



FES ZARAGOZA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

ÁREA DE MICROBIOLOGÍA DE SUELOS

“Tolerancia en la simbiosis *Rhizobium*-Leguminosa frente a tres
hidrocarburos Policíclicos Aromáticos”

Tesis

Que para obtener el título de:

BIÓLOGO

Presenta

Yessica González Paredes

México, D.F. Noviembre 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatoria

A mis padres Cruz González y Teresa Paredes por apoyarme en todo momento.

Ustedes son lo más sagrado que tengo en la vida “los amo”.

A Omar, Baby, Arge y Sofi por ser los mejores hermanos y los mejores amigos, los quiero mucho.

A mi cuñadita Moni por sus consejos de superación.

A mis adorados sobrinos Israel, José Manuel y a la nenita Kenia por ser unos verdaderos ángeles.

A mis queridas amigas Lety, Fabis, Miriam y Paulikikis.

Al Green Team: Pedro, Sergy, Raúl, Balam, Andy, Omar, Peter, Huguito, Joy, Eduardo.

A Eric, Luis, Ale y Susana por brindarme su Amistad dentro del Colegio.

Agradecimientos

Agradezco a mi respetada **UNAM** y a mi querida **FES ZARAGOZA** por mi formación.

Al Colegio de Postgraduados por permitirme llevar acabo esta tesis en sus instalaciones.

A los profesores que me impartieron clases en los cinco años de estancia en la universidad principalmente: Enrique Laguna, Zavala, Alejandrina, María del Carmen, Alfredo Bueno y David Espinoza.

A la Mtra María de Jesús Sánchez Colín por mostrarme una pequeña parte del mundo microscópico.

Al Dr. Ronald Ferrera Cerrato por aceptarme en su exitoso equipo de trabajo. Mil Gracias.

Al Dr. Alejandro Alarcón por apoyarme en todo momento en la realización de esta tesis.

A mi honorable jurado:

BIÓL. ELVIA GARCÍA SANTOS

DR. RONALD FERRERA CERRATO

M. en C. MA. DE JESÚS SÁNCHEZ COLÍN

DR. GERARDO CRUZ FLORES

M. en C. MIGUEL CASTILLO GONZÁLEZ

A las personas del Colegio que me apoyaron durante la realización de esta tesis y por brindarme su amistad. Gracias a todos.

La tesis que lleva como título **Tolerancia en la simbiosis *Rhizobium* – Leguminosa frente a tres Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos**, se realizó en el laboratorio del área de Microbiología de suelos del Colegio de Posgraduados Campus Montecillo, bajo la Dirección del Dr. Ronald Ferrera Cerrato Profesor investigador titular del Colegio de Posgraduados. Campus Montecillo y con la participación de la Maestra en Ciencias María de Jesús Sánchez Colín Profesor investigador de la Universidad Nacional Autónoma de México como asesor interno.

Esta tesis forma parte del Proyecto SEP-CONACYT 79456 “Simbiosis Tripartita *Rhizobium*-Leguminosa-Micorriza Arbuscular y su respuesta a los Hidrocarburos del Petróleo”

CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS.....	7
INDICE DE CUADROS.....	8
RESUMEN.....	9
I. INTRODUCCIÓN.....	10
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	12
2.1. La rizósfera y su importancia en la degradación de hidrocarburos.....	12
2.1.1. <i>Rhizobium</i>	13
2.1.3. Formación del nódulo.....	14
2.2. Tipos y características físicas y químicas de los hidrocarburos policíclicos aromáticos.....	15
2.2.1. Propiedades físicas y químicas de los HPAs.....	16
2.2.2. Producción y usos de los HPAs.....	18
2.2.3. Contaminación de suelos por hidrocarburos.....	19
2.2.3.1. Interacción microorganismos - hidrocarburos.....	20
2.3. Efectos de los hidrocarburos policíclicos aromáticos en el sistema simbiótico <i>Rhizobium</i> – Leguminosa.....	22
III. JUSTIFICACIÓN.....	23
IV. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	24
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
5.1. Fase I. Tolerancia in vitro de la bacteria <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 ante los HPAs ..	25
5.1.1. Reactivación de la cepa <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899.....	25
5.1.3. Análisis estadístico.....	26
5.2. Fase II. Capacidad de nodulación y contenido de nitrógeno en la simbiosis <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899– <i>Phaseolus vulgaris</i> frente a hidrocarburos policíclicos aromáticos.....	27

5.2.1. Evaluación de la nodulación de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 en <i>Phaseolus vulgaris</i> expuesto a HPAs en sistema “growth pouch”	27
5.2.2. Unidades formadoras de colonias (UFC)	28
5.2.3. Mediciones de la parte aérea y raíz de la planta	29
5.2.4. Concentraciones de nitrógeno foliar en parte aérea	29
5.6. Diseño experimental y análisis de datos.....	29
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
6.1 Fase 1. Tolerancia in vitro de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 ante tres diferentes hidrocarburos policíclicos aromáticos	30
6.2. Fase II. Capacidad de nodulación y contenido de nitrógeno en la simbiosis <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899– <i>Phaseolus vulgaris</i> frente a hidrocarburos policíclicos aromáticos.....	34
6.2.1. Formación y Número de nódulos	35
6.2.2. Peso nodular después de la cosecha	40
6.2.3. Peso seco total de <i>Phaseolus vulgaris</i>	42
6.2.6. Contenido de nitrógeno foliar de <i>Phaseolus vulgaris</i> contaminado con tres HPAs.....	46
VII. CONCLUSIONES.....	48
VIII. LITERATURA CITADA.....	49
IX. APENDICE.....	58

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Unidades formadoras de colonias bacterianas de *Rhizobium tropici* CIAT 899 después de seis días de exposición a seis concentraciones de tres hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs). n=3. I=error estándar.....31
- Figura 2. Unidades formadoras de colonias que crecieron en medio contaminado con hidrocarburos policíclicos aromáticos a los seis días de siembra. A) naftaleno, B) fenantreno y C) benzo[a]pireno..... 33
- Figura 3. Plantas de *Phaseolus vulgaris* en simbiosis con *Rhizobium tropici* por técnica de growth pouch y en medio contaminado con HPAs.....36
- Figura 4. Número de nódulos registrados a los 21 días, por la técnica de growth pouch, que crecieron en medio contaminado por tres hidrocarburos policíclicos aromáticos (mg L⁻¹). A) naftaleno, B) fenantreno, y C) benzo[a]pireno. T= Testigo, T+Acetona= Testigo con acetona. n=6.....37
- Figura 5. Número de nódulos registrados al final del experimento (30 días) por efecto de cada contaminante comparado con los tratamientos testigo. TR= testigo con *Rhizobium* y TR + A= testigo con *Rhizobium* y acetona. n=3, I= error estándar.....39
- Figura 6. Peso seco de nódulos (mg), presente en plantas que fueron expuestas a diferentes concentraciones de tres hidrocarburos policíclicos aromáticos. A) naftaleno, B) fenantreno, y C) benzo[a]pireno. n=3. I= error estándar.....41
- Figura 7. Peso seco total de plantas de *Phaseolus vulgaris* que fue inoculado con *Rhizobium tropici* y expuestas a HPAs durante treinta días. A) naftaleno B) phenantreno y C) benzo[a]pireno, n= 3, I= error estándar.....43
- Figura 8. Peso seco total de la plantas (mg) por efecto del tipo de hidrocarburo policíclico aromático. TR=Testigo con *Rhizobium* y TR+A= Testigo con *Rhizobium* y acetona. n=3, I= error estándar.....45
- Figura 9. Contenido total de nitrógeno de *Phaseoulus vulgaris* por efecto de su exposición a tres hidrocarburos policíclicos aromáticos, después de 30 días. A) naftaleno, B) fenantreno, y C) benzo[a]pireno. T=Testigo no inoculado; TR=Testigo con *Rhizobium*; TR+A=Testigo con *Rhizobium*+acetona. n=3. I=error estándar.....47

“Tolerancia en la simbiosis *Rhizobium*-Leguminosa frente a tres hidrocarburos Policíclicos Aromáticos”

RESUMEN

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs), tienen determinados efectos biológicos incluyendo toxicidad crónica, mutagénica y cancerígena. Es escasa la información que se tiene sobre el efecto de los HPAs en sistemas simbióticos como es el caso de *Azolla-Anabaena*, hongo micorrizico arbuscular-planta, o leguminosa-rhizobia. Pocas investigaciones informan que los rizobios, además de llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno, tienen también la capacidad de degradar algunos compuestos alifáticos y aromáticos. Por tal razón esta investigación evaluó la tolerancia de la bacteria *Rhizobium tropici* CIAT 899 frente a diferentes tipos y concentraciones crecientes de HPAs, en fase asimbiótica y simbiótica con *Phaseolus vulgaris*. Para conocer el efecto en la fase asimbiótica, se impregnaron cajas de petri con medio ELMARC, con naftaleno (NAPH), fenantreno (PHE), o benzo[*a*]pireno (BAP), con las siguientes concentraciones: 20, 40, 60, 80 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, disueltos previamente en acetona. Además se incluyeron dos testigos, uno sin contaminante y otro sin contaminante más el solvente acetona y posteriormente, se sembró la cepa bacteriana. El crecimiento bacteriano se observó a los seis días a pesar de que *Rhizobium tropici* CIAT 899 es una bacteria de crecimiento rápido; sin embargo, la bacteria fue tolerante a todos los hidrocarburos empleados en el experimento, por lo cual se puede decir que los tres HPAs no tuvieron efectos inhibitorios en el crecimiento de la bacteria. El crecimiento de las UFC por efecto de la interacción HPAs*Concentración fue estadísticamente significativo ($P \leq 0.01$). No se observaron diferencias significativas por el tipo de HPAs o por la concentración de éstos contaminantes. En la segunda fase experimental se evaluó la simbiosis de *Rhizobium tropici* CIAT 899-*Phaseolus vulgaris*. El experimento consistió en 17 tratamientos y tres repeticiones que fueron distribuidos completamente al azar. Las semillas de *Phaseolus vulgaris* fueron desinfectadas superficialmente y posteriormente, germinadas en agar-agua al 1%. Siete días después las semillas fueron transplantadas al sistema “growth pouch”, con tres compartimientos. Cada bolsa contenía solución nutritiva Jensen y el HPAs correspondiente a las concentraciones mencionadas previamente. Tratamientos con y sin acetona fueron también incluidos en el experimento. Siete días después del trasplante los tratamientos fueron inoculados con 1.0 mL de *Rhizobium tropici* CIAT 899 ($87.2 \text{ UFC} \times 10\text{mL}^{-1}$). Los tratamientos se mantuvieron en cámara de crecimiento en las condiciones siguientes. 70% Humedad Relativa, 23°C, 12 h durante 21 días. Cinco días después de la inoculación se contó y registro el número de nódulos hasta los 21 días. El macrosimbionte y el simbiote fueron tolerantes a los tres HPAs y a las diferentes concentraciones empleadas en este estudio, observándose la simbiosis en todos los tratamientos inoculados. No hubo diferencias estadísticas entre tratamientos en el peso seco nodular. El contenido de nitrógeno fue significativamente bajo, sin embargo el testigo con *Rhizobium*+acetona presentó un incremento del 50% de nitrógeno comparado con el testigo con *Rhizobium*, y un 25% más que el testigo absoluto (sin inoculación).

I. INTRODUCCIÓN

La contaminación del suelo por hidrocarburos, ocurre durante su transporte o por ruptura de ductos (Rivera-Espinoza y Dendooven, 2004). Los derrames de estos combustibles ocasionan graves problemas, sobre todo si el suelo es permeable ya que la contaminación puede extenderse rápidamente. Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs), se encuentran en el aire, agua y suelo y proceden de fuentes naturales o antropogénicas. Debido a que alteran el equilibrio ecológico, a su potencial genotóxico y cancerígeno (Kanaly y Harayama, 2000), muchos HPAs han sido incluidos en la lista de principales contaminantes según la agencia de protección ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos de América (Keith, 1991). Dada la problemática de la contaminación por hidrocarburos, se han buscado alternativas que solucionen dicha situación. Por tal razón, una alternativa de limpiar de HPAs en los suelos, es por medio de la degradación microbiana (Cunningham, 1996), mecanismo primario responsable para la eliminación de compuestos orgánicos en el suelo (Frick *et al.*, 1999).

La degradación de contaminantes orgánicos vía microbiana ocurre como resultado de su utilización por parte de los microorganismos para su crecimiento y reproducción (Smith, 1997). Una característica importante de las bacterias es que tienen la capacidad de adaptarse rápidamente a cambios ambientales bruscos, incluyendo su exposición a los contaminantes (Bollag, 1994). Existen géneros bacterianos que pueden degradar compuestos derivados del petróleo como *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, entre otras (Riser–Roberts, 1998), así como algunas bacterias con capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. Algunos microorganismos y algunas plantas junto con su rizosfera tienen la capacidad de remover contaminantes, como insecticidas y herbicidas, presentes en el suelo, proceso denominado fitorremediación (Walton y Anderson, 1990).

Desde el punto de vista agronómico, la presencia de bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno en leguminosas, es muy importante para el crecimiento y la producción de estas plantas (Ferrera-Cerrato y Pérez, 1995). Pocas investigaciones informan que los rizobios, además de llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno, tienen la capacidad de degradar algunos compuestos alifáticos (Vela *et al*, 2002) y aromáticos (Latha y Mahadevan, 1997). Sin embargo, es escaso el conocimiento relacionado con la capacidad de los rizobios para degradar HPAs y fijar nitrógeno atmosférico cuando están en simbiosis con una planta, bajo condiciones de contaminación por hidrocarburos del petróleo. Más aun, no se conoce el efecto de los HPAs en el proceso de reconocimiento y nodulación, así como la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico.

Por tal razón esta investigación evaluó la tolerancia de la bacteria *Rhizobium tropici* CIAT 899 frente a diferentes tipos y concentraciones de HPAs, en fase asimbiótica y simbiótica con *Phaseolus vulgaris*.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. La rizósfera y su importancia en la degradación de hidrocarburos

El termino rizósfera fue usado por primera vez por un alemán en 1904, la cual definió como “el volumen de suelo que recibe influencia de la raíz” (Ferrera-Cerrato, 200). La rizósfera se puede dividir dependiendo de la capacidad invasiva de la flora microbiana: si coloniza sólo la superficie de la raíz conocida como rizoplano, pertenece a la ectorrizósfera y si invade las células de la capa más superficial o epidermis de la raíz, corresponde a la zona conocida como endorrizósfera (Ferrera-Cerrato, 2007).

La rizósfera está determinada por el tamaño y complejidad de la raíz de la planta y puede representar un área de contacto significativa (Atlas y Bartha, 1993). La actividad y biomasa microbiana es alta en la rizósfera, comúnmente entre 5 y 10 veces más grande que en suelos sin raíces. En la rizósfera existe un flujo continuo de compuestos exudados por la raíz en forma de carbohidratos, ácidos orgánicos, vitaminas, enzimas, nucleótidos, flavononas, así como hormonas vegetales y otros compuestos importantes para la actividad microbiana (Ferrera-Cerrato y Pérez, 1995; Kennedy, 1999). En respuesta, las plantas se benefician de la mayor solubilización de minerales, síntesis de vitaminas y otros productos que estimulan el crecimiento por la actividad fisiológica de los microorganismos.

El efecto de los microorganismos que están presentes en el suelo en los diferentes ecosistemas, ha recibido una atención considerable en los últimos años (Abbondanzi *et al*, 2003)

2.1.1. *Rhizobium*

El género *Rhizobium* comprende bacterias que corresponden a bacilos motiles Gram negativos. Además, son microorganismos quimioautótrofos, esto quiere decir que utilizan CO₂ como fuente de carbono y compuestos inorgánicos como fuentes de energía. Crecen a una temperatura de 25 a 30 °C y en un pH neutro, y son considerados como microorganismos aerobios obligados. De manera particular este género se caracteriza por formar simbiosis con leguminosas mediante la cual, convierten el nitrógeno atmosférico en nitrógeno combinado, proceso que se define como fijación de nitrógeno (Martínez y Hernández, 1999).

2.1.2. La simbiosis *Rhizobium* – Leguminosa

La simbiosis mutualista es una asociación entre dos organismos, los cuales obtienen beneficio uno del otro. En el caso de la simbiosis mutualista *Rhizobium*–Leguminosa, se llegan a formar órganos especializados llamados nódulos en las raíces de las plantas. En estos nódulos se lleva a cabo la reducción de nitrógeno atmosférico por medio de la enzima nitrogenasa, que presenta dos componentes que contienen hierro y molibdeno (Peters *et al*, 1995), que es activada en un ambiente microaerofílico. Es por esto que en el nódulo, las cantidades necesarias de O₂ son controladas mediante la producción de leghemoglobina una proteína roja parecida a la hemoglobina, que se encuentra siempre en nódulos activos en la fijación de de nitrógeno (Madigan *et al*, 1999; Atlas y Bartha, 2002). La leghemoglobina sirve como un amortiguador de oxígeno haciendo un ciclo con el fierro entre la forma oxidada (Fe³⁺) y la reducida (Fe²⁺) para conservar concentraciones muy bajas de O₂ libre dentro del nódulo. Las estimaciones de la contribución de esta simbiosis a la economía global de nitrógeno varían, pero los cultivos crecen en más de 250 millones de hectáreas alrededor del mundo y fijan cerca de 90 T de N año⁻¹, lo cual representa casi el 50% del nitrógeno usado en la agricultura. La tasa de fijación simbiótica de dinitrógeno en leguminosas es de 145–450 Kg de N ha⁻¹ año⁻¹ (Unkovich y Pate, 1997).

2.1.3. Formación del nódulo

El reconocimiento de la bacteria con el pelo radical, inicia con la presencia de exudados radicales, entre ellos los flavonoides que provocan primero un desplazamiento o quimiotaxis de los rizobios a la superficie radical de la planta. Como segunda consecuencia, se activan los genes *Nod* que son los responsables de la nodulación (Broughton *et al*, 2003). La presencia de los genes *Nod*, es suficiente para que en la planta se produzca la deformación de los pelos radicales, para formar los precanales de infección y se inicie la división de células del corteza de la raíz (Trevors y Van, 1997). Finalmente se da la organogénesis del nódulo (Porcel *et al.*, 2003; Szczyglowski y Florence *et al*, 2003). Al mismo tiempo, en ciertas especies, las células corticales se dividen para formar el primer primordio del nódulo (Rhijin *et al*, 1998). Los rizobios cubiertos con una capa de origen vegetal (Gonzalez y Marketon, 2003), son transportados a través del hilo de infección. Allí, los rizobios se reproducen mientras el hilo de infección crece hacia el primordio del nódulo gracias a la secreción de polisacáridos extracelulares y de proteínas exportadas por el sistema de secreción (Hirsch, 1999; Denison, 2000). Al unirse el primordio del nódulo con el hilo de infección, las bacterias se diferencian en bacteroides, que son más grandes que los rizobios cuando están en vida libre y son totalmente dependientes de la planta. Únicamente después de tener lugar la formación de bacteroides, se inicia la fijación de nitrógeno siempre y cuando estén presentes los genes *Nif* (genes que se encargan de fijar el nitrógeno) y se sintetice la leghemoglobina (González y Markenton, 2003). Finalmente, se inicia la fijación biológica del nitrógeno atmosférico, transformando el dinitrógeno (N₂) en amoníaco y transfiriéndolo a la planta (Oke y Long, 1999). Por último, una alteración sobre alguno de los simbiontes ocasionará una acidificación en el interior del nódulo llevándolo a una senescencia nodular, cuando esto sucede, los bacteroides mueren y los rizobios que estaban en los nódulos en un estado de latencia, son liberados nuevamente al suelo.

2.2. Tipos y características físicas y químicas de los hidrocarburos policíclicos aromáticos

El petróleo crudo se caracteriza por ser un líquido viscoso con una composición química sumamente compleja, y contiene miles de compuestos básicamente hidrocarburos (Rosini, 1996). Los hidrocarburos constituyen del 50 al 98% de los compuestos del petróleo, por lo que constituye uno de los grupos de contaminantes ambientales más importantes, tanto por su abundancia, como por su persistencia en distintos ecosistemas (Casellas, 1995). Los constituyentes químicos de los compuestos orgánicos pueden generalmente ser clasificados en tres principales grupos: alifáticos, alicíclicos y aromáticos.

Los compuestos alifáticos son de cadena abierta, y están relacionados con el metano. Dentro de este grupo se encuentran, los alcanos, alquenos y alquinos, y estos hidrocarburos pueden ser fácilmente degradados por microorganismos aeróbicos. Los alicíclicos son compuestos de cadena cerrada en cuyo anillo hay un elemento distinto al carbono y su biodegradación es más lenta comparado con los alifáticos (Freedman, 1989).

La última clase de hidrocarburos contienen múltiples anillos de benceno (C_6H_6) fusionados, conocidos como hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs). Los HPAs son contaminantes ambientales ampliamente distribuidos que tienen determinados efectos biológicos incluyendo toxicidad crónica, mutagénica y cancerígena (Kanaly y Harayama, 2000). Debido a su potencial genotóxico, muchos HPAs han sido incluidos en la lista de principales contaminantes según la agencia de protección ambiental (EPA por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos de América (Keith, 1991). La combustión incompleta de materiales que contienen carbono es mayormente responsable de la amplia distribución de los HPAs en la atmósfera, aguas superficiales y sedimentos.

Los HPAs son compuestos hidrofóbicos cuya persistencia en los ecosistemas se debe principalmente a su baja solubilidad en agua, lo que los hace menos disponibles para los

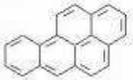
procesos biológicos (Futoma *et al*, 1981; Wild *et al*, 1990). Entre los HPAs encontramos hidrocarburos diaromáticos como el naftaleno (NAF), a los triaromáticos como el fenantreno (PHE) y los policíclicos que tienen más de tres anillos de benceno como el benzo[*a*]pireno (BaP).

2.2.1. Propiedades físicas y químicas de los HPAs

Algunos de estos hidrocarburos son sólidos a temperatura ambiente y su volatilidad es muy baja. Dependiendo de la cantidad de anillos, absorben luz ultravioleta y producen un espectro fluorescente característico. Son solubles en muchos disolventes orgánicos, pero muy poco solubles en agua, entre más alto es el peso molecular de los HPAs, más baja es la solubilidad (Cuadro 1). Desde el punto de vista químico, los HPAs reaccionan por sustitución del hidrógeno o por adición cuando se produce su saturación, y generalmente se conserva el sistema de anillos. La mayoría de los HPAs pueden reaccionar con SO₂, SO₃ y H₂SO₄ para formar ácidos sulfínico y sulfónico.

La mayoría de los HPAs son susceptibles a procesos de fotooxidación, se volatilizan, se bioacumulan, se adsorben a partículas de suelo o se filtran. De manera particular, los HPAs son susceptibles a la degradación vía microbiana (Cerniglia, 1993).

Cuadro1. Características físicas y químicas de tres hidrocarburos policíclicos aromáticos (The Merck Index, 1996)

HPAs	Formula	Peso molecular (g mol ⁻¹)	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)	Constante de solubilidad de Henry	Volumen molar (cm ³ mol ⁻¹)	Color y Forma	Solubilidad	Obtención
Naftaleno		128.16	80.2	217.96	43.03	148	Sólido blanco cristalino en forma de escamas, cubos, polvo y esferas. Tiene fuerte olor a alquitrán.	Hidrofóbico, soluble en solventes orgánicos.	A partir de la cristalización del aceite de alquitrán.
Fenantreno		178.20	100.35	340.0	3.24	199	Cristales brillantes, incoloros.	Hidrofóbico, soluble en solventes orgánicos	Destilación fraccionada de aceites de alquitrán de hulla de alto punto de ebullición, con posterior recristalización en alcohol.
Benzo[<i>a</i>]pireno		252.32	179.0	311.0	0.046	263	Cristales amarillentos	Hidrofóbico, soluble en solventes orgánicos	Se halla en el alquitrán, humo de cigarrillos y en la atmósfera como producto de la combustión incompleta.

2.2.2. Producción y usos de los HPAs

Muchos HPAs pueden obtenerse a partir de alquitrán. Las sustancias puras no tienen aplicaciones técnicas, salvo el naftaleno y el antraceno. No obstante, se utilizan indirectamente en el alquitrán y el petróleo, que contienen mezclas de distintos HPAs.

Los HPAs pueden encontrarse casi en todas partes, en el aire, en el suelo y en el agua, procedentes de fuentes naturales o antropogénicas. La contribución de las fuentes naturales, como los incendios forestales y los volcanes, es mínima si la comparamos con las emisiones causadas por el ser humano. La combustión de combustibles fósiles es la principal fuente de emisiones de HPAs. Otras emisiones proceden de la combustión de residuos y madera, así como de los vertidos de petróleo crudo o refinado que en sí mismo contiene HPAs. Los HPAs están también presentes en el humo del tabaco y en los alimentos a la parrilla, ahumados y fritos (Riser–Roberts, 1998):

- ❖ El naftaleno (NAF) está presente en el humo del tabaco y el alquitrán de carbón. Pigmenta algunas sustancias incoloras aisladas del alquitrán de carbón, como el antraceno. El naftaleno arde fácilmente y, bien en partículas o vapores, forma mezclas explosivas con el aire. Su acción tóxica se ha observado principalmente en casos de intoxicación.
- ❖ El fenantreno (PHE) se obtiene a partir del alquitrán de carbón y puede sintetizarse haciendo pasar difeniletileno a través de un tubo calentado al rojo. Está presente en el humo del tabaco y se encuentra entre los HPAs presentes en el aire. No parece exhibir actividad cancerígena.
- ❖ El benzo[*a*]pireno (BaP) se encuentra en asfaltos, alquitrán de carbón, alquitrán de madera, gases de escape de los automóviles, humo del tabaco, aceites minerales, aceites usados de motor y equipos eléctricos.

2.2.3. Contaminación de suelos por hidrocarburos

Los suelos varían debido a la geología, hidrológica, clima, fertilidad y otros atributos físicos (Tan, 1982; Buchman y Brady, 1969). Las propiedades geofisicoquímicas de un suelo se pueden utilizar para conocer los comportamientos de algunos contaminantes en virtud de esas interacciones. Todos los suelos son sistemas con fases que contienen una matriz de mineral sólido iónico y alguna materia orgánica asociada. En suelos insaturados la fase de gas pasa a través de los espacios porosos, en suelos saturados estos espacios son parte de la fase acuosa. Cuando los hidrocarburos son introducidos a la superficie del suelo, un cierto número de fenómenos físicos impacta sobre su remoción en el ambiente (Bossert y Bartha, 1984; McGill *et al*, 1981).

Para derrames recientes de hidrocarburos ligeros, la volatilización puede jugar un papel importante en la remoción del material de la superficie del suelo particularmente en superficies menos permeables. Para hidrocarburos más pesados, tanto los mecanismos de autooxidación, y termooxidación además de degradación biológica pueden parcialmente oxidar los contaminantes de la superficie del suelo haciéndolos más solubles al agua o biodisponibles.

Los intermediarios más polares exhiben mayor movimiento a través del suelo insaturado o zona vadosa hasta llegar a la fuente de agua. Esto no siempre sucede, por ejemplo, estudios en laboratorio han demostrado que la toxicidad de BaP es rápidamente eliminada por los fotoproductos de la fotólisis, mayormente a través de mineralización o a través de enlaces con la materia orgánica del suelo (Miller *et al*, 1988).

2.2.3.1. Interacción microorganismos - hidrocarburos

Los microorganismos degradadores de hidrocarburos le dan otra dimensión al ya complejo sistema del suelo. Las consecuencias biológicas de los contaminantes pueden tener varias rutas. Bajo condiciones ideales los hidrocarburos son completamente mineralizados hasta CO_2 y H_2O , con alguna producción de biomasa. No obstante, en la mayoría de las veces, la biodegradación no es completa, por lo que al metabolizar los hidrocarburos a productos parcialmente oxidados, la actividad microbiana contribuye a remediar el suelo, estabilizando materiales potencialmente peligrosos. Por otra parte, los hidrocarburos parcialmente oxidados y degradados se pueden incorporar a la materia orgánica del suelo y ser sujetos a procesos de humificación (Shannon y Unterman, 1993; Schwarzenbach *et al*, 1993; Tate, 1987; McGill *et al*, 1981). Los hidrocarburos son compuestos hidrofóbicos y los microorganismos generalmente viven en la fase acuosa, por lo que para que ocurra una biodegradación efectiva es esencial que el contaminante sea biodisponible para los microorganismos degradadores (Gerson, 1985). Muchos organismos poseen la habilidad de usar sustratos insolubles al agua, en algunos casos producen agentes extracelulares surfactantes, que pueden solubilizar los hidrocarburos en la fase acuosa (Miller, 1994).

Se tiene conocimiento de que los microorganismos reducen la toxicidad de los hidrocarburos hacia las plantas, en suelos donde las condiciones son adversas y donde existe una estimulación de la degradación de otros contaminantes no tóxicos para las plantas (Kennedy, 1999). Se conocen varios géneros de hongos, algas y bacterias que tienen la habilidad de degradar HPAs (Sutherland *et al*, 1995). La degradación de contaminantes orgánicos, vía actividad microbiana, ocurre como resultado de su utilización como fuente de energía y carbono, necesario para su crecimiento y reproducción (Smith, 1997).

De particular interés son los estudios hechos por Sorensen *et al.* (1994); Aprill y Sims (1990), en los que se resalta la importancia de la mineralización de los HPAs en zonas de la rizósfera, resultantes de la mezcla de pastos de pradera. Por ejemplo, Walton y Anderson (1990) reportaron un acelerado aumento en la mineralización de TCE (tricloroetileno) en muestras de rizósfera de cuatro plantas diferentes.

En otra investigación se aislaron 37 cepas bacterianas, de las cuales el 100% degradaron naftaleno y antraceno, el 78.6% degradó fenantreno y sólo un 71.41% degradó DBT (dibenzotiofeno, un hidrocarburo aromático azufrado). El menor porcentaje de bacterias que tuvieron una acción en el DBT indica que este hidrocarburo es más resistente al ataque microbiológico. La recalcitrancia de este compuesto podría estar relacionada tanto a los factores físicos, como a restricciones enzimáticas de las bacterias Baldi *et al* (2003).

Poonthrigpun (2006) observó que una cepa de *Rhizobium* sp, aislada de suelo contaminado con petróleo, tuvo la habilidad de crecer sobre acenaftaleno, usándolo como fuente de carbono y energía y además, fue capaz de transformarlo a naftaleno 1,8 dicarboxílico, vía acenaftiquinona.

También Cheung y Kinkle (2001) lograron aislar cepas bacterianas capaces de degradar HPAs y además, observaron la pérdida de diversidad microbiana en función de la concentración de contaminante presente en el suelo.

2.3. Efectos de los hidrocarburos policíclicos aromáticos en el sistema simbiótico *Rhizobium* – Leguminosa.

Algunos reportes indican que las bacterias que fijan nitrógeno en vida libre se encuentran ampliamente distribuidas en muchos ecosistemas del suelo. Bossert y Bartha (1984) reportaron que los suelos contaminados con petróleo crudo son capaces de sostener abundantes poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno. Parke y Ornston (1984), mencionaron el potencial genético de cepas de *Rhizobium* sp, a crecer en altas concentraciones de una mezcla de hidrocarburos.

También algunas leguminosas, pueden crecer y tolerar concentraciones arriba de 10% v/v de petróleo crudo (Radwan *et al*, 1998). Por su parte, San Gabriel (2006), observaron la tolerancia y capacidad de fitorremediación en leguminosas y gramíneas al exponerlas a la presencia de combustóleo. En este estudio las leguminosas presentaron mayor biomasa en comparación con las gramíneas, observando que la presencia de combustóleo estimuló el peso seco total comparado con el testigo.

Rivera–Cruz (2005) evaluó la toxicidad en leguminosas por estar presentes en suelos contaminados con petróleo, donde observó que la producción de biomasa, el número de nódulos y la presencia de la leghemoglobina en éstos disminuyeron significativamente con el incremento en las concentraciones de petróleo.

III. JUSTIFICACIÓN

El género *Rhizobium* es una bacteria que forma simbiosis con la familia Leguminosae. Como resultado de esta simbiosis se desarrollan nódulos en las raíces de la planta que fijan nitrógeno atmosférico. La leguminosa *Phaseolus vulgaris* tiene una amplia diversidad en sus centros de origen, también es una especie promiscua en cuanto a su rango de bacterias del tipo de *Rhizobium*, y por ello se utilizó como planta modelo para este trabajo, además de que algunos estudios mencionan el crecimiento de plantas de frijol en suelos contaminados. Por lo anterior, es importante conocer el efecto que tienen los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) en el desarrollo de estos dos organismos, ya que han sido incluidos en la lista de principales contaminantes. Lo anterior denota que la información que se genere de este estudio es de suma importancia ya las leguminosas pueden ser en un futuro, una alternativa biológica para limpiar sitios contaminados con este tipo de hidrocarburos, con la ventaja de incorporar nitrógeno al sistema contaminado a través de su capacidad fisiológica de fijar nitrógeno atmosférico cuando se establece la simbiosis con bacterias del tipo *Rhizobium*.

IV. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

4.1 Hipótesis General

- ❖ Los hidrocarburos policíclicos aromáticos inhibirán a *Rhizobium tropici* CIAT 899 y su capacidad de nodulación y el contenido de nitrógeno en simbiosis con *Phaseolus vulgaris*.

4.2 Objetivo General

- ❖ Analizar la tolerancia, la capacidad de nodulación y el contenido de nitrógeno de *Rhizobium tropici* CIAT 899 cuando está en simbiosis con *Phaseolus vulgaris*, en presencia de hidrocarburos policíclicos aromáticos.

4.3 Objetivos específicos

- ❖ Determinar la tolerancia *in vitro* de *Rhizobium tropici* CIAT 899 ante diferentes concentraciones de tres hidrocarburos policíclicos aromáticos (naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno).
- ❖ Evaluar la capacidad de nodulación y el contenido de nitrógeno de *Rhizobium tropici* CIAT 899 en simbiosis con *Phaseolus vulgaris* por efecto de concentraciones crecientes de tres hidrocarburos policíclicos aromáticos (naftaleno, fenantreno, benzo[*a*]pireno).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en el laboratorio del Área de Microbiología de Suelos, del Programa de Edafología, en el Colegio de Postgraduados en Montecillo, Estado de México. La investigación consistió en dos fases: I) Tolerancia *in vitro* de la bacteria *Rhizobium tropici* CIAT 899 ante tres diferentes HPAs (naftaleno, fenantreno, benzo[*a*]pireno) y II) Capacidad de nodulación y contenido de nitrógeno en la simbiosis *Rhizobium tropici* CIAT 899-*Phaseolus vulgaris* frente a los HPAs mencionados.

5.1. Fase I. Tolerancia *in vitro* de la bacteria *Rhizobium tropici* CIAT 899 ante los HPAs

5.1.1. Reactivación de la cepa *Rhizobium tropici* CIAT 899

El medio de cultivo que se utilizó para reactivar la bacteria *Rhizobium tropici* CIAT 899 donada por la Dra. Esperanza Martínez-Romero (Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM), fue extracto de levadura manitol agar rojo congo (ELMARC, Cuadro 1 en Apéndice) en cajas de Petri. Posteriormente, se tomó una asada de la bacteria y se hizo un estriado simple para reactivar la bacteria durante cuatro días a 26°C, verificando su crecimiento cada 24 h (Vicent, 1970). Una vez reactivada la bacteria ésta fue transferida a tubos inclinados con extracto de levadura manitol agar ELMA (Cuadro 2 en Apéndice), para su conservación y posterior uso. La prueba que se realizó para comprobar la pureza de la bacteria fue por medio de leche tornasolada (Cuadro 3 en Apéndice), que se basa en la capacidad del microorganismo en producir determinadas reacciones metabólicas con la leche. Estas reacciones se manifiestan en el cambio de pH, en viraje de color y formación de coágulos. En este caso no se observó cambio en el color tornasol de la leche, pero hubo un crecimiento superficial de suero, y un ligero cambio de pH de 7 a 6.8, indicando que el cultivo corresponde a una cepa pura

de *Rhizobium*. Para visualizar la bacteria y conocer su morfología celular se realizó la técnica de tinción de Gram, dando como resultado una bacteria gram negativa.

5.1.2. Tolerancia y crecimiento de colonias de *Rhizobium tropici* CIAT899 en medio de cultivo contaminado con HPAs

Para llevar a cabo el conteo de colonias bacterianas formadas en presencia de tres hidrocarburos policíclicos aromáticos, las cajas con medio ELMARC fueron impregnadas individualmente con naftaleno (NAF), fenantreno (PHE) y benzo(a)pireno (BaP) en las siguientes concentraciones: 20, 40, 60, 80 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Además se incluyeron dos testigos, uno sin contaminantes y otro sin contaminantes más el solvente acetona. Posteriormente, se realizó la técnica de dilución y conteo en placa, para la siembra bacteriana solo se tomaron las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} . Después de la siembra se utilizó una varilla de vidrio para esparcir la alícuota bacteriana, y las cajas fueron incubadas a 26 °C hasta observar el crecimiento de las UFC bacterianas. Se realizó por triplicado para cada contaminante y sus respectivas concentraciones.

5.1.3. Análisis estadístico

El análisis de varianza se llevó acabo con los datos de cada variable y se procedió a la prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha=0.05$), mediante el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2000).

5.2. Fase II. Capacidad de nodulación y contenido de nitrógeno en la simbiosis *Rhizobium tropici* CIAT 899– *Phaseolus vulgaris* frente a hidrocarburos policíclicos aromáticos.

5.2.1. Evaluación de la nodulación de *Rhizobium tropici* CIAT 899 en *Phaseolus vulgaris* expuesto a HPAs en sistema “growth pouch”

Se realizaron soluciones madre por separado para cada contaminante (NAF, PHE y BaP) y por cada concentración [20, 40, 60, 80 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$]. De cada solución se tomaron 30 mL de cada contaminante respectivamente que estaba diluido en acetona y se vació en frascos que contenían 30 mL de solución nutritiva de Jensen (ver Tabla 4 en Apéndice). Esta mezcla se agitó y se incubó en baño maría para que se evaporara la mayor cantidad de acetona y solo quedara el contaminante en la solución Jensen. Una vez evaporada la acetona se tomaron 10 mL de esta solución y se depositó en los sistemas “growth pouch” para que se impregnara el contaminante. El “growth pouch” o bolsa de crecimiento es una técnica donde el contenedor que se utiliza normalmente para el crecimiento de la planta, es remplazado por una bolsa de plástico que contiene papel y que sirve como soporte para la semilla. Se tuvieron dos bolsas y cada una de ellas con tres compartimentos (n=6), por cada tratamiento. Cuando todas las bolsas contaminadas estuvieron listas, se esterilizaron junto con dos bolsas que contenían solo 10 mL de solución Jensen y dos con solución Jensen y acetona.

Posteriormente, las semillas fueron desinfectadas superficialmente de la siguiente manera: se colocaron en un matraz que contenía alcohol etílico al 95% y se dejaron por 30 s, al finalizar este tiempo se hicieron tres lavados con agua destilada, después se les agregó cloro al 10% durante 10 min, posteriormente se hicieron siete lavados con agua destilada estéril y se procedió a colocar ocho semillas por cada frasco para propiciar su germinación. El medio que se utilizó para la pregerminación fue agar-agua al 1% estéril en frascos de 100 mL con una cantidad de 30 mL del medio.

Una vez que germinaron las semillas se colocaron en los sistemas de “growth pouch”, y se regaron con agua destilada estéril y mantuvieron en la cámara de crecimiento en las siguientes condiciones 70% HR, 23 °C, 12h durante 30 días.

La inoculación de las rizobias se llevó a cabo hasta que se presentaron las primeras hojas verdaderas. El medio líquido que se utilizó para preparar el inóculo fue extracto de levadura manitol (ELM), el cual después de esterilizarlo se inoculó con una asada de la bacteria y se incubó en agitadora orbital durante 48 h a 125 rpm y 25°C. Después de las 48 h el inóculo se extrajo con ayuda de una centrifuga a 4500 rpm durante 15 minutos, el pellet bacteriano, se obtuvo por decantación y se concentró todo en un tubo para centrifuga de 50 mL estéril, que contenía 35 mL de agua destilada estéril, se agitó con ayuda de un vortex y se observó el número de células bacterianas con la escala de Mc Farland (Cuadro 5 en Apéndice). Cada tratamiento con *Rhizobium*, se inoculó con 1 mL de la suspensión bacteriana con ayuda de una jeringa estéril para evitar alguna contaminación. El inóculo se dispersó en toda la bolsa en cada tratamiento. Las bolsas fueron colocadas en la cámara de crecimiento y se revisó cada dos días para observar y cuantificar el crecimiento de los nódulos. Los riegos posteriores se realizaron con agua estéril y solución Jensen.

5.2.2. Unidades formadoras de colonias (UFC)

Para conocer cuantas UFC tenía el inóculo se midió con la turbidez en la escala de Mc Farland, la cual fue de 10^{-6} . Se tomó 1 mL para hacer la técnica de dilución, pero solo se utilizaron las diluciones de 10^{-6} a 10^{-10} y se hicieron tres repeticiones de cada una utilizando medio ELMARC. Las cajas fueron colocadas en incubadora y se revisaron al cuarto día para cuantificar el número total de colonias.

5.2.3. Mediciones de la parte aérea y raíz de la planta

A los treinta días las raíces se sacaron de las bolsas y se midió el volumen radical, se cuantificó el número total de nódulos retirándolos de las raíces y fueron secados en una estufa a 70°C para conocer la biomasa nodular. Las raíces sin nódulos se colocaron en bolsas de papel de estraza al igual que la parte aérea de la planta para que se secaran a 70 °C en una estufa y se pesaran posteriormente.

5.2.4. Concentraciones de nitrógeno foliar en parte aérea

Se determinó por el procedimiento de semimicrokjeldahl (Etchevers, 1989 y Morris, 1983).

5.6. Diseño experimental y análisis de datos

El experimento consistió de un factorial 2x6, con dos niveles de inoculación con *Rhizobium* y seis niveles de concentraciones para cada HPA. Los tratamientos fueron distribuidos en un diseño experimental completamente al azar. Se realizó el análisis de varianza de los datos por cada variable y se procedió a la prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha=0.05$) mediante el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2000).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Fase 1. Tolerancia *in vitro* de *Rhizobium tropici* CIAT 899 ante tres diferentes hidrocarburos policíclicos aromáticos

El crecimiento bacteriano se observó a los seis días a pesar de que *Rhizobium tropici* CIAT 899 es una bacteria de crecimiento rápido; sin embargo, la bacteria fue tolerante a todos los hidrocarburos empleados en el experimento, por lo cual se puede decir que los tres HPAs no tuvieron efectos inhibitorios en el crecimiento de la bacteria. El crecimiento de las UFC por efecto de la interacción HPAs*Concentración fue estadísticamente significativo ($P \leq 0.01$). No se observaron diferencias significativas por el tipo de HPAs o por la concentración de éstos contaminantes (Cuadro 2).

Cuadro 2. Crecimiento *in vitro* de unidades formadoras de colonias (UFC) de *Rhizobium tropici* CIAT 899 ante diferentes concentraciones de hidrocarburos policíclicos aromáticos, después de seis días de cultivo.

Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	UFC X 10^7 mL^{-1}		
	Naftaleno	Fenantreno	Benzo[a]pireno
0	9.96 efg*	9.96 efg	9.96 efg
20	9.40 efg	14.23 bcd	4.03 i
40	8.76 fg	13.23 bcd	14.56 bc
60	13.70 bcd	5.93 h	10.50 f
80	11.63 ed	15.80ab	7.56 gh
100	3.86 i	11.93 cde	17.73 a

*Medias con la misma letra entre contaminantes y concentraciones son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0.05$). n=3.

La concentración con $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de BaP, presentó mayor crecimiento de UFC, el cual fue casi un 50% de incremento comparando con el testigo, seguido del PHE y NAF a las concentraciones 80 y $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente (Figura 1).

Las concentraciones de NAF comparándolas con el testigo, no produjeron diferencias significativas en el número de colonias, aunque si hubo ligera estimulación, en las diferentes concentraciones de este contaminante, excepto para la concentración $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ donde hubo disminución de un 50% comparado con el testigo.

En los tratamientos con PHE la concentración $60 \mu\text{g mL}^{-1}$, mostró menor número de UFC, a diferencia de las concentraciones de menor y mayor cantidad de este hidrocarburo con respecto al testigo.

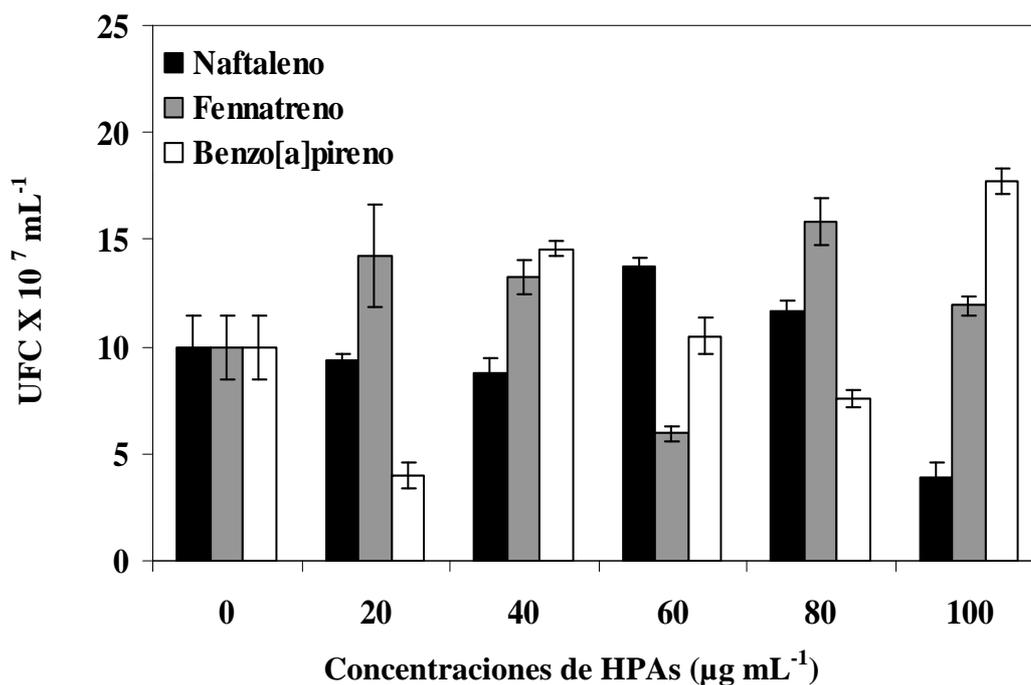


Figura 1. Unidades formadoras de colonias bacterianas de *Rhizobium tropici* CIAT 899 después de seis días de exposición a seis concentraciones de tres hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs). $n=3$. I=error estándar.

En el caso de BaP, la menor cantidad de UFC se observó en la concentración más baja $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, seguida de la concentración $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ comparados con el testigo. Sin embargo en este contaminante se reporta el mayor número de UFC, en la concentración más alta. Efectos similares fueron observados por Rivera-Cruz *et al* (2002), donde el crecimiento *in vitro* de la población de bacterias, fue mayor al exponerlas a concentraciones altas de BaP.

Los resultados muestran que *Rhizobium tropici* CIAT 899, es capaz de tolerar las concentraciones de los tres HPAs (Figura 2), como se ha demostrado en otras bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre y hongos filamentosos, los cuales han sido caracterizados como degradadores de petróleo crudo y de BaP (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2004). Se sabe que las bacterias tienen la característica de adaptarse rápidamente a cambios ambientales bruscos como lo es la exposición a contaminantes, de los cuales se pueden aislar bacterias capaces de degradar contaminantes orgánicos (Bollang *et al*, 1994; Urbance, 2003). Por ejemplo, Bracho (2005) aisló 37 cepas bacterianas fijadoras de vida libre capaces de degradar en su totalidad los HPAs (NAF y antraceno), y un 78% degradó el PHE. Lo anterior denota que la mayoría de los contaminantes químicos pueden ser transformados por organismos microbianos (Cerniglia, 1992; Alexander, 1994), y en este caso particular, las rizobios pueden tener esa característica, aunque se requiere de mayor estudio.

La tolerancia y el bajo efecto negativo de contaminantes orgánicos como los HPA en el crecimiento de UFC microbianas pueden deberse a las propiedades de la membrana bacteriana, ya que tiene potencial enzimático para degradar compuestos orgánicos. Además de que provee una barrera de permeabilidad ante sustancias hidrofóbicas (Rosenberg y Ro, 1998).

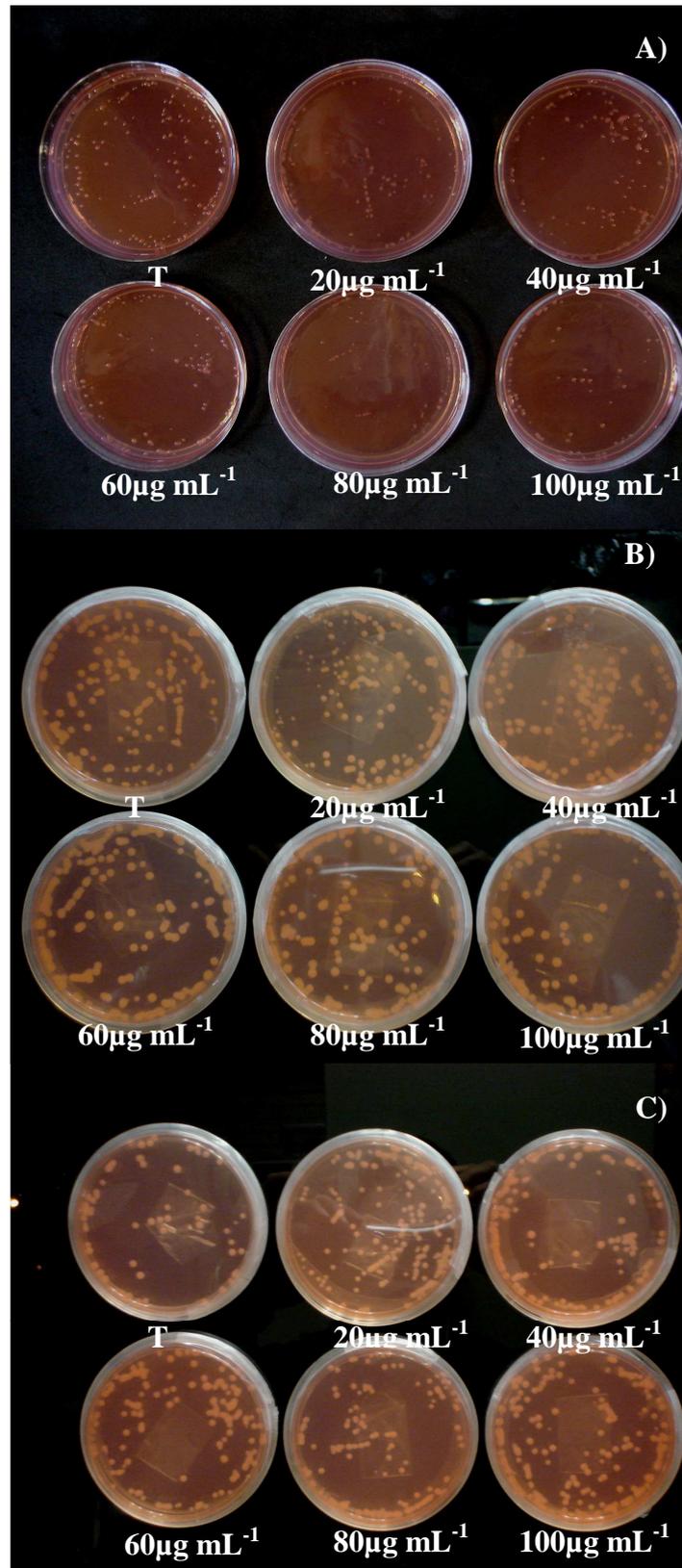


Figura 2. Unidades formadoras de colonias que crecieron en medio contaminado con hidrocarburos policíclicos aromáticos a los seis días de siembra. A) naftaleno, B) fenantreno y C) benzo[a]pireno. T=Testigo.

Concentraciones similares de HPA evaluadas en este experimento fueron también examinadas por Alarcón *et al.*, (2006) para observar la respuesta de germinación de las esporas del hongo *Gigaspora margarita* frente a PHE y BaP. En dicho trabajo la germinación de las esporas en todas las concentraciones de fenantreno fue drástica, al reducirla en un 92% en comparación con el testigo. Sin embargo, no hubo una reducción significativa para los tratamientos con BaP y en presencia de 100 mg de este hidrocarburo, la reducción fue del 40% comparado con el testigo.

La capacidad de adaptación de *Rhizobium tropici* CIAT 899 ante los HPAs, no había sido evaluada anteriormente con estos tipos de contaminantes. Se puede decir que esta bacteria en vida libre (fase asimbiótica), podría utilizarse como una alternativa en la biorremediación de suelos contaminados con HPAs tomando de éstos su fuente de energía y carbono, no obstante, lo anterior requiere de mayor estudio.

6.2. Fase II. Capacidad de nodulación y contenido de nitrógeno en la simbiosis

***Rhizobium tropici* CIAT 899–*Phaseolus vulgaris* frente a hidrocarburos policíclicos aromáticos.**

En las variables como volumen radical, peso seco de la parte aérea, peso seco de la raíz y peso seco del nódulo, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos y las diferentes concentraciones de los tres HPAs estudiados (Cuadro 1A, en apéndice)

6.2.1. Formación y Número de nódulos

El macrosimbionte (planta) y el simbiote (bacteria) fueron tolerantes a los tres HPAs y a las diferentes concentraciones empleadas en este estudio ya que se llevó a cabo la simbiosis en todos los tratamientos (Figura 3). A los 5 días se realizó el primer conteo de nódulos y a partir de esa fecha se cuantificaron cada dos días por 21 días.

En PHE la concentración con $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, reportó el mayor número de nódulos, comparado con el testigo absoluto y el testigo con acetona. Colocando así a las altas concentraciones, como menos aptas para el desarrollo nodular, tanto para PHE como para BaP, excepto para NAF que disminuyó sólo un 5% comparándolo con los testigos.

Es necesario resaltar que los tratamientos con BaP siguen una tendencia de que a mayor concentración del contaminante, menor número de nódulos. En los tratamientos con NAF y PHE a pesar de que el número de nódulos fue reducido comparados con los testigos, no se observaron diferencias significativas (Figura 4).

A los 21 días, se observó una disminución en el número de nódulos en *Phaseolus vulgaris* en las concentraciones más altas de los tres HPAs. Una respuesta similar fue observada por Rivera-Cruz (2005) al evaluar cuatro leguminosas frente a petróleo nuevo e intemperizado donde observó la disminución del número de nódulos al aumentar la concentración de petróleo. A diferencia de estos resultados, el presente experimento demuestra que la simbiosis se presentó en todos los tratamientos contaminados, mientras que en el estudio de Rivera-Cruz (2005) la única especie que no desarrollo nódulos fue *Crotalaria* sp.

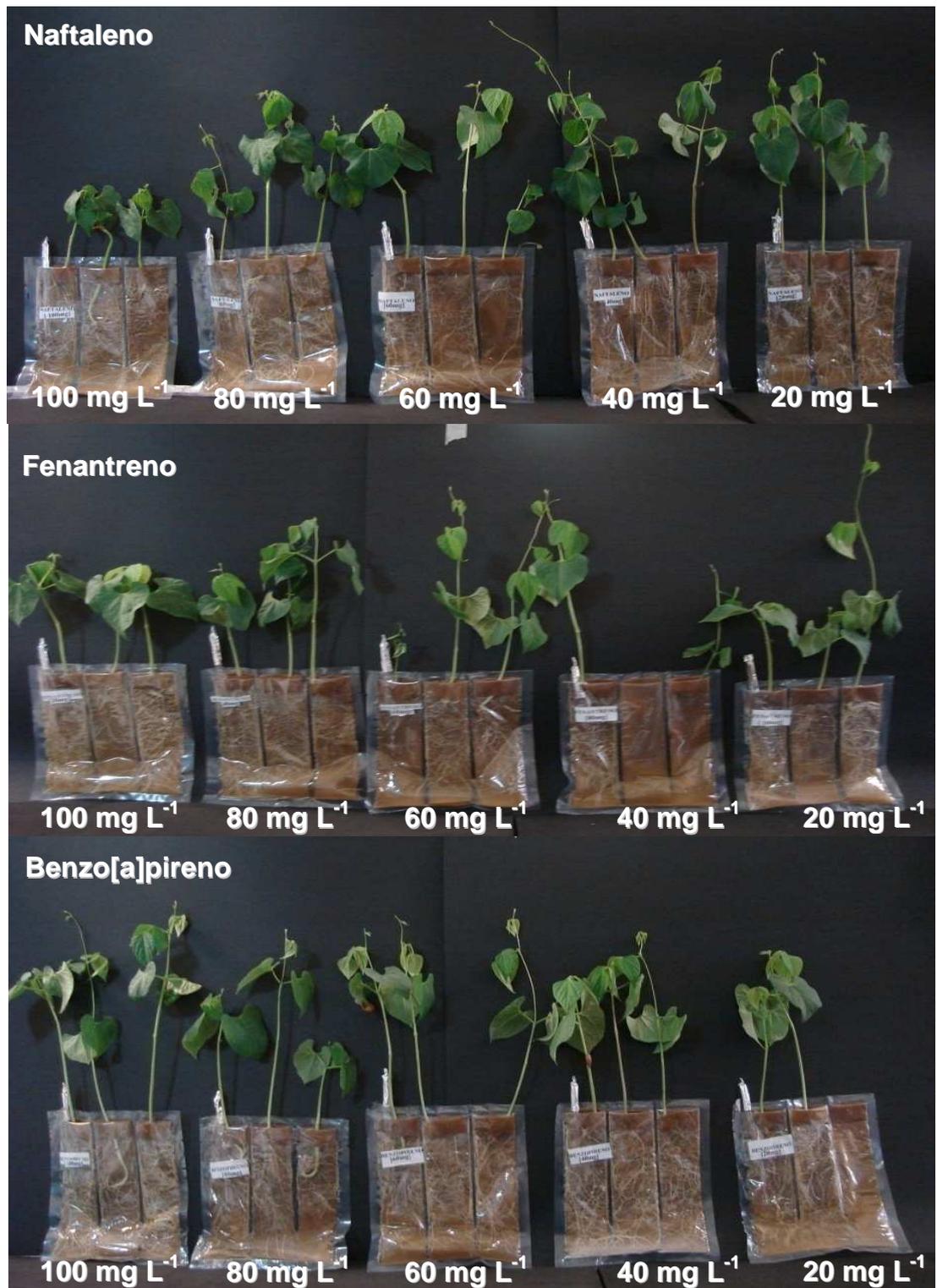


Figura 3. Plantas de *Phaseolus vulgaris* en simbiosis con *Rhizobium tropici* por técnica de “growth pouch” y en medio contaminado con HPAs, a los 30 días después de la contaminación con el HPA.

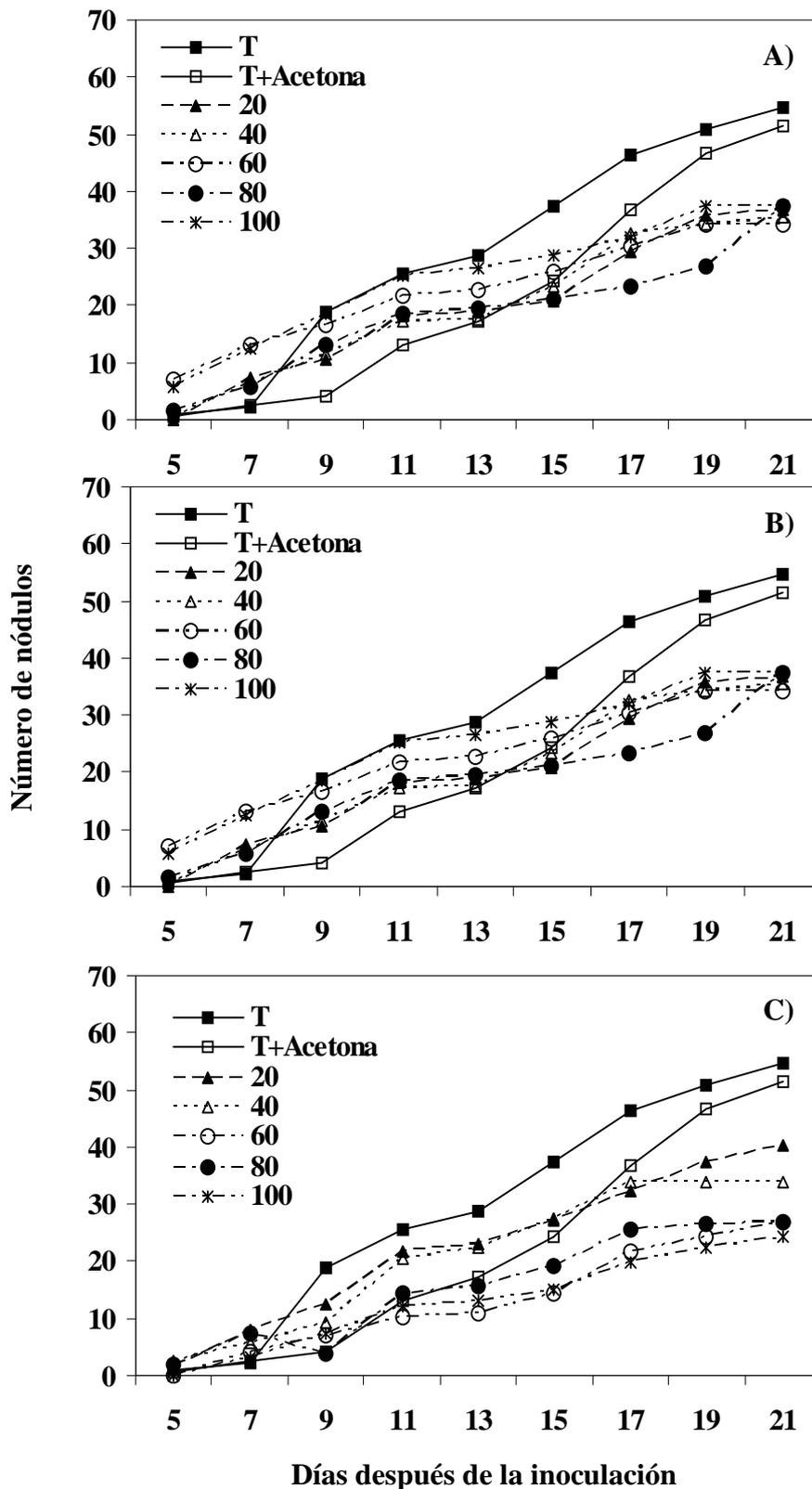


Figura 4. Número de nódulos registrados a los 21 días, por la técnica de “growth pouch”, que crecieron en medio contaminado por tres hidrocarburos policíclicos aromáticos (mg L^{-1}). A) naftaleno, B) fenantreno, y C) benzo[a]pireno. T= Testigo, T+Acetona= Testigo con acetona. n=6.

Por otra parte, las plantas de *Phaseolus vulgaris* en todos los tratamientos no presentaron síntomas de deficiencia de nitrógeno evaluada por la presencia de clorosis, a pesar de que en la solución nutritiva (Solución Jensen) empleada para el riego no se incluyó este macronutriente. Lo anterior hace pensar que el nitrógeno necesario para la leguminosa lo está aportando la simbiosis nodular, ya que se conoce que en el interior del nódulo se lleva a cabo la reducción de nitrógeno atmosférico por medio de la enzima nitrogenasa (una proteína con dos componentes que contiene hierro y molibdeno), pero solo en un ambiente microaerófilico, esta enzima es activada (Petrus *et al.*, 1995; Burgues y Lowe 1996).

También se resalta la capacidad que tiene *Phaseolus vulgaris* para crecer en un medio contaminado con HPAs, indicando su tolerancia a estos contaminantes orgánicos, por lo que resulta interesante evaluar en un futuro la capacidad de la planta y su simbiosis para degradar HPAs en suelo, y tratar de identificar algunos mecanismos de oxidación que han sido descritos para la degradación de estos contaminantes orgánicos (Wilson y Jones 1993; Meulenbergh *et al.*, 1997; Chapple, 1998; Siciliano y Germida, 1998; Vásquez-Dulhalt, 2000; Siciliano *et al.*, 2001). Con base en la capacidad de tolerancia que tiene esta leguminosa frente a estos HPAs, se podría también utilizar con éxito como planta fitorremediadora. Hernández (1997) menciona que en rizósfera de frijol contaminada con keroseno se encuentran numerosas poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico que actúan como microorganismos biodegradadores.

Al final del experimento (30 días) se observó un menor número de nódulos en los tratamientos con HPAs, comparado con los tratamientos testigo. Sin embargo, no se reporta una diferencia estadística entre los tipos de HPAs. Aunque cabe señalar que en PHE hay mayor número de nódulos comparado con NAF y BaP, por lo cual se puede

decir que este hidrocarburo fue menos tóxico para la simbiosis o que puede estimular el crecimiento nodular (Figura 5). El efecto negativo de los hidrocarburos del petróleo sobre la nodulación fue demostrado por Suominen *et al*, (2000) mencionan que en concentraciones de 500 ppm de benceno, tolueno y xileno, la nodulación es bloqueada al hacer un estudio con *Galega orientalis*. Se puede resaltar la interacción sinérgica entre *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium tropici* ya que ambos organismos podrían realizar más rápido la eliminación de estos HPAs, sin embargo se requiere de mayor estudio.

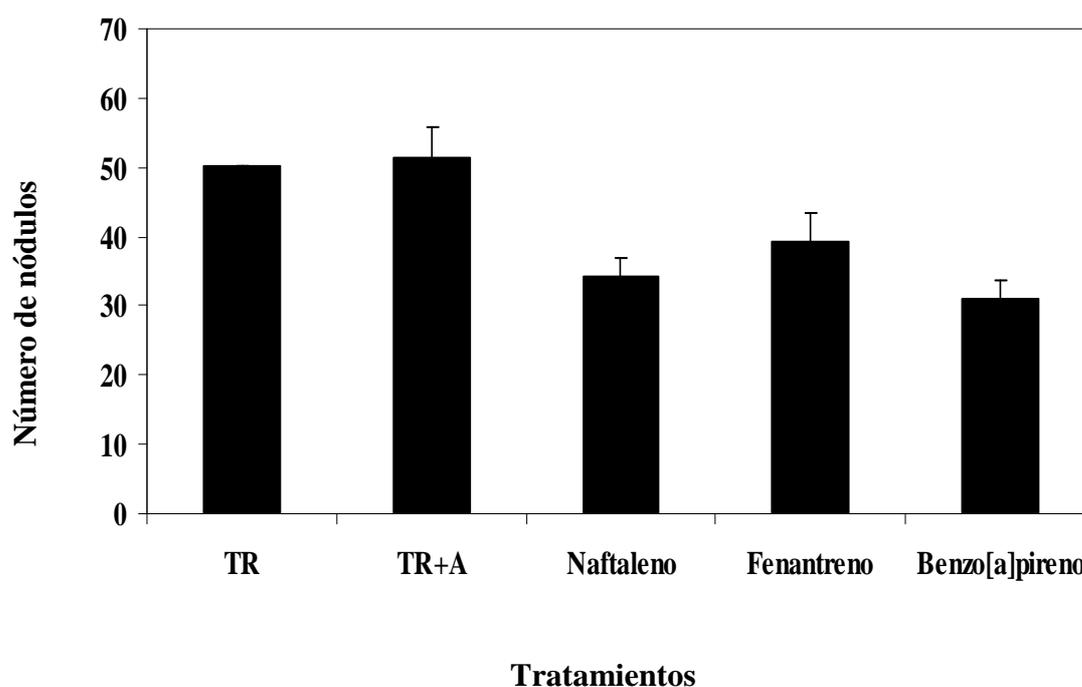


Figura 5. Número de nódulos registrados al final del experimento (30 días) por efecto de cada contaminante comparado con los tratamientos testigo. TR= testigo con *Rhizobium* y TR + A= testigo con *Rhizobium* y acetona. n=3, I= error estándar.

6.2.2. Peso nodular después de la cosecha

No hubo diferencias estadísticas entre tratamientos en el peso seco nodular (PSN). Sin embargo, el PSN del testigo con acetona, fue 50% mayor que el testigo absoluto. El tratamiento BaP con $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, fue el que tuvo el mayor PSN con 63.0 mg, y el menor con 3.7 mg se obtuvo en el tratamiento NAF con $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 6). Se observó un diámetro mayor de nódulos (datos no presentados), en los tratamientos con concentraciones más altas de BaP y PHE comparado con los testigos. Esto podría explicar la diferencia que hay en los tratamientos donde hay mayor número de nódulos y pero menor PSN.

Adam y Duncan (2003) mencionan que en suelos contaminados con diesel, el número de nódulos en *Vicia sativa* se redujo significativamente, aunque éstos fueron más grandes y desarrollados que los que estaban en plantas testigos. En el tratamiento con BaP $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ se observó mayor aumento en el diámetro de nódulos comparado con los testigos, esto hace pensar que la simbiosis a esta concentración y con este recalcitrante HPA, pudo haber provocado mayor estrés por toxicidad para la planta limitando su óptimo funcionamiento, pero desarrollando el crecimiento de células del corteza en los nódulos como barrera física de protección hacia los bacteroides. Esto denota la importancia de conocer si estos nódulos son eficientes para fijar nitrógeno atmosférico bajo condiciones de contaminación con hidrocarburos del petróleo.

Es necesario mencionar que no hay muchos reportes sobre el PSN en medios contaminados, pero se observa que algunas concentraciones estimularon el desarrollo y mayor crecimiento de los nódulos comparados con los testigos. Aunque no es una comparación directa, Quiñones *et al.* (2003) mencionan que ciertas concentraciones de petróleo estimulan la germinación y el crecimiento de algunas plantas, esto podría también estar pasando con los nódulos

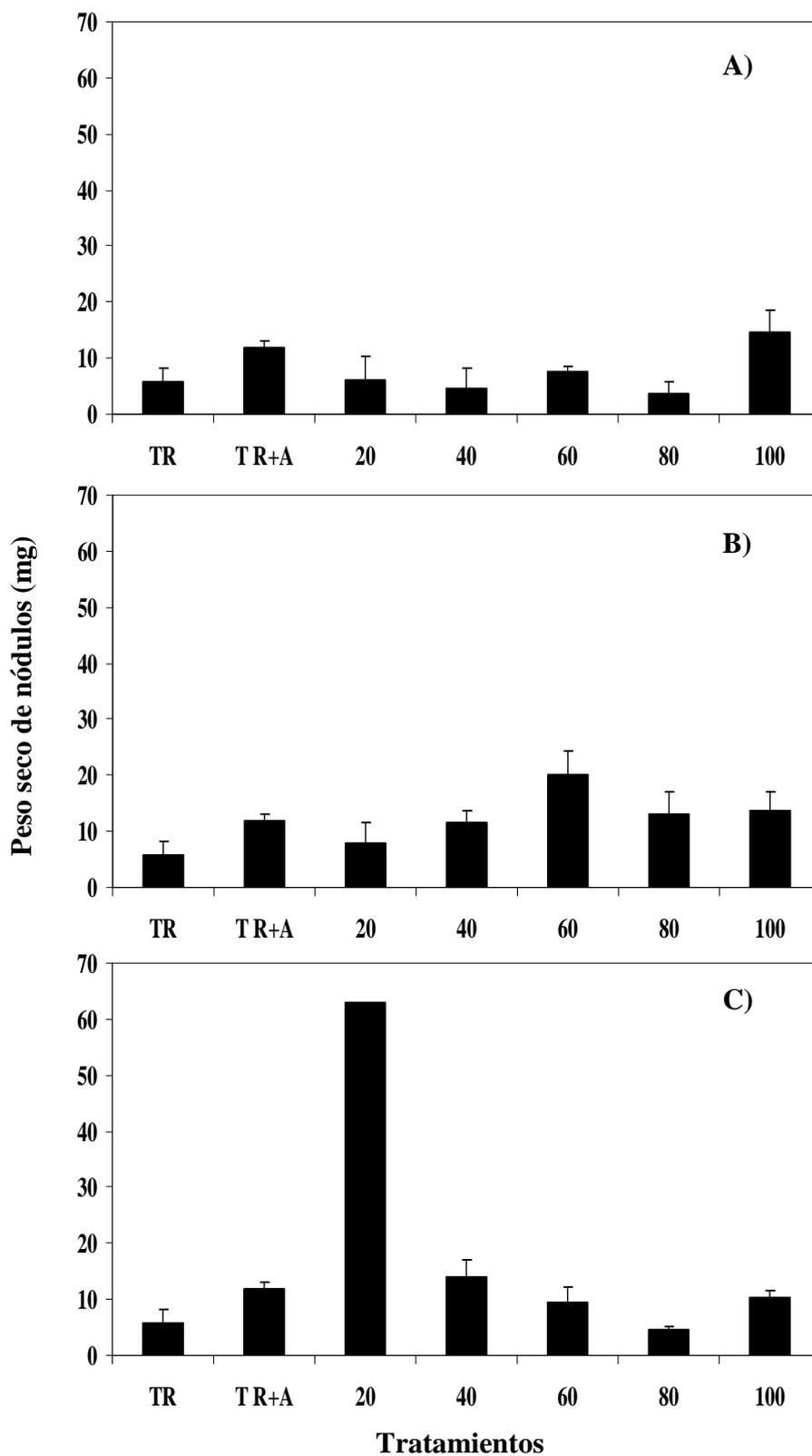


Figura 6. Peso seco de nódulos (mg), presente en plantas expuestas a diferentes concentraciones de tres hidrocarburos policíclicos aromáticos. A) naftaleno, B) fenantreno, y C) benzo[*a*]pireno. n=3. I= error estándar.

6.2.3. Peso seco total de *Phaseolus vulgaris*

El testigo absoluto (sin inoculación de *Rhizobium*) reportó menor producción de biomasa seca comparada con el testigo con acetona y los tratamientos con HPAs. El tratamiento con mayor biomasa seca fue NAF con $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ comparado con los tratamientos testigo y los tratamientos restantes con HPAs. La menor acumulación de biomasa también se reportó en el mismo contaminante pero en la concentración con $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 7). La cantidad de biomasa que se reporta en naftaleno en la concentración con $40 \mu\text{g mL}^{-1}$, es similar a la cantidad de biomasa reportada para el tratamiento testigo absoluto.

En el caso de PHE, no se observaron diferencias significativas entre las distintas concentraciones de este hidrocarburo, respecto al testigo con acetona, pues hubo un aumento casi del 50% en el peso seco nodular en todos los tratamientos en comparación con el testigo absoluto. Para BaP, las concentraciones que produjeron mayor biomasa seca fueron $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, seguidas del testigo con acetona y las concentraciones $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $60 \mu\text{g mL}^{-1}$. En contraste, la menor biomasa seca se obtuvo para el testigo absoluto (no inoculado) y la concentración de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ de BaP (Figura 7 C).

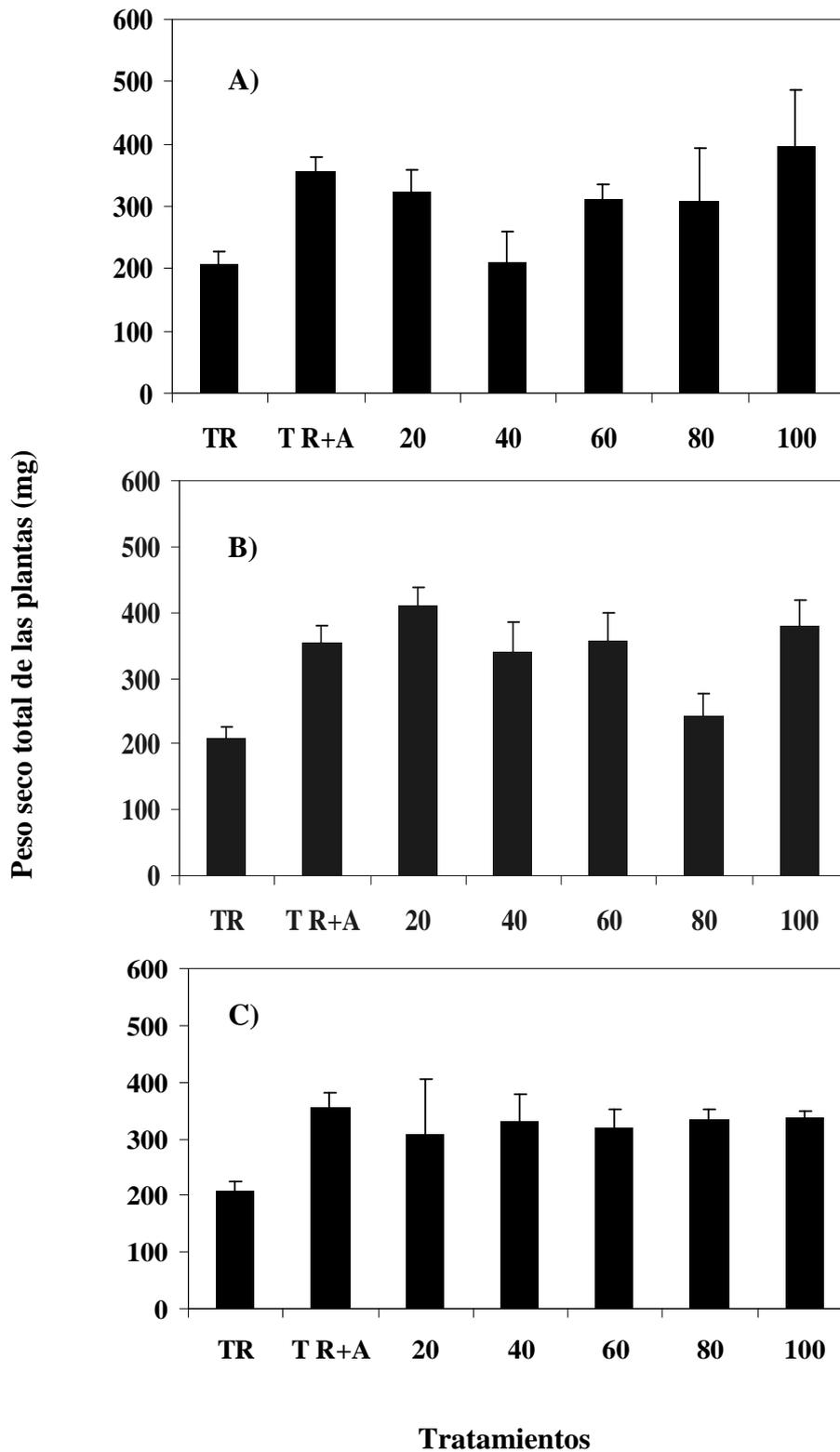


Figura 7. Peso seco total de plantas de *Phaseolus vulgaris* inoculado con *Rhizobium tropici* CIAT y expuestas a HPAs durante treinta días. A) naftaleno B) fenantreno y C) benzo[a]pireno, n= 3, I= error estándar.

Contrario a lo obtenido en el presente trabajo, Rivera-Cruz (2005) observó mayor biomasa seca en leguminosas presentes en suelo sin contaminar en comparación con aquella obtenida cuando las plantas fueron expuestas un complejo de hidrocarburos. Mujia *et al* (2006) reportaron que la aplicación de cuatro niveles de petróleo afectó el crecimiento y desarrollo de plántulas de frijol, encontrando una tendencia general a disminuir los caracteres de crecimiento en la medida que aumentaba la concentración del petróleo. Por otra parte, Hernández-Valencia y Mager (2003) indicaron que una contaminación del 3% de petróleo liviano afectó el desarrollo de dos gramíneas, al limitar la sobrevivencia y la producción de biomasa. Además, Kulakow (2006) indica que el crecimiento de las plantas puede ser inhibido por la exposición a concentraciones iguales o superiores a $40,000 \text{ mg kg}^{-1}$ de hidrocarburos totales de petróleo, mientras que concentraciones inferiores a $5,000 \text{ mg kg}^{-1}$ normalmente no causan efecto dañino en el crecimiento vegetal.

Al comparar únicamente el efecto de los HPAs por separado (independientemente de su concentración), se observó que estos contaminantes estimularon el desarrollo de *Phaseolus vulgaris*, lo cual fue reflejado en la biomasa seca producida en la mayoría de los tratamientos. La biomasa de *Phaseolus vulgaris* fue estimulada por BaP, en comparación con fenantreno y con naftaleno, aunque no presentaron diferencias estadísticas significativas (Figura 8).

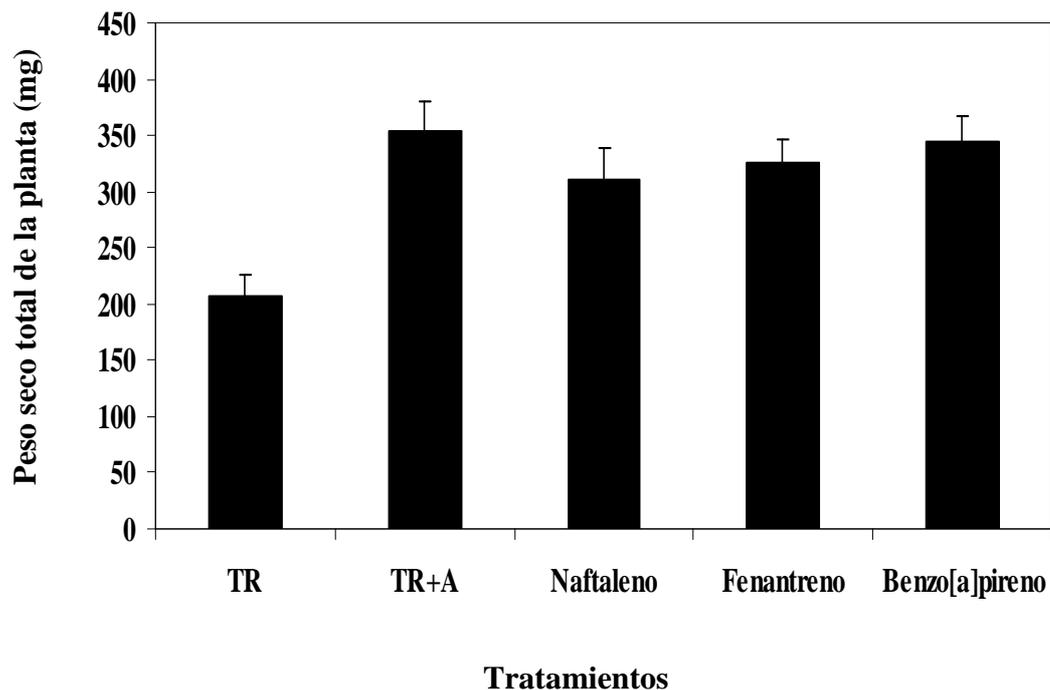


Figura 8. Peso seco total de la plantas (mg) por efecto del tipo de hidrocarburo policíclicos aromático. TR=Testigo con *Rhizobium* y TR+A= Testigo con *Rhizobium* y acetona. n=3, I= error estándar.

Efectos similares fueron reportados por Rivera-Cruz (2005) quien observó que el benzo[a]pireno estimuló la producción de biomasa total del pasto alemán, aunque estadísticamente todos los tratamientos fueron iguales. Referente a esto, es importante mencionar que en un estudio donde se evaluaron seis especies vegetales se observó que *Brachiaria* híbrido, presentó mayor acumulación de biomasa seca en suelo contaminado con combustóleo y que *Phaseolus coccineus* en presencia de este contaminante estimuló no significativamente el peso seco total comparado con su testigo en suelo no contaminado (Sangabriel *et al.*, 2006).

6.2.6. Contenido de nitrógeno foliar de *Phaseolus vulgaris* contaminado con tres HPAs.

El nitrógeno es uno de los nutrientes más abundantes y versátiles de la naturaleza. Forma parte de todas las células de las plantas, estimula el rápido crecimiento, favorece la síntesis de clorofila, de aminoácidos y proteínas. Una forma de que las plantas obtengan nitrógeno es por medio de la fijación biológica de nitrógeno que se lleva a cabo por medio de bacterias como *Rhizobium* (Paul y Clark, 1996).

El testigo con *Rhizobium*+acetona presentó un incremento del 50% de nitrógeno comparado con el testigo con *Rhizobium*, y un 25% más que el testigo absoluto (sin inoculación). Las concentraciones de BaP con 100 y 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fueron las que produjeron mayor contenido de nitrógeno, seguidas de NAF 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y PHE 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en comparación con los tratamientos testigos. A pesar de haberse observado variaciones en el contenido de nitrógeno, no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (Figura 9).

Para NAF, el contenido de nitrógeno fue mayor para la concentración con 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ seguida de 60 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$; la concentración 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ presentó menor contenido de nitrógeno pero mayor que el testigo con *Rhizobium* (Figura 9A)

En el caso de PHE, el contenido de nitrógeno fue similar para todas las concentraciones, aunque cabe señalar que estas plantas tuvieron mayor cantidad de este macronutriente con respecto al testigo con *Rhizobium* (Figura 9B).

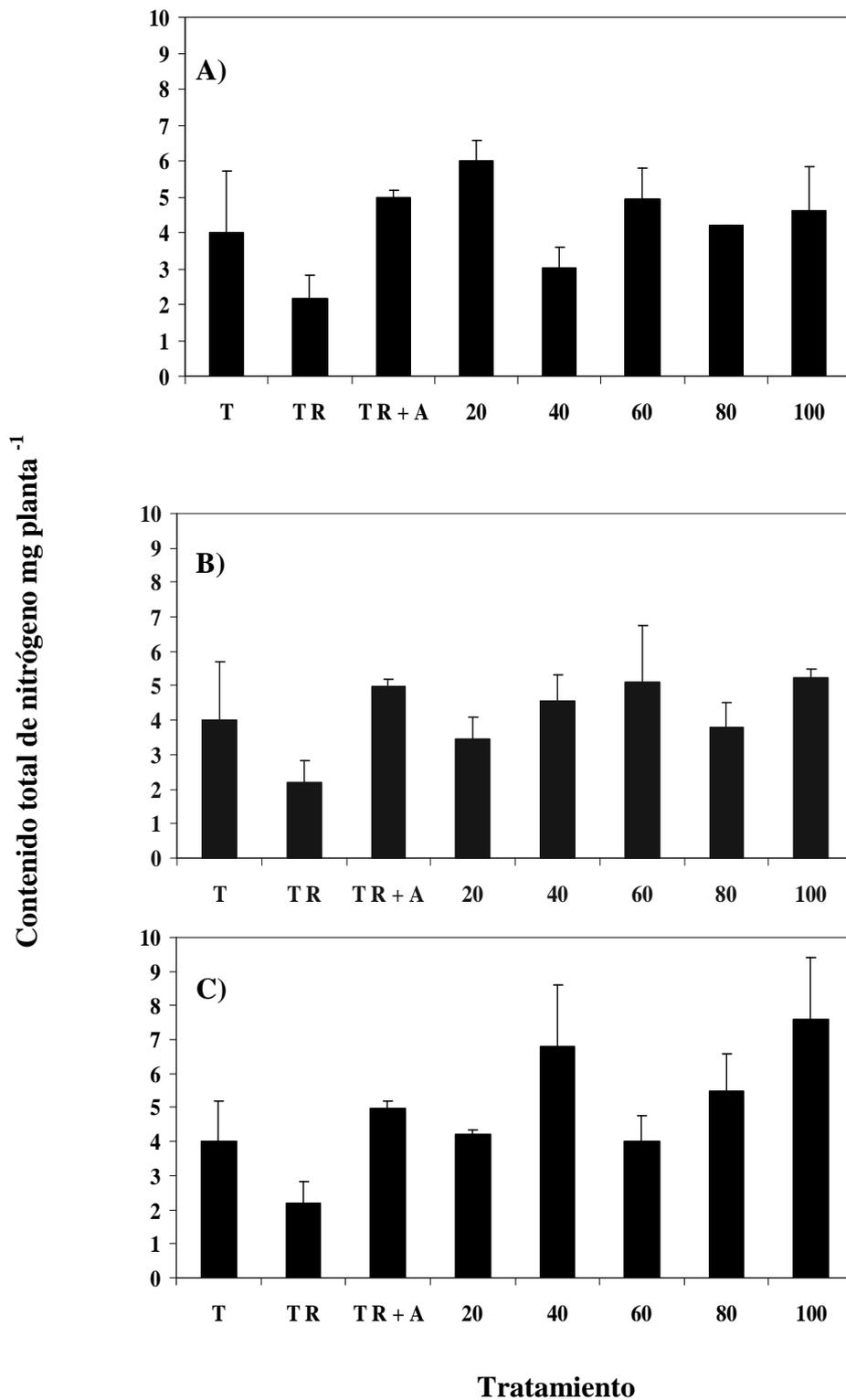


Figura 9. Contenido total de nitrógeno de *Phaseolus vulgaris* por efecto de su exposición a tres hidrocarburos policíclicos aromáticos, después de 30 días. A) naftaleno, B) fenantreno, y C) benzo[a]pireno. T=Testigo no inoculado; TR=Testigo con *Rhizobium*; TR+A=Testigo con *Rhizobium*+acetona. n=3. I=error estándar.

VII. CONCLUSIONES

- ❖ Los tres HPAs (naftaleno, fenantreno y benzo[a]pireno), no tuvieron efectos inhibitorios en el crecimiento *in vitro* de la bacteria *Rhizobium tropici* CIAT 899, ya que se observó crecimiento colonial en todas las concentraciones de los tres HPAs.
- ❖ El mayor crecimiento de UFC se reportó en la concentración más alta de benzo[a]pireno, aún siendo este HPA el más recalcitrante. Con base en los datos, aquí presentados se puede decir que algunas concentraciones de los HPAs estimulan el crecimiento bacteriano.
- ❖ Las diferentes concentraciones de los tres HPAs no inhibieron la simbiosis entre *Phaseolus vulgaris-Rhizobium tropici*, observándose nódulos en todos los tratamientos contaminados con HPAs.
- ❖ Al final del experimento (30 días) se observó menor número de nódulos en los tratamientos con HPAs. Los tratamientos con fenantreno tuvieron mayor número de nódulos, concluyendo que este HPA es el menos tóxico para la simbiosis.
- ❖ El tratamiento testigo con *Rhizobium* tuvo menor cantidad de biomasa seca producida con respecto a los tratamientos contaminados, indicando que los HPAs estimularon el crecimiento y el desarrollo de la planta.
- ❖ La concentraciones de BaP con 100 y 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fueron las que produjeron mayor contenido de nitrógeno, seguidas de NAF 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y PHE 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en comparación con los tratamientos testigos

VIII. LITERATURA CITADA

- Abbondanzi, F., Cachada, A., Tiziana, C., Guerra, R; Raccagn, M., Iacondini, A. 2003. Optimisation of a microbial bioassay for contaminated soil monitoring: bacterial inoculum standardisation and comparison with Microtox assay. *Chemosphere* 53: 889-897.
- Adam G, y Duncan, H. 2003. The effect of diesel fuel on common vetch (*Vicia sativa* L.) plants, *Environ. Geochem. Health* 25: 123- 130.
- Alarcón, A; Delgadillo-Martinez. J; Franco.Ramirez, A; Frederick T.D.Jrs; and Ferrera-Cerrato, R.2006. Influence of two polycyclic aromatic hidrocarbons on spore germination, and phytoremediation potencial of *Gigaspora margarita-Echinochloa polystachya* symbiosis in benzo[a]pyrene-polluted substrate. *Rev.Int. Contam. Amb.* 22(1) 39 – 47.
- Alexander, M. 1994. Introducción a la microbiología de suelos. 2da Reimp. AGT. Editor. S.A. México D.F. p.491.
- Aprill, W. y R.C. Sims.1990. Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chemosphere* 20:253-265.
- Atlas, R.M. y Bartha. R. 1993. *Microbial Ecology: Fundamentals and Application*, 3ra ed. New York: Benjamin-Cummings. p.563
- Atlas, R.M. y R. Bartha. 2002. *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Prentice may. 4ta Edición Madrid, España. p677.
- Baldi. F., Pepi, M, y Fava, F. 2003. *Appl.Environ Microbiol*, 69: 4689- 4686.
- Bollag,,J.M., Mertz T., y Otjen, L. 1994. Role of microorganisms in soil bioremediation. In: T.A. Anderson, and J.R.Coats (eds). *Bioremediation through*

- rhizosphere technology. ACS Symposium series. American Chemical Society. Washington, DC,U.S.A. p 2-10.
- Bracho M., Díaz, L., Soto, M.L. 2005. Degradación de hidrocarburos aromáticos por bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo en el estado de Zulia,Venezuela. *Biológico* 38 (3) p 1 – 9.
- Broughton, W.J., Hernández G, M. Blair, S. Beebe, P. Gepts y Vanderleyden. 2003. Beans (*Phaseolus* spp) model food legumes. *Plant and soil* 252: 55-128.
- Bossert, I y Bartha, R. 1984. The fate of petroleum in soil ecosystems. In *Atlas R: Petroleum Microbiology*. New York: Macmillan. p. 435-473.
- Buchman, H.O., Brady N.C. 1969. *The Nature and Properties of Soil*. New York: MacMillan. p 435-474.
- Campebell, D.H.,J.S. Garvey, N.E. Cremer. and D.H. Sussdorf. 1970. *Immunology. A Laboratory Text for Instruction and Research*. 2nd.Inc. New York, USA. p. 454.
- Chapple C. 1998. Molecular – genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Plant . Mol. Biol* 49:311-43.
- Casellas, M; Fernandez, P; Bayona, M y Solanas, A. M. 1995. Biossay – directed chemical analysis of genotoxic components in urban airborne particulate matter from Barcelona (Spain). *Chemosphere* 30: 725-740.
- Cheung, P.Y. y Kinkle, B.K. 2001. Mycobacterium diversity and pyrene mineralization in petroleum contaminated soil. *Appl. Environmental. Microbiology*. 67: 2222-2229. *Applied and Environmental Microbiology*
- Cerniglia, C.E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3: 351-368.
- Cerniglia, R.M; Bartha. R. 1993. *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*, 3ra ed. New York: Benjamin- Cummings.

- Cunningham, S.D., T.A. Anderson, A.P. Schwab y F.C. Hsu. 1996. Phytoremediation of soil contaminated with organic pollutants. *Advances in Agronomy*. 56: 55-114.
- Denison, R.F. 2000. Legume sanctions and the evolution of symbiotic cooperation by rhizobia. *The American Naturalist* 156: 567-576.
- Etchevers B. J.D. 1989. Análisis químico de suelos y plantas. Centro de Edafología. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México.
- Ferrera-Cerrato. R. 1989. Rizósfera. En: R. Ferrera- Cerrato (ed) *Ecología de la raíz* Sociedad Mexicana de Fitopatología. Montecillo. Edo de México.
- Ferrera-Cerrato, R. y Perez, M.J 1995. Agromicrobiología, elemento útil en la agricultura sustentable, Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Montecillo, Estado de México.
- Ferrera-Cerrato, R. 2000. Microorganismos de la rizósfera y su potencial en la degradación de hidrocarburos. In: *La edafología y sus perspectivas al siglo XXI* .R. Quintero, L. Colay- Chee, A. Ibáñez-Huerta y N.E. García Calderón (eds). Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, UNAM, UACH. México. Tomo II. p706-713.
- Ferrera-Cerrato, R. y Alarcón, A. 2004. Papel de los microorganismos rizosfericos en la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Química verde en Latinoamérica*. IUPACINCA Argentina. 89 - 109.
- Florence, A., Mathis R., Vand G. de Sype., Herovart D. y Puppo A. 2003. Possible roles for a cysteine protease and hydrogen peroxide in soy bean nodule development and senescence. *New Phytologist* 158: 131-138.
- Freedman, B. 1989. Environmental ecology (The impacts of pollution and other stresses on ecosystem structure and function). Academic Press. Inc. U.S.A p. 424.

- Frick, C.M., Farrell R.E. y Germida, J.J 1999. Assessment of phytoremediation as an in situ technique for cleaning oil- contaminated sites. Report prepared by Petroleum Technology Alliance of Canada (PTAC). Calgary, Canada.
- Futoma, D.J., Smith S.R., Smith, T. E y J. Tanaka. 19981. Solubility studies of PAH in water. In D.J.Futama, S.R.Smith, T.E.Smith, and J. Tanaka, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water Systems. CRC Press Boca Raton, Fla. P 13-24.
- Gerson, D.F. 1985. The biophysics of microbial growth on hydrocarbons: Insoluble substrates. In Zajin J.E, Donaldson, S.G (ed). International Bioresources J, Vol I, Microbes an oil Recovery. p 39-53.
- González, E.J y Markenton, M..M. 2003. Quórum Sensing in nitrogen-fixing rhizobia. Microbiology and Molecular. Biology Reviews 67: 574 -592.
- Hernández, A.E. 1997. Influencia de un complejo de hidrocarburos en poblaciones rizosféricas y en el crecimiento del frijol variedad Michoacán 12-A3. Tesis de Maestría, Colegio de Postgraduados, Montecillos México p12-43.
- Hernández, V.I. y D. Mager. 2003. Uso de *Panicum maximum* y *Vaciaría brizantha* para fitorremediar suelos contaminados con un crudo de petróleo liviano. Biagro. 15(3): 149-155.
- Hirsch, A.M. 1999. Role of lectins (and rhizobia exopolysacharides) in legume nodulation. Curr Opinion in Plant Biology 2:320-326.
- Kanaly, R.A and Harayana, S. 2000. Biodegradation of high-molecular- weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. J. Bacteriol. 182:2059-2067.
- Keith, L.H y Telliard, W.A.1991. Priority pollutants. I-A perspective view. Environ. Sci. Technol. 13:416-423.

- Kennedy, C.A.1999. The rhizosphere and spermosphere. In: Principles and Aplications of soil Microbiology. Edited by Sylvia M.D; Jeffry J. Fuhrmann, Peter G. Hartel and David A. Zuberer. Prentice Hall, Inc. p 387-407.
- Kulakow, P. L. 2006. Seed mix and plant density. In Remediation Technologies forum. San Francisco, C.A. EE.UU. p 1-7.
- Latha,S. and Mahadevan, A. 1997. Role of Rhizobia in the degradation of aromatic substances. World Journal of Microbiology and Biotechnology 13: 601-607.
- Madigan,M.T., Martinko, J..M; Parker,J. 1999. Brok. Biología de los Microorganismos 8 ed. Prentice Hall Iberia. Madrid, España p 1064.
- Martinez, E. y Hernández, G. 1999. Highlights of Nitrogen Fixation Research Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, E.U.A.
- McGill,W. B., Rowell, M.J., Westlake, D.W.S. 1981. Biochemistry, ecology and microbiology of petroleum components in soil. I: Paul EA, Ladd, J.N. (eds) Soil Biochemistry. New York. Marcel Dekker, pp. 229-295.
- Meulenber, R; Rijmaarts, H. H. M; Doddema, H. J.1997. Partially oxidized polycyclic aromatic hydrocarbons show an increased bioavalability. Lett. 152: 45-49.
- Miller R.M., Singer, G.M., Rosen J.D., Bartha R. 1988. Photolysis primes biodegradation of benzo[a]pireno. Appl. Environ Microbiol 54: 1724-1730.
- Miller, R. M.1994. Surfactants-enhanced bioavailability of slightly soluble organic compounds. In skipper H. (ed). Bioremediation Science and Aplications. Madison WI: Soil Science Society of American Publications.
- Morries, P. 1983..A century of kjeldahl (1883 - 1983). J. Assoc. Pub. Analysis 21:53-

- Mujia Blanco, C., Mendez R.J., Pino M.F. 2006. Crecimiento de plántulas de fríjol (*vigna unguiculata* L.) en dos suelos contaminados con petróleo, Revista Tecnológica. 19: 17-24.
- Oke, V and S.R. Long 1999. Bacterial genes induced within the nodule during the *Rhizobium*- legume symbiosis. *Molecular Microbiology* 32: 837-849.
- Parke D. y Ornston N.L. 1984. In: Nutritional Diversity of Rhizobiaceae Revealed by Auxanography. *Journal of General Microbiology* 130, 1743 – 1750.
- Paul, E.A. y Clark, F.E. 1996. *Soil Microbiology and Biochemistry*, Academic Press, San Diego, California.
- Peters, J.W., Fisher, K. y Dean, D.R. 1995. Nitrogenase Structure and function: A Biochemical- Genetic Perspective *Annu. Rev. Microbiol* 49: 335-366.
- Poonthrigpun, S., Pattaragulwanit, K., Paengthai, S., Kriangkripipat, T., Juntongjin, K., Thaniyavarn, S. 2006. In Novel Intermediates of acenaphthylene Degradation by *Rhizobium* sp. Strain CU – A1: Evidence for naphthalene -1, 8- Dicarboxylic Acid. *Metabolism. American Society for Microbiology* Vol.72. No 9 p. 6034 – 6039.
- Porcel, R; Barea, M.J. and Ruíz- Lozano, J.M. 2003. Antioxidant activities in mycorrhizal soybean plants under drought stress and their possible relationship to the process of nodule senescence. *New Phytologist* 157: 135-143.
- Quiñones–Aguilar, E. F., R. Ferrera-Cerrato, F. Gavi-Reyes., L. Fernández-Linares, R. Rodríguez-Vázquez y A. Alarcón. 2003. Emergence and growth of maize in crude oil polluted soil. *Agrociencia* 37, 585 – 594.
- Radwan, S.S., Al – Awadhi, H., Sorkhoh, A.N, y El-Ner, I.M. 1998. Rhizospheric hydrocarbon–utilizing microorganisms as potential contributors to phytoremediation for the oily Kuwaiti desert. *Microbiol. Res.* 153: 247-251.

- Rhijin, V.P.; Goldberg, B. and Hirsch, A.M. 1998. Lotus nodulation specificity is change by the presence of soybean lectin gene. *The Plant Cell* 10: 1233-1249.
- Rosini, F, D. 1996. Hydrocarbons in petroleum *Journal of Chem. Educ.* 39: 554 – 561.
- Riser–Roberts, E. 1998. Monitoring bioremediation. In: *Remediation of petroleum contaminated soils. Biological, physical an chemical processes.* Lewis Publishers. Boca raton, FLA, U.S.A p 142 - 155
- Rivera-Cruz, M. C; Ferrera-Cerrato, R.; Volke, V; Rodríguez, R. y Fernández, L. 2002. Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo. *Terra Latinoamericana* 20(4): 423-434.
- Rivera-Cruz, M. C. 2005. Evaluación Toxicológica de Suelos Contaminados con Petróleos Nuevos e Intemperizado Mediante ensayos con Leguminosas. *Interciencia* 30: 326-331.
- Rivera, E. y Dendooven, L. 2004. Dynamics of carbon, nitrogen and hydrocarbons in disell- contaminated soil amenden with biosolids and maize. *Chemosphere* 54: 379-386.
- Rosenberg, E. y Ron, E,Z. 1998. Bioremediation of petroleum contamination. In *Bioremediation Principles and applications.* Cambridge University Press. Canbridge. U.K. p 100 – 124.
- SAS Institute Inc. 2000. SAS/IML. Software: Usage and reference, version 8:1 st ed. SAS Instute Inc. Cary, NC.
- Sangabriel, W., Ferrera–Cerrato, R., Tejo–Agular, D., Mendoza–López, M., Cruz-Sánchez, J., López–Ortiz, C., Delgadillo–Martinez, J., Alarcón, A. 2006. Tolerancia y capacidad de fitorremediación de combustóleo en el suelo por seis especies vegetales. *Rev. Int. Contam. Ambient* 22 (2) 63 – 73.

- Schwarzenbach, R.P.; Eschwend, P.M.; Imboden, D.M. 1993. Environmental Organic Chemistry. New York: John Wiley and Sons.
- Shannon, M.; Unterman, R. 1993. Evaluating bioremediation- Distinguishing Fact from fiction. *Annu Rev Microbiol* 47: 715-738.
- Siciliano, S. D y Germida J. J. 1998. Mechanisms of phytoremediation: biochemical and ecological interactions between plants and bacteria. *Environ. Rev.* 6: 65 – 679.
- Siciliano, S.D; Fortin, N; Mihoc, A; Wisses, G; Labelle, S; Beaumier, D; Qullete, D;, Roy, R; White, M.K; Banks, P; Schwab, K. 2001. Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination *Appl. Environ. Microbiology.* 67: 2469 – 2475.
- Sorensen, D.L., R.C. Sims, X. Qui 1994. Field scale evaluation of grass- enhanced bioremediation of PAH contaminated soils. EPA Risk Reduction Engineering 20th Annu Res Syemp, Cincinnati, OH.
- Smith, S. 1997. Phytoremediation: Using plants to remediate soil and ground water contamination. Brigham Young University, Provo, Utah, U.S.A.
- Suominen L., Jussila. M, M., Makelainen, K., Romantschuk, M., Lindstrom, K. 2000. Evaluation of the *Galega-Rhizobium galegae* system of the bioremediation of oil – contaminated soil. *Envir. Pollut.* 107: 239 – 244.
- Sutherland, J. B., Rafii, F., Khan, A.A. y Cerniglia, C.E. 1995. Mechanisms of PAHs degradation. Pp. 269-306. In. Y. Young and C.E. Cerniglia (ed), *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemical.* Wiley-Liss, Inc., New York.
- Szczyglowski, K, y Amyot, L. 2003. Symbiosis inventiveness by recruitment. *Plant Physiology* 131: 935-940.
- Tan, K. 1982. Principles of soil Chemistry. New York: Marcel Dekker.

- Tate, R.L. 1987. Soil Organic Matter. Biological and Ecological Effects. New York. Jhon Wiley and Sons.
- The Merck Index an Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals 1996.
- Trevors, T. J and Van, E.J.D. 1997. Microbial interactions in soil. In : Elsas J.D.V., T.J.Trevors and E.M.H. Wellington (eds).Soil Microbiology. M. Dekker. New York U.S.A. 215-245.
- Unkovich, M.J., Pate, J.S. and Sanford, P. 1997. Nitrogen Fixation by annual legumes in Australian mediterranean agricultural. Australian Journal of Agricultural Research. 48: 267-293.
- Urbance, J.W., Cole, J., Saxman, P., Tiedje J, M. 2003. The biodegradative strain Database, Nucl Acids. Res 31, 152 – 155.
- Vasquez-Duhalt.R.2000. Environmental oil biocatalysis. Environmental biotechnonology and cleaner bioprocesses. Taylor and Francis Publicher, London p 191- 207.
- Vela, S., Haggglom, M.M. y Young, L.M. 2002. Biodegradation of aromatic and aliphatic compounds by rhizobial species. Soil Science 167: 802-810.
- Vicent, J.M. 1970. A Manual for the practical Study of root-nodule bacteria, p.75. Oxford: Blackwell, Scientific Publications.
- Walton, B.T., Anderson, T.A. 1990. Microbial degradation of trichloroethylene in the rhizosphere: Potential application to biological remediation of waste site-soil. Appl Environ Microbiol 56: 1012-1016.
- Wild, S.R; Waterhouse, K.S; McGrath, S.P. and K.C.Jones. 1990. Organic contaminants in an agricultural soil with a known history of sewage sludge amendments: polynuclear aromatic hydrocarbons. Environmental. Sci. Technol. 24: 1706-1711.

Wilson, S.C and Jones, K.C.1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environ. Pollut.* 80. 229-249.

IX. APENDICE

Cuadro 1A. Variables de crecimiento de las plantas de *Phaseolus vulgaris* con *Rhizobium tropici* CIAT 899, e, presencia de tres hidrocarburos policíclicos aromáticos.

HPAs	Concentración (mg L ⁻¹)	VORA (mg)	PSPA (mg)	PSRA (mg)	PSNO (mg)
T con R	0	1.0 ab	140.0 d	6.7 bcd	5.7 b
T con R+ Acetona	0	1.3 ab	260.0 abc	82.3 abcd	12.0 b
R + Naftaleno	20	1.0 ab	243.3 abcd	73.0 abcd	6.0 b
	40	1.0 ab	153.3 cd	52.0 cd	4.6 b
	60	0.8 ab	236.7 abcd	69.0 abcd	7.7 b
	80	1.5 a	206.7 abcd	99.7 ab	3.7 b
	100	1.3 ab	273.3 ab	108.7 a	14.7 b
R + Fenantreno	20	1.2 ab	210.0 abcd	89.3 abc	8.0 b
	40	1.2 ab	240.0 abcd	80.3 abcd	11.76 b
	60	0.8 ab	226.7 abcd	72.3 abcd	20.0 b
	80	1.5 a	235.0 abcd	85.0 abcd	13.0 b
	100	1.0 ab	260.0 abc	63.0 bcd	13.6 b
R+ Benzo[a]pireno	20	1.3 a b	260.0 abc	88.0 abcd	63.0 a
	40	1.3 ab	223.3 abcd	103.3 ab	14.0 b
	60	1.3 ab	260.0 abc	88.7 abc	9.3 b
	80	0.7 b	183.3 bcd	46.0 d	4.6 b
	100	1.3 ab	303.3 a	66.3 bcd	10.3 b
DMS		0.74	116.6	42	35.6
	HPAs	NS	NS	NS	NS
	CON	NS	NS	NS	NS
	HPAs* CON	NS	NS	NS	NS

VORA= volumen radical, PSPA= peso seco parte aérea, PSRA= peso seco de la raíz, PSNO= peso seco del nódulo, R= *Rhizobium* y T= Testigo.

Cuadro 1. 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	10 mL
Agar	15 g

Cuadro 2. Medio Extracto de levadura manitol (ELM)

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.3. Leche tornasolada

Reactivo	Cantidad
Leche tornasolada Difco	100 g
Agua destilada	1000 mL

NOTA: El pH debe ser 7

Cuadro.4. Composición de la solución nutritiva de Jensen

Reactivo	Cantidad por 1000 mL
CaHPO ₄	1.0 g
K ₂ HPO ₄	0.2 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.2 g
FeCl ₃	0.1 g
Agua destilada	1000 mL
Micronutrientes	0.1 g

Reactivos para micronutrientes	Cantidad por 1000 mL
MnCl ₂ 4H ₂ O	1.50 g
(NH ₄) ₂ MoO ₇ 4H ₂ O	0.074 g
H ₃ BO ₃	0.934 g
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.0350 g
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.0310 g
FeCl ₃ 6 H ₂ O	7.70 g

Cedro 5. Escala de Mc Farland (Campbell *et al.*, 1970).

Tubo	Solución acuosa de H ₂ SO ₄ al 1% mL	Solución acuosa de BaCl ₂ al 1% mL	Numero de bacterias 10 ⁶ mL
1	9.9	0.1	300
2	9.8	0.2	600
3	9.7	0.3	900
4	9.6	0.4	1200
5	9.5	0.5	1500
6	9.4	0.6	1800
7	9.3	0.7	2100
8	9.2	0.8	2400
9	9.1	0.9	2700
10	9.0	1.0	3000