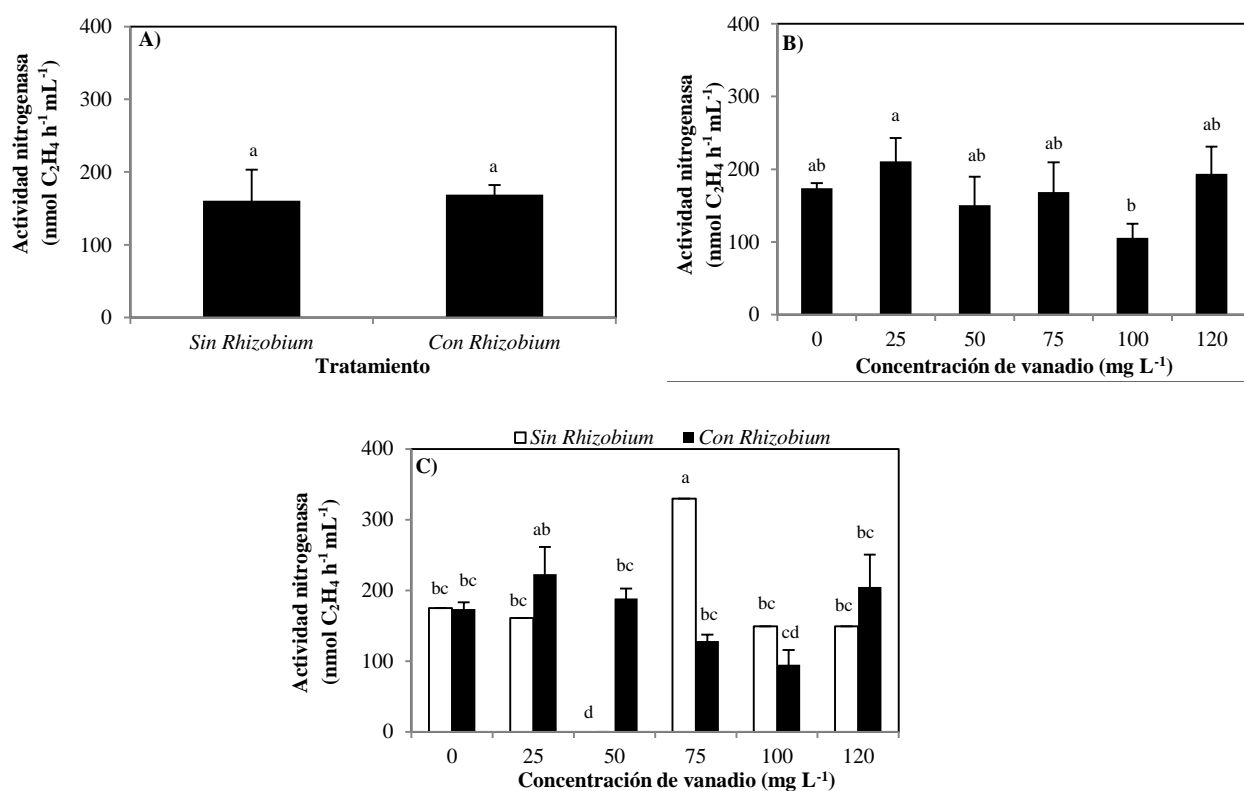


Figura 4.7. Actividad nitrogenasa de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* CIAT899 y aplicación de diferentes concentraciones de vanadio, después de 30 días. (A) Efecto de la inoculación con rizobios, (B) Efecto de la concentración de vanadio, (C) Efecto del tratamiento. n=6. Letras idénticas sobre las barras para cada gráfica son estadísticamente iguales (LSD, $\alpha=0.05$). Medias \pm Error estándar.

b) Efecto de las concentraciones de níquel en la formación de nódulos y crecimiento de las plantas

El proceso de nodulación inició al cuarto día después de la inoculación para el tratamiento testigo, mientras que ante 50 y 75 mg Ni L⁻¹, la nodulación se inició al séptimo día (Figura 4.8). La mayor nodulación a lo largo del experimento, se observó en el testigo, y en las concentraciones de 25 y 50 mg Ni L⁻¹, mientras que el menor ($p \leq 0.05$) número de nódulos se contabilizó en la concentración de 100 mg L⁻¹ (Figura 4.8). A los 30 días, las plantas con níquel mostraron en general, menor número de nódulos (Figura 4.9); esta nodulación fue menor al comparar su respuesta ante vanadio (Figura 4.4). Los tratamientos con menor concentración de níquel (0, 25 y 50 mg L⁻¹) presentaron mayor número de nódulos (25 en promedio) con respecto al resto de las concentraciones, las que presentaron en promedio 10 nódulos por planta (Figura 4.9).

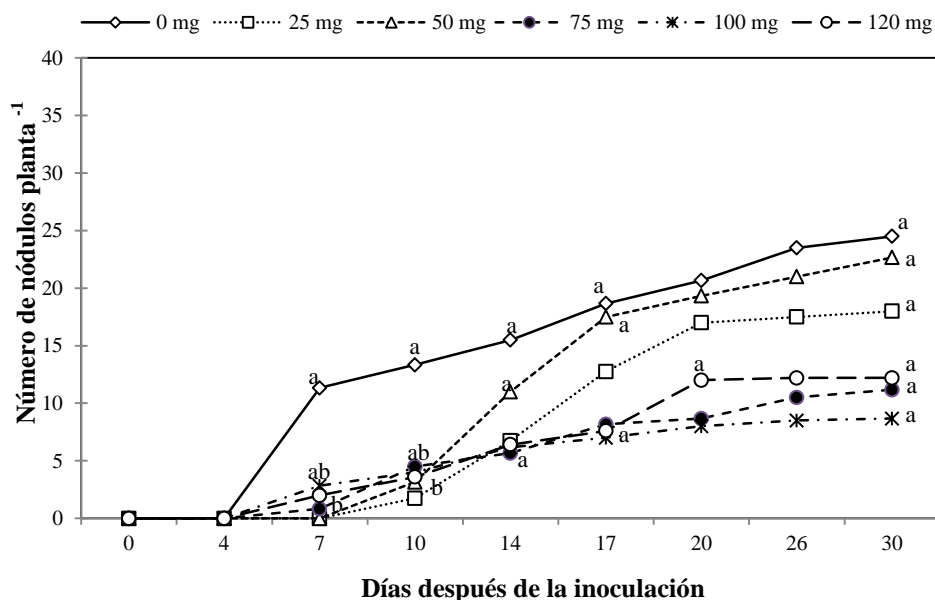


Figura 4.8. Dinámica de nodulación en raíces de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899 y crecidas en solución nutritiva de Jensen contaminada con diferentes concentraciones de níquel (mg L⁻¹). n=6. Letras idénticas para la misma fecha de muestreo son estadísticamente iguales (LSD, $\alpha=0.05$).

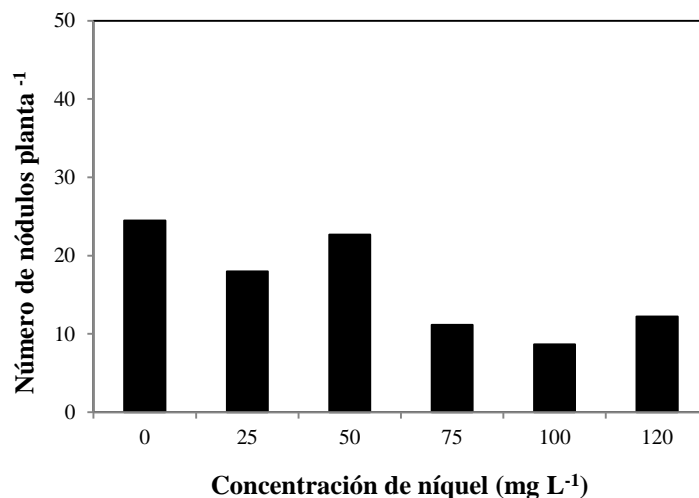


Figura 4.9. Número total de nódulos en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, contaminadas con diferentes concentraciones de níquel a los 30 días. n=6. Letras idénticas sobre las barras son estadísticamente iguales. (LSD, $\alpha=0.05$). Medias \pm Error estándar.

En el caso del peso seco total de las plantas, la contaminación con níquel resultó en diferencias significativas. En la figura 4.10A se puede observar que los tratamientos con *Rhizobium* presentaron mayor peso seco total en comparación con el tratamiento sin inocular ($p \leq 0.05$). Similarmente la concentración de níquel produjo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en las concentraciones de 25, 50 y 100 mg Ni L⁻¹, el mayor peso seco se presentó en el tratamiento de 50 mg Ni L⁻¹ y el menor en 100 mg Ni L⁻¹ (Figura 4.10B). No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos; sin embargo, se puede observar que las plantas inoculadas con *Rhizobium*, ante 50 mg Ni L⁻¹ presentaron mayor peso seco, mientras que en el tratamiento sin inoculación en presencia de 100 mg Ni L⁻¹ el peso seco fue menor (Figura 4.10C).

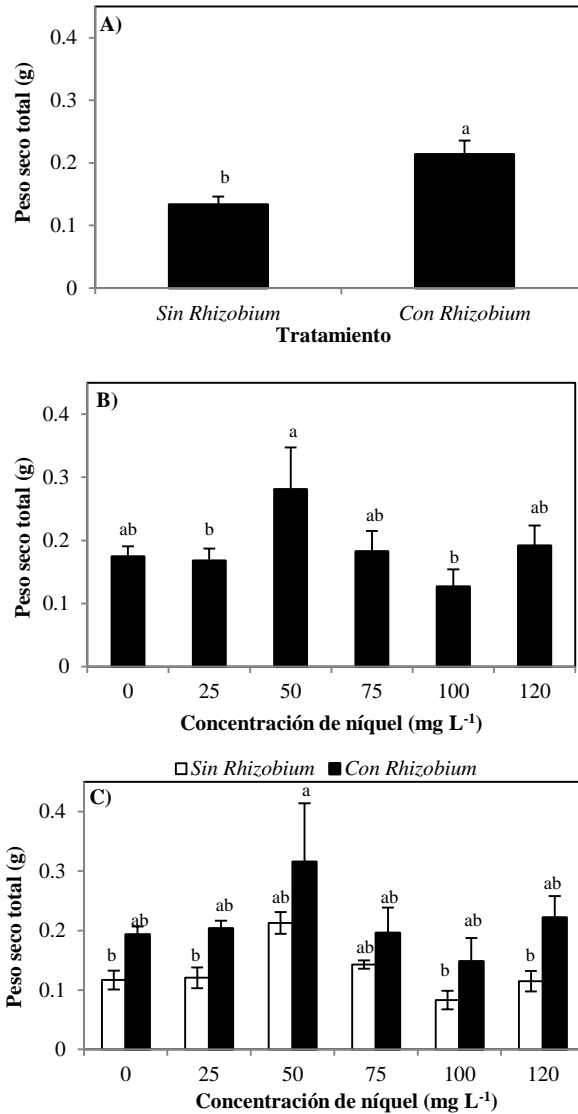


Figura 4.10. Peso seco total de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* CIAT899 y aplicación de diferentes concentraciones de níquel, después de 30 días. (A) Efecto de la inoculación con rizobios, (B) Efecto de la concentración de níquel, (C) Efecto del tratamiento. n=6. Letras idénticas sobre las barras para cada gráfica son estadísticamente iguales (LSD, $\alpha=0.05$). Medias \pm Error estándar.

El contenido de clorofila total en las plantas en presencia de níquel no mostró diferencias significativas por los factores de inoculación (Figura 4.11A), ni por efecto de la concentración de Ni (Figura 4.11B). En el caso del efecto por tratamiento se encontraron diferencias significativas (LSD, $\alpha=0.05$), donde el mayor contenido se obtuvo en la

concentración 100 mg Ni L⁻¹ sin inocular (Figura 4.11C). En las concentraciones de 0 y 25 mg Ni L⁻¹, las plantas inoculadas con *Rhizobium* presentaron mayor contenido de clorofila, mientras que a partir de la concentración de 50 mg Ni L⁻¹, las plantas no inoculadas tuvieron mayor contenido de este pigmento fotosintético (Figura 4.11C).

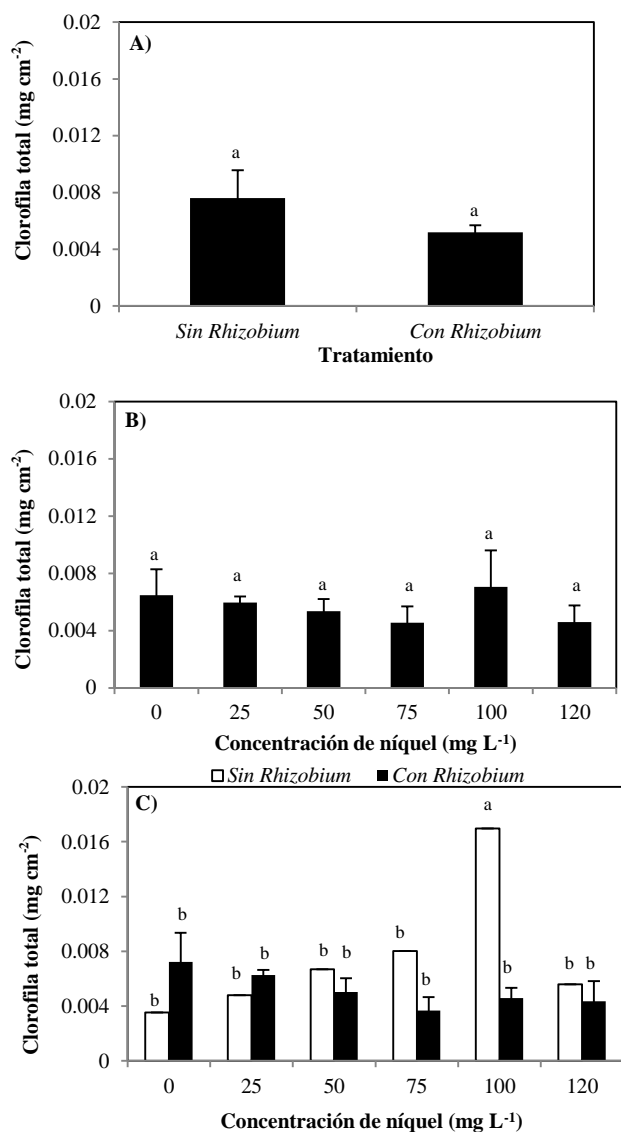


Figura 4.11. Clorofila total de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* CIAT899 y aplicación de diferentes concentraciones de níquel, después de 30 días. (A) Efecto de la inoculación con rizobios, (B) Efecto de la concentración de níquel, (C) Efecto del tratamiento. n=6. Letras idénticas sobre las barras para cada gráfica son estadísticamente iguales (LSD, $\alpha=0.05$). Medias \pm Error estándar.

En cuanto a la actividad nitrogenasa no se observaron diferencias significativas en el factor de inoculación (Figura 4.12A) y por efecto del tratamiento (Figura 4.12C). Por efecto de la concentración se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre el testigo, con la aplicación de 50, 100 y 120 mg Ni L⁻¹ (Figura 4.12B). En el testigo, las plantas presentaron alrededor de 60 nmoles de etileno, mientras que en las concentraciones de 100 y 120 mg Ni L⁻¹ la concentración de etileno se redujo drásticamente, registrándose 0 nmoles de etileno en la concentración de 120 mg Ni L⁻¹ (Figura 4.12B). Tanto en los tratamientos como en el factor concentración se observó que entre más elevada sea la concentración de níquel, la actividad nitrogenasa fue menor; en el tratamiento correspondiente a 100 mg Ni L⁻¹ (Figura 4.12C) existe cierta actividad en los nódulos a pesar de ser la concentración en la que se obtuvo menor número de éstos (Figura 4.9).

c) Acumulación de V y Ni en nódulos y su efecto en el contenido elemental

El contenido elemental de los nódulos radicales obtenidos a partir de las plantas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con *Rhizobium tropici* en presencia de ambos metales, se analizó con la técnica de fluorescencia de rayos X, mediante el sistema no destructivo (SANDRA). Para este trabajo se detectó potasio, fósforo, azufre, calcio, zinc, manganeso, cloro, fierro, y cobre, además de vanadio y/o níquel. Estos dos últimos elementos no se detectaron en todas las muestras analizadas, sin embargo, se pudo observar el efecto de la acumulación o pérdida de los otros elementos por el efecto de la concentración de vanadio y/o níquel.

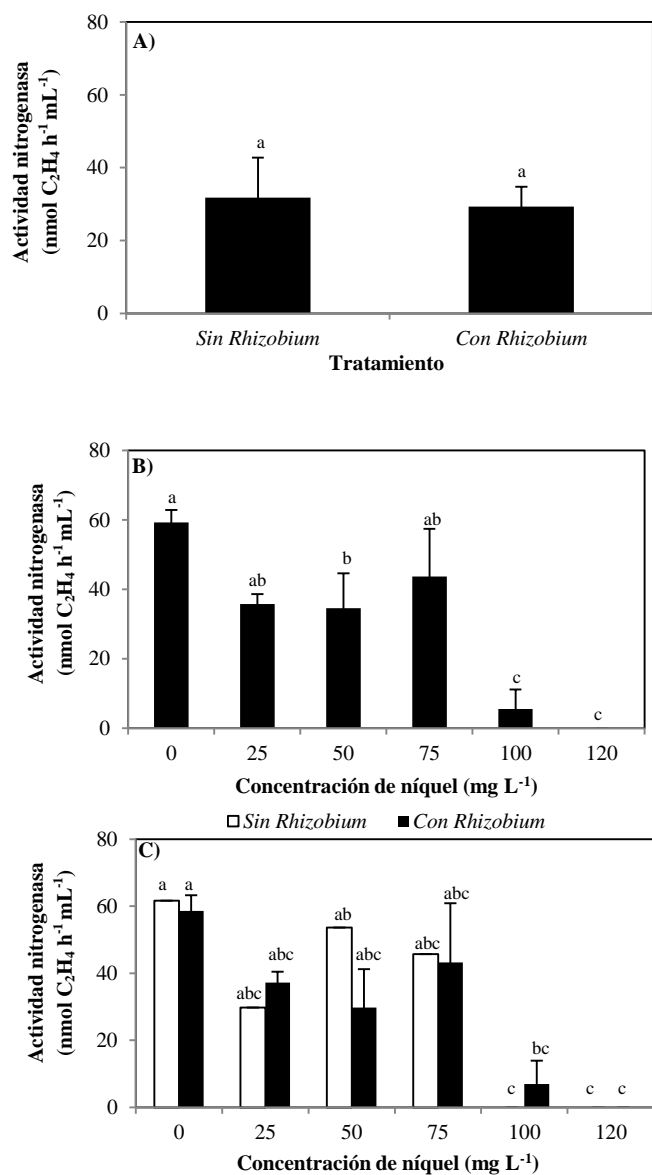


Figura 4.12. Actividad nitrogenasa de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* CIAT899 y aplicación de diferentes concentraciones de níquel, después de 30 días. (A) Efecto de la inoculación con rizobios, (B) Efecto de la concentración de níquel, (C) Efecto del tratamiento. n=6. Letras idénticas sobre las barras para cada gráfica son estadísticamente iguales (LSD, $\alpha=0.05$). Medias \pm Error estándar.

En las concentraciones de 0, 25 y 50 mg V L⁻¹, el vanadio se encontró en el límite de detección, mientras que en las concentraciones de 75, 100 y 120 mg V L⁻¹, el vanadio se acumuló en los nódulos e interactuó con los demás elementos analizados (Figura 4.13). En

el caso del fósforo, cloro, potasio, calcio, hierro y zinc, se encontraron diferencias significativas en el tratamiento correspondiente a 120 mg L⁻¹ (LSD, $\alpha=0.05$) (Figura 4.13 A-E; Figura 4.14A, C), mientras que para cobre se encontraron diferencias en la concentración de 75 mg L⁻¹ (Figura 4.14B), el cobre no se detectó en las concentraciones de 25 y 75 mg V L⁻¹. Por último, el manganeso presentó diferencias significativas en las concentraciones de 100 y 120 mg L⁻¹ (LSD, $\alpha=0.05$) (Figura 4.13F). Conforme aumenta la concentración de vanadio se comenzó a detectar este elemento en los nódulos, encontrándose el máximo en la concentración de 100 mg V L⁻¹ y el mínimo en la concentración más alta de vanadio (120 mg L⁻¹) (Figura 4.12; Figura 4.14).

El comportamiento del vanadio fue diferente en relación a cada uno de los elementos analizados. En relación con el fósforo, manganeso y zinc la intensidad del vanadio fue mayor en comparación con lo observado con los demás elementos, en la concentración de 100 mg L⁻¹ se presentó la mayor intensidad y en 120 mg L⁻¹ la menor (Figura 4.13A, F y Figura 4.14C). El azufre, cloro, potasio, calcio y hierro (Figura 4.13B, C, D, E y Figura 4.14A) están en mayor concentración que el vanadio. Por último el cobre, presentó menor intensidad que el vanadio en las concentraciones de 75 a 120 mg V L⁻¹ (Figura 4.14B).

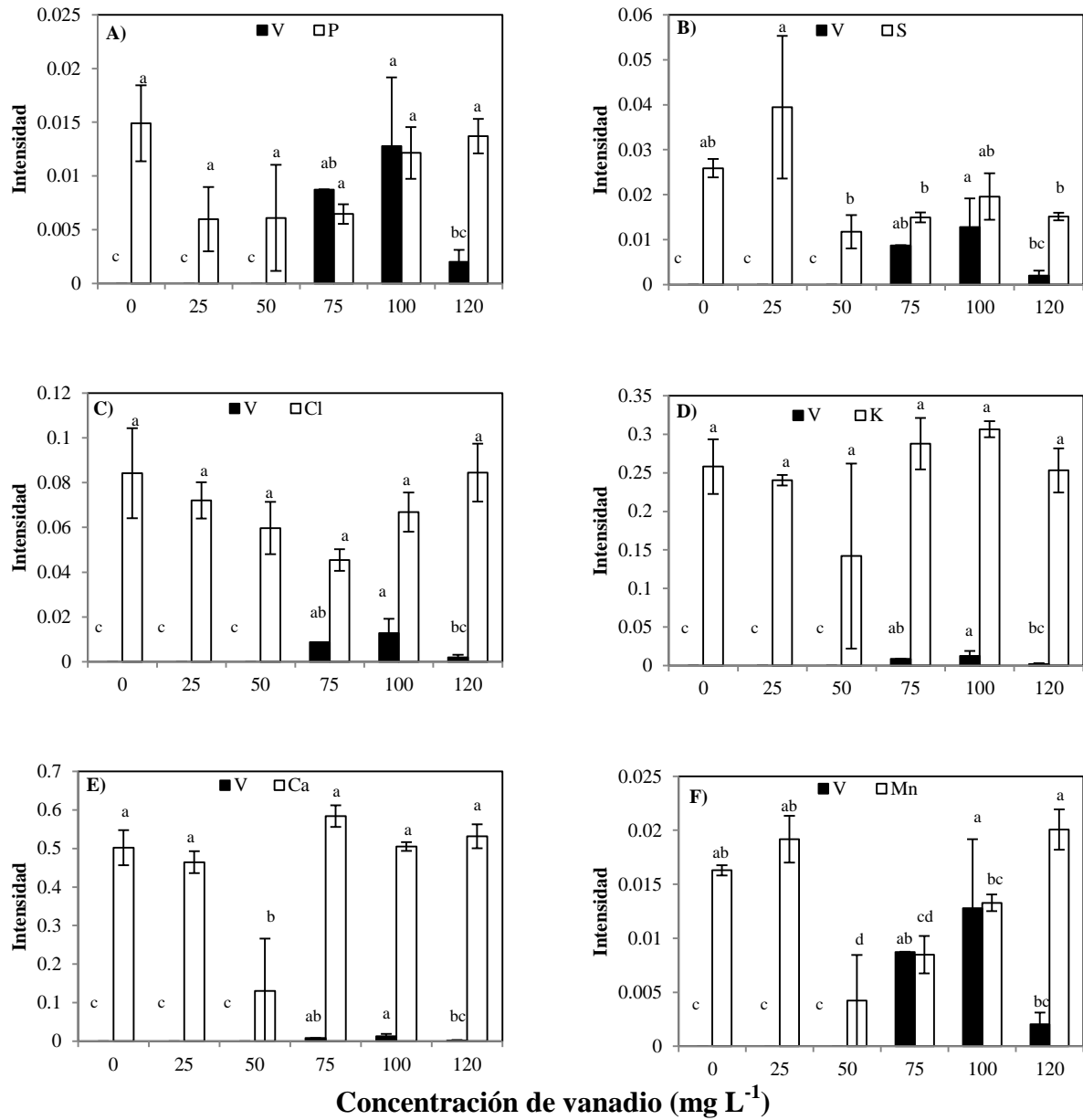


Figura 4.13. Contenido elemental de los nódulos de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo inoculados con *Rhizobium tropici* CIAT899, por efecto de la contaminación con diferentes concentraciones de vanadio, después de 30 días. Fósforo (A), Azufre (B), Cloro (C), Potasio (D), Calcio (E), y Manganeso (F). n=6. Letras idénticas sobre las barras para cada gráfica son estadísticamente iguales (LSD, $\alpha=0.05$). Medias \pm Error estándar.

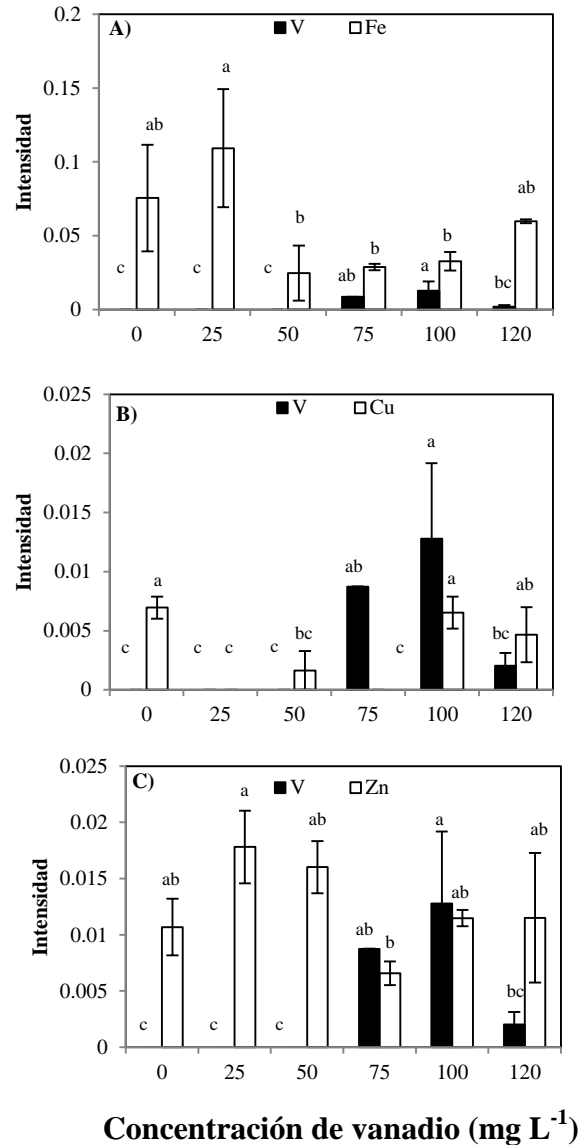


Figura 4.14. Contenido elemental de los nódulos de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo inoculados con *Rhizobium tropici* CIAT899, por efecto de la contaminación con diferentes concentraciones de vanadio, después de 30 días. Hierro (A), Cobre (B) y Zinc (C). n=6. Letras idénticas sobre las barras para cada gráfica son estadísticamente iguales (LSD, $\alpha=0.05$). Medias \pm Error estándar.

En los nódulos en presencia de níquel se observó que para fósforo se encontró en la concentración de 0 y 120 mg Ni L⁻¹ se presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$), a partir del tratamiento de 50 mg Ni L⁻¹ conforme aumenta la concentración aumenta la intensidad reflejada del níquel incrementó, y la del fósforo disminuyó (Figura 4.15A). Para

azufre se observaron diferencias estadísticas (LSD, $\alpha=0.05$) todas las concentraciones analizadas a excepción de 120 mg Ni L⁻¹, cuando se comparan las intensidades de ambos elementos se observó que para todos los tratamientos el níquel reflejó mayor energía en comparación con el azufre (Figura 4.15B). Resultados similares se encontraron para cloro y potasio, en donde se obtuvieron diferencias significativas (LSD, $\alpha=0.05$) para todas las concentraciones excepto en la de 120 mg Ni L⁻¹ (Figuras 4.15C y 4.15D). En el caso del calcio se encontraron diferencias significativas en las concentraciones (LSD, $\alpha=0.05$) de 50, 75 y 120 mg Ni L⁻¹ y al igual que el potasio y el azufre, la energía reflejada por el níquel fue considerablemente menor a la del calcio (Figura 4.14E). En cuanto al manganeso hubo diferencias ($p\leq 0.05$) en las concentraciones correspondientes al testigo en donde no se detectó este elemento en presencia de níquel; sin embargo al aumentar la concentración de este metal la intensidad del manganeso disminuyó en el tratamiento de 120 mg Ni L⁻¹ (Figura 4.15F). Para hierro y cobre se encontraron diferencias significativas ($p\leq 0.05$) en 0 y 50 mg Ni L⁻¹. En el caso de hierro a partir del tratamiento de 50 mg Ni L⁻¹ la intensidad del níquel aumentó conforme se incrementó la concentración de níquel; en el tratamiento de 120 mg Ni L⁻¹ ambos metales tuvieron la misma intensidad (Figura 4.16A), mientras que al aumentar la concentración de níquel la intensidad del cobre disminuyó (Figura 4.16B). La intensidad de zinc en todos los tratamientos fue similar excepto con 120 mg Ni L⁻¹ donde la intensidad de Ni fue significativamente mayor (Figura 4.16C).

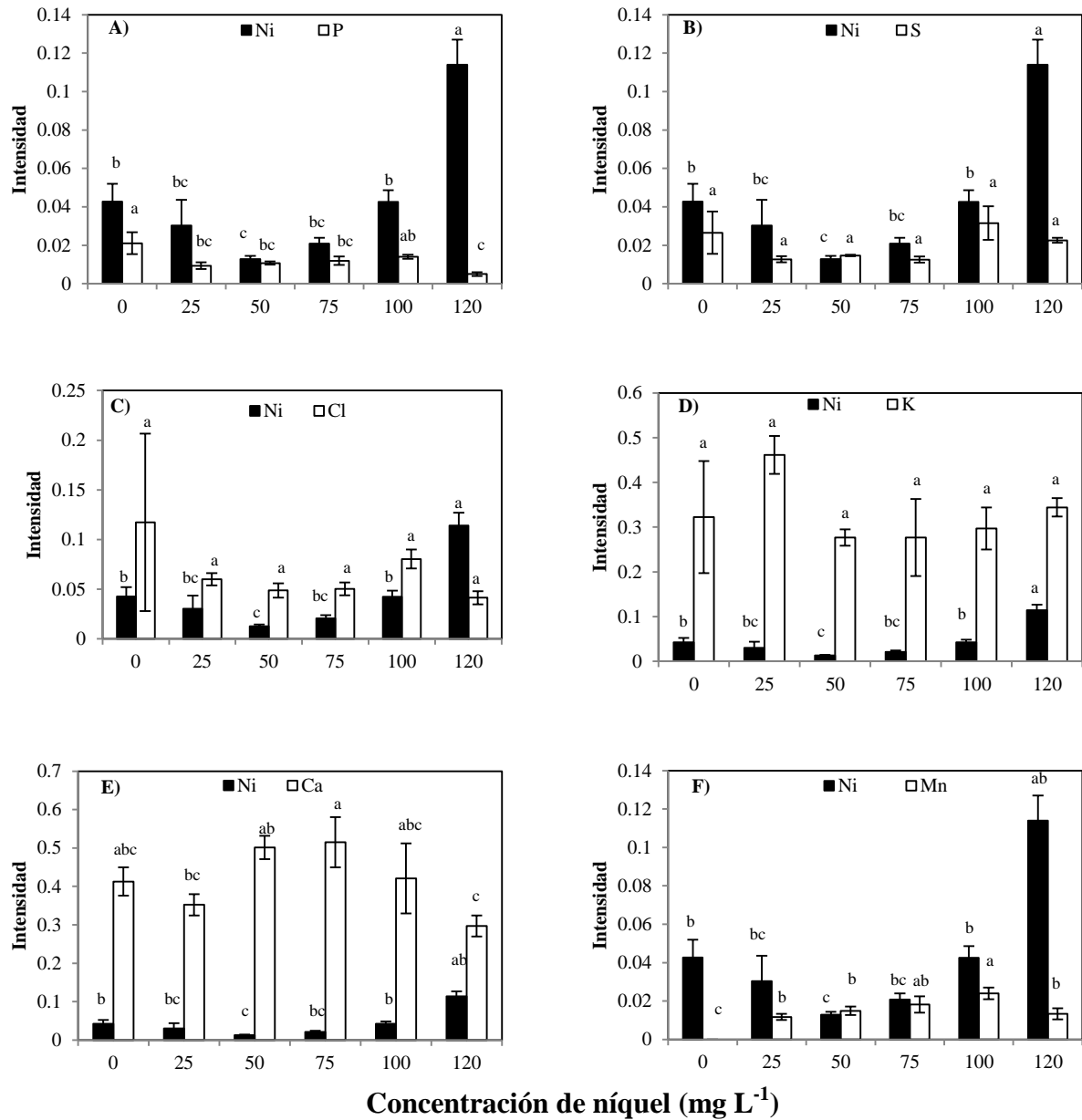


Figura 4.15. Contenido elemental de los nódulos de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo inoculados con *Rhizobium tropici* CIAT899, por efecto de la contaminación con diferentes concentraciones de níquel, después de 30 días. Fósforo (A), Azufre (B), Cloro (C), Potasio (D), Calcio (E) y Manganeso (F). n=6. Letras idénticas sobre las barras para cada gráfica son estadísticamente iguales (LSD, $\alpha=0.05$). Medias \pm Error estándar.

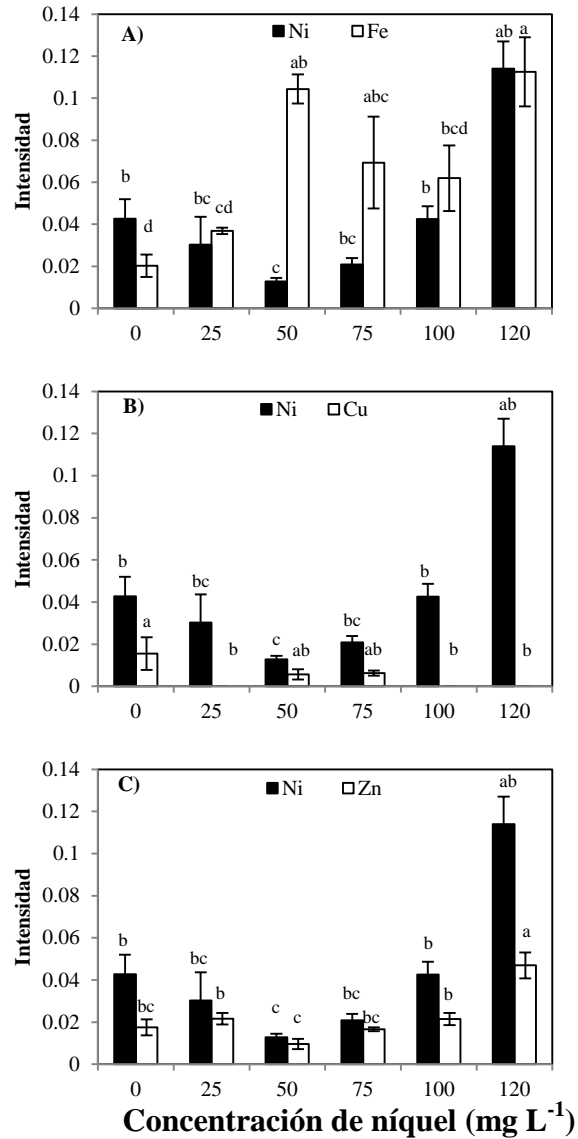


Figura 4.16. Comparación del contenido elemental de los nódulos de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo inoculados con *Rhizobium tropici* CIAT899, por efecto de la contaminación con diferentes concentraciones de níquel, después de 30 días. Hierro (A), Cobre (B) y Zinc (C). n=6. Letras idénticas sobre las barras para cada gráfica son estadísticamente iguales (LSD, $\alpha=0.05$). Medias \pm Error estándar.

DISCUSIÓN

Tanto la planta como el microsimbionte fueron tolerantes a las diferentes concentraciones de vanadio y níquel. De acuerdo con Campanharo *et al.* (2010), el frijol común puede tolerar hasta 100 mg L^{-1} de níquel ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) sin presentar síntomas de toxicidad que se manifiestan por la presencia de manchas cloróticas en hojas maduras. En el presente experimento a partir de los 15 días después del trasplante, las plantas con 50 mg Ni L^{-1} , presentaron hojas maduras cloróticas; sin embargo, este síntoma fue constante para las concentraciones superiores, por lo que no se atribuyeron efectos de toxicidad de las plantas por la presencia de níquel.

Para vanadio, no se encontraron referencias para frijol, aunque la alfalfa puede tolerar concentraciones de hasta 400 mg kg^{-1} de suelo (Yang *et al.*, 2011), mientras que soya tolera hasta 75 mg kg^{-1} de suelo (Wang y Liu, 1999), esto se debe principalmente a la forma de cultivo la alfalfa, ya que por lo regular el riego es con aguas tratadas, además de que es una planta que acumula metales (Su *et al.*, 2004). Cuando existe elevada concentración de vanadio en el suelo, la toxicidad en la planta se refleja en disminución del crecimiento y puede acumularse en el sistema radical (Wang y Liu, 1999). A la fecha, no se ha reportado una dosis de vanadio que resulte extremadamente tóxica para las plantas ya que esta toxicidad depende de diferentes factores como el pH del suelo, la disponibilidad de nutrientes, y en mayor medida del genotipo de la planta (Stratton *et al.*, 2001). En el caso de jitomate y de lechuga, la concentración óptima de vanadio para no causar alteraciones fisiológicas es de 2 ng g^{-1} (Welch, 1973), mientras que *Astragalus preussi* puede tolerar hasta $100 \text{ } \mu\text{g V mL}^{-1}$ de solución nutritiva (Warrington, 1956).

El níquel es considerado como un micronutriente esencial para las plantas aunque en concentraciones muy bajas ($0.1\text{-}1.0 \text{ mg kg}^{-1}$ de peso seco) (Eskew *et al.*, 1983). Se ha

identificado una serie de enzimas en las que el Ni es un componente principal; por ejemplo, glioxalasa, péptido deformilasa, reductasa metil-CoM, y la ureasa, por lo que este metal juega un papel muy importante en ciertos procesos metabólicos, incluyendo la ureolisis, el metabolismo del hidrógeno y la acetogénesis (Ermler *et al.*, 1998).

Desde el descubrimiento de la importancia del níquel en el metabolismo de las plantas, se ha estudiado su absorción y transporte durante sus procesos fisiológicos. Cuando hay exceso de níquel en el suelo o sustrato se presentan algunos síntomas que incluyen clorosis por la reducción de la absorción de hierro, poco crecimiento de la raíz y de la parte aérea, la deformación de varias partes de la planta, e inusuales manchas foliares (Mishra y Kar, 1974). Las plantas varían en su sensibilidad o tolerancia para el exceso de Ni. Los niveles tóxicos en las plantas están comúnmente en el rango de 25 a 50 mg kg⁻¹; sin embargo, existen especies que soportan altos niveles de Ni en el sustrato, acumulándolos en sus tejidos (Kidd *et al.*, 2007). En el presente experimento se utilizaron concentraciones medias para V y Ni de acuerdo a lo reportado en la literatura (Campanharo *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011), lo cual justificaría la ausencia de síntomas visibles de toxicidad tanto en la planta como para los rizobios.

Los resultados de la dinámica de nodulación y número total de nódulos indican que se pudo haber presentado una autorregulación de la nodulación en las plantas, siendo más evidente en presencia del níquel. La autorregulación es un mecanismo de la planta para controlar una nodulación excesiva bajo condiciones de estrés, por ejemplo, produce etileno y disminuye la absorción de nitrato forzando los mecanismos de regulación de la planta (Stougaard, 2000). La baja nodulación cuando hay níquel en la rizosfera, puede ser una respuesta a la presencia de contaminantes fomentando los mecanismos de regulación (Aveline *et al.*, 2003). Aunque la presencia de níquel no afectó la formación del nódulo, el

proceso de fijación biológica de nitrógeno disminuyó en presencia de este metal debido a la carencia de nódulos rojos, lo cual es indicativo de la presencia de enzima leghemoglobina que favorece el proceso de fijación de nitrógeno.

El estrés debido a la presencia de níquel interfiere con la actividad de la superóxido dismutasa, provocando una posible acumulación de H_2O_2 en el tejido foliar. De acuerdo con Chen *et al.*, (2000), se ha sugerido que el H_2O_2 inhibe el crecimiento de las plantas tratadas con metales pesados, ya que actúa como sustrato de la peroxidasa que participa en el endurecimiento de las paredes celulares, restringiendo la elongación celular (Díaz *et al.*, 2001). Para este experimento, las plantas tratadas con níquel presentaron menor crecimiento vegetativo en comparación con el testigo. A pesar de la importancia del Ni para el metabolismo del nitrógeno en las leguminosas, las plantas de frijol son consideradas como sensibles a este metal en comparación con otros cultivos (Gerendas *et al.*, 2000). En este experimento no se observaron efectos de toxicidad debido a níquel en las plantas; sin embargo, la nodulación fue inhibida en las concentraciones más altas afectando el crecimiento vegetativo.

El contenido de clorofila total para *Phaseolus vulgaris* en presencia de vanadio y níquel, pudo haber sido afectado debido a la falta de luz durante la última fase del experimento ya que el tejido foliar presentaba clorosis indicando una baja concentración de clorofila para ambos metales. De acuerdo con Sozudogru *et al.* (2001), el contenido de clorofila total aumenta conforme se incrementa la concentración de vanadio ($0-2 \mu\text{g g}^{-1}$) en *Glycine max*, comportándose como un oligoelemento para este cultivo en este intervalo de concentración de este metal ya que estimula la producción de sustancias como la clorofila. Para el presente trabajo se utilizaron concentraciones más elevadas de vanadio (hasta 120 mg kg^{-1}), y al hacer la comparación con la referencia citada se puede inferir que cualquier

metal a ciertas concentraciones deja de ser un contaminante y se convierte en un oligoelemento como lo ha descrito Panichev *et al.* (2006).

El frijol común reduce significativamente su rendimiento cuando los niveles de níquel en hoja sobrepasan los 40 mg kg^{-1} , afectando también los niveles de clorofila total debido a una menor absorción de Mg^{2+} ante un exceso de Ni. Por ejemplo, una dosis de fertilización de $2.3 \text{ mg NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O kg}^{-1}$ en suelo es suficiente para aumentar el contenido de este metal en hoja por encima de 5 mg kg^{-1} en peso fresco (Berton *et al.*, 2006). Las dosis mencionadas son menores a las que se aplicaron en el presente experimento, por lo que se corrobora que la concentración de níquel pudiera estar afectando los niveles de clorofila, aunque es necesario evaluar el contenido de vanadio y de níquel en el tejido foliar para corroborar estos resultados, así como relacionarlos con la influencia de la intensidad lumínica.

La actividad nitrogenasa (AN) que se lleva a cabo por las bacteroides del interior de los nódulos se inhibe por las altas concentraciones de oxígeno, cuya difusión es regulada por la leghemoglobina (Hussein, 2001). La actividad nitrogenasa requiere un gasto energético en forma de ATP y un poder reductor que se obtiene a partir de fotosintatos aportados por la planta, y es fundamental para la fijación biológica de nitrógeno (Taiz y Zeiger, 2002). Las investigaciones acerca de la variación en la capacidad de reducción de acetileno (forma como se determina la AN) y la leghemoglobina (LB) durante el crecimiento de algunas especies de leguminosas, han establecido una correlación positiva en el aumento de AN y LB en el tejido nodular a medida que aumenta la edad de la planta, produciéndose la máxima AN al inicio de la floración. Posteriormente, la AN disminuye por efecto de la competencia y mayor flujo de carbohidratos hacia el fruto (Pate y Herridge, 1978). Esta relación está fuertemente influida por los diferentes factores ambientales (Lie,

1974). Para cada especie vegetal y cepa de rizobios las condiciones óptimas de temperatura, humedad, radiación y pH son particulares (Soto-Urzúa y Baca, 2001). El uso de las reservas de carbohidratos que dan soporte a la AN, parece estar mediado por la temperatura (Skwierinski *et al.*, 1995).

La técnica de fluorescencia por rayos X, no es una técnica tradicional en el análisis elemental en material biológico, por lo que tiene la desventaja de que para cada análisis se tiene que calibrar el equipo (SANDRA) y estandarizar los valores del mismo. Sin embargo, es una técnica rápida, versátil y no destructiva para el análisis del contenido elemental en los diferentes órganos vegetales.

El contenido elemental de los nódulos fue diferente para cada metal contaminante aplicado (V y Ni). La concentración para cada uno de los elementos fue menor en los nódulos recolectados de las plantas contaminadas con vanadio en comparación de aquellos tratados con níquel. Los elementos que se encontraron en mayor proporción son el potasio y el manganeso en ambos metales contaminantes. Sin embargo, se desconoce el contenido de estos elementos en los diferentes tejidos de la planta y por lo tanto, cómo están influyendo en las demás variables.

El comportamiento del vanadio fue similar respecto los otros elementos analizados; en las concentraciones de 0 a 50 mg L⁻¹ el vanadio se encontraba en el límite más bajo de detección, mientras que la concentración más alta se encontró en 100 mg L⁻¹. Para fósforo, azufre, potasio, calcio, manganeso y hierro se observó que a medida que aumenta la concentración de vanadio, estos elementos disminuyen su intensidad llegando a su punto más bajo en 50 mg L⁻¹, para después volver a aumentar en 75 mg L⁻¹. En el caso de cloro, cobre y zinc la menor intensidad de estos elementos se encontró en 75 mg V L⁻¹. En cuanto al níquel, la menor intensidad se observó en la concentración de 50 mg L⁻¹ y la mayor en

120 mg Ni L⁻¹, en relación a todos los elementos analizados. En potasio, zinc y calcio se observó una correlación, ya que a medida que aumenta la concentración de níquel de igual manera aumenta la concentración del elemento analizado; mientras que para cobre, azufre, manganeso, cobre y fósforo se encontró una correlación inversa, es decir, conforme aumenta el níquel la concentración del otro elemento disminuye.

En presencia de altas concentraciones de vanadio (75-100 mg V L⁻¹) el contenido de hierro y de azufre disminuyó en los nódulos. El hierro es un componente de las enzimas implicadas en la transferencia de electrones, y los dos principales grupos de proteínas que contienen Fe son las hemo y las Fe-S (Taiz y Zeiger, 2002). Las primeras se caracterizan por la presencia de un complejo Fe- hemo-porfirina que actúa como un grupo prostético de citocromos que facilitan el transporte de electrones en la respiración (Fernández-Luqueño y Espinoza-Victoria, 2008). La actividad de las proteínas hemo disminuye en deficiencia de Fe, causando clorosis en las hojas jóvenes ya que este elemento se considera necesario para la síntesis de complejos proteína-clorofila. La baja movilidad del hierro se debe a su precipitación en las hojas más viejas al formar óxidos insolubles, fosfatos o la formación de fitoferritina (Rivera-Ortiz *et al.*, 2009). La cadena de transporte de electrones durante la fotosíntesis tiene varios grupo hemo, cuando hay deficiencia de Fe se reduce el contenido de clorofila y la actividad de los transportadores de electrones en ambos fotosistemas. La ferridoxina (proteína Fe-S) es el primer compuesto redox estable en la cadena de transporte electrones durante la fotosíntesis. La falta de Fe disminuye la producción de ferridoxina, que a su vez afecta el transporte de electrones (Taiz y Zeiger, 2002).

El azufre es componente de la cisteína y la metionina, además de coenzimas y vitaminas esenciales para el metabolismo (Taiz y Zeiger, 2002). Para estar disponible para las plantas, las formas reducidas de azufre deben ser primero oxidadas; aproximadamente el

40% de las enzimas (ferrodoxina, nitrogenasa, etc.) dependen de la presencia de grupos sulfidrilo (SH) para su actividad catalítica. Los grupos SH proporcionan sitios de unión para los metales y se relacionan con la destoxificación de diversos componentes, además de participar en reacciones redox debido a su relativa facilidad de oxidación (Imsande y Schmidt, 1998).

Cuando la concentración de vanadio fue baja ($0-50 \text{ mg L}^{-1}$), el hierro y el azufre presentaron una intensidad alta que cambia conforme aumentó la concentración de este metal. Esto se puede deber a que el azufre participa en la destoxificación de metales a nivel celular, por lo que al aumentar su concentración el mecanismo pierde eficiencia en la destoxificación, afectando la movilidad del hierro y por lo tanto, se inhiben los procesos metabólicos relacionados con este elemento, principalmente la fotosíntesis (Iqbal *et al.*, 2012).

Al aumentar la concentración de níquel, la intensidad de fósforo y potasio incrementó, mientras que la del cobre disminuyó. El fósforo tiene como función principal el almacenamiento y la transferencia de energía a través de la molécula de ATP. Además, forma parte de los ácidos nucleicos, nucleótidos, coenzimas, fosfolípidos, etc.; y participa en la división y crecimiento celular, la floración, la fructificación y la formación de semillas (Taiz y Zeiger, 2002). El potasio está relacionado con la osmoregulación, la síntesis de los almidones, la activación de enzimas, la síntesis de proteínas, el movimiento osmótico y el balance de cargas iónicas, y contribuye en la adaptación de los cultivos a condiciones de estrés biótico y abiótico (Salisbury y Ross, 2004). El cobre es parecido al Fe ya que forma quelatos altamente estables que permiten la transferencia de electrones durante los procesos redox de la fisiología vegetal. Varias enzimas (ácido ascórbico oxidasa, tirosinasa, monoaminoxidasa, uricasa, citocromo oxidasa, fenolasa, lacasa) y proteínas

(plastocianina) que contienen Cu desempeñan un papel fundamental en la fotosíntesis, en la respiración, o en la desintoxicación de radicales libres. La reducción del transporte de electrones en la fotosíntesis, como consecuencia de concentraciones bajas de plastocianina provoca la disminución de la tasa de fijación de CO₂, de tal forma que el contenido de almidón y sacarosa se reduce (Taiz y Zeiger, 2002). El manganeso desempeña un importante papel en los procesos redox, como el transporte de electrones en la fotosíntesis y en la desintoxicación de radicales libres de oxígeno (Salisbury y Ross, 2004). Cuando aumenta la concentración de níquel en los nódulos se tiende a disminuir la intensidad del fósforo y manganeso, mientras que el cobre no fue detectado en las concentraciones más elevadas de níquel, siendo este metal el predominante en relación al cobre. En contraste, la intensidad del potasio es mucho más elevada que la del níquel, y se observó la misma tendencia de los elementos anteriores en la que al elevarse la concentración de níquel aumenta la intensidad de ambos metales.

Todos los elementos analizados cumplen una función y se relacionan entre sí; al propiciarse cambios en la concentración de alguno de ellos se alteran diversos procesos biológicos dentro de la planta. Por ejemplo, al aumentar la concentración de Ni en los nódulos es posible que la producción de radicales libres incremente por efecto de un estrés oxidativo, y al bajar la concentración de Cu la desintoxicación se hace más lenta, ya que este elemento estimula los procesos de detoxificación por metales (Khalil *et al.*, 2006). Un mecanismo de reacción es el aumento en la producción de Mn que sintetiza la superóxido dismutasa para bajar la producción de radicales libres (Becana *et al.*, 1986). Como todos los elementos están relacionados al aumentar la concentración de vanadio o de níquel, los rizobios pueden ser inhibidos, afectado así el establecimiento de la simbiosis con la leguminosa, sin llegar a causar síntomas de toxicidad. La alteración en la concentración de

ambos metales, influyó en el contenido elemental de los nódulos, y en cambios en el contenido de clorofila, afectando la fotosíntesis, la actividad nitrogenasa, y por consiguiente, el crecimiento de *Phaseolus vulgaris*.

CONCLUSIONES

El vanadio y el níquel son tóxicos para la simbiosis *P. vulgaris-R. tropici* en un sistema de bolsa de crecimiento. La contaminación con vanadio y níquel no afectó la capacidad de *P. vulgaris* var. Flor de mayo de establecer simbiosis con *Rhizobium tropici* CIAT899, sin embargo el número total de nódulos fue menor en las concentraciones más altas para ambos metales.

El peso seco total fue mayor en las plantas inoculadas con *Rhizobium*, mientras que el contenido de clorofila total y actividad nitrogenasa es mayor en las plantas no inoculadas.

A medida que aumentó la concentración de los metales se disminuyó el contenido de clorofila y la actividad nitrogenasa.

La técnica de fluorescencia por rayos X no es una técnica ampliamente utilizada en el análisis de material biológico; sin embargo, demostró ser método útil, rápido y no destructivo en la determinación del contenido elemental en los nódulos de *Phaseolus vulgaris* contaminados con vanadio y níquel. El empleo de fluorescencia por rayos X, mediante el SANDRA permitió determinar que a medida que aumenta la concentración de vanadio en los nódulos el contenido elemental del hierro y el azufre disminuye en concentraciones superiores a 75 mg V L^{-1} , mientras que para níquel se observó el mismo efecto en potasio, fósforo y cobre. El contenido de hierro y manganeso se incrementó conforme la concentración de níquel aumentó.

CAPÍTULO V

RESPUESTAS DE LA SIMBIOSIS TRIPARTITA *Rhizobium tropici-Phaseolus vulgaris-Rhizophagus intraradices* EN SUELO CONTAMINADO CON VANADIO Y NÍQUEL

RESUMEN

Esta investigación evaluó el efecto de la simbiosis tripartita entre *Rhizobium tropici* CIAT899, *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo y *Rhizophagus intraradices* en la fitoextracción de vanadio y/o níquel (120 mg kg^{-1}). El experimento fue de un factorial 4×2 , con cuatro niveles de inoculación [Sin inocular (T), *Rhizobium tropici* (R), *Rhizophagus intraradices* (M) y doble inoculación (R+M)] y dos niveles de V o Ni (con o sin metal) en suelo, durante 60 días en condiciones de invernadero. Se evaluó el peso seco total, la tasa relativa de crecimiento, el número de nódulos, el porcentaje de colonización micorrízica, el contenido de clorofila y carotenoides, el intercambio gaseoso de la planta (transpiración, conductancia estomática, fotosíntesis, y uso eficiente del agua), la actividad nitrogenasa, y el contenido de V y Ni en tejido foliar y suelo. La simbiosis tripartita *Rhizobium-Phaseolus-Rhizophagus* fue más sensible a la presencia de níquel que de vanadio. En presencia de V, las plantas con R presentaron mayor número de nódulos (12 nódulos), mientras que la doble inoculación (R+M), mostró un porcentaje de colonización micorrízica de 26%, y contenido de clorofila total de 0.008 mg cm^{-2} . La actividad fotosintética fue más elevada en T ($10.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) con aplicación de V. La mayor actividad nitrogenasa se presentó en las plantas no contaminadas e inoculadas con R ($10218 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ mL}^{-1}$). El contenido de V en suelo fue más elevado en las plantas con M (1.2 mg V kg^{-1}). Las plantas contaminadas con Ni presentaron menor peso seco que las no contaminadas, y un promedio de 13 nódulos en las plantas con R sin contaminar, además de 60% de colonización micorrízica con la doble inoculación. La clorofila *b* fue la más sensible a la contaminación con Ni ($0.0025 \text{ mg cm}^{-2}$). La mayor actividad fotosintética ($11.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y la actividad nitrogenasa ($9837 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ mL}^{-1}$) se presentó en el tratamiento con R sin contaminante. El tratamiento con la concentración más elevada de Ni en suelo se presentó en las plantas con M ($4.5 \text{ mg Ni kg}^{-1}$).

Palabras clave: simbiosis, colonización micorrízica, intercambio gaseoso, actividad nitrogenasa

CHAPTER V

RESPONSES OF THE TRIPARTITE SYMBIOSIS *Rhizobium tropici*-*Phaseolus vulgaris*-*Rhizophagus intraradices* AT CONTAMINATED SOIL WITH VANADIUM AND NICKEL

ABSTRACT

This research evaluated the responses of the tripartite symbiosis *Rhizobium tropici* CIAT899, *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo and *Rhizophagus intraradices* to contaminated soil with vanadium or nickel (120 mg kg^{-1}). A 4x2 factorial experiment was set with four levels of inoculation [(control (C), *Rhizobium tropici* (R), *Rhizophagus intraradices* (M) and the double inoculation (R+M)] and two levels of V or Ni (with or without the metal) in the soil, during 60 days under greenhouse conditions. The total dry weight, the relative growth rate, the number of nodules, the mycorrhizal colonization, the content of chlorophyll and carotenoids, the plant gas exchange (transpiration, stomatal conductance, photosynthesis, and water use efficiency), the nitrogenase activity, and the content of V or Ni in leaves or soil were determined. The tripartite symbiosis *Rhizobium-Phaseolus-Rhizophagus* was more sensitive to Ni than V. In presence of V, plants inoculated with R had greater number of nodules (12 nodules); whereas the double inoculation (R+M) showed 26% of mycorrhizal colonization and 0.008 mg cm^{-2} of total chlorophyll. The highest photosynthetic activity was found at C ($10.9 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-2}$) in presence of V. The greatest nitrogenase activity was observed in plants inoculated with R and without contamination ($10218 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ mL}^{-1}$). The content of V in soil was high in plants with M (1.2 mg V kg^{-1}). In regards to Ni contamination, plants showed lower dry weight than plants without Ni, and plants with R without Ni had greater number of nodules (13 nodules), whereas plants with double inoculation had 60% of mycorrhizal colonization. Chlorophyll *b* was more sensitive to Ni contamination ($0.0025 \text{ mg cm}^{-2}$). The highest photosynthetic activity ($11.2 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) and nitrogenase activity ($9837 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ mL}^{-1}$) was obtained at plants inoculated with R without Ni. The content of Ni in soil was high in plants with M ($4.5 \text{ mg Ni kg}^{-1}$).

Key words: *symbiosis, mycorrhizal colonization, plant gas exchange, nitrogenase activity*

INTRODUCCIÓN

La contaminación del suelo por altas concentraciones de metales derivadas de las actividades industriales es uno de los problemas ambientales actuales. El riesgo de la presencia de estos contaminantes en el ambiente se centra en su capacidad de acumularse en la superficie del suelo quedando accesibles hacia la rizosfera y con ello se favorece su movilización hacia las cadenas tróficas hasta llegar al ser humano (Puga *et al.*, 2006).

El petróleo está compuesto por una mezcla de compuestos orgánicos, heteroátomos y compuestos metálicos. Estos últimos están presentes como metaloporfirinas destacando las porfirinas de vanadio y de níquel (Speight, 2001). Ambos metales cumplen una función biológica; sin embargo, la emisión de gases producto de la quema de los combustibles fósiles ha contribuido a la elevada concentración de estos metales en el ambiente. Por ejemplo, en zonas aledañas a campos petroleros de México, la acumulación de vanadio y níquel varía de acuerdo al transecto, entre más cercano se encuentre el suelo a la fuente contaminante la concentración es más elevada (Zavala-Cruz *et al.*, 2003).

La fitorremediación se ha utilizado en los últimos años para eliminar contaminantes orgánicos e inorgánicos presentes en el ambiente. En el caso de los metales, la fitoextracción permite la acumulación de metales en raíces, tallos o follajes, proceso que es facilitado por microorganismos asociados a la rizosfera (Morikawa y Takahasi, 2000). El establecimiento y el éxito de la fitoextracción está mediado por el tipo de plantas a utilizar, de las cuales se han reportado exitosamente: *Medicago sativa*, *Triticum aestivum*, *Glycine max*, *Thlaspi* sp., *Zea mays*, *Phaseolus vulgaris*, *Alyssum* sp., entre otras (Andrade *et al.*, 2004; Freeman *et al.*, 2004; Nakata *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011). Además de la planta, es importante considerar las condiciones del suelo (pH, materia orgánica, contenido

nutrimental, etc.), el tipo y la concentración del contaminante, y los microorganismos asociados a la rizosfera (Singh *et al.*, 2007).

A pesar de la importancia de los microorganismos simbióticos en la fitoextracción de metales, se ha prestado poca importancia al papel que tienen durante los procesos que se dan en el suelo, especialmente cuando se trata de una doble simbiosis (Andrade *et al.*, 2004). La mayoría de las investigaciones se centran en el uso de un solo microorganismo, destacando los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) debido a su capacidad de acumular metales pesados en sus hifas (Hildebrandt *et al.*, 2007). Las plantas micorrizadas tienen mayor tolerancia a las elevadas concentraciones de metales debido a la capacidad de inmovilizarlos en la raíz; y a su vez, la pared celular de los HMA tiene una capacidad de adsorber cationes (Navarro-Aviño *et al.*, 2007), además los HMA, reducen el acceso de los metales a la planta a través del apoplasto y favorecen la quelación mediante los exudados (Leyval *et al.*, 1997). A pesar de la contaminación por metales, se puede establecer la simbiosis entre los HMA y las plantas; por ejemplo, se ha reportado 30% de colonización de un consorcio de HMA en raíces de *Trifolium* sp., los cuales crecen naturalmente en suelos cercanos a minas (Gildon y Tinker, 1981). También se reportó que en un suelo con 456 mg kg⁻¹ de plomo, disminuye el número de esporas por gramo de suelo, reportándose un porcentaje de colonización del 27% (Díaz y Honrubia, 1993). Esto demuestra que el uso de los HMA en la fitoextracción de metales se ha estudiado ampliamente (Upadhyaya *et al.*, 2010). Sin embargo, todavía se desconocen las relaciones que se presentan al asociarse con más de un microorganismo en la rizosfera.

Las leguminosas y la simbiosis que forman con los rizobios, representan un componente importante en los ciclos biogeoquímicos en los ecosistemas naturales y en la agricultura (Feller *et al.*, 2008). Las leguminosas han sido asociadas a suelos contaminados

con arsénico y plomo, entre otros (Reichman, 2007), notándose efectos en la disminución de la nodulación. El estrés por metales induce que ciertas proteínas involucradas en el metabolismo vegetal no se expresen adecuadamente y se inicie la síntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) (Qureshi *et al.*, 2010). Sin embargo, el establecimiento de esta simbiosis estimula en la planta la tolerancia a metales pesados; por ejemplo, la simbiosis entre *Astragalus sinicus* y *Mesorhizobium huakuii* subsp. *rengei*, toleró concentraciones de hasta 100 mg kg⁻¹ de cadmio y se contabilizaron 1 x 10⁶ unidades formadoras de colonias mL⁻¹ (Ike *et al.*, 2007).

La importancia de las leguminosas en la fitoextracción de metales pesados o elementos potencialmente tóxicos, radica en que puede establecer simbiosis tanto rizobios como con HMA. Estas relaciones simbióticas tripartitas han sido poco estudiadas en el contexto de la fitorremediación, por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la simbiosis tripartita entre *Rhizobium tropici*-*Phaseolus vulgaris*-*Rhizophagus intraradices* ante la presencia de vanadio y níquel.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estableció un experimento factorial 4x2, considerando: *Phaseolus vulgaris* sin inocular (T), o inoculado con *Rhizobium tropici* (R), *Rhizophagus intraradices* (M) y con la doble inoculación (R+M), y dos niveles de vanadio o de níquel (con o sin metal). Cada tratamiento estuvo integrado por ocho repeticiones, y se mantuvieron en condiciones de invernadero durante 60 días.

El suelo que se utilizó fue colectado de San Diego, Estado de México (Cuadro 5.1), esterilizado a 121 °C en intervalos de 2 h durante dos días, y secado a 110 °C durante 4 días, y colocando 170 g de suelo estéril en recipientes de plástico de 59 cm³ de capacidad. Para la contaminación se pesaron 120 mg de NiSO₄·6H₂O (Sigma-Aldrich®) y/o

O₅SV·H₂O (Sigma-Aldrich®), y se diluyeron en solución nutritiva Long Ashton modificada con 10.25 µg mL⁻¹ de fósforo (Ver Anexo Cuadro 4A), esterilizada a 121 °C durante 18 minutos.

Cuadro 5.1. Origen, y principales características físicas y químicas del suelo utilizado en el experimento

Suelo	pH 1:2 H ₂ O	CE 1:5 H ₂ O mmhos	M.O. (%) Walkley Black	N (%)	P Olsen (mg kg ⁻¹)	K (Meq/100 g) NH ₄ ac 1N pH 7	CIC pH 7	N-NO ₃ N-NH ₄ (mg kg ⁻¹) KCl 2N	Textura	
San Diego, Estado de México	7.2	0.28	2.8	0.14	34	1.5	14.8	45	6	Franco Arenoso

Las semillas de *Phaseolus vulgaris* Flor de mayo de origen comercial se desinfectaron con alcohol etílico al 95% durante 1 minuto y aplicando tres lavados con agua destilada estéril. Posteriormente, las semillas se transfirieron a una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 20 min y se enjuagaron siete veces con agua destilada estéril. Finalmente, las semillas fueron colocadas en una solución de gentamicina (500 mg L⁻¹) a la que se le añadió una gota de Tween 80, durante 30 min en agitación constante. Transcurrido ese tiempo la solución se decantó, y las semillas se colocaron sobre papel absorbente estéril para su secado en condiciones de campana de flujo laminar. Una vez secas, se sembraron dos semillas en cada uno de los recipientes de plástico con el suelo estéril contaminado o sin contaminar, respectivamente.

En los tratamientos correspondientes, antes de sembrar la semilla, se inoculó con 0.1 g de raíces de *Sorghum vulgare* Pers colonizadas con *Rhizophagus intraradices* (65% de colonización).

El inóculo de *Rhizobium* se preparó en CELM (Ver Anexo Cuadro 2A) inoculado con una asada de la cepa de *Rhizobium* con crecimiento activo, y se incubó a 28 °C en agitación orbital a 180 rpm por 48 h. Transcurrido ese tiempo, el inóculo fue centrifugado a 7500 rpm durante 10 min y el pellet bacteriano fue recuperado en tubos para centrifuga de 50 mL con 35 mL de agua destilada estéril. A partir de esta suspensión se cuantificó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de inóculo. La inoculación se realizó cuatro días después de la germinación, al aplicar 3 mL de dicha suspensión con una carga bacteriana de 4.2×10^9 UFC mL⁻¹ por planta, en los tratamientos correspondientes.

Las plantas se mantuvieron durante 60 días en condiciones de invernadero. La temperatura y humedad relativa fue monitoreada con un data logger modelo 150. La temperatura mínima fue de 12 °C y la máxima diurna 39°C, la humedad relativa media fue de 53% (máxima 80% y mínima 23%), y se aplicaron riegos diarios con agua destilada estéril. Una vez por semana las plantas fueron fertilizadas con solución nutritiva Long Ahston modificada (Ver Anexo Cuadro 4A).

Nodulación y colonización micorrízica

Después de 60 días, las plantas se cosecharon y se disectaron separando hojas, tallos, raíces y nódulos; además se contabilizó el número total de nódulos. Cada órgano disectado se secó a 70°C durante 72 h, para evaluar su peso seco.

Se evaluó el porcentaje de colonización micorrízica en las raíces de *Phaseolus vulgaris* mediante el método de clareo y tinción con azul tripano (Phillips y Hayman, 1970). Las raíces se lavaron y se cortaron en segmentos de 1 cm aproximadamente, para colocarlas en cápsulas esterilizables con una cantidad suficiente de KOH al 10% hasta

cubrir las. Se sometieron a calor en autoclave a 100 °C durante 10 min. Transcurrido ese tiempo, se procedió a enjuagar con agua corriente y se agregó peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 10% durante 10 min y se enjuagaron con agua corriente. Posteriormente, las raíces se sumergieron en HCl al 10% por 10 min y sin enjuagar se tiñeron con la solución colorante (azul tripano 0.05% en lactoglicerol) a 100 °C durante 10 min.

Se disectaron 25 segmentos de raíces teñidas de 1 cm de largo, y se colocaron en portaobjetos paralelamente (tres repeticiones por planta). Sobre las raíces se adicionaron gotas de lactoglicerol y se colocaron cubreobjetos. La evaluación de la colonización se realizó mediante una observación al microscopio óptico a 40x (Microstar IV 410), efectuando tres pasajes equidistantes por laminilla y se registraron los segmentos con hifas, vesículas y arbusculos. El porcentaje de colonización se estimó dividiendo el número total de segmentos colonizados entre el número de segmentos totales observados (Ferrera-Cerrato *et al.*, 1993).

Estimación de la tasa absoluta de crecimiento, contenido de clorofila total, intercambio gaseoso y actividad nitrogenasa

La estimación de la tasa absoluta de crecimiento, se realizó mediante la medición de la altura de cada una de las plantas a partir del día 17 después de la germinación y hasta el día 45. Con los datos obtenidos se calculó la tasa absoluta de crecimiento mediante la siguiente ecuación (Reed, 2007).

$$TAC = \frac{n2 - n1}{t2 - t1}$$

Donde: **TAC**= Tasa relativa de crecimiento; **n2**=Altura final (cm); **n1**= Altura inicial (cm); **t2**= Fecha del último muestreo (días); **t1**= Fecha del primer muestreo (días).

A los 60 días, se determinó el contenido de clorofila total, actividad nitrogenasa e intercambio gaseoso. Para la determinación de clorofila total se prepararon tubos con 3 mL de metanol al 80% en los que se colocó un fragmento de hoja fresca (0.4 mm²), realizándose por triplicado para cada tratamiento. De cada muestra se tomó 1 mL y se traspasó a tubos eppendorf (1.5 mL de capacidad), para centrifugarlos a 3000 rpm durante 5 min. A partir del sobrenadante, se transfirieron 200 µL a microplacas de 96 pozos para tomar lecturas de absorbancia de 470, 653 y 666 nm (Dere *et al.*, 1998) en espectrofotómetro (BIOTEK, modelo Synergy 2).

El intercambio gaseoso se determinó con un medidor de gases infrarrojo (CIRAS 2 Portable Photosynthesis System), para lo cual, se tomaron tres plantas por tratamiento utilizando la hoja central del foliolo, con el suelo a capacidad de campo. La medición se llevó a cabo por la mañana, momento en que se presenta una mayor actividad fotosintética en la planta. Se midió la fotosíntesis ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), la asimilación de CO₂, la tasa de transpiración ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), y la conductancia estomática ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); y a partir de los datos de la conductancia estomática y la fotosíntesis se calculó el uso eficiente del agua (gs/Pn).

La determinación de la actividad nitrogenasa se realizó mediante la prueba de reducción de acetileno (Hardy *et al.*, 1968). Las raíces recién cortadas de cada uno de los tratamientos por triplicado, se colocaron en frascos de vidrio de 210 mL sellados herméticamente, y se retiró el 10% del volumen de aire con una jeringa de 50 mL, remplazándolo con acetileno e incubándolos durante 1h. Posteriormente, se tomaron 3 mL de cada muestra y se colocaron en tubos Vacutainer® al vacío de 7 mL de capacidad. A partir de estas muestras se inyectó 1 mL en un cromatografo de gases Hewlett Packard (5890 Series II Gas Chromatograph), con detector de ionización de flama, para medir la

reducción de acetileno a etileno. Los resultados se expresaron en nM de etileno (C_2H_4) h^{-1} mL^{-1} .

Contenido de vanadio y níquel en tejido foliar y en el suelo

A partir del tejido foliar secado a 70 °C durante 48 h, se seleccionaron tres plantas por tratamiento y se molieron individualmente en mortero de porcelana. El contenido elemental de vanadio y de níquel en hoja y suelo se determinó mediante digestión vía húmeda (Jackson, 1976; Alcantar-González, 1992). Se pesó 1 g de material foliar seco molido, colocándolo en un matraz Erlenmeyer de 125 mL, al cual se agregaron 10 mL de HNO_3 concentrado y 2.5 mL de una mezcla de $HClO_4$ (70%) y H_2SO_4 concentrado en una proporción 9:1(v/v). Las muestras se digestaron durante la noche, y luego se colocaron en la plancha de digestión a 120 °C hasta reducir el volumen a 1.5 mL, y que el color de la solución fuera totalmente transparente. Al término del proceso anterior, se dejó enfriar y filtrar, para agregar agua destilada hasta completar 50 mL (permitir que el sílice se decante). El filtrado se midió usando espectrofotometría de absorción atómica.

Diseño experimental

El experimento para cada metal fue un factorial 2x4, con dos niveles de contaminación (suelo contaminado y sin contaminar) y cuatro niveles de inoculación (testigo, *Rhizobium tropici*, *Rhizophagus intraradices* y *Rhizobium* + *Rhizophagus*). Tanto para vanadio como para níquel, se tuvieron ocho tratamientos con ocho repeticiones cada uno, distribuidos en un diseño experimental completamente al azar. Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias (LSD, $\alpha = 0.05$) con el paquete de análisis estadístico SAS 9.0 (SAS Institute Inc., 1999).

RESULTADOS

a) Respuesta de la simbiosis tripartita ante vanadio

Las plantas en presencia de vanadio (120 mg kg^{-1}), no presentaron diferencias significativas en el peso seco total por efecto de ninguno de los tres factores analizados (Figura 5.1). De manera general, las plantas con *Rhizobium* tuvieron mayor peso seco en comparación con el resto de los tratamientos (Figura 5.1B); de igual manera las plantas sin la aplicación de vanadio presentaron mayor peso total que aquellos tratamientos contaminados (Figura 5.1 A y C).

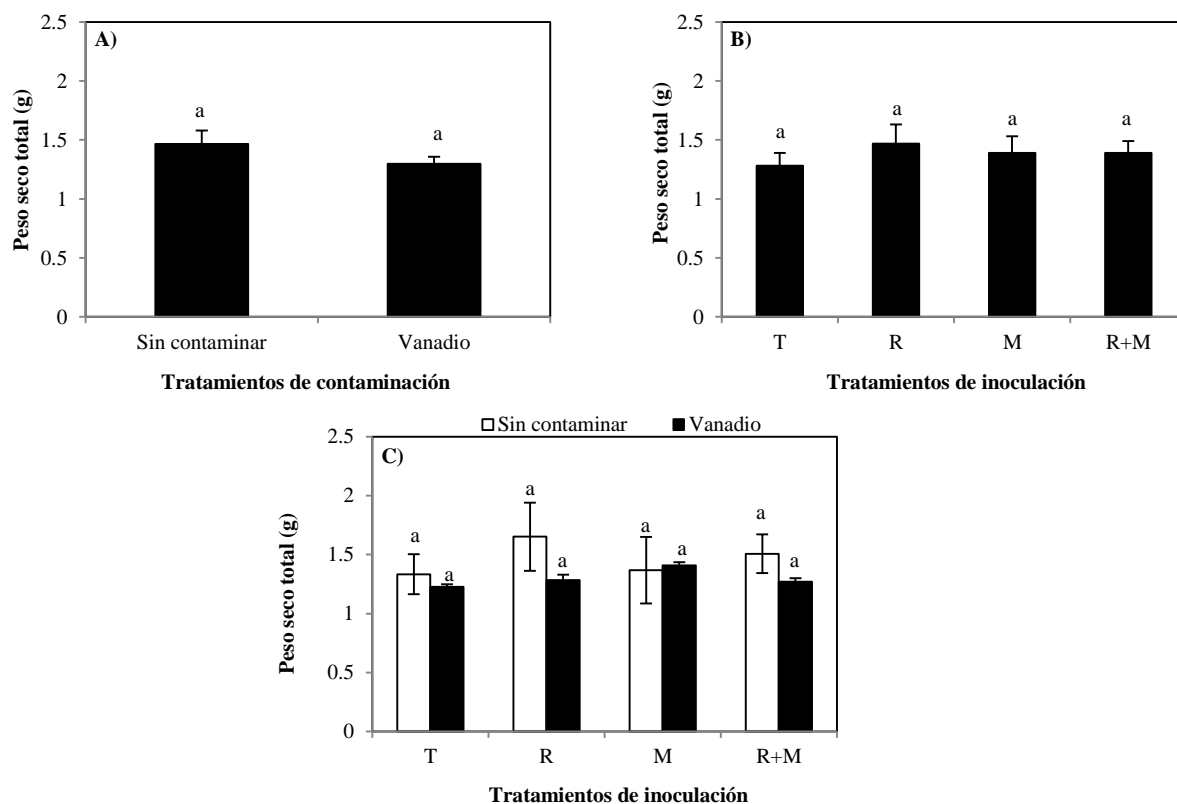


Figura 5.1. Peso seco total de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* CIAT899 y *Rhizopagus intraradices*, y por efecto de la contaminación con vanadio (120 mg kg^{-1}). (A) Efecto de concentración de vanadio; (B) Efecto de inoculación; (C) Efecto de tratamientos, después de 60 días. Letras idénticas sobre las barras para cada gráfica son estadísticamente iguales (LSD, $\alpha=0.05$). Medias \pm Error estándar. Abreviaciones: T= Testigo; R= *Rhizobium tropici*; M= *Rhizopagus intraradices*; R+M=*Rhizobium* y *Rhizopagus*.

La tasa absoluta de crecimiento no mostró diferencias significativas por los factores de contaminación y tratamientos (Figura 5.2A y C); mientras que por efecto de la inoculación se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$), en el cual el tratamiento, con *Rhizophagus* tuvo mayor tasa de crecimiento que el testigo (Figura 5.2B). Las plantas sin contaminar presentaron mayor tasa absoluta de crecimiento, excepto en el tratamiento correspondiente a R+M (Figura 5.2C).

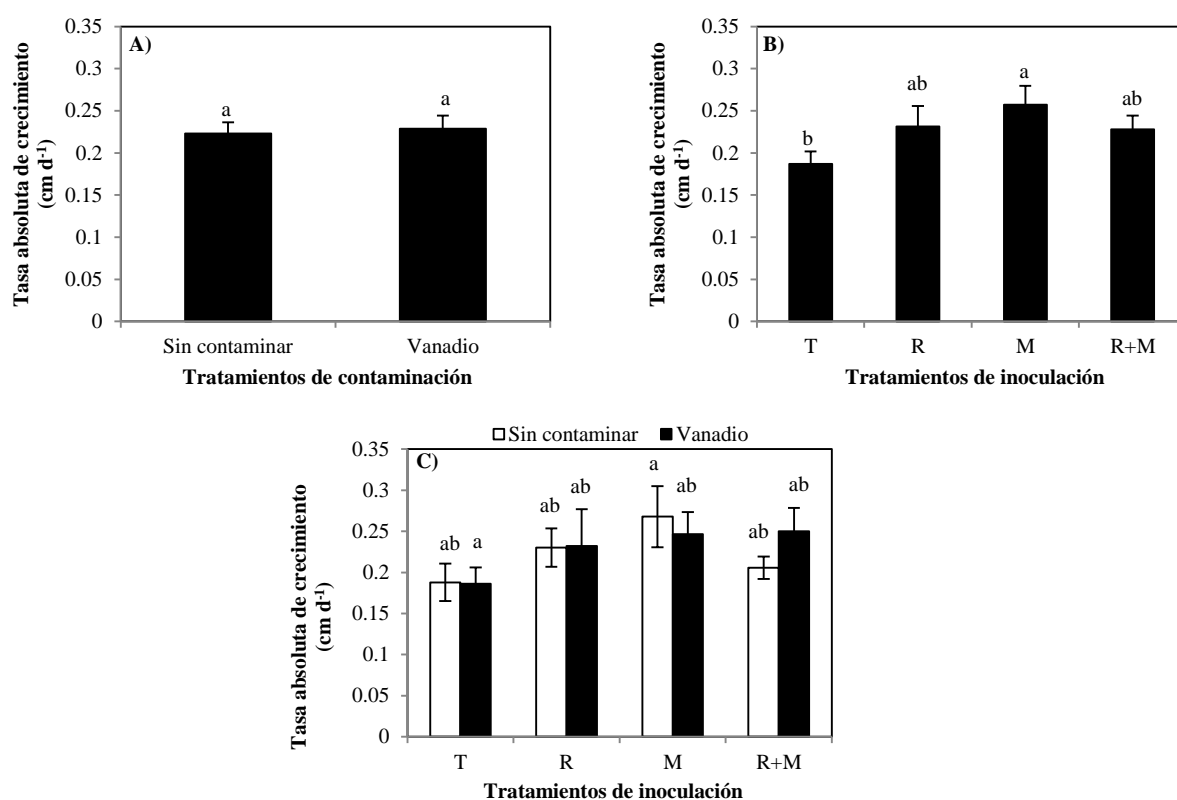


Figura 5.2. Tasa absoluta de crecimiento de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* CIAT899 y *Rhizophagus intraradices*, y por efecto de la contaminación con vanadio (120 mg kg⁻¹). (A) Efecto de concentración de vanadio; (B) Efecto de inoculación; (C) Efecto de tratamientos, después de 60 días. Letras idénticas sobre las barras para cada gráfica son estadísticamente iguales (LSD, $\alpha=0.05$). Medias \pm Error estándar. Abreviaciones: T= Testigo; R= *Rhizobium tropici*; M= *Rhizophagus intraradices*; R+M=*Rhizobium* y *Rhizophagus*.

El número de nódulos no mostró diferencias significativas por efecto la contaminación con vanadio (Figura 5.3A); sin embargo por efecto de la inoculación ($p \leq 0.05$) (Figura 5.3B) y por tratamiento (LSD, $\alpha = 0.05$) (Figura 5.3C) presentaron diferencias significativas. El mayor número de nódulos se encontró en el tratamiento inoculado con R (Figura 5.3B), mientras que el testigo y el tratamiento con M la nodulación fue significativamente baja (Figura 5.3B). En presencia de vanadio las plantas con R+M tuvieron mayor nodulación respecto al testigo y a M (Figura 5.3C).

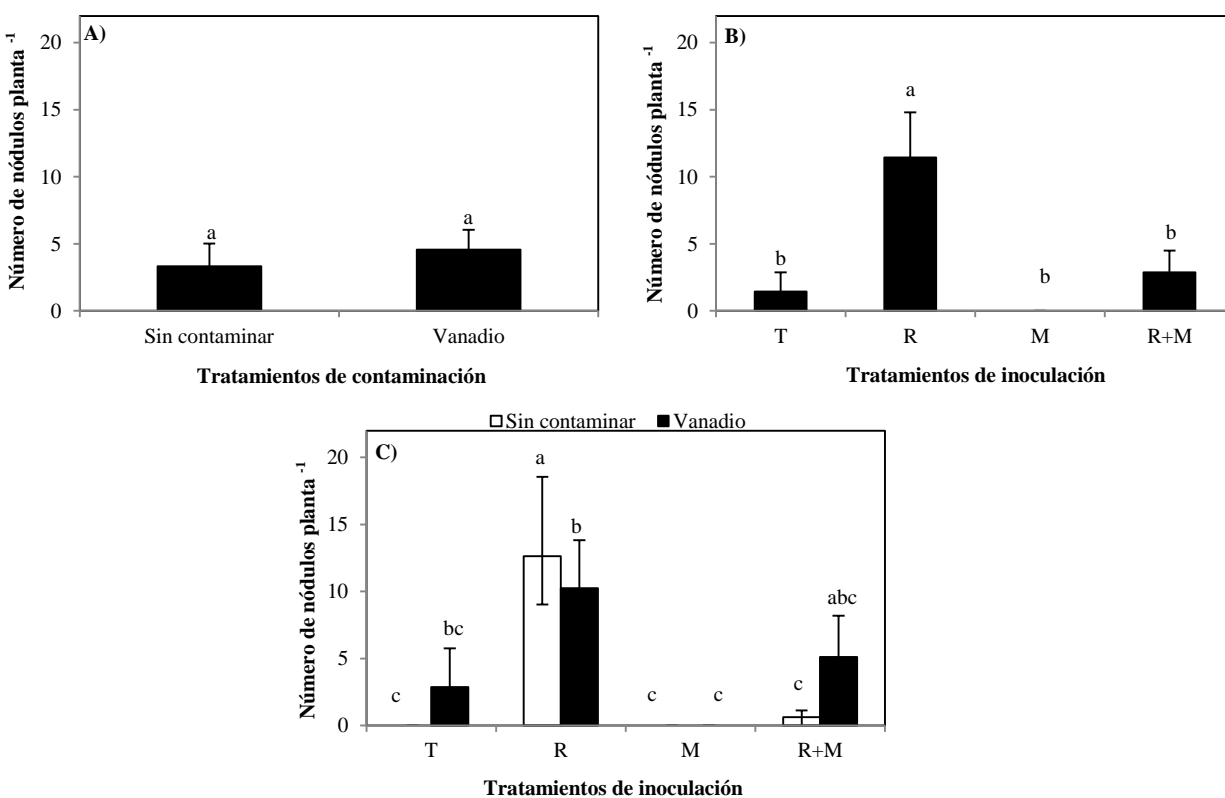


Figura 5.3. Número de nódulos de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* CIAT899 y *Rhizophagus intraradices*, y por efecto de la contaminación con vanadio (120 mg kg^{-1}). (A) Efecto de concentración de vanadio; (B) Efecto de inoculación; (C) Efecto de tratamientos, después de 60 días. Letras idénticas sobre las barras para cada gráfica son estadísticamente iguales (LSD, $\alpha = 0.05$). Medias \pm Error estándar. Abreviaciones: T= Testigo; R= *Rhizobium tropici*; M= *Rhizophagus intraradices*; R+M=*Rhizobium* y *Rhizophagus*.

El porcentaje de colonización de *Rhizophagus intraradices* no mostró diferencias significativas entre las plantas no contaminadas con respecto a las contaminadas con vanadio (Figura 5.4). La colonización micorrízica fue menor en los tratamientos no contaminados, encontrándose 13% de colonización para la inoculación con *Rhizophagus*, y 18% para la doble inoculación. Se estimó un porcentaje de colonización de aproximadamente un 30% para los tratamientos de *Rhizophagus* y la doble inoculación en condiciones de suelo contaminado (Figura 5.4).

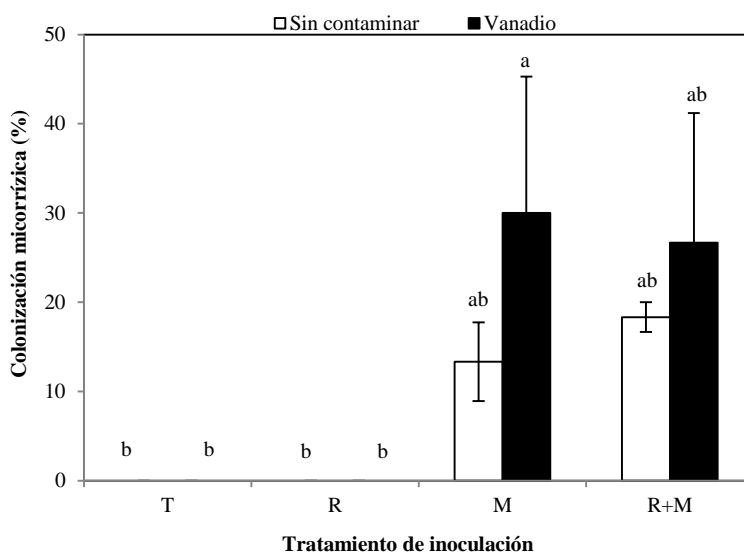


Figura 5.4. Porcentaje de colonización micorrízica de *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo por efecto de la aplicación de vanadio (120 mg kg^{-1}), después de 60 días. Letras idénticas sobre las barras para cada gráfica son estadísticamente iguales (LSD, $\alpha=0.05$). $n=3$ Medias \pm Error estándar. Abreviaciones: T= Testigo; R=*Rhizobium tropici*; M= *Rhizophagus intraradices*; R+M=*Rhizobium* y *Rhizophagus*.

El contenido de Clorofila (*a*, *b*, total) y el contenido de carotenoides no mostraron diferencias significativas por efecto de los factores independientes, ni por efecto de tratamiento (Figura 5.5 A, B, C, D). Sin embargo, se observó mayor contenido de clorofila en las plantas contaminadas con vanadio e inoculadas con *Rhizophagus* y la doble

inoculación (Figura 5.5A, B y C). En los tratamientos correspondientes a la inoculación con *Rhizobium*, las plantas contaminadas y no contaminadas presentaron la misma concentración de pigmentos fotosintéticos. En las plantas testigo, el mayor contenido de clorofila *a*, *b*, total y carotenoides se presentó en ausencia de vanadio (Figura 5.5 A, B, C, D). El contenido de carotenoides fue mayor en relación al contenido de clorofilas (Figura 5.5D).

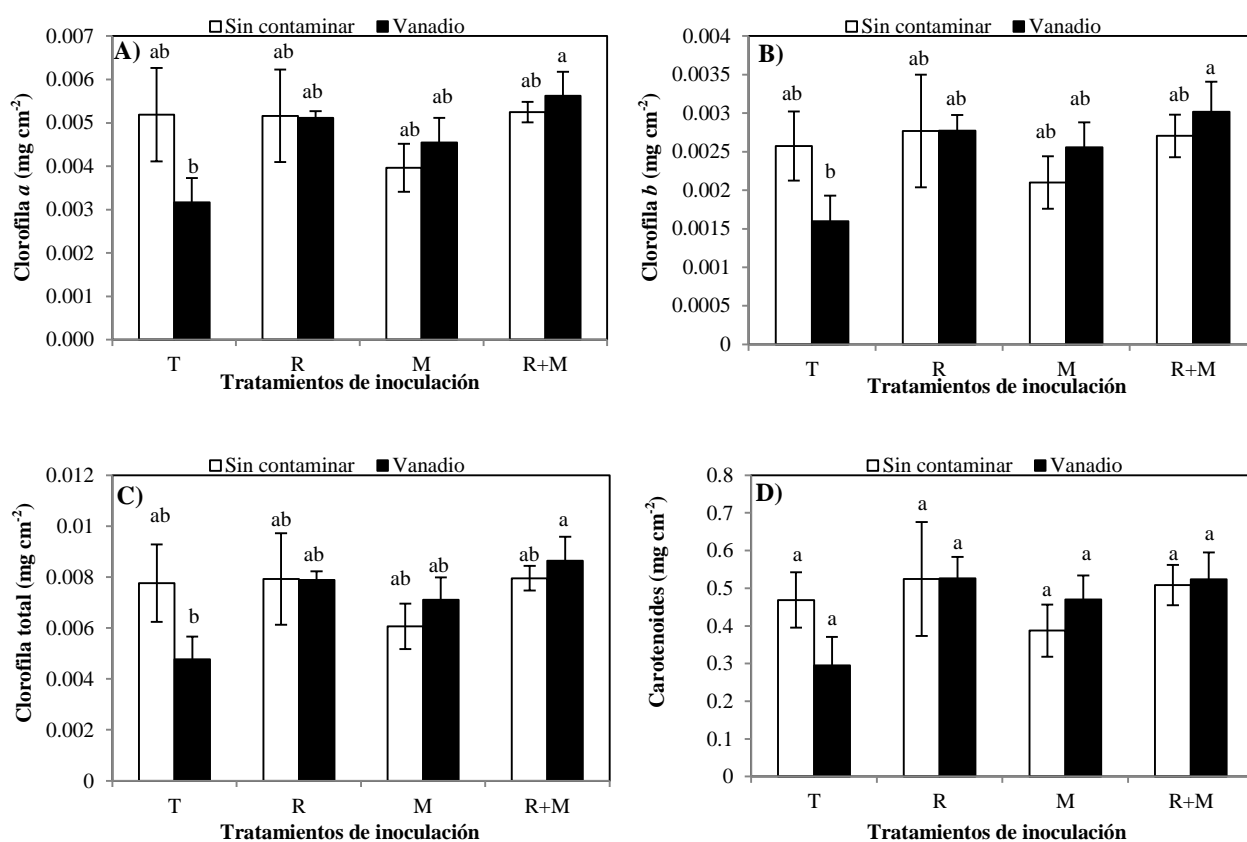


Figura 5.5. Contenido de clorofila y carotenoides de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* CIAT899 y *Rhizophagus intraradices*, y por efecto de la contaminación con vanadio (120 mg kg⁻¹). (A) Clorofila *a*; (B) Clorofila *b*; (C) Clorofila total; (D) Carotenoides, después de 60 días. Letras idénticas sobre las barras para cada gráfica son estadísticamente iguales (LSD, $\alpha=0.05$). Medias \pm Error estándar. Abreviaciones: T= Testigo; R= *Rhizobium tropici*; M= *Rhizophagus intraradices*; R+M=*Rhizobium* y *Rhizophagus*.

La tasa de transpiración mostró diferencias estadísticas (LSD, $\alpha=0.05$), siendo significativamente mayor en el tratamiento con R en presencia de vanadio (Figura 5.6A). En general, las plantas contaminadas con el metal presentaron mayor tasa de transpiración que los tratamientos sin contaminar. Tendencia similar se presentó en la conductancia estomática, ya que las plantas inoculadas con M, la doble inoculación y las testigo contaminados tuvieron mayor conductancia estomática en comparación a los tratamientos no contaminados (Figura 5.6B). La fotosíntesis fue mayor en las plantas contaminadas que en las no contaminadas, a excepción del tratamiento de R (Figura 5.6C). Por último, el uso eficiente del agua mostró diferencias significativas ($p\leq 0.05$) en los tratamientos del testigo y la inoculación con R, para todos los tratamientos se encontró que las plantas contaminadas tuvieron mayor uso eficiente del agua en comparación a las plantas no contaminadas (Figura 5.6D).

La actividad nitrogenasa no mostró diferencias significativas por efecto de la concentración de vanadio (Figura 5.7A). La mayor actividad nitrogenasa se presentó en las plantas con *Rhizobium*, y la menor con *Rhizophagus* y la doble inoculación (Figura 5.7B). En el caso de los tratamientos ($p\leq 0.05$), el tratamiento testigo y el tratamiento inoculado con *Rhizobium* sin vanadio presentaron mayor actividad nitrogenasa con respecto a sus correspondientes tratamientos en presencia del metal (Figura 5.7C). En contraste, los tratamientos con *Rhizophagus* y la doble inoculación con o sin vanadio, presentaron los valores más bajos de la actividad nitrogenasa (Figura 5.7C).

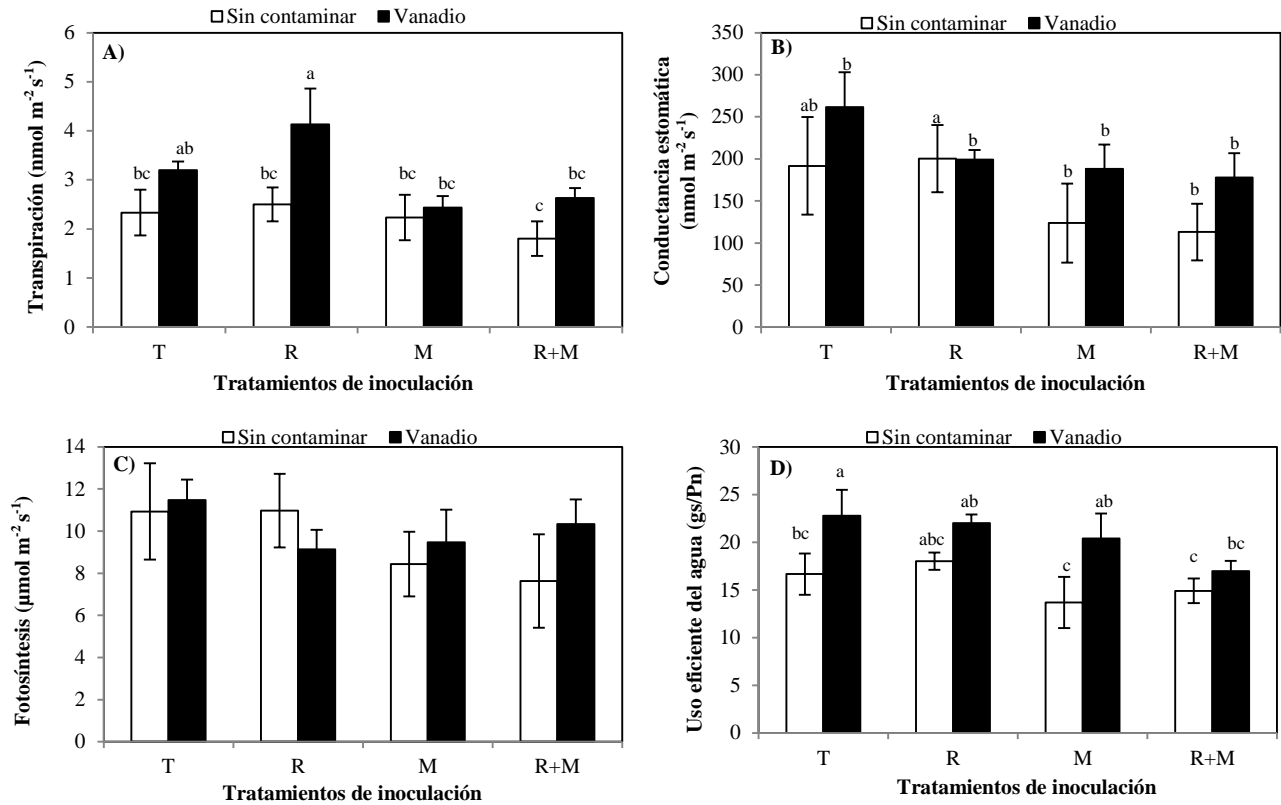


Figura 5.6. Intercambio gaseoso en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* y *Rhizophagus intraradices* y por efecto de la contaminación con vanadio (120 mg kg^{-1}). (A) Tasa de transpiración; (B) Conductancia estomática; (C) Fotosíntesis; (D) Uso eficiente del agua, después de 60 días. Letras idénticas sobre las barras para cada gráfica son estadísticamente iguales (LSD, $\alpha=0.05$). Medias \pm Error estándar. Abreviaciones: T= Testigo; R= *Rhizobium tropici*; M= *Rhizophagus intraradices*; R+M=*Rhizobium* y *Rhizophagus*.

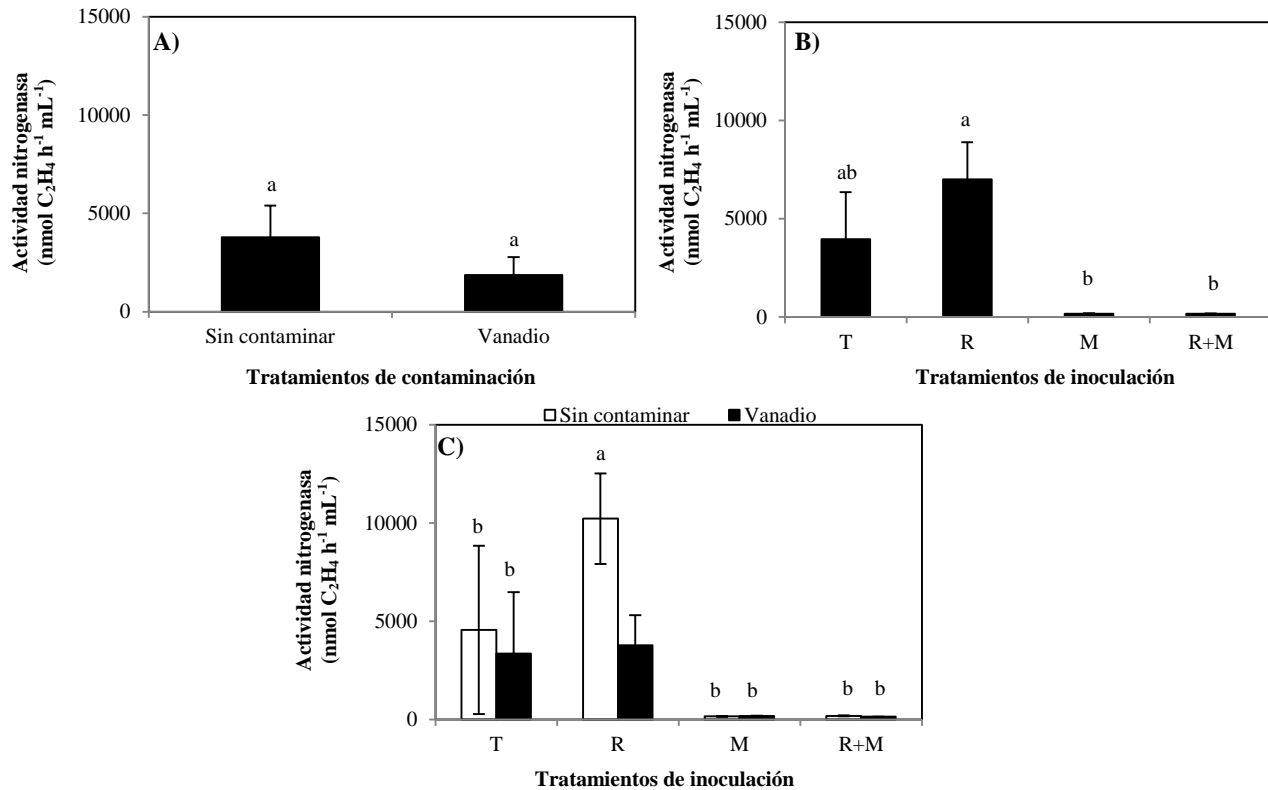


Figura 5.7. Actividad nitrogenasa en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* y *Rhizopagus intraradices* y por contaminación con vanadio (120 mg kg⁻¹). (A) Efecto de la concentración de vanadio; (B) Efecto de la inoculación; (C) Efecto de tratamientos, después de 60 días. Letras idénticas sobre las barras para cada gráfica son estadísticamente iguales (LSD, $\alpha=0.05$). Medias \pm Error estándar. Abreviaciones: T= Testigo; R= *Rhizobium tropici* CIAT899; M= *Rhizopagus intraradices*; R+M=*Rhizobium* y *Rhizopagus*.

El contenido de vanadio en el tejido foliar no presentó diferencias significativas en ninguno de los tratamientos inoculados con los microorganismos con respecto al testigo (Figura 5.8), presentando en promedio 18.7 mg kg⁻¹. En cuanto al análisis químico del suelo, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0.05$). La mayor concentración de vanadio se tuvo en el tratamiento con *Rizopagus*, y la menor concentración con *Rhizobium* (Figura 5.9).

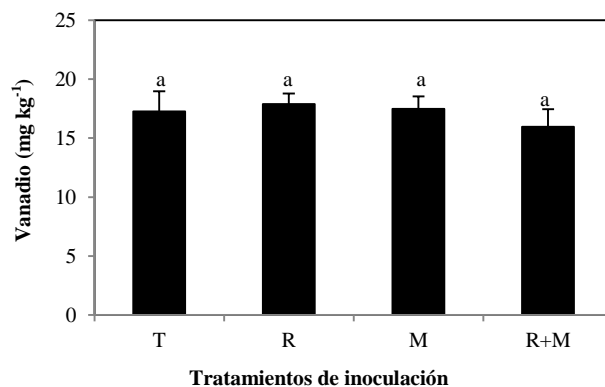


Figura 5.8. Contenido elemental de vanadio en tejido foliar de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* y *Rhizophagus intraradices* y por la contaminación con vanadio (120 mg kg⁻¹), después de 60 días. Letras idénticas sobre las barras para cada gráfica son estadísticamente iguales (LSD, $\alpha=0.05$). Medias \pm Error estándar. n=3. Abreviaciones: T= Testigo; R= *Rhizobium tropici* CIAT899; M= *Rhizophagus intraradices*; R+M=*Rhizobium* y *Rhizophagus*.

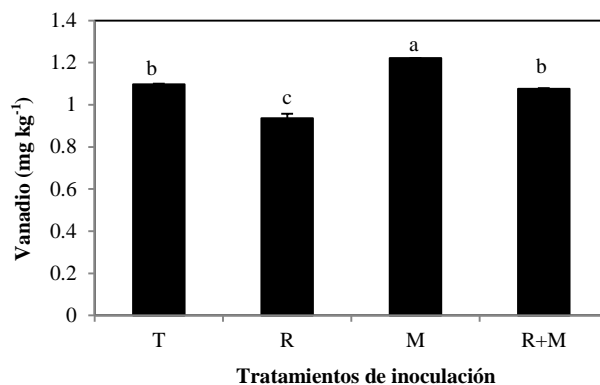


Figura 5.9. Contenido elemental de vanadio en suelo rizosférico de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* y *Rhizophagus intraradices* y por la contaminación con vanadio (120 mg kg⁻¹), después de 60 días. Letras idénticas sobre las barras para cada gráfica son estadísticamente iguales (LSD, $\alpha=0.05$). Medias \pm Error estándar. n=3. Abreviaciones: T= Testigo; R= *Rhizobium tropici* CIAT899; M= *Rhizophagus intraradices*; R+M=*Rhizobium* y *Rhizophagus*.

b) Respuesta de la simbiosis tripartita ante níquel

El peso seco de las plantas tratadas con níquel (120 mg kg⁻¹), no presentó diferencias significativas (Figura 5.10A); en contraste, el factor inoculación y el efecto por tratamiento mostraron diferencias significativas (LSD, $\alpha=0.05$). En el caso de la

inoculación, las plantas testigo tuvieron menor peso seco total en comparación con las plantas inoculadas (Figura 5.10B). Por otra parte, el tratamiento con *Rhizobium* sin níquel, mostró el mayor peso seco; mientras que en presencia del metal, la inoculación con *Rhizobium* o *Rhizopagus* resultó en mayor acumulación de peso seco (Figura 5.10C).

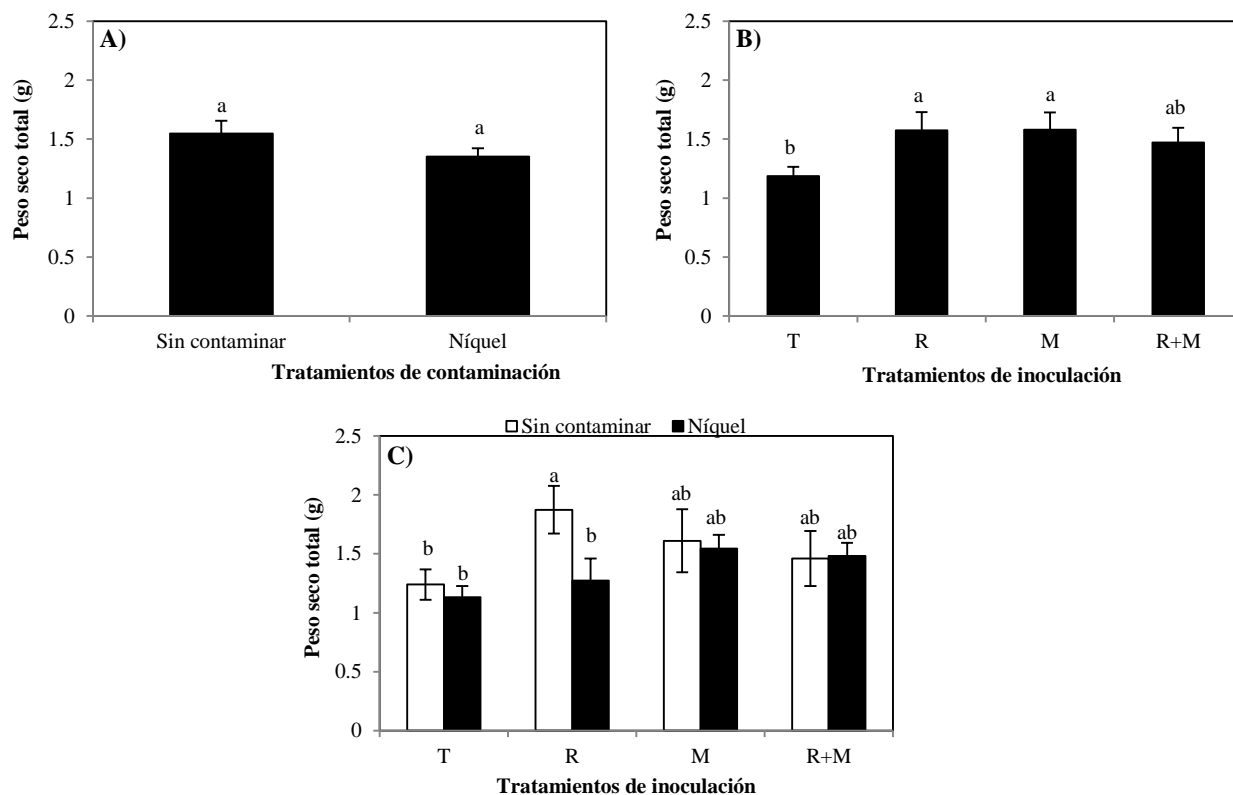


Figura 5.10. Peso seco total de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* CIAT899 y *Rhizopagus intraradices*, y por efecto de la contaminación con níquel (120 mg kg^{-1}). (A) Efecto de concentración de níquel; (B) Efecto de inoculación; (C) Efecto de tratamientos, después de 60 días. Letras idénticas sobre las barras para cada gráfica son estadísticamente iguales (LSD, $\alpha=0.05$). Medias \pm Error estándar. Abreviaciones: T= Testigo; R= *Rhizobium tropici*; M= *Rhizopagus intraradices*; R+M=*Rhizobium* y *Rhizopagus*.

La tasa absoluta de crecimiento no presentó diferencias significativas por efecto de Ni, ni por efecto de la inoculación (Figura 5.11A y B). Sin embargo, se encontraron

diferencias significativas (LSD, $\alpha=0.05$) por efecto del tratamiento. En ausencia de Ni, la inoculación con *Rhizobium* produjo la mayor tasa de crecimiento; mientras que en presencia de este metal, la menor tasa de crecimiento se observó con la inoculación con *Rhizobium* (Figura 5. 11C).

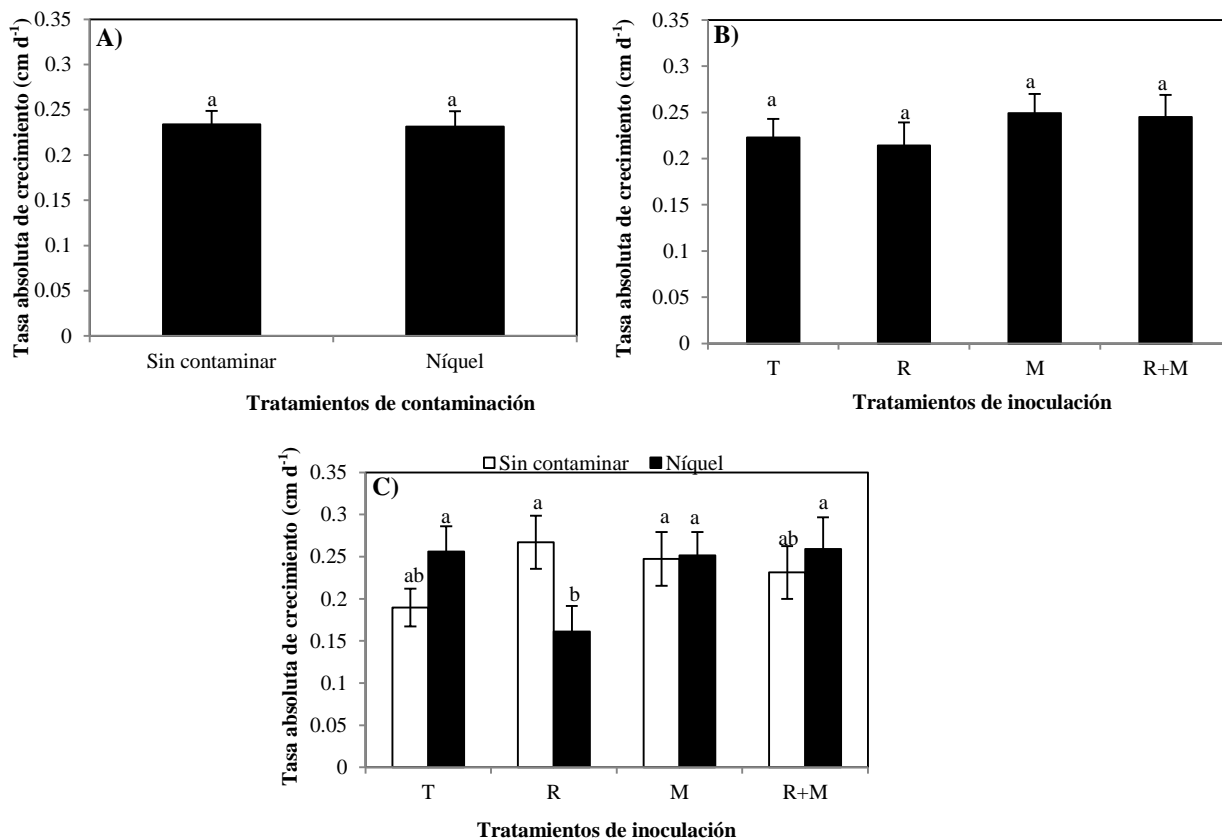


Figura 5.11. Tasa absoluta de crecimiento de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* CIAT899 y *Rhizophagus intraradices*, y por efecto de la contaminación con níquel (120 mg kg^{-1}). (A) Efecto de concentración de níquel; (B) Efecto de inoculación; (C) Efecto de tratamientos, después de 60 días. Letras idénticas sobre las barras para cada gráfica son estadísticamente iguales (LSD, $\alpha=0.05$). Medias \pm Error estándar Abreviaciones: T= Testigo; R= *Rhizobium tropici*; M= *Rhizophagus intraradices*; R+M=*Rhizobium* y *Rhizophagus*.

El número de nódulos no mostró diferencias significativas por efecto de la contaminación con níquel (Figura 5.12A); en contraste, por efecto de la inoculación se

encontraron diferencias ($p \leq 0.05$), en el cual el tratamiento con *Rhizobium* presentó en promedio 10 nódulos por planta (Figura 5.12B). El efecto de tratamiento presentó diferencias significativas ($p \leq 0.05$), en las plantas con *Rhizobium* se encontraron hasta 12 nódulos sin Ni y 10 nódulos en presencia del metal (Figura 5.12C). El tratamiento con *Rhizophagus intraradices* presentó el menor número de nódulos, tanto en presencia o no del metal. Las plantas con doble inoculación no presentaron diferencias entre los tratamientos contaminados y los no contaminados, además el número de nódulos fue menor con respecto a las plantas únicamente inoculadas con *Rhizobium* (Figura 5.12C).

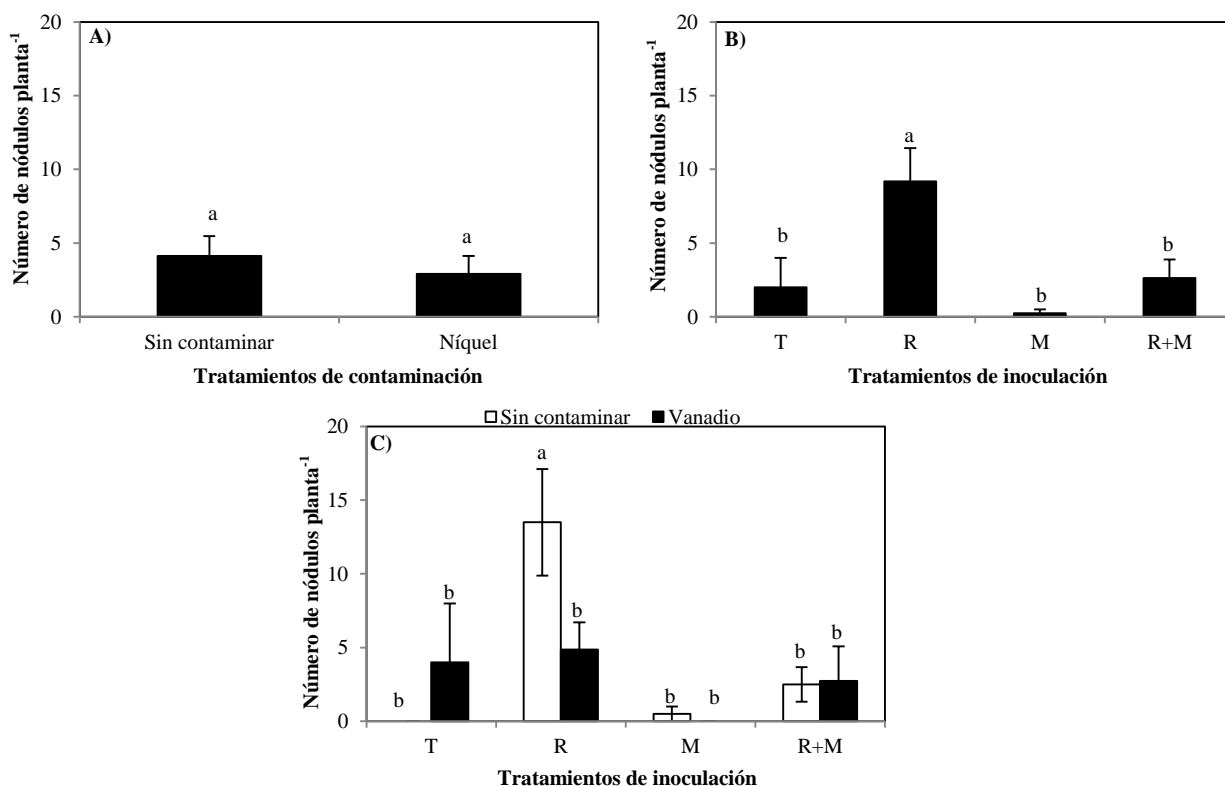


Figura 5.12. Número de nódulos de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* CIAT899 y *Rhizophagus intraradices*, y por efecto de la contaminación con níquel (120 mg kg^{-1}). (A) Efecto de concentración de níquel; (B) Efecto de inoculación; (C) Efecto de tratamientos, después de 60 días. Letras idénticas sobre las barras para cada gráfica son estadísticamente iguales (LSD, $\alpha=0.05$). Medias \pm Error estándar. Abreviaciones: T= Testigo; R= *Rhizobium tropici*; M= *Rhizophagus intraradices*; R+M=*Rhizobium* y *Rhizophagus*.

El porcentaje de colonización de *Rhizophagus intraradices* en plantas de frijol contaminadas con Ni mostró diferencias significativas ($p \leq 0.05$). El mayor porcentaje de colonización (60%) correspondió a la doble inoculación, mientras que la inoculación con *Rhizophagus* presentó una colonización del 20% (Figura 5.13). La inoculación con *Rhizobium* estimuló la colonización de *Rhizophagus* en las raíces. Las plantas contaminadas presentaron mayor porcentaje de colonización en el tratamiento de la doble inoculación (61%), mientras que las plantas no contaminadas tuvieron un 38% de colonización (Figura 5.13). Las plantas inoculadas con *Rhizophagus* y contaminadas con Ni tuvieron 20% de colonización y las no contaminadas 23% de colonización micorrízica (Figura 5.13).

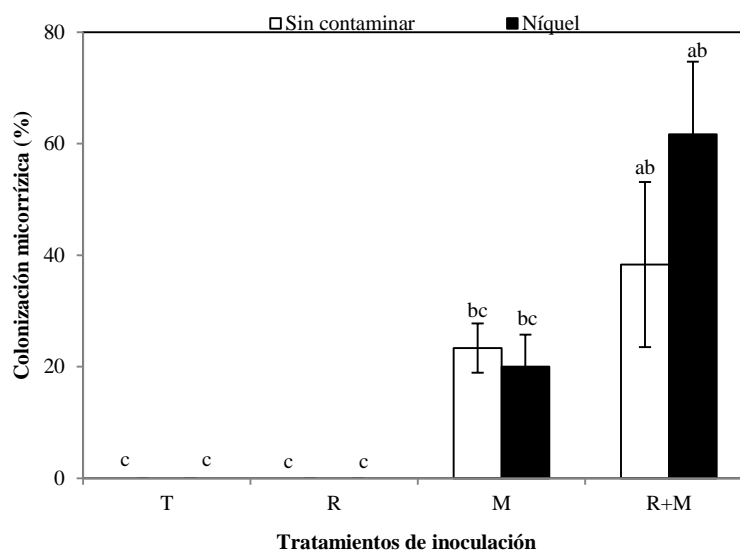


Figura 5.13. Porcentaje de colonización micorrízica de *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo por efecto de la aplicación de níquel (120 mg kg^{-1}), después de 60 días. . Letras idénticas sobre las barras para cada gráfica son estadísticamente iguales (LSD, $\alpha=0.05$). Medias \pm Error estándar. $n=3$. Abreviaciones: T= Testigo; R=*Rhizobium tropici*; M= *Rhizophagus intraradices*; R+M=*Rhizobium* y *Rhizophagus*.

El contenido de clorofila *a* no presentó diferencias significativas entre tratamientos; sin embargo, en las plantas inoculadas con *Rhizobium* la concentración de clorofila *a* fue

mayor en las plantas no contaminadas (Figura 5.14A). La clorofila *b* mostró diferencias en el testigo (LSD, $\alpha=0.05$), al ser significativamente menor con la contaminación con Ni (Figura 5.14B). La clorofila total fue mayor las plantas testigo o con *Rhizobium* sin contaminante; mientras que con la inoculación de *Rhizopagus* o con la doble inoculación en presencia de Ni, el contenido de clorofila total fue mayor (Figura 5.14C). El contenido de carotenoides fue más alto en las plantas con *Rhizobium* sin contaminar, mientras que en presencia de Ni la doble inoculación presentó el mayor contenido de carotenoides (Figura 5.14D).

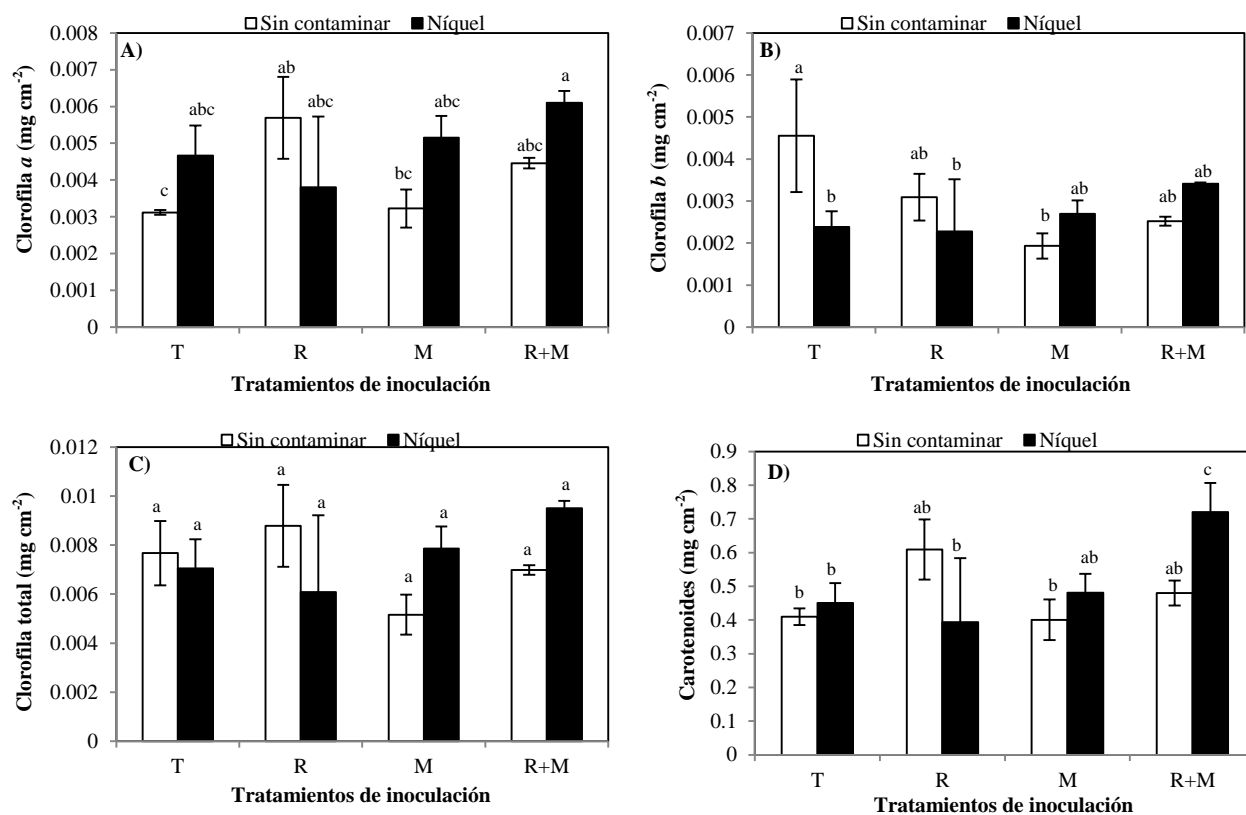


Figura 5.14. Contenido de clorofila y carotenoides de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* CIAT899 y *Rhizopagus intraradices*, y por efecto de la contaminación con níquel (120 mg kg^{-1}). (A) Clorofila *a*; (B) Clorofila *b*; (C) Clorofila total; (D) Carotenoides, después de 60 días. . Letras idénticas sobre las barras para cada gráfica son estadísticamente iguales (LSD, $\alpha=0.05$). Medias \pm Error estándar. Abreviaciones: T= Testigo; R= *Rhizobium tropici*; M= *Rhizopagus intraradices*; R+M=*Rhizobium* y *Rhizopagus*.

No se encontraron diferencias significativas en el intercambio gaseoso de las plantas (Figura 5.15 A, B y C). Tanto para la transpiración, conductancia estomática, fotosíntesis y uso eficiente del agua, los menores valores se obtuvieron en los tratamientos con la doble inoculación con o sin Ni (Figura 5.5 A-D).

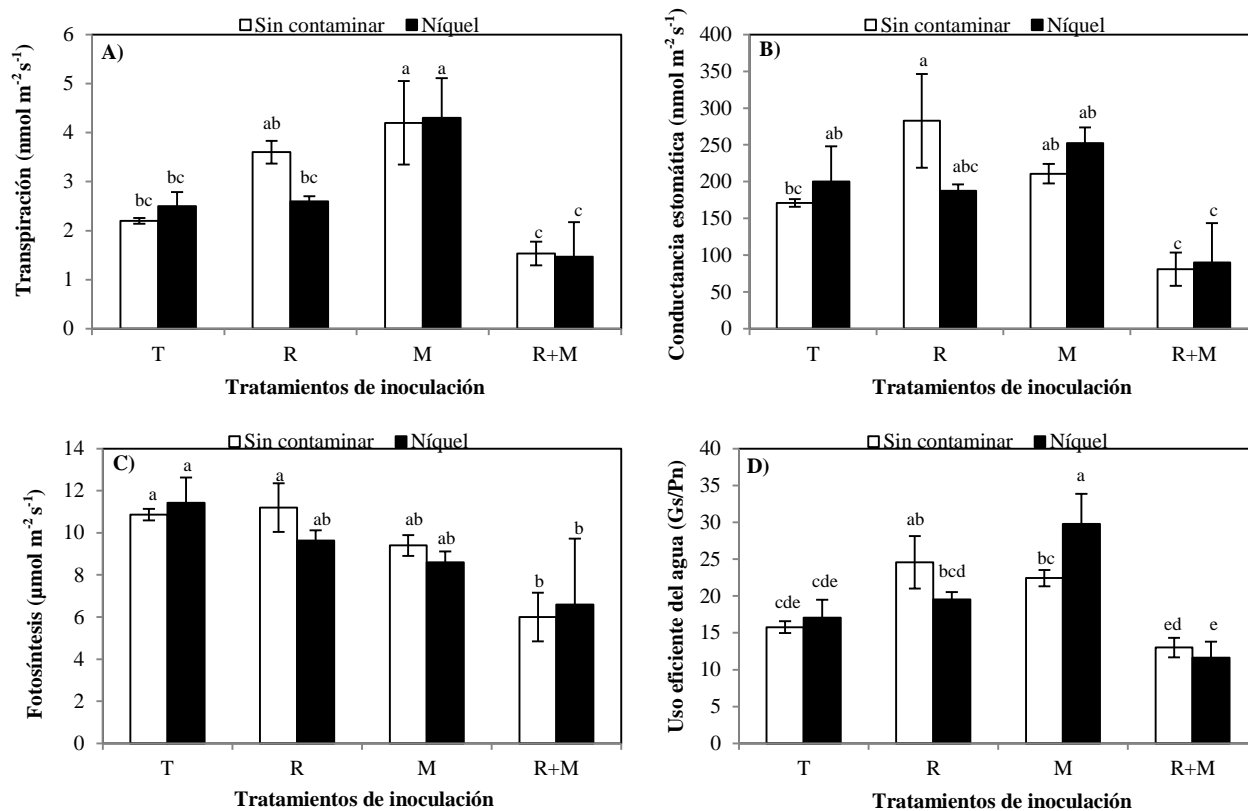


Figura 5.15. Intercambio gaseoso de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* y *Rhizophagus intraradices* y por contaminación con níquel. (A) Tasa de transpiración; (B) Conductancia estomática; (C) Fotosíntesis; (D) Uso eficiente del agua, después de 60 días. . Letras idénticas sobre las barras para cada gráfica son estadísticamente iguales (LSD, $\alpha=0.05$). Medias \pm Error estándar. Abreviaciones: T= Testigo; R= *Rhizobium tropici*; M= *Rhizophagus intraradices*; R+M=*Rhizobium* y *Rhizophagus*.

La actividad nitrogenasa no mostró diferencias significativas por efecto de la contaminación con Ni, aunque las plantas con este metal presentaron menor actividad (Figura 5.16A). En cuanto al factor inoculación ($p \leq 0.05$), la mayor actividad nitrogenasa se presentó en las plantas con *Rhizobium* (Figura 5.16B). La mayor actividad nitrogenasa se

obtuvo en las plantas sin contaminar con *Rhizobium* (9837 nmol C₂H₄ h⁻¹ mL⁻¹) y la más baja en el tratamiento testigo con y sin Ni (Figura 5.16C).

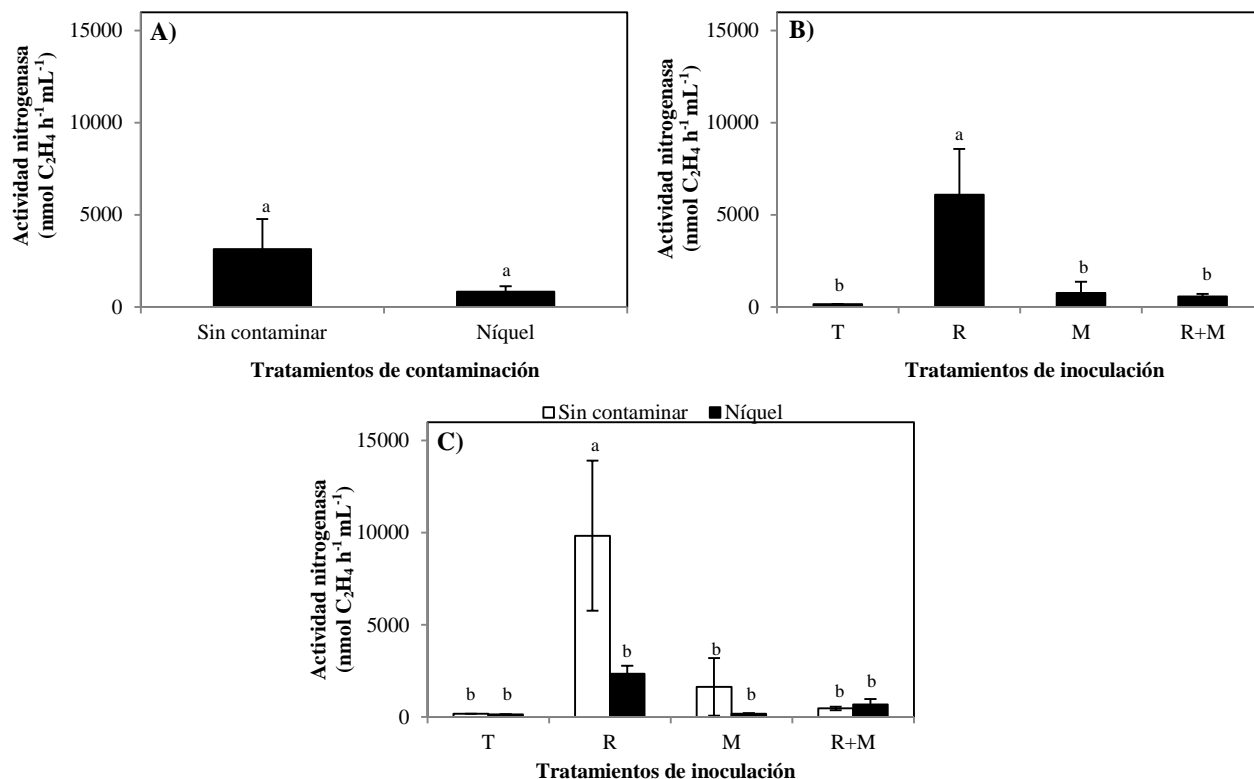


Figura 5.16. Actividad nitrogenasa en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* y *Rhizophagus intraradices* y por contaminación con níquel (120 mg kg⁻¹). (A) Efecto de la concentración de níquel; (B) Efecto de la inoculación; (C) Efecto de tratamientos, después de 60 días. . Letras idénticas sobre las barras para cada gráfica son estadísticamente iguales (LSD, $\alpha=0.05$). Medias \pm Error estándar. Abreviaciones: T= Testigo; R= *Rhizobium tropici*; M= *Rhizophagus intraradices*; R+M=*Rhizobium* y *Rhizophagus*.

El contenido elemental de Ni en el tejido foliar de plantas contaminadas con este metal no mostró diferencias significativas; sin embargo, el mayor contenido de Ni se presentó en las plantas inoculadas con *Rhizobium* y la menor en el Testigo (Figura 5.17). En contraste, el contenido de Ni en suelo, mostró diferencias significativas ($p \leq 0.05$); la

concentración más elevada de Ni en el suelo se presentó en las plantas con *Rhizophagus*, y el menor contenido correspondió a las plantas con la doble inoculación (Figura 5.18).

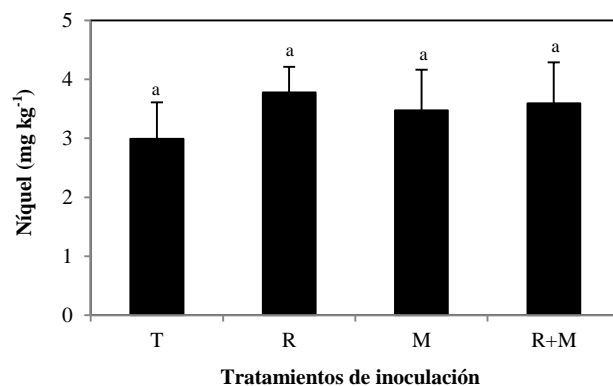


Figura 5.17. Contenido elemental de níquel en tejido foliar de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* y *Rhizophagus intraradices* y por la contaminación con níquel (120 mg kg⁻¹), después de 60 días. Letras idénticas sobre las barras para cada gráfica son estadísticamente iguales (LSD, $\alpha=0.05$). Medias \pm Error estándar. n=3. Abreviaciones: T= Testigo; R= *Rhizobium tropici* CIAT899; M= *Rhizophagus intraradices*; R+M=*Rhizobium* y *Rhizophagus*

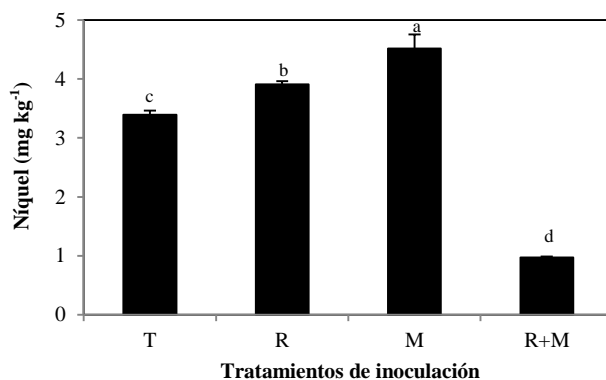


Figura 5.18. Contenido elemental de níquel en suelo rizosférico de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Flor de mayo por efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici* y *Rhizophagus intraradices* y por la contaminación con níquel (120 mg kg⁻¹), después de 60 días. Letras idénticas sobre las barras para cada gráfica son estadísticamente iguales (LSD, $\alpha=0.05$). Medias \pm Error estándar. n=3. Abreviaciones: T= Testigo; R= *Rhizobium tropici* CIAT899; M= *Rhizophagus intraradices*; R+M=*Rhizobium* y *Rhizophagus*.

DISCUSIÓN

La contaminación del suelo por la presencia de elevadas concentraciones de compuestos inorgánicos como los metales ocasiona alteraciones a nivel fisiológico y celular en las plantas y microorganismos asociados a éstas (Jadia y Fulekar, 2009). La aplicación de vanadio y níquel en *Phaseolus vulgaris* redujo el peso seco total y la tasa relativa de crecimiento en comparación con los tratamientos no contaminados. La inoculación de microorganismos resistentes a los metales pesados ocasiona, en ciertos casos, la disminución de la biomasa vegetal, lo que se atribuye a que los microorganismos permiten la entrada de los metales existentes en el suelo a la planta (Rahmanian *et al.*, 2011), dependiendo de las condiciones del suelo, el pH, el contenido de materia orgánica, el contenido de arcilla, el metal, la planta, los microorganismos asociados a la rizosfera, etc (Lebeau *et al.*, 2008). Algunos cultivos como el maíz, cuando se desarrolla en un suelo arcilloso, tienen mayor capacidad de absorción de Cd, Ni, Pb y Cu, alterando por ello la acumulación de biomasa seca (Prieto-Méndez *et al.*, 2009).

El tratamiento correspondiente a la inoculación con *Rhizobium* presentó mayor acumulación de peso seco, denotando una estimulación del crecimiento de la planta en ausencia de ambos metales. Las comunidades microbianas del suelo se consideran como bioindicadores del efecto de los metales en los diferentes procesos biológicos (Paudyal *et al.*, 2007). Los metales pesados tienen efectos negativos a largo plazo; por ejemplo, reducen la actividad enzimática, el funcionamiento, la biomasa y la diversidad de las comunidades microbianas (Karimi *et al.*, 2011). Además, afectan la fisiología vegetal por lo que el establecimiento de simbiosis benéficas puede ayudar en los procesos de fitoextracción (Bhargava *et al.*, 2012).

Ciertos microorganismos desarrollan tolerancia ante concentraciones elevadas de metales. Como ejemplo, los HMA contribuyen en la remediación de suelos contaminados, a través de la fitoextracción y estimulando los procesos de estabilización del metal (Göhre y Paszkowski, 2006). *Funneliformis mosseae* y *Rhizophagus intraradices* asociados a la rizosfera de *Veronica rechingeri* M.A.Fisch., presentan tolerancia a concentraciones de plomo (100 mg kg^{-1}) y zinc (300 mg kg^{-1}) en un suelo cercano a una mina a cielo abierto (Zarei *et al.*, 2008). De manera similar, la inoculación de un consorcio bacterias promotoras del crecimiento vegetal y *Rhizophagus intraradices*, aumentó la absorción y la acumulación de Cd^{2+} y Zn^{2+} en *Zea mays* con respecto a las plantas no inoculadas (Gharemaleki *et al.*, 2010). La resistencia al metal generada por los microorganismos confiere fortaleza en aquellas plantas sensibles a elevadas concentraciones de metales pesados (Bhargava *et al.*, 2012).

La relación simbiótica entre las leguminosas y los rizobios es un factor importante en el crecimiento vegetal en suelos con deficiencia de nitrógeno, por lo que ha habido interés en encontrar especies capaces de colonizar suelos contaminados con metales para la recuperación de éstos, ya que las leguminosas rara vez crecen en suelos contaminados con metales (Chaudhary *et al.*, 2011). La compleja naturaleza de la simbiosis hace que ésta sea sensible a las condiciones de toxicidad por metales, *Rhizobium* ha sido reportada como elemento clave en el establecimiento de leguminosas en condiciones de estrés para las plantas (Requena *et al.*, 1996). Por ejemplo, Chaudhary *et al.* (2011) reportan que un consorcio de *Rhizobium* tolera concentraciones de Ni (207 mg kg^{-1}) y de Pb (41 mg kg^{-1}), además de estimular el crecimiento vegetal de *Vigna radiata* L. y *Vigna angularis* L.

El número de nódulos por planta fue mayor en las plantas donde se aplicó el vanadio con respecto a la aplicación del níquel. Para ambos metales, la mayor nodulación

se presentó en las plantas inoculadas con *Rhizobium*. En el caso de vanadio, las plantas inoculadas con *Rhizobium* y *Rhizophagus* (doble inoculación) tuvieron nodulación por lo que la presencia del HMA podría estar confiriéndole resistencia a *Rhizobium* para establecerse en un sistema contaminado con vanadio. En este sentido, se ha comprobado que los HMA tienen un efecto benéfico cuando se encuentran en un sistema de fitorremediación, ya que inmovilizan los metales en la raíz, reducen su translocación hacia la parte aérea, y permiten el establecimiento de otros microorganismos rizosféricos benéficos (Guerra-Sierra, 2008).

El porcentaje de colonización de *Rhizophagus intraradices* no fue afectado por la presencia de vanadio y del níquel en el suelo. Lo anterior permite considerar a esta especie fúngica como tolerante a ambos metales (120 mg kg⁻¹). No obstante, la presencia de vanadio disminuyó el porcentaje de colonización de *Rhizophagus intraradices* (27%) en comparación con las plantas tratadas con níquel (62%). En los tratamientos correspondientes a la doble inoculación (*Rhizobium*+*Rhizophagus*). El número de esporas y la colonización micorrízica de las raíces de las plantas hospederas a menudo disminuyen por las alteraciones del suelo. Sin embargo, algunas especies de HMA adaptadas a las condiciones del suelo contaminado, podrían estimular el crecimiento de las plantas (Leyval *et al.*, 1997). Los HMA pueden desarrollarse en suelos altamente contaminados con metales pesados como plomo, cadmio, zinc, níquel, etc.; sin embargo, el porcentaje de colonización a menudo disminuye en esas condiciones. Varios metales pesados pueden ser tóxicos para los HMA, dependiendo de su concentración, pH del suelo, forma química del metal, etc., afectando la germinación de esporas, el crecimiento micelial, y la colonización micorrízica (Jamal *et al.*, 2002).

Ambos metales no tuvieron efecto en el intercambio gaseoso (tasa de transpiración conductancia estomática, fotosíntesis y uso eficiente del agua); sin embargo, para vanadio se encontró que las plantas con *Rhizobium* y con la doble inoculación presentaron mayor cantidad de clorofila, aunque esto no se refleja en un aumento en la tasa fotosintética de las plantas. En cuanto a níquel, los tratamientos correspondientes a *Rhizobium* y *Rhizophagus*, presentaron mayor intercambio gaseoso, excepto en la actividad fotosintética en donde el testigo presentó mayor fotosíntesis ($11.43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

En cuanto a níquel, la clorofila *b* fue más sensible a la contaminación por este metal. El estrés generado por los metales altera las funciones metabólicas y fisiológicas de la planta (Vig *et al.*, 2003). La fotosíntesis es el proceso por el cual las plantas convierten la energía luminosa en energía química, y este proceso se inicia cuando la luz es absorbida por los pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, *b* y carotenoides) de los complejos antena de la membrana fotosintética, donde parte de la energía absorbida es transferida como energía de excitación y atrapada por centros de reacción (González-Moreno *et al.*, 2008). Los metales pesados pueden sustituir al ión Mg en la molécula de clorofila, lo que imposibilita la captación de fotones, generando como consecuencia una disminución de la actividad fotosintética (Díaz-Aguilar *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2005). Los carotenoides por su parte, desempeñan un papel importante en el ensamblaje de los complejos captadores de luz y tienen una función indispensable, en la protección del aparato fotosintético por un posible daño fotooxidativo (Taiz y Zeiger, 2002). En el presente trabajo, el contenido de los carotenoides, en comparación a los otros pigmentos fotosintéticos, fue mayor para ambos metales. Para vanadio, las plantas contaminadas presentaron mayor concentración de carotenoides excepto en el testigo, mientras que con níquel, las plantas con *Rhizobium* presentaron menor contenido de carotenoides.

Pernia *et al.* (2003) indicaron que en condiciones de estrés oxidativo las plantas aumentan sus concentraciones de carotenoides, para contrarrestar la formación de radicales libres. La relación clorofila/carotenoide disminuye por el estrés generado por los metales pesados (Taiz y Zeiger, 2002). En promedio, para todos los tratamientos contaminados con vanadio, se presentó un contenido de clorofila total de 0.007 mg cm^{-2} y 0.46 mg cm^{-2} en carotenoides; mientras que para níquel la clorofila total fue de 0.007 mg cm^{-2} y los carotenoides 0.49 mg cm^{-2} . La disminución en la concentración de clorofila es atribuida al hecho de que el vanadio y el níquel inhiben su biosíntesis a través de las enzimas implicadas en este proceso (Feller *et al.*, 2008). Sin embargo, en el presente trabajo la relación de estos pigmentos fotosintéticos tanto en ausencia como en presencia de V o de Ni, los tratamientos mostraron una relación semejante de 0.015. Lo que indica que ambos metales no ejercen un estrés en la planta.

Los resultados indican que el vanadio y el níquel no afectaron el establecimiento de la simbiosis, tanto con *Rhizobium*, con *Rhizophagus*, y con la doble inoculación. Sin embargo, se observa que estos metales ocasionan ciertas alteraciones en el metabolismo de la simbiosis con *Rhizobium* ya que la actividad nitrogenasa fue afectada por la presencia de ambos metales. En las plantas con la doble inoculación la actividad nitrogenasa es mínima en comparación con las plantas con *Rhizobium*, para ambos metales. La leghemoglobina es una proteína sintetizada por las leguminosas en los nódulos durante la simbiosis, que sirve de protección para los bacteroides al regular el flujo de oxígeno (Taiz y Zeiger *et al.*, 2002). La disminución de la concentración de esta proteína tiene una relación directa con la disminución de la actividad nitrogenasa, siendo probable que el vanadio y el níquel inhiban la síntesis de leghemoglobina afectando la actividad nitrogenasa, ya que en los tratamientos

en donde no se aplicaron ambos contaminantes presentaron mayor actividad nitrogenasa (Figuras 5.7 y 5.16).

El vanadio se acumuló en el tejido foliar, ya que la concentración de éste fue de 18 mg kg⁻¹, mientras que en suelo fue de 1.2 mg kg⁻¹, superando con ello el límite máximo permisible establecido para vanadio en *Phaseolus vulgaris* (8.3 mg kg⁻¹) (Khono, 1986). La acumulación de níquel fue similar tanto en el tejido foliar (4 mg kg⁻¹) como en el suelo (4.5 mg kg⁻¹), indicando que no se rebasa el límite que podría causar toxicidad en las plantas (10-83 mg kg⁻¹) (Macnicol y Beckett, 1985). El mayor contenido de níquel en el suelo se encontró en el tratamiento con *Rhizophagus*, mientras que el menor contenido se obtuvo en el tratamiento con la doble inoculación, en donde probablemente la actividad de la simbiosis tripartita tuvo en efecto significativo en la traslocación del níquel.

En este experimento se evaluó la interacción de la simbiosis tripartita *Rhizobium tropici-Phaseolus vulgaris-Rhizophagus intraradices* en la fitoextracción de vanadio y níquel, buscando un modelo y determinar el papel de los sistemas simbióticos en la fitoextracción de metales. Sin embargo, es necesario considerar más parámetros como el análisis químico vegetal de los demás órganos, la estructura física del suelo y su relación con los metales contaminantes. No obstante, este trabajo es de los primeros en describir los efectos del vanadio y del níquel (metales acompañantes del petróleo) en una leguminosa con la doble simbiosis (*Rhizobium* y HMA).

CONCLUSIONES

Rhizobium tropici y *Rhizophagus intraradices* presentaron tolerancia a la presencia de vanadio y níquel, ya que no inhibieron el establecimiento de la simbiosis con *Phaseolus vulgaris*. La aplicación de vanadio o de níquel reduce el peso seco total y la tasa relativa de crecimiento de las plantas, y los microorganismos atenúan su efecto negativo.

El número de nódulos fue mayor en las plantas contaminadas con vanadio, indicando que *Rhizobium* fue menos sensible al vanadio que al níquel. La colonización micorrízica en plantas ante vanadio fue del 30% mientras que con níquel fue del 60%, concluyendo que *Rhizophagus intraradices* es más tolerante a la presencia de níquel que al vanadio.

La doble inoculación de *Rhizobium tropici* y *Rhizophagus intraradices*, estimuló el contenido de clorofila *a*, *b*, total y carotenoides. El contenido de clorofila total fue mayor en las plantas contaminadas con vanadio y con la doble inoculación, mientras que para níquel, las plantas con *Rhizobium* y sin contaminar presentaron mayor contenido de clorofila total. En ambos metales la fotosíntesis fue más alta en los testigos.

Ambos metales afectaron la actividad nitrogenasa en raíces de *Phaseolus vulgaris*, y la mayor reducción de acetileno se presentó en las plantas con *Rhizobium*.

El vanadio se acumuló en el tejido foliar, superando el límite crítico para frijol; mientras que el níquel se encontró dentro de las concentraciones establecidas como no tóxicas.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES GENERALES

- La simbiosis entre *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium tropici* es tolerante a vanadio y níquel ante concentraciones de hasta 120 mg L^{-1} , aunque el número total de nódulos fue menor en las concentraciones más altas para ambos metales.
- *Phaseolus vulgaris* es más sensible al níquel que al vanadio, al presentar menor número total de nódulos, peso seco total y actividad nitrogenasa.
- El vanadio disminuye el contenido elemental de hierro y azufre en los nódulos en concentraciones superiores a 75 mg L^{-1} ; mientras que el níquel disminuyó al fósforo y cobre, e incrementó el contenido de potasio, además estimuló al hierro y manganeso.
- El vanadio y el níquel (120 mg L^{-1}) redujeron el peso seco total de las plantas, además del contenido de clorofila, el intercambio gaseoso y la actividad nitrogenasa.
- *Rhizophagus intraradices* presentó una colonización micorrízica del 27% para vanadio, mientras que para níquel el porcentaje de colonización fue del 62%.
- El vanadio se acumuló en el tejido foliar, superando el límite crítico para frijol; mientras que el níquel se encontró dentro de las concentraciones establecidas como no tóxicas.
- La simbiosis tripartita *Rhizobium tropici-Phaseolus vulgaris-Rhizophagus intraradices*, puede considerarse como un modelo útil para la fitoextracción de vanadio o de níquel, los cuales son metales acompañantes del petróleo crudo, y se acumulan en suelos con derrames frecuentes.

CAPÍTULO VII

LITERATURA CITADA

- Agarwal P, Sah P (2009) Ecological importance of ectomycorrhizae in world forest ecosystems. *Nature and Science* 7: 107-116.
- Agudelo-Betancur LM, Macias-Mazo KI, Suárez-Mendoza JA (2005) Fitorremediación: la alternativa para absorber metales pesados de los biosólidos. *Revista Lasallista de Investigación* 2: 57-60.
- Aguilera-Gómez LI, Olalde-Portugal V, Arriaga MR, Contreras Alonso R (2008) Micorrizas Arbusculares. *Ciencia Ergo Sum* 14: 300-306.
- Alarcón A (2007) Micorriza arbuscular. In: Ferrera-Cerrato R, Alarcón A (eds) *Microbiología agrícola*. Editorial Trillas México, D. F. 90-119 pp.
- Alcalá J, Sasa M, Moreno, M, Rodríguez JC, Quintana C, Terrazas C, Rivero O (2009) Metales pesados en suelo urbano como un indicador de la calidad ambiental: Ciudad de Chihuahua, México. *Multequina* 18: 53-69.
- Alcántar-Gonzalez EG (1992). *Manual de análisis químico vegetal: guía de muestreo, preparación, análisis e interpretación*. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. México, D.F. 156 p.
- Almaraz-Suarez JJ. Ferrera-Cerrato R (2007) Fijación simbiótica de nitrógeno en leguminosas. In: Ferrera-Cerrato R, Alarcón A (eds) *Microbiología agrícola*. Editorial Trillas México, D. F. 225-238 pp.
- Andrade SAL, Abreu CA, de Abreu MF, Silveira APD (2004) Influence of lead on arbuscular mycorrhiza and *Rhizobium* symbioses under soybean plants. *Applied Soil Ecology* 26: 123-131.

- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (2005) Nickel. Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE. UU. Servicio de Salud Pública. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. <http://www.atsdr.cdc.gov/substances/toxsubstance.asp?toxid=44#12>
- Aveline A, Crozat Y, Cleyet-Marel JC, Pinochet X (2003) Bacterial growth rate and growth pouch nodulation profile differences as possible ways of *Bradyrhizobium japonicum* strain for low P soils. *Plant and Soil* 251: 199-209.
- Ayotamuno JM, Kogbara RB, Agele EA, Agoro OS (2010) Composting and phytoremediation treatment of petroleum sludge. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal* 19: 686-695.
- Bacana M, Sprent JI (1987) Nitrogen fixation and nitrate reduction in the root nodules of legumes. *Physiologia Plantarum* 70: 757-765.
- Bai C, Reilly CC, Wood BW (2006) Nickel deficiency disrupts metabolism of ureides, amino acids, and organic acids, and organic acids of young pecan foliage. *Plant Physiology* 140: 433-443.
- Bala A, Guiller KE (2001) Symbiotic specificity of tropical tree rhizobia for host legumes. *New Phytologist* 149: 495-507.
- Bhargava A, Carmona FF, Bhasgava M, Srivastava S (2012) Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals. *Journal of Environmental Management* 105: 103-120.
- Becana M, Aparicio-Trejo P, Irigoyen JJ, Sánchez-Díaz M (1986) Some enzymes of hydrogen peroxide metabolism in leaves and root nodules of *Medicago sativa*. *Plant Physiology* 82: 1169-1171.

- Becerril RF, Franken P, Gianinazzi S, Gianinazzi PV (2006) La micorriza arbuscular activa la expresión de un gen vegetal codificador de una metalotioneína en *Pisum sativum* L. *Revista Mexicana de Micología* 22: 1-6.
- Berton RS, Moreno-Pires AM, López-de Andrade SA, de Abreu CA, Ambrosano EJ, Dias-da Silveira AP (2006) Toxicidade do níquel em plantas de feijão e efeitos sobre a microbiota do solo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41: 1305-1312.
- Binet P, Portal JM, Leyval C (2000) Dissipation of 3–6 polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of ryegrass. *Soil Biology & Biochemistry* 32: 2011-2017.
- Bode HP, Friebel C, Fuhmann F (1990) Vanadium uptake by yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1022: 163-170.
- Bonfante-Fasolo P, Genre A, Bianciotto V (2004) The colonization strategies of arbuscular mycorrhizal fungi: an overview of their celular interactions with plants and bacteria. In: Frías-Hernández J, Olalde-Portugal T, Ferrera-Cerrato R (eds.). *Avances en el conocimiento de la biología de las micorrizas*. Universidad de Guanajuato. Guanajuato, México. 19-28 pp.
- Botello AV (2005) Características, composición y propiedades fisicoquímicas del petróleo. In: Botello A V, Rendón-von O J, Gold-Bouchot G, Agraz-Hernández C (eds) *Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*. 2a. ed. Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Ecología. 261-268 p.
- Caballero-Mellado J, Rivera-Becerril F (2006) Tolerancia de la micorriza arbuscular contra los metales pesados. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 48: 154-161.

- Campanharo M, Henrique-Monnerat P, Curitiba-Espíndula M, Souza-Rabello W, Ribeiro G (2010) Toxicity symptoms of nickel in common bean. *Revista Ciência Agronômica* 41: 490-494.
- Carpena RO, Bernal MP (2007) Claves de la fitorremediación: fitotecnologías para la recuperación de suelos. *Ecosistemas* 16: 1-3.
- Centeno G, Trejo F, Ancheyta F, Carlos A (2004) Precipitación de asfaltenos del crudo Maya en un sistema a presión. *Revista de la Sociedad Química de México* 48: 179-188.
- Chaudhary SK, Inouhe M, Rai UN, Mishra K, Gupta DK (2011) Inoculation of *Rhizobium* (VR-1 and VA-1) induces an increasing growth and metal accumulation potential in *Vigna radiate* and *Vigna angularis* L. growing under fly-ash. *Ecological Engineering* 37: 1254-1257.
- Chaudri AM, McGrath SP, Giller KE, Rietz E, Sauerbeck DR (1993) Enumeration of indigenous *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in soils previously treated with metal-contaminated sewage sludge. *Soil Biology & Biochemistry* 25: 301-309.
- Chen, LM, Lin CC, Kao CH (2000) Copper toxicity in rice seedlings: Changes in antioxidative enzyme activities, H₂O₂ level, and cell wall peroxidase activity in roots. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 41: 99-103.
- Chen C, Huang D, Liu J (2009) Functions and Toxicity of Nickel in Plants: Recent Advances and Future Prospects. *Clean-Soil, Air, Water* 37: 304-313.
- Crans DC, Smee JJ, Gaidamauskas E, Yang L (2004) The chemistry and biochemistry of vanadium and biological activities exerted by vanadium compounds. *Chemical Reviews* 104: 849-902.

- Dalton DA (1995) Antioxidant defenses of plants and fungi. In: Ahmad S (ed) Oxidative stress and antioxidant defenses in biology. Chapman & Hall, New York, pp 298-355.
- Daniell TJ, Husband R, H Fitter A, Young JPW (2001) Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing arable crops. *FEMS Microbiology Ecology* 36: 203-209.
- Datta R, Sarkar D (2004) Biotechnology in phytoremediation of metal-contaminated soils. *Proceedings of the Indian National Science Academy* 70: 99-108.
- Davis LC, Castro-Diaz S, Zhang Q, Erickson LE (2002) Benefits of vegetation for soils with organic contaminants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21: 457-491.
- Delfert DM, McDonald JM (1985) Vanadyl and vanadate inhibit Ca^{2+} transport systems of the adipocyte plasma membrane and endoplasmic reticulum. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 241: 665-672.
- del Val C, Barea JM, Azcón-Aguilar C (1999) Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy-metalcontaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 718-723.
- Dere S, Günes T, Sivaci R (1998) Spectrophotometric determination of chlorophyll –A, B and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. *Turkish Journal of Botany* 22: 13-17.
- Díaz-Aguilar I, Larqué-Saavedra MU, Alcántar-González G, Carrillo-González R, Vázquez-Alarcón A (2001) Alteración de algunos procesos fisiológicos en trigo por la adición de plomo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 17: 79-90.

- Díaz, J, Bernal A, Pomar F, Merino F (2001) Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. *Plant Science* 161:179-188.
- Diaz G, Honrubia M (1993) Infectivity of mine soils from south-east Spain. II. Mycorrhizal population levels in spoilt sites. *Mycorrhiza* 4: 85-88
- Eady RR (2003) Current status of structure function relationships of vanadium nitrogenase. *Coordination Chemistry Reviews* 237: 23-30.
- Ermler U, Grabarse W, Shima S, Goubeaud M, Thae RK (1998) Active sites of transition-metal enzymes with a focus on nickel. *Current Opinion in Structure Biology* 8: 749-758.
- Escobar-Acevedo JC, Zuluaga-Pelaez JJ, Colorado-Gasca G, Páez D (2007) Micorriza vesícula arbúscular (MVA) Recurso microbiológico para desarrollar una agricultura sostenible. Programa Nacional de Transferencia de Tecnología Agropecuaria. Bogotá, Colombia. 20 p.
- Eskew DL, Welch RM, Norvell WA (1983) Nickel, an essential micronutrient for legumes and possibly all higher plants. *Science* 222: 621-623.
- Eugenia-Baca B, Soto-Urzúa L, Pardo-Ruíz MPA (2000) Fijación biológica de nitrógeno. *Elementos: Ciencia y Cultura* 38: 43-49.
- Feller U, Anders I, Demirevska K (2008). Degradation of rubisco and other chloroplast proteins under abiotic stress. *General and Applied Plant Physiology* 34: 5-8.
- Fernández-Luqueña F, Espinoza-Victoria D (2008) Bioquímica, fisiología y morfología de la senescencia nodular: una revisión crítica. *TERRA Latinoamericana* 26: 133-144.
- Ferrera-Cerrato R, González-Chávez MCA, Rodríguez-Mendoza MN (1993). Manual de agromicrobiología. Editorial Trillas. 142 p.

- Foucher C, Kondorosi E (2000) Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. *Plant Molecular Biology* 43:773-786.
- Franche C, Lindström K, Elmerich C (2009) Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil* 321: 35-59.
- Freeman JL, Persans MW, Nieman N, Albrecht C, Wendy P, Pickering IJ, Salt DE (2004) The glutation biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators. *The Plant Cell* 16: 2176-2191.
- Freedman B (1989) *Environmental ecology: the impacts of pollution and other stresses on ecosystem structure and function*. Academic Press, Inc. San Diego California. USA. 424 p.
- Gage DJ (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68:280-300.
- Gharemaleki T, Rasouli-Sadaghiani MH, Besharati H, Tavasoli A (2010). Plant growth-promoting microorganisms effect on Cd uptake by *Zea mays* in a contaminated soil. International Soil Science Congress on “Management of Natural Resources to Sustain soil health and Quality” Samsun, Turkey. 1135-1140 pp.
- George-Okafor U, Tasié F, Muotoe-Okafor F (2009) Hydrocarbon degradation potentials of indigenous fungal isolates from petroleum contaminated soils. *Journal of Physical and Natural Sciences* 3: 1-6.
- Gerendas J, Polacco J C, Freyermuth S K, Sattelmacher B (2000) Significance of nickel for plant growth and metabolism. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 162: 241-256.

- Gianinazzi-Pearson V (1996) Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. *Plant Cell* 8: 1871-1883.
- Gildon A, Tinker PB (1981) A heavy metal tolerant strain of a mycorrhizal fungus. *Transactions of the British Mycological Society* 77: 648-649.
- Giordani C, Cecchi S, Zanchi C (2005) Phytoremediation of soil polluted by nickel using agricultural crops. *Environmental Management* 36: 675-681.
- Gómez MT, Ancheyta J, Marroquín G, Alonso F, Betancourt G, Centeno G (2003) Formación de sedimentos durante la hidrodeseintegración de residuos del petróleo. *Revista de la Sociedad Química de México* 46: 260-266.
- González-Chávez MC, Carrillo-González R, Wright SF, Nichols KA (2004) The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environmental Pollution* 130: 317-323.
- González-Chávez MC (2007) Los hongos micorrízicos en suelos contaminados con elementos potencialmente tóxicos: mecanismos de tolerancia, relevancia ecológica y su uso en biorremediación. In: Ferrera-Cerrato R, Alarcón A. *Microbiología agrícola*. Editorial Trillas. 455-469 pp.
- González-Moreno S, Perales-Vela H, Salcedo-Álvarez MO (2008) La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Revista de Educación Bioquímica* 27: 119-129.
- Göhre V, Paszkowski U (2006) Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta* 223, 1115-1122.
- Graham PH (2008) Ecology of the root-nodule bacteria of legumes. In: Dilworth MJ, James EK, Sprent JI, Newton WE (eds) *Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses*. Springer Science. 23-58 pp.

- Gray EJ, Smith DL (2005) Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology & Biochemistry* 37: 395-412.
- Guerra-Sierra BE (2008) Micorriza arbuscular. Recurso microbiológico en la agricultura sostenible. *Tecnología en Marcha* 21: 191-201.
- Gunes A, Inal A, Kadloglu K (2009) Determination of mineral element concentration in wheat, sunflower, chickpea and lentil cultivars in response to P fertilization by polarized energy dispersive X-ray fluorescence. *X-Ray Spectrometry* 38: 451-462.
- Gutiérrez-Castillo ME, Roubicek DA, Cebrián-García ME, De Vizcaya-Ruíz A, Sordo-Cedeño M, Ostrosky-Wegman P (2006) Effect of chemical composition on the induction DNA damage by airborne particulate matter. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 47: 199-211.
- Guzmán-González S, Farías-Larios J (2005) Biología y regulación molecular de la micorriza arbuscular. *Avances en Investigación Agropecuaria* 9:17-31.
- Halbleib CM, Ludden PW (2000) Regulation of biological nitrogen fixation. *Journal of Nutrition* 130: 1081-1084.
- Hales BJ, Case EE, Mornisgstar JE, Dzeda MF, Mautere LA (1986) Isolation of a new vanadium from *Azotobacter vinelandii*. *Biochemistry* 25: 7251-7255.
- Hall C, Tharakan P, Hallock J, Cleveland C, Jefferson M (2003) Hydrocarbons and the evolution of human culture. *Nature* 426: 318-322.
- Hardy RWF, Holsten RD, Jackson EK, Burna RC (1968) The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology* 43: 1185-1207.

- Harris-Valle C, Esqueda M, Valenzuela-Soto EM, Castellanos AE (2009) Tolerancia al estrés hídrico en la interacción planta-hongo micorrízico arbuscular: metabolismo energético y fisiología. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32: 265-271.
- Hewitt EJ (1966) The composition of the nutrient solution. In: Hewitt EJ (ed) *Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition*. Commonwealth Agricultural Bureau, Farnham. United Kingdom. 187-246.
- Hildebrandt U, Regvar M, Bothe H (2007) Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* 68: 139-146.
- Hirel B, Le Gouis J, Ney B, Gallais A (2007) The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *Journal of Experimental Botany* 58: 2369-2387.
- Hussein HZ (2001) Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *Journal of Biotechnology* 91: 143-153.
- IIE (Instituto de Investigaciones Electricas) (1998) Los crudos mexicanos, sus características <http://www.iie.org.mx/publica/bolmj98/secmj98.htm> (Consultado 19/08/11).
- Ike A, Sriprang R, Ono H, Murooka Y, Yamashita M (2007) Bioremediation of cadmium contaminated soil using symbiosis between leguminous plant and recombinant rhizobia with the *MTL4* and the *PCS* genes. *Chemosphere* 66: 1670-1676.
- Imsande J, Schmidt J (1998) Effect of N source during soybean pod filling on nitrogen and sulfur assimilation and remobilization. *Plant and Soil* 202: 41-47.
- IMP (Instituto Mexicano del Petróleo) (2011) Tipos de petróleos crudos. <http://www.imp.mx/petroleo/tipo.htm> (Consultado 19/08/11).

- IPCS (International Programme on Chemical Safety) (2001) Vanadium pentoxide and other inorganic vanadium compounds. World Health Organisation. Ginebra, Suiza. 29.
- IPCS (International Programme on Chemical Safety) (2005) Sulfato de níquel. Fichas Internacionales de Seguridad Química. <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/FISQ/Ficheros/0a100/nspn0063.pdf> (Consultado 20/08/11).
- Iqbal N, Khan NA, Nazar R, Teixeira da Silva JA (2012) Ethylene-stimulated photosynthesis results from increased nitrogen and sulfur assimilation in mustard types that differ in photosynthetic capacity. *Environmental and Experimental Botany* 78: 84-90.
- Jackson ML (1976) Soil chemical analysis. Tercera Edición. Ediciones Omega, S. A. Barcelona, España. 524-560 pp.
- Jadia CD, Fulekar MH (2009) Phytoremediation of heavy metals: recent techniques. *African Journal of Biotechnology* 8: 921-928.
- Jamal A, Ayub N, Usman M, Kham A (2002) Arbuscular mycorrhizal fungi enhance zinc and nickel uptake from contaminated soil by soybean and lentil. *International Journal of Phytoremediation* 4: 205-221.
- January MC, Cutright TJ, Van Keulen H, Wei R (2008) Hydroponic phytoremediation of Cd, Cr, Ni, As, and Fe: Can *Helianthus annuus* hyperaccumulate multiple heavy metals? *Chemosphere* 70: 531-537.
- Jing Y, He Z, Yang X (2007) Role rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soil. *Journal Zhejiang University Science (Biomedicine & Biotechnology)* 8:192-207.
- Joner EJ, Briones R, Leyval C (2000) Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. *Plant and Soil*. 226: 227-234.

- Joner EJ, Leyval C (2003) Phytoremediation of organic pollutants using mycorrhizal plants: a new aspect of rhizosphere interactions. *Agronomie* 23: 495-502.
- 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.
- Karimi A, Khodaverdiloo H, Sepehri M, Sadaghiani MR (2011) Arbuscular mycorrhizal fungi and heavy metal contaminated soils. *African Journal of Microbiology Research* 5: 1571-1576.
- Khalil GA, Barcelo-Quintal ID, Cetina-Alcalá VM, Laure BA, Pérez-Nieto J, Borja-Salín MA (2006) Absorción de cobre características de *Leucaena leucocephala* asociada con *Glomus* spp. y *Rhizobium* en suelo contaminado del Río Lerma, México. *TERRA Latinoamericana* 24: 347-354.
- Khan MS, Zaidi A, Wani PA, Oves M (2009) Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. *Environmental Chemistry Letters* 7:1-19.
- Khan MS, Zaidi A, Wani PA, Oves M (2010) Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils: a review. *Organic farming, pest control and remediation of soil pollutants. Sustainable Agriculture Reviews* 1: 319-350.
- Karandashov V, Kuzovkina I, Hawkins HJ, George E (2000) Growth and sporulation of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus caledonium* in dual culture with transformed carrot roots. *Mycorrhiza* 10: 23-28.
- Kerr RA (2005) Earth's inner core is running a tad faster than the rest of the planet. *Science* 309: 1313-1323.

- Keller RJ, Rush JD, Grover TA (1991) Spectrophotometric and ESR evidence for vanadium (IV) deferioxamine complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry* 41: 81-91.
- Kidd PS, Becerra- Castro C, García-Lestón M, Monterroso C (2007) Aplicación de plantas hiperacumuladoras de níquel en la fitoextracción natural: el género *Alyssum* L. *Ecosistemas* 16: 26-43.
- Kiers ET, van der Heijden GA (2006) Mutualistic stability in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: exploring hypotheses of evolutionary cooperation. *Ecology* 87: 1627-1636.
- Kiers ET, West SA, Deniso RF (2008) Maintaining cooperation in the legume-rhizobia symbiosis: identifying selection pressures and mechanisms. In: Dilworth MJ, James EK, Sprent JI, Newton WE (eds) *Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses*. Springer Science. 59-76 pp.
- Kiikkilä O (2003) Heavy-metal pollution and remediation of forest soil around the Harjavalta Cu-Ni smelter, in SW Finland. *Silva Fennica* 37: 399-415.
- Kling M, Jakobsen I (1998) Arbuscular mycorrhiza in soil quality assessment. *Ambio* 27: 29-34.
- Klucas RV, Hanus FJ, Russell SA, Evans HJ (1983) Nickel: a micronutrient element for hydrogen-dependent growth of *Rhizobium japonicum* and for expression of the urease activity in soybean leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 2253-2257.
- Kirk T, Cain R (1996) Biodegradation of phenolics by the alga *Ochromonas danica*. *Applied and Environmental Microbiology* 16: 133-141.

- Kneip C, Lockhart P, Voß C, Maier UG (2007) Nitrogen fixation in eukaryotes – New models for symbiosis. *BMC Evolutionary Biology* 7: 55-66.
- Khono Y (1986) Vanadium induced manganese toxicity in bush bean plants grown in solution culture. *Journal of Plant Nutrition* 9: 1261-1272.
- Kucerová P, Wiesche C, Wolter M, Macek T, Zadrazil F, Macková M (2001) The ability of different plant species to remove polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls from incubation media. *Biotechnology Letters* 23: 1335-1359.
- Lebeau T, Braud A, Jézéquel K (2008) Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: A review. *Environmental Pollution* 153: 497-522.
- Le Duc D, Terry N (2005) Phytoremediation of toxic trace elements in soil and water. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 32: 514-520.
- Leyval C, Turnau K, Haselwandter K (1997) Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* 7: 139-153.
- Lima AIG, Pereira SAI, Figueira EMAP, Caldeira GCN, Caldeira HDQM (2006) Cadmium detoxification in roots of *Pisum sativum* seedlings: relationship between toxicity levels, thiol pool alterations and growth. *Environmental and Experimental Botany* 55:149–162
- Lloyd JR, Lovley DR (2001) Microbial detoxification of metals and radionuclides. *Current Opinion in Biotechnology* 12:248-253.

- López de Mesa JB, Quintero G, Guevara-Vizcaíno L, Jaimes-Cáceres DC, Gutiérrez-Riaño SM, Miranda-García J (2006) Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. NOVA. 5: 1-10
- Lohrke SM, Orf JH, Martínez-Romero E, Sadowsky MJ (1995) Host-controlled restriction of nodulation by *Bradyrhizobium japonicum* strains in serogroup 110. Applied and Environmental Microbiology 61: 2378-2383.
- Lovatt CJ, Zheng YS, Hake KD (1988) Demonstration of change in nitrogen-metabolism influencing flower initiation in citrus Israel. Journal of Botany 37: 182-188
- MacLean AM, Turlough MF, Sadowsky MJ (2007) Genomes of the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of legumes. New Phytology 144: 615-622.
- Macnicol RD, Beckett PHT (1985) Critical tissue concentrations of potentially toxic elements. Plant and Soil 85: 107-109.
- Malavolta E, Leao HC, Oliveira SC, Lavres J, Moraes MF, Cabral CP, Malavolta M (2006) Reparticao de nutrients nas flores, folhas e ramos da laranjeira cultivar natal. Revista Brasileira de fruticultura 28: 506-511.
- Martínez LB, Pugnaire FI (2009) Interacciones entre las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares y de plantas. Algunos ejemplos en los ecosistemas semiáridos. Ecosistemas 18: 44-54.
- Mayz-Figueroa J (2004) Fijación biológica de nitrógeno. UDO Agrícola 4: 1-20.
- Meléndez HF (1982) El origen del petróleo. COLPA 37. Editorial Universidad Complutense. Madrid, España. 50 p.
- Melo RV, Cuamatzi OT (2007) Bioquímica de los procesos metabólicos. 2a. ed. Reverté, México. 406 p.

- Memon A, Schröder P (2009) Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. *Environmental Science & Pollution Research* 16:162-175.
- Meneses R, Waaijberg H, Piérola L (1996) Las leguminosas en la agricultura boliviana: revisión de información. Proyecto Rhizobiología Bolivia (CIAT-CIF-PNLG-CIFP-WAU). Cochabamba, Bolivia. 434 p.
- Mirabal L, Ortega E, Rodés R, Fernández F (2002) Método efectivo para la desinfección total de esporas de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA): aislamiento y caracterización de bacterias endospóricas en *Glomus clarum*. *Cultivos tropicales* 23: 21-24.
- Miransari M (2011) Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and soil bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89: 917-930.
- Mishra D, Kar M (1974) Nickel in plant growth and metabolism. *Botanical Review* 40: 395-452.
- Molina R, Massicotte H, Trappe JM (1992) Specific phenomena in mycorrhizal symbiosis; Community ecological consequences and practical implications. In: *Mycorrhizal functioning an integrative plant fungi process*. Ed. My Allen. Chapman and Hall. New York. 357-423 pp.
- Morikawa H, Takahashi M (2000) Remediation of soil, water and air by naturally occurring and transgenic plants. In: *Proc Gamma Field Symposia (No. 39)* Institute of Radiation Breeding NIAR, MAFF, Japan. 110 p.
- Nakata C, Qualizza C, MacKinnon M, Renault S (2010) Growth and physiological response of *Triticum aestivum* and *Deschampsia caespitosa* exposed to petroleum coke. *Water Air Soil Pollution* 216: 59-72.

- Navarro-Aviño JP, Aguilar-Alonso I, López-Moya JR (2007) Aspectos bioquímicos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas* 16: 1-17.
- Neugschwandtner RW, Tlustoš P, Komárek M, Száková J (2008) Phytoextraction of Pb and Cd from a contaminated agricultural soil using different EDTA application regimes: Laboratory versus field scale measures of efficiency. *Geoderma* 144: 446- 454.
- Newton WE (2007) Physiology, biochemistry and molecular biology of nitrogen fixation. In: Botthe H, Ferguson SJ, Newton W E (eds). *Biology of nitrogen cycle*. Elsevier, Amsterdam. 109-130.
- Nie L, Shah S, Burd GI, Dixon DG, Glick BR (2002) Phytoremediation of arsenate contaminated soil by transgenic canola and the plant growth promoting bacterium *Enterobacter cloacae* CAL2. *Plant Physiology Biochemistry* 40:355-361.
- Núñez-Escobar R (2007) El suelo como medio natural en la nutrición de los cultivos In: Alcántar-González G, Trejo-Téllez LI (eds) *Nutrición de cultivos*. Mundi Prensa México S.A. de C.V y Colegio de Postgraduados. México. 149-157.
- Núñez-López RA, Vong YM, Ortega-Vorges R, Olguíb, EJ (2004) Fitorremediación: fundamentos y aplicaciones. *Ciencia* 55: 69-82.
- Oldroyd GED, Downie JA (2008) Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in Legumes. *Annual Review of Plant Biology* 59:519-546.
- Oller AR, Costa M, Oberdörster G (1997) Carcinogenicity assessment of selected nickel compounds. *Toxicology and Applied Pharmacology* 143:152-166.
- Olson JW, Mehta NS, Maier RJ (2001) Requirement of nickel metabolism protein HypA and HypB for full activity of both hydrogenase and urease in *Helicobacter pylori*. *Molecular Microbiology* 39:176–182.

- Oyarzún J (2009) Minería, desarrollo y ambiente: una perspectiva histórica Ciencia y Sociedad 2: 1-13.
- Panichev N, Mandiwana K, Moema D, Molathegi R, Ngobeni P (2006) Distribution of vanadium (V) species between soil and plants in the vicinity of vanadium mine. Journal of Hazardous Materials 137: 649-553.
- Parida BK, Chhibba IM, Nayyar VK (2003) Influence of nickel-contaminated soils on fenugreek (*Trigonella corniculata* L.) growth and mineral composition. Scientia Horticulturae 98: 113-119.
- Pate J, Herridge D (1978) Partitioning and utilization of net photosynthate in a nodulated annual legume. Journal of Experimental Botany 29: 401-412.
- Paudyal SP, Aryal RR, Chauhan SVS, Maheshwari DK (2007). Effect of heavy metals on growth of *Rhizobium* strains and symbiotic efficiency of two species of tropical legumes. Scientific World 5: 27-32.
- Peña-Castro JM, Barrera-Figueroa BE, Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cázares B. (2006) Bases moleculares de la fitorremediación de hidrocarburos totales del petróleo. Terra Latinoamericana. 24:529-539.
- Pereira G, Sánchez M, Ríos D, Herrera MA. (2001) Micorrizas vesículo arbusculares y su incidencia en el crecimiento de plántulas de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. Bosque 22: 39-44.
- Pereira SIA, Lima AIG, Figueira EMAP (2006) Heavy metal toxicity in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* isolated from soils subjected to different sources of heavy metal contamination: effect on protein expression. Applied Soil Ecology 33: 286-293.

- Pérez-Vargas J, García-Esquivel G, Esparza-García F (2002) Papel ecológico de la flora rizosférica en fitorremediación. *Avance y Perspectiva* 21: 297-300.
- Pernia B, de Sousa A, Reyes R, Castrillo M (2008) Biomarcadores de contaminación por cadmio en las plantas. *Interciencia* 32: 112-119.
- Perret X, Freiberg C, Rosenthal A, Broughton WJ, Fellay R (1999) High-resolution transcriptional analysis of the symbiotic plasmid of *Rhizobium* sp. NGR234. *Molecular Microbiology* 32: 415-425.
- Perret X, Staehelin C, Broughton WJ (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64:180-201.
- Phillips JM, Hayman DS (1970) Improves procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assesment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*. 55:158-161.
- Pilon-Smits E (2005) Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology* 56: 15-39.
- Prieto-Méndez J, González-Ramírez CA, Román-Gutierrez AD, Prieto-García F (2009) Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 10: 29-44.
- Puga S, Sosa M, Lebgue T, Quintana C, Campos A (2006) Contaminación por metales pesados en suelo provocada por la industria minera. *Ecología Aplicada* 5: 149-155.
- Qureshi MI, Munner S, Bashir H, Ahmand J, Iqbal M (2010) Nodule physiology and proteomics of stressed legumes. *Advances in Botanical Research* 56: 1-48.
- Rabie GH (2005) Role of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of soil rhizosphere spiked with poly aromatic hydrocarbons. *Microbiology* 33: 41-50.
- Rajkumar K, Sivakumar S, Senthilkumar P, Prabha D, Subbhuraam CV, Song YC (2009) Effects of selected heavy metals (Pb, Cu, Ni, and Cd) in the aquatic medium on the

- restoration potential and accumulation in the stem cuttings of the terrestrial plant, *Talinum triangulare* Linn. *Ecotoxicology* 18:952-960.
- Rahmanian M, Habib K, Younes RD, MirHasan RS (2011) Effects of heavy metal resistant soil microbes inoculation and soil Cd concentration on growth and metal uptake of millet, couch grass and alfalfa. *African Journal of Microbiology Research* 54: 403-410.
- Read DJ (1991) Mycorrhizas in ecosystems. *Experientia* 47:376-391.
- Read DJ (1998) Mycorrhiza-the state of the art. In: Varma A, B Hock. *Mycorrhiza* Springer-Verlag. Berlin. 3-36 pp.
- Reed DW (2007) Applied physiology of horticultural crops. Department of Horticultural Sciences. Texas A&M University 40 p.
- Rehder D (1992) Structure and function of vanadium compounds in living organisms. *Biometals* 5: 3-12.
- Reichman SM (2007) The potential use of the legume-rhizobium symbiosis for the remediation of arsenic contaminated sites. *Soil Biology & Biochemistry* 39: 2587-2593.
- Remy W, Taylor TN, Hass H, Kerp H (1994) Four-hundred million year old vesicular arbuscular mycorrhizae (VAM). *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 91: 11841-11843.
- Reyes-Jaramillo I (2002) Asociaciones biológicas en el suelo: la micorriza arbuscular (MA). *ContactoS* 44: 5-10.
- Rivera-Ortiz P, Castro-Meza B, Garza-Requena FR (2009) Clorosis férrica en cítricos y fertilización foliar. *TERRA Latinoamericana* 27: 11-16.

- Robinson B, Shulin R, Nowack B, Roulier S, Menon M, Clothier B, Green S Mills T (2006) Phytoremediation for the management of metal flux in contaminated sites. *Snow and Landscape Research* 80: 221-234.
- Ruvalcaba-Sil JL, Ramírez-Miranda D, Aguilar-Melo V, Picazo F (2010) SANDRA: a portable XRF system for the study of Mexican cultural heritage. *X-Ray Spectrometry* 39: 338-345.
- Salisbury FB, Ross CW (2004) *Plant Physiology*. Fourth Edition. Grupo Editorial Iberoamérica, S.A de C.V. 729 p.
- Salt DE, Smith, RD, Raskin I (1998) Phytoremediation. *Annual Review Plant Physiology, Plant Molecular Biology* 49: 643-68.
- Sánchez-Viveros G (2012) Mecanismos de tolerancia del simbiosistema *Azolla-Anabaena azollae* ante arsénico y cobre. Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco. 170 p.
- SAS Institute Inc (1999) *The SAS system for windows*, ver. 9.0 SAS Institute Inc, Car, North Carolina. EUA.
- Shkolnik MY (1984) Trace elements in plants. Elsevier, New York, USA. 140-171 pp.
- Shalamuk S, Velazquez S, Chidichimo H, Cabello M (2006) Fungal spore diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with spring wheat: effects of tillage. *Mycologia* 98: 16-22.
- Schüßler A, Walker C (2010) *The Glomeromycota*. A species list with new families and new genera. The Royal Botanic Garden Edinburgh, The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University. www.amf-phylogeny.com

- Selosse MA, Richard F, He X, Simard SW (2006) Mycorrhizal networks: *des liaisons dangereuses?* Trends in Ecology and Evolution 21: 621-628.
- Seregin IV, Kozhevnikova AD (2006) Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. Russian Journal of Plant Physiology 53: 257-277.
- Singh S, Kayasthab AM, Asthanaa RK, Singh SP (2005) Response of garden pea to nickel toxicity. Journal of Plant Nutrition. 27: 1543-1560.
- Singh RP, Dhania G, Sharma A, Jaiwal PK (2007) Biotechnological approaches to improve phytoremediation efficiency for environment contaminants In: Singh RP, Tripathi RD (eds) Environmental Bioremediation Technologies Springer. 223-258 pp.
- Skwierinski R, Jaimes R, Muñoz A (1995) Variaciones diarias y estacionales de actividad nitrogenasa y concentración de leghemoglobina y su relación con factores climáticos. Agronomía Tropical 54: 171-188.
- Soto-Urzúa L, Baca BE (2001) Mecanismos de protección de la nitrogenasa a la inactivación por oxígeno. Revista Latinoamericana de Microbiología 43:37-49.
- Sozudogru S, Kutuk AC, Halilova H (2001) Effects of Vanadium on the growth, chlorophyll, and mineral content of soybean (*Glycine max* (L.) Merr). Ciencia 9: 88-95.
- Speight JG (1999) The chemistry and technology of petroleum. Third Edition Marcel Dekker, Inc. 934 p.
- Speight JG (2001) Handbook of petroleum analysis John Wiley & Sons, Inc. 512 p.
- Sprent JI (2007) Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. New Phytologist 174: 11-25.
- Stougaard J (2000) Regulators and regulation of legume root nodule development. Plant Physiology 124: 531-540.

- Strasburger E, Noll F, Shenk H, Schimper AFW (2004). Tratado de botánica. 35ª Edición Ediciones Omega. Barcelona, España. 1031 p.
- Stratton ML, Good GL, Barker AV (2001) The effects of nitrogen source and concentration on the growth and mineral composition of privet. *Journal of Plant Nutrition* 24: 1745-1772.
- Stürmer SL (2012) A history of the taxonomy and systematics of arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the phylum Glomeromycota. *Mycorrhiza* 22: 247-258.
- Su DC, Wong JWC, Jagadeesan H (2004) Implications of rhizospheric heavy metals and nutrients for the growth of alfalfa in sludge amended soil. *Chemosphere* 56: 957-965.
- Tabak HH, Lens P, van Hullebusch ED, Dejonghe W (2005) Developments in bioremediation of soils and sediments polluted with metals and radionuclides-1. Microbial processes and mechanisms affecting bioremediation of metal contamination and influencing metal toxicity and transport. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 4:115-156.
- Taiz L, Zeiger E (2002) *Plant Physiology*. Third Edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts. USA 266-272 pp.
- Tham LX, Nagasawa N, Matsuhashi S, Ishioka NS, Ito T, Kume T (2001) Effect of radiation-degraded chitosan on plants stressed with vanadium. *Radiation Physics and Chemistry* 61: 171-175.
- Thangavel P, Subbhuraam CV (2004) Phytoextraction; Role of hyperaccumulators in metal contaminated soils. *Proceedings Indian National Science Academic* 70:109-130.
- Tas E, Leinonen P, Saano A, Piippola S, Kaijalainen S, Räsänen LA, Hakola S, Lindström K (1996) Assessment of the competitiveness of rhizobia infecting *Galega orientalis*

- using plant yield, nodulation, and strain identification by PCR and antibiotic resistance. *Applied and Environmental Microbiology* 62:529-535.
- Tippens PE (2008) Física, conceptos y aplicaciones. Séptima Edición. Mc Graw-Hill Interamericana. México, DF. 800 p.
- Trejo-Téllez LI, Gómez-Merino FC, Alcántar-González G (2007) Elementos benéficos In: Alcántar-González G, Trejo-Téllez LI (eds) Nutrición de cultivos. Mundi Prensa México S.A. de C.V y Colegio de Postgraduados. México. 49-80 p.
- Turgut C, Pepe MK, Cutright TJ (2004) The effect of EDTA and citric acid on phytoremediation of Cd, Cr, and Ni from soil using *Helianthus annuus*. *Environmental Pollution* 131:147-154.
- Upadhyaya H, Panda SK, Bhattacharjee MK, Dutta S (2010) Role of arbuscular mycorrhiza in heavy metal tolerance in plants: prospects for phytoremediation. *Journal of Phytology* 2: 16-27.
- Van-Epps A (2006) Phytoremediation of Petroleum Hydrocarbons. Environmental Protection Agency. Washington, DC. 171 p.
- Vassilev A, Shwitzguébel JP, Thewys T, van der Lelie D, Vangronsvel J (2004) The use of plants for remediation of metal-contaminated soils. *The Scientific World Journal* 4: 9-34.
- Varela L, Trejo D (2001) Los hongos micorrizógenos arbusculares como componentes de la biodiversidad del suelo en México. *Acta Zoológica Mexicana* 1: 39-51.
- Vekemans B, Janssens L, Vincze F, Adams P, Van Espen P (1994) Analysis of X-ray spectra by iterative least squares (AXIL): New developments. *X-ray Spectrometry* 23: 278-285.

- Vig K, Megharaj M, Sethunathan N, Naidu R (2003) Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil: a review. *Advances in Environmental Research* 8: 121-135.
- Vivas A, Barea J, Biró B, Azcón R (2006a) Effectiveness of autochthonous bacterium and mycorrhizal fungus on *Trifolium* growth, symbiotic development and soil enzymatic activity in Zn contaminated soil. *Journal of Applied Microbiology* 100: 587-598.
- Vivas A, Biró B, Németh T, Barea J, Azcón R (2006b) Nickel-tolerant *Brevibacillus brevis* and arbuscular mycorrhizal fungus can reduce metal acquisition and nickel toxicity effects in plant growing in nickel supplemented soil. *Soil Biology & Biochemistry* 38: 2694-2704.
- Volke-Sepúlveda T, Velasco-Trejo JA, de la Rosa-Pérez DA (2005) Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. INE-SEMARNAT. Primera Edición México DF. 144p.
- Walker CD, Graham RC, Madison, J, Cary EE, Welch RM (1985) Effects of Ni Deficiency on Some Nitrogen Metabolites in Cowpeas (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Plant Physiology* 79: 474-479.
- Wang JF, Liu Z (1999) Effect of vanadium on the growth of soybean seedlings. *Plant and Soil* 216: 47-51.
- Wani PA, Khan MS, Zaidi A (2007) Effect of metal tolerant plant growth promoting Rhizobium on the performance of pea grown in metal amended soil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 55: 33-42
- Wani PA, Khan MS, Zaidi A (2008) Chromium reducing and plant growth promoting *Mesorhizobium* improves chickpea growth in chromium amended soil. *Biotechnology Letters* 30:159-163.

- Warington K (1956) Interaction between iron and molybdenum or vanadium in nutrient solutions with or without a growing plant. *Annals of Applied Biology* 44: 535-546.
- Wauquier JP (2004) El refinado del petróleo: petróleo crudo, productos petrolíferos, esquema de fabricación 1a. ed. Díaz Santos, Madrid España. 462 p.
- Welch RM (1973) Vanadium uptake by plants. Absorption kinetics and the effects of pH, metabolic inhibitors, and other anions and cations. *Plant Physiology* 51: 828-832.
- Wood BW, Reilly R, Nyczepir AP (2006) Field deficiency of nickel in trees: symptoms and cause. *Acta Horticulture* 721: 83-97.
- Xoconostle-Cázares B, Ruiz-Medrano R (2002) Impacto de la biotecnología agrícola en cultivos: el caso de las micorrizas. *Avance y Perspectiva* 21: 263-266.
- Yang J, Teng Y, Wang J, Li J (2011) Vanadium uptake grown in V-Cd-contaminated soil by experiment. *Biological Trace Element Research* 142: 787-795.
- Yang X, Feng Y, He Z, Stoffella PJ (2005) Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 18: 339-353.
- Young JPW, Crossman LC, Johnston AWB, Thomson NR, Ghazoui ZF, Hull KH, Wexler M, Curson ARJ, Todd JD, Poole PS, Mauchline TH, East AK, Quail MA, Churcher C, Arrowsmith C, Cherevach I, Chillingworth T, Clarke K, Cronin A, Davis P, Fraser A, Hance Z, Hauser H, Jagels K, Moule S, Mungall K, Norbertczak H, Rabbinowitsch E, Sanders M, Simmonds M, Whitehead S, Parkhill J (2006) The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biology* 7: R34.
- Younis M (2007) Responses of *Lablab purpureus*-*Rhizobium* symbiosis to heavy metals in pot and field experiments. *World Journal of Agricultura Sciences* 3: 111-122.

- Zarei M, König S, Hempel S, Nekouei MK, Savaghebi Gh, Buscot F (2008) Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi associated to *Veronica rechingeri* at the Anguran zinc and lead mining region. *Environmental Pollution* 156: 1277-1283.
- Zavala-Cruz J, Palma-López DJ, Ruíz-Bello A (2003) Metales pesados en tierras y grano de maíz. In: Zavala-Cruz J, Gutierrez-Castorena MC, Palma-López DJ (eds) *Impacto ambiental en las tierras del campo petrolero Samaria, Tabasco*. Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco 131 p.
- Zhuang X, Chen J, Shin H, Bai Z (2007) New advances in plant growth promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environmental International* 33: 406-413.
- Zobiolo LHS, Oliveira RS, Kremer RJ, Constantin J, Yamada T, Castro C, Oliveira FA, Oliveira A (2010) Effect of glyphosate on symbiotic N₂ fixation and nickel concentration in glyphosate-resistant soybeans. *Applied Soil Ecology* 44: 176-180.

ANEXO

Cuadro 1A. Extracto de levadura manitol rojo congo (ELMARC)

Reactivo	Cantidad en 1000 mL de Agua destilada
K ₂ HPO ₄	1.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.18 g
Manitol	9.0 g
Extracto de levadura	1.5 g
Rojo congo 1:400 (p/v)	10 mL
Agar	15 g

Cuadro 2A. Caldo de extracto de levadura (CELM)

Reactivo	Cantidad en 1000 mL de Agua destilada
K ₂ HPO ₄	1.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.18 g
Manitol	9.0 g
Extracto de levadura	1.5 g

Cuadro 3A. Solución nutritiva de Jensen

Reactivo	Cantidad en 1000 mL de Agua destilada
CaHPO ₄	1.0 g
K ₂ HPO ₄	0.2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.2
FeCl ₃	0.1
Micronutrientes*	1 mL

*Preparación de la solución para micronutrientes	Cantidad en 1000 mL de Agua destilada
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.5 g
(NH ₄)Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.074 g
H ₂ BO ₃	0.934 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.0350 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0310 g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	7.70 g

Cuadro 4A. Solución Long Ahston modificada

Solución stock	Cantidad de reactivo en peso (g L⁻¹)	Cantidad de solución stock para preparar 1 L (1000 mL)
KNO ₃	80.8	5.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	73.6	5.0
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	188.8	5.0
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	36.8	1.25 para 10.25 µg mL ⁻¹ 2.50 para 20.50 µg mL ⁻¹ 5.00 para 41 µg mL ⁻¹
Elementos traza		1.0
Solución de citratos (adicionar antes de la fertilización)		5.0

Solución stock de elementos traza: aforar a 1000 mL con agua destilada

MnSO ₄ ·H ₂ O	1.69
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.29
H ₃ BO ₃	3.10
NaCl	5.90
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.088
MnSO ₄ ·H ₂ O	1.69

Solución stock de citratosCitrato férrico (FeC₆H₅O₇) 4.9Ácido cítrico (H₃C₆H₅) 4.9

*Aforar a 1000 mL con agua desionizada destilada.

*Agitar por unos minutos y autoclavear para la completa disolución.

*Almacenar en refrigeración

Hewitt (1966)