



*La simbiosis rizobio-leguminosa  
como bioherramienta para la  
fitorremediación de suelos  
contaminados con metales pesados*

Memoria que presenta el Licenciado en Biología  
Mohammed Dary para optar al grado de  
Doctor en Biología por la Universidad de Sevilla

Sevilla 2015





LOS DOCTORES ELOÍSA PAJUELO DOMÍNGUEZ Y MIGUEL ÁNGEL CAVIEDES FORMENTO, PROFESORES TITULARES DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,

INFORMAN: Que la presente Memoria de Investigación titulada *“La simbiosis rizobio-leguminosa como bioherramienta para la fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados”*, presentada por el Licenciado en Biología MOHAMMED DARY, para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Sevilla, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, reuniendo todos los requisitos exigidos.

Y para que así conste, firman el presente informe en Sevilla, a 26 de septiembre de dos mil quince.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'E. Pajuelo'.

Fdo.: Eloísa Pajuelo Domínguez

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'M. Caviedes'.

Fdo.: Miguel Ángel Caviedes Formento





Facultad de Farmacia  
Dpto. de Microbiología y Parasitología  
c/. Profesor García González, 2  
41012 Sevilla

ANTONIO VENTOSA UCERO, CATEDRÁTICO Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,

INFORMA: Que la presente Memoria de Investigación titulada *“La simbiosis rizobio-leguminosa como bioherramienta para la fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados”*, presentada por el Licenciado en Biología MOHAMMED DARY, para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Sevilla, ha sido realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, bajo la dirección de la Dra. Dña. Eloísa Pajuelo Domínguez y el Dr. D. Miguel Ángel Caviedes Formento, reuniendo todos los requisitos exigidos a los trabajos de Tesis Doctorales.

Y para que así conste, firma el presente informe en Sevilla, a 26 de septiembre de dos mil quince.

Fdo.: Prof. Dr. D. Antonio Ventosa Uceró



El trabajo presentado en esta Memoria ha sido realizado en el Grupo de Investigación BIO-181 de Junta de Andalucía, en el marco de los siguientes Proyectos de Investigación:

1. “La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa para la rizorremediación de suelos contaminados con metales pesados. Desarrollo de una nueva tecnología de descontaminación *in situ*” (Ministerio de Medio Ambiente, Rural y Marino, 611/2006/1-1.1).
2. “Desarrollo de un sistema agrícola alternativo para la regeneración ecológica de medioambientes degradados mediante la utilización de la diversidad de las simbiosis autóctonas entre plantas y microorganismos”, (Ministerio de Educación y Ciencia-INIA-IFAPA, RTA-2006-059-C02-02).
3. “Modificación genética de leguminosas y *Rhizobium* para su uso en biorremediación. Análisis molecular del efecto del arsénico sobre la interacción simbiótica modelo *Sinorhizobium meliloti*-*Medicago truncatula*”, (Ministerio de Ciencia e Innovación, BIO-2006-02245).
4. “Biorremediación de suelos de Andalucía contaminados con metales pesados. Aplicación de la nueva tecnología basada en el uso de leguminosas y sus interacciones rizosféricas” (Proyecto de Excelencia de Junta de Andalucía, P06-CVI-01850).





Las publicaciones incluidas en esta Tesis Doctoral, que se presenta bajo la modalidad “Compendio de publicaciones”, son las siguientes:

#### Revistas

1. Toxic effects of arsenic on *Sinorhizobium-Medicago sativa* symbiotic interaction.  
Pajuelo, E., Rodríguez-Llorente, I.D., Dary, M. and A.J. Palomares.  
Environmental Pollution, 154: 203-211 (2008).
2. *In situ* phytostabilization of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria.  
Dary, M., Chamber-Pérez, M.A., Palomares, A.J. and E. Pajuelo.  
Journal of Hazardous Materials, 177: 323-330 (2010).
3. Cadmium biosorption properties of the metal-resistant *Ochrobactrum cytisi* Azn6.2.  
Rodríguez-Llorente, I.D., Gamane, D., Lafuente, A., Dary, M., El Hamdaoui, A., Delgadillo, J., Doukkali, B., Caviedes, M.A. and E. Pajuelo.  
Engineering in Life Sciences, 10: 49-56 (2010).
4. Rhizostabilization of metals in soils using *Lupinus luteus* inoculated with the metal resistant *Serratia* sp. MSMC541.  
El Aafi, N., Brhada, F., Dary, M., Maltouf, A.F. and E. Pajuelo.  
International Journal of Phytoremediation, 14: 261-274 (2012).

#### Capítulos de libros

1. Biorhizoremediation of heavy metals toxicity using *Rhizobium*-legume symbioses.  
Pajuelo, E., Dary, M., Palomares, A.J., Rodríguez-Llorente, I.D., Carrasco, J.A. and M.A. Chamber-Pérez.

In: Biological Nitrogen Fixation: Towards Poverty Alleviation through Sustainable Agriculture", Dakora *et al.*, (eds.), Vol. 42, pp. 101-104 (2008). Ed. Springer, Berlin (Germany).

2. Changing concepts on nitrogen fixing symbionts: *Ochrobactrum* sp., a nitrogen fixing  $\alpha$ -proteobacteria with bioremediation capability.

Dary, M., Palomares, A.J., Lafuente, A., Doukkali, B., Chamber, M.A. and E. Pajuelo.

En: Agricultura y Medio Ambiente. la apuesta por una alianza natural. Robles, J.F.(Ed.), pp. 174-177. ASAJA. I.S.B.N.: 978-84-612-1710-4.

Otras publicaciones relacionadas con el tema de trabajo, pero no incluidas en la Tesis:

1. Physiological and biochemical defense reactions of *Vicia faba* L.-*Rhizobium* symbiosis face to chronic exposure to cyanobacterial bloom extract containing microcystins.

Lahrouni, M., Oufdou, K., El Khalloufi, F., Baz, M., Lafuente, A., Dary, M., Pajuelo, E. and B. Oudra.

Environmental Science Pollution Research, 20: 5405-5415 (2013).

2. Prospecting metal-tolerant rhizobia for phytoremediation of mining soils from Morocco using *Anthyllis vulneraria* L.

El Aafi, N., Saidi, N., Maltouf, A.F., Pérez-Palacios, P., Dary, M., Brhada, F. and E. Pajuelo.

Environmental Science Pollution Research, 22: 4500-4512 (2015).

# ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. La contaminación en el medio ambiente .....	1
1.2. El vertido tóxico de Aznalcóllar .....	3
1.3. Contaminación por metales pesados .....	4
1.3.1. El arsénico .....	7
1.3.2. El cadmio .....	10
1.3.3. El cobre .....	11
1.4. Eliminación tradicional de metales pesados .....	13
1.5. Biorremediación .....	14
1.6. Fitorremediación .....	17
1.6.1. Fitoextracción .....	20
1.6.2. Fitoestabilización .....	21
1.6.3. Fitovolatilización .....	23
1.6.4. Fitodegradación .....	23
1.6.5. Rizofiltración .....	25
1.7. Rizorremediación .....	25
1.8. La simbiosis Rizobio-leguminosa .....	28
1.9. La simbiosis rizobio-leguminosa como herramienta en la rizorremediación de metales pesados .....	33
1.10. Resistencia bacteriana a los metales pesados .....	34
1.11. Resistencia a arsénico en bacterias .....	36
1.12. Mecanismos de resistencia a arsénico en los rizobios .....	37
1.13. Efecto de los metales pesados sobre las poblaciones de rizobios .....	40

	Página
1.14. Efecto de los metales pesados sobre la interacción Rizobio-leguminosa .....	41
2. OBJETIVOS .....	45
3. PUBLICACIONES .....	47
3.1. Toxic effects of arsenic on <i>Sinorhizobium-Medicago sativa</i> symbiotic interaction .....	49
3.2. <i>In situ</i> phytostabilisation of heavy metal polluted soils using <i>Lupinus         luteus</i> inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria .....	59
3.3. Cadmium biosorption properties of the metal-resistant <i>Ochrobactrum         cytisi</i> Azn6.2 .....	67
3.4. Rhizostabilization of metals in soils using <i>Lupinus luteus</i> inoculated with the metal resistant rhizobacterium <i>Serratia</i> sp. MSMC541 .....	75
3.5. Changing concepts on nitrogen fixing symbionts: <i>Ochrobactrum</i> sp., a nitrogen fixing $\alpha$ -proteobacteria with bioremediation capability .....	91
3.6. Biorhizoremediation of heavy metals toxicity using <i>Rhizobium-legume         symbioses</i> .....	95
4. RESUMEN DE LOS RESULTADOS .....	99
4.1. Identificación de la cepa MA11, determinación de su resistencia a arsénico y evaluación de sus propiedades simbióticas .....	99
4.2. Estudio del potencial de la simbiosis <i>Lupinus luteus-Bradyrhizobium         en rizadorremediación</i> .....	101
4.3. Bioadsorción de cadmio por la bacteria <i>Ochrobactrum cytisi</i> Azn6.2 .....	104
4.4 Utilización de plantas de <i>Lupinus luteus</i> inoculadas con <i>Serratia</i> sp. MSMC541 para la rizo-estabilización de metales en suelos .....	105
5. DISCUSIÓN .....	109
6. CONCLUSIONES .....	121
7. BIBLIOGRAFÍA .....	123

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. La contaminación en el medio ambiente

El suelo es un soporte imprescindible para la vida además de ser el centro de funciones tan esenciales en el planeta como la producción primaria, la regulación de los gases producidos por los seres vivos, la regulación del clima y de los ciclos biogeoquímicos y del agua, y el mantenimiento de la biodiversidad (Hodson, 2010; Banwart, 2011). Se estima que el 30% del suelo está degradado o contaminado como consecuencia de diversas actividades antropogénicas (Huttermann *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2011). Lo más grave es que este porcentaje sigue en aumento.

Para la vida de los seres vivos es indispensable un equilibrio ecológico que se establece en base a la relación existente entre los individuos y el medio ambiente. La actividad dinámica del ecosistema viene determinada por una combinación de factores físicos, químicos y biológicos. Si estos factores se modifican, se producirá una alteración de las condiciones ambientales y, en consecuencia, se llegará a una situación adversa para la vida ya establecida que incidirá también sobre el ser humano.

La industrialización global ha supuesto la liberación de grandes cantidades de compuestos tóxicos a la biosfera que afecta a la salud de millones de personas en todo el mundo (EPA, 1998). Con frecuencia, la estructura química de estos contaminantes no se corresponde con la de ningún compuesto existente anteriormente, por lo que se denominan xenobióticos, como, por ejemplo, es el caso de policlorobifenilos, policlorodioxinas y colorantes azoicos. En otras ocasiones, los contaminantes son productos naturales que han sido movilizados y/o acumulados en formas tóxicas, como es el caso de los hidrocarburos presentes en los combustibles fósiles o los metales pesados que forman parte de minerales.

En los Estados Unidos de Norteamérica, el organismo encargado de declarar como tóxica a una sustancia determinada es la "Environmental Protection Agency" (EPA). Los criterios utilizados por la EPA para incluir un compuesto en la lista de los más tóxicos para la biosfera son: persistencia, bioacumulación, toxicidad y biodisponibilidad en el caso de los metales. Los compuestos denominados como PBT ("persistent bioaccumulative toxic chemicals") están entre los que se consideran más nocivos tanto para la salud humana como para el medio ambiente.

La atenuación natural es un proceso físico-químico o biológico que contribuye a la desaparición de los contaminantes del suelo de forma natural. Aunque es una opción de bajo coste, por su lentitud, es incapaz de contrarrestar la contaminación generada por la actividad humana al ritmo que ésta avanza actualmente, por lo que en ocasiones es imposible que el suelo pueda restaurarse por sí solo (Vazquez *et al.*, 2008). De no mediar respuesta, el daño para la biosfera puede ser irreversible. Por ello, es necesario aplicar políticas medioambientales que contribuyan a eliminar estos contaminantes de los suelos, propiciar su tratamiento e impedir su acumulación. No es de extrañar, por tanto, que para las autoridades y los gobiernos la contaminación ambiental y el constante incremento de desechos tóxicos constituyan problemas prioritarios cuya resolución es urgente (Kalia *et al.*, 2008; Banerjee *et al.*, 2011; Mandal *et al.*, 2012).

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

A diferencia de la biodegradación de tóxicos orgánicos, los elementos básicos que contaminan suelos, aguas o aire, como metales pesados (mercurio, cinc, cadmio o cobre), metaloides (arsénico) y radioisótopos, no pueden degradarse debido a su naturaleza elemental (Meagher y Heaton, 2005). Esto favorece su acumulación y su persistencia en el ambiente, convirtiéndolos en especialmente dañinos (Wani *et al.*, 2007). Actividades industriales como la minería, la fundición o el uso de combustibles fósiles han provocado la acumulación de metales en el suelo, cuya negativa repercusión ha afectado al medio natural y agrario, y, por consiguiente, a la salud del ser humano (McIlveen y Negusanti, 1994). En el caso concreto del arsénico (As), su acumulación en determinadas regiones del mundo se ha convertido en un grave problema de salud (Duker *et al.*, 2005; Banerjee *et al.*, 2011; Mandal *et al.*, 2012).

## **1.2. El vertido tóxico de Aznalcóllar**

En la madrugada del 25 de abril de 1998 se produjo una de las mayores catástrofes ambientales ocurridas en Andalucía: el desprendimiento de unos 50 metros del muro de contención de la gran balsa de decantación de estériles de la explotación minera, propiedad de la empresa sueco-canadiense Boliden-Apirsa, ubicada en el municipio sevillano de Aznalcóllar.

La rotura del muro ocasionó el vertido de, aproximadamente, 2.000 millones de litros de lodos piríticos y otros 4.000 millones de litros de aguas ácidas, con una elevada concentración de elementos tóxicos (cinc, plomo, arsénico, cobre, antimonio, talio y cadmio) al río Guadiamar (Grimalt y Mcpherson, 1999, Ayora *et al.*, 2001). Como consecuencia del vertido, resultó afectado un tramo fluvial de unos 62 km de longitud, desde la mina hasta el límite con el Parque Nacional de Doñana, con una anchura variable de 500 a 1.000 metros, contaminando una superficie de 4.634 ha pertenecientes a terrenos de nueve municipios de la provincia de Sevilla.

El carácter tóxico del vertido radicaba en la gran cantidad de elementos contaminantes presentes que arrasaron completamente cosechas, fauna, flora y suelos, estimándose las pérdidas en millones de euros.

### 1.3. Contaminación por metales pesados

Se considera metal pesado a aquel elemento que tiene una densidad igual o superior a  $5 \text{ gr} \times \text{cm}^{-3}$  cuando está en forma elemental, o cuyo número atómico es superior a 20 (excluyendo a los metales alcalinos y alcalino-térreos). Su presencia en la corteza terrestre es inferior al 0,1% y casi siempre menor del 0,01%. En biología, "pesado" se refiere a una serie de metales y metaloides que pueden ser tóxicos para plantas y animales incluso a concentraciones muy bajas. Junto a estos metales pesados hay otros elementos químicos que aunque son metales ligeros o no metales, se suelen englobar con ellos por presentar orígenes y comportamientos asociados; es este el caso de As, boro (B), bario (Ba) y selenio (Se).

Dentro de los metales pesados hay dos grupos: oligoelementos o micronutrientes y metales sin función establecida o conocida. Los primeros son requeridos en pequeñas cantidades por plantas y animales y son necesarios para que los organismos completen su ciclo vital. Pasado cierto umbral se vuelven tóxicos. Dentro de este grupo están: B, cobalto (Co), cromo (Cr), cobre (Cu), molibdeno (Mo), manganeso (Mn), níquel (Ni), Se y zinc (Zn). En el segundo grupo se encuentran aquellos cuya presencia en determinadas cantidades lleva aparejadas disfunciones en los seres vivos. Resultan altamente tóxicos y suelen acumularse en los organismos vivos. Son, principalmente, cadmio (Cd), mercurio (Hg), plomo (Pb), antimonio (Sb) y bismuto (Bi) (Cánovas *et al.*, 2003).

Los metales pesados también provocan graves daños en las comunidades microbianas en el suelo, ya que reducen la biomasa microbiana total y el tamaño de



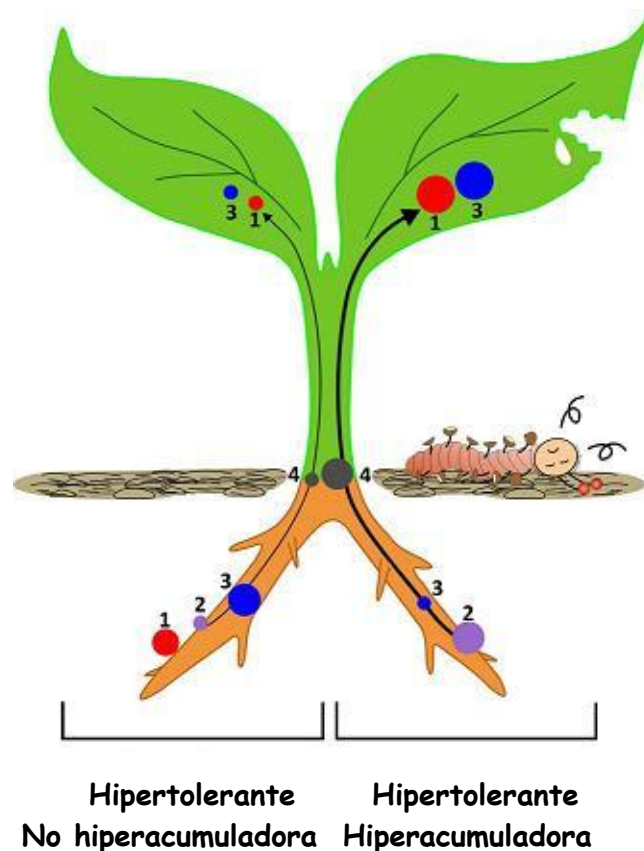
las poblaciones de grupos microbianos con funciones específicas (Zhuang *et al.*, 2007).

Concentraciones altas de metales pesados (esenciales o no) en el suelo, pueden causar síntomas de toxicidad en las plantas e, inclusive, inhibir su crecimiento. La fototoxicidad puede venir provocada por alteraciones de numerosos procesos fisiológicos originados a nivel molecular y/o celular por la inactivación de enzimas, el bloqueo de grupos funcionales de moléculas metabólicamente importantes, el desplazamiento o la sustitución de elementos esenciales o la destrucción de la integridad de las membranas. Una consecuencia bastante común de la toxicidad del metal pesado es el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno debido a la interferencia con la actividad de los transportadores de electrones, especialmente en la membrana de los cloroplastos (Pagliano *et al.*, 2006; La Rocca *et al.*, 2009). Este incremento de especies reactivas provoca en la célula un estrés oxidativo que conduce a la peroxidación de lípidos, el deterioro de macromoléculas, el desmantelamiento de las membranas, la pérdida de iones y la rotura de las cadenas del ADN (Navari-Izzo *et al.*, 1999; Quartacci *et al.*, 2001).

Las plantas por su parte, acuden a una serie de mecanismos de defensa para controlar la absorción, la acumulación y el transporte de estos peligrosos elementos y detoxificarlos excluyendo del citoplasma las formas iónicas libres (Figura 1). Una de las estrategias más utilizadas es impedir la entrada del metal pesado en las células de la raíz atrapándolo en el apoplasto uniéndolo a exudados (ácidos orgánicos) (Watanabe y Osaki, 2002) o a grupos aniónicos de la pared celular (Dalla Vecchia *et al.*, 2005; Rascio *et al.*, 2008). La mayoría de los metales pesados que entran en la planta son confinados en las células de la raíz, donde son detoxificados acomplejándolos con aminoácidos, ácidos orgánicos o péptidos de unión a metales y/o acumulados en vacuolas (Hall, 2002). Todo esto hace que se restrinja enormemente el transporte a los órganos aéreos, protegiendo de esta

forma los tejidos de las hojas y, en particular, las células fotosintéticas metabólicamente activas del daño provocado por el metal pesado.

Otro mecanismo de defensa adoptado generalmente por plantas expuestas a metales pesados es el aumento de sistemas celulares antioxidantes que contrarrestan el estrés oxidativo (Navari-Izzo *et al.*, 1998; Sgherri *et al.*, 2003).



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

Es interesante señalar que hay plantas que sobreviven, crecen y se reproducen en suelos metalíferos naturales al igual que en suelos contaminados con metales pesados como resultado de actividades humanas. La mayoría de especies

que toleran concentraciones de metales pesados que resultan muy tóxicas para otras plantas, se comportan como "excluyentes" (Figura 1), dependiendo la tolerancia o incluso la hipertolerancia de útiles estrategias para restringir la entrada del metal. Estas plantas retienen y detoxifican la mayor parte de los metales pesados en los tejidos radiculares, con un mínimo transporte hacia las hojas cuyas células permanecen sensibles a los efectos fitotóxicos (Hall, 2002). Sin embargo, ciertas especies hipertolerantes, definidas como "hiperacumuladoras", presentan un comportamiento opuesto ya que lo que les interesa es la absorción del metal pesado y su distribución por la planta (Figura 1).

### 1.3.1. El arsénico

El arsénico (As) es un carcinógeno de clase 1 ubicuo en el medio ambiente. Es el vigésimo elemento más abundante en la corteza terrestre con una concentración media de aproximadamente  $5 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$  (Cullen y Reimer, 1989), existiendo más de 200 minerales que lo contienen.

Se libera al medio ambiente tanto por medios naturales, erosión de rocas, emisiones volcánicas o descargas de fuentes termales, como por actividades humanas tales como la minería, la fundición o el uso de pesticidas, herbicidas y otros productos que contienen As (Zhao *et al.*, 2010).

En la zona sur de Asia existe un envenenamiento crónico con As, que afecta potencialmente a decenas de millones de personas, debido a la contaminación del agua de bebida extraída de acuíferos (Smith *et al.*, 2000; Brammer y Ravenscroft, 2009). En Bangladesh, cerca de la mitad de los acuíferos suministran agua para una población estimada de 57 millones de personas, con una cantidad de arsénico superior a  $10 \text{ ug} \times \text{L}^{-1}$ , que es el límite recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el agua de bebida (Br. Geol. Surv, 2001). Estas aguas también se emplean para el riego de los cultivos de arroz en la temporada de sequía,

añadiendo más de 1.000 toneladas de As por año a los suelos agrícolas de Bangladesh (Ali *et al.*, 2003).

La concentración de arsénico total en suelos puede ir desde menos de 10 mg kg<sup>-1</sup> en suelos no contaminados, hasta cientos de miles de mg x kg<sup>-1</sup> en suelos contaminados (Kabata-Pendias y Pendias, 1992; Int. Agency Res. Cancer, 2004). Sin embargo, la biodisponibilidad del As para las plantas viene determinada por propiedades edáficas, condiciones ambientales y modificación del suelo en la rizosfera.

El arsénico tiene cuatro estados de oxidación: -3, 0, +3 y +5, siendo los dos últimos los más abundantes en el medio ambiente terrestre. El arsenato [As(V)] es la especie predominante en suelos aeróbicos, mientras que el arsenito [As(III)] predomina en ambientes anaeróbicos. La interconversión entre ambos esta mediada por procesos tanto bióticos como abióticos y fuertemente influenciada por el potencial redox y el pH.

El arsénico, ubicuo en el medio ambiente, se ha convertido en un problema de salud pública en todo el mundo. Todos los organismos, desde las bacterias hasta los mamíferos, poseen mecanismos para el transporte y la detoxificación de los compuestos arsenicales (Rosen, 2002a). Es evidente que el incremento en la utilización de insecticidas, herbicidas, fungicidas, pesticidas y conservantes (protectores) para las maderas que contienen arsénico a la vez que la minería y la combustión del carbón, han modificado el ciclo global del arsénico (Smedley y Kinniburgh, 2002; Luo *et al.*, 2007).

Para el gobierno de los EE.UU., el arsénico ocupa el primer lugar en su lista de productos peligrosos, tanto por su toxicidad como por su prevalencia en el medio ambiente (Chou y De Rosa, 2003).

La salud de millones de personas en todo el mundo está en riesgo por beber aguas procedentes de pozos contaminados con arsénico (Milton y Rhaman, 2002).

Los efectos tóxicos del arsénico están relacionados con su estado de oxidación (Thomas *et al.*, 2007), por lo que el estudio de los factores que afectan a la especiación del arsénico se ha convertido en un objetivo importante. La amenaza de la contaminación medioambiental por la liberación y dispersión de arsénico a través de causas naturales y provocadas por la actividad humana, ha estimulado en gran medida la investigación de las propiedades de este metaloide y de su interacción con los sistemas biológicos.

El arsénico es letal para la mayoría de los microorganismos, si bien ciertas bacterias y el fitoplancton pueden sobrevivir a su exposición. Los microorganismos han desarrollado numerosos mecanismos que les permitan tolerar altas concentraciones de arsénico en su medioambiente, incluyendo la transformación de las especies arsenicales por oxidación (Fisher *et al.*, 2008), reducción (Mukhopadhyay *et al.*, 2002) y metilación (Bentley y Chasteen, 2002).

Un número importante de bacterias, entre las que se incluyen *Escherichiacoli*, *Bacillus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus xylois*, *Chromobacterium violaceum* y *Pseudomonas* sp. (Rosen 2002a; Mateos *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2007), son capaces de detoxificar arsénico. Se trata de cepas seleccionadas que poseen determinantes genéticos que confieren la capacidad de tolerar altos niveles de arsénico en el medioambiente. Se sabe, porque así se ha documentado, que hay bacterias que pueden utilizar el arsénico como donador de electrones, como aceptor de electrones o que poseen mecanismos de detoxificación de arsénico, que proporcionan resistencia frente a la toxicidad del mismo.

En general, los metales pesados se eliminan de las aguas contaminadas mediante precipitación química, intercambio iónico o adsorción (Schmidt *et al.*, 2008). Sin embargo, estos métodos tienen la desventaja de resultar caros y proporcionar la aparición de contaminantes secundarios. El reconocimiento reciente de la necesidad de desarrollar tecnologías de bajo coste y amigables con el medioambiente para el tratamiento de aguas contaminadas, ha estimulado el interés por los estudios sobre la biorremediación de metales (Mateos *et al.*, 2006; Patelet *et al.*, 2007; Mondalet *et al.*, 2008).

Bacterias capaces de extraer arsénico de sus inmediaciones serían candidatas ideales para biorremediación, pudiendo constituir una alternativa o una ayuda para los métodos físicoquímicos ya existentes. Aunque ya existen algunos microorganismos modificados genéticamente (Kostal *et al.*, 2004), todavía no se ha establecido su posible utilidad en la eliminación de arsénico (Takeuchi *et al.*, 2007).

### **1.3.2. El cadmio**

La exposición a cadmio provoca un envenenamiento crónico. El período de incubación para esta intoxicación crónica varía considerablemente, pero oscila, generalmente, entre los 5 y los 10 años, aunque en ocasiones, supera los 30 años. Durante la primera fase del envenenamiento se produce el amarilleamiento de los dientes, se pierde el sentido del olfato y aumenta considerablemente la sequedad de la boca. Además, disminuyen los glóbulos rojos como resultado del mal funcionamiento de la médula ósea. El hecho más característico de la intoxicación es la aparición de dolores lumbares y mialgias en las piernas que continúan durante varios años hasta que el paciente queda postrado en cama y los síntomas clínicos progresan rápidamente. Se produce también un grave daño en el riñón que provoca la eliminación de albúmina por la orina. Por otra parte, el cadmio altera el metabolismo del calcio, lo que provoca un ablandamiento de los huesos que genera

fracturas en los huesos y deformaciones del esqueleto que llegan a disminuir la altura del cuerpo en más de 30 cm (Rai y Pal, 2002).

### 1.3.3. El cobre

El cobre es el elemento químico de número atómico 29. Se trata de un metal de transición de color rojizo y brillo metálico que se caracteriza por ser uno de los mejores conductores de electricidad (el segundo después de la plata). Gracias a su alta conductividad eléctrica, ductilidad y maleabilidad, se ha convertido en el material más utilizado para fabricar cables eléctricos y otros componentes eléctricos y electrónicos. Es un metal duradero porque se puede reciclar un número casi ilimitado de veces sin que pierda sus propiedades mecánicas. Fue uno de los primeros metales en ser utilizado por el ser humano en la prehistoria. Aunque su uso perdió importancia relativa con el desarrollo de la siderurgia, el cobre y sus aleaciones siguieron siendo empleados para hacer objetos tan diversos como monedas, campanas y cañones. A partir del siglo XIX, concretamente de la invención del generador eléctrico en 1831 por Faraday, el cobre se convirtió de nuevo en un metal estratégico, al ser la materia prima principal de cables e instalaciones eléctricas.

El cobre posee una importancia biológica considerable en diferentes actividades al ser constituyente de muchas enzimas y proteínas. Por ejemplo, en especialmente importante en el proceso de la fotosíntesis, en concreto en la síntesis de clorofila aunque no forma parte de este pigmento. En el ser humano interviene en la formación de los glóbulos rojos, en el mantenimiento de los vasos sanguíneos, de las terminaciones nerviosas, del sistema inmunitario y de los huesos. Por tanto, se le puede considerar un oligoelemento esencial para la vida humana. En bacterias, el Cu es un cofactor de oxigenasas y proteínas transportadoras de electrones. En altas concentraciones es tóxico para las células, principalmente al generar radicales libres que dañan al ADN y las membranas (Voloudakis *et al.*,

2005). Para contrarrestar estos daños, las bacterias han desarrollado sistemas de detoxificación, pero permitiendo que se cubran las necesidades de este metal. Los genes involucrados en estos sistemas de detoxificación se encuentran en plásmidos o en cromosomas y se dividen en dos tipos principales, los operones *cop* y *cue*. Arnesano *et al.*, (2003), indicaron que el Cu intracelular se mantiene formando complejos por la acción de un sistema homeostático fuertemente controlado. El exceso de Cu que no se puede acomplejar, es tóxico. Es por esto que, para controlar microorganismos patógenos agrícolas, desde la antigüedad se han venido utilizando productos que contienen Cu. La presencia de cantidades elevadas de este elemento en los ambientes naturales ha permitido la selección de microorganismos que presentan resistencia a Cu.

Es muy raro que se produzca una deficiencia de cobre en el organismo ya que se encuentra presente en una gran cantidad de alimentos tales como ostras, mariscos, legumbres, vísceras y nueces entre otros, además del agua potable.

El cobre, aunque no suele ser habitual, puede acumularse de forma natural en los suelos hasta alcanzar niveles tóxicos. Así ha ocurrido, por ejemplo, en el cinturón pirítico del sur de España, donde los depósitos de sulfatos se erosionan liberando grandes cantidades de metales pesados (Cu y As, principalmente) que se lixivian y se acumulan en los cauces de ríos como el Tinto y el Odiel (Sarmiento *et al.*, 2011). No obstante, la acumulación de Cu se asocia, en la mayoría de los casos, a la actividad humana, especialmente a la actividad minera en los procesos de extracción y acumulación de residuos. En las zonas áridas y semi-áridas del mundo, es común la presencia de lugares donde se acumulan residuos de minas, tanto si éstas se encuentran abandonadas como si continúan en funcionamiento (Mendez y Maier, 2008). Algunas zonas con estos problemas se localizan en el suroeste de España (Conesa *et al.*, 2006; Sánchez-Andrea *et al.*, 2011), el norte de México (Rojas-Rodríguez *et al.*, 2010), el oeste de los Estados Unidos de Norteamérica (Mendez y Maier, 2008; Crinnion, 2010), la costa del Pacífico en Chile y Perú (Tapia



*et al.*, 2011), el oeste de la India (Banerjee, 2003), y gran parte de los territorios de Sudáfrica (Jeon *et al.*, 2011) y Australia (Taylor y Schniering, 2010)

#### **1.4. Eliminación tradicional de metales pesados**

La contaminación medioambiental por metales pesados no es un problema nuevo. Sin embargo, no siempre se han puesto los medios necesarios para su correcta eliminación. En algunos casos, la descontaminación consistía simplemente en devolver los residuos a la mina de donde habían sido extraídos, verterlos al mar o a un cuerpo de agua dulce o confinarlos en una piscina o batería de almacenamiento (Mendez *et al.*, 2007). A medida que estos sistemas se mostraron ineficaces para mantener la contaminación bajo control, se fueron desarrollando métodos físico y/o químicos que conllevan la utilización de técnicas *in situ* o *ex situ*. Las primeras requieren normalmente la estabilización mediante la adición de productos químicos como correctores de pH o agentes quelantes. En las segundas, se suele realizar un traslado del suelo a contenedores especiales donde se lava, para proceder a continuación a la separación física o química de los contaminantes ("soil washing"). Frecuentemente se lleva a cabo la excavación y retirada de la capa superficial contaminante seguida de un proceso conocido como "landfill". La técnica de "landfill" consiste en depositar dicha capa en una balsa excavada sobre el terreno y sellada herméticamente mediante una capa aislante. La balsa se cubre con suelo no contaminado y turba. Por último, se procede a su revegetación. Sin embargo, uno de los problemas asociados a la técnica de "landfill" es el lixiviado de metales u otros compuestos a las aguas subterráneas, por lo que cuando se trata de grandes superficies contaminadas, se suele optar por la estabilización de los contaminantes mediante la adición de compuestos químicos que disminuyan su movilidad y, por tanto, el riesgo de que alcancen los reservorios de agua (Pajuelo *et al.*, 2011).

El coste de la remediación tradicional es en cualquier caso muy elevado, aunque dependerá en último término de los contaminantes, de las características del suelo y de las condiciones y superficie de la zona contaminada (Pajuelo *et al.*, 2011).

### **1.5. Biorremediación**

Como se ha comentado previamente, las soluciones que se han utilizado para paliar los problemas de contaminación son caras y en muchos casos conllevan otros inconvenientes medioambientales que se añaden a los que pretenden resolver. Desde hace unos años, se tiende a utilizar, cuando es posible, la capacidad de detoxificación de contaminantes de algunos organismos vivos, sobre todo microorganismos y plantas, como una herramienta útil y eficaz para combatir la contaminación (Cunningham y Ow, 1996; Singh *et al.*, 2003). Así ha surgido la biorremediación, una tecnología eficaz para el tratamiento de una amplia variedad de contaminantes (Kumar *et al.*, 2011; Prasad, 2011).

La biorremediación utiliza organismos vivos y/o sus productos para eliminar completamente contaminantes del medio ambiente (Abhilash *et al.*, 2009; Singh, 2009). La Biorremediación es una tecnología amigable desde el punto de vista medioambiental, de bajo coste y gran aceptación pública. Particularmente, las bacterias se han utilizado con éxito en la descontaminación tanto de compuestos orgánicos (Díaz, 2004) como de metales pesados (Valls y de Lorenzo, 2002; Silver y Phung, 2005). Precisamente, la biorremediación se basa en la utilización del potencial de la diversidad biológica para la completa eliminación de los contaminantes y, cuando esto no es posible, provocar su inmovilización o al menos la reducción de su toxicidad. Los organismos han desarrollado numerosas estrategias para sobrevivir en presencia de contaminantes tanto orgánicos como inorgánicos (Díaz, 2004; Silver y Phung, 2005; Shroeder y Collins, 2011). Las bacterias, particularmente, han desarrollado estrategias para obtener energía prácticamente

de cualquier compuesto orgánico ya sea en condiciones de aerobiosis o de anaerobiosis. La transferencia horizontal de genes entre poblaciones microbianas para la degradación de productos xenobióticos, se ve facilitada porque dichos genes se encuentran, normalmente, en elementos genéticos movilizables como plásmidos o transposones, lo que permite la rápida adaptación de los microorganismos a nuevos contaminantes (Diaz, 2004).

En general, los metales pesados se eliminan de las aguas contaminadas mediante precipitación química, intercambio iónico o adsorción (Schmidt *et al.*, 2008). Sin embargo, estos métodos tienen la desventaja de resultar caros y proporcionar la aparición de contaminantes secundarios. El reconocimiento reciente de la necesidad de desarrollar tecnologías de bajo coste y amigables con el medioambiente para el tratamiento de aguas contaminadas, ha estimulado el interés por los estudios sobre la biorremediación de metales (Mateos *et al.*, 2006; Patelet *et al.*, 2007; Mondalet *et al.*, 2008).

Aunque muchos organismos están capacitados para detoxificar determinadas sustancias (mediante procesos de mineralización, transformación y/o inmovilización de los contaminantes), los microorganismos, especialmente las bacterias, desempeñan un papel esencial en los ciclos biogeoquímicos y en el desarrollo sostenible de la biosfera, siendo las mejor estudiadas y las que más se utilizan en biorremediación (Banerjee *et al.*, 2011). Las bacterias, que han evolucionado a lo largo de más de tres mil millones de años, han desarrollado una amplia variedad de mecanismos para tolerar e incluso obtener energía virtualmente de cualquier compuesto de origen natural mediante procesos aerobios o anaerobios (utilizando aceptores finales de electrones alternativos como los iones nitrato, sulfato y férrico). La gran diversidad de microorganismos con una gran versatilidad metabólica permite tener un amplio espectro de posibilidades a la hora de elegir un microorganismo adecuado para la degradación o detoxificación de un determinado compuesto. Una gran mayoría de los genes implicados en tolerancia/resistencia y /o

detoxificación de contaminantes están localizados en elementos genéticos móviles, por lo que la transferencia horizontal de estos genes de resistencia entre microorganismos es frecuente en la naturaleza, permitiendo la rápida adaptación de los microorganismos a ambientes contaminados incluso en condiciones extremas, donde el desarrollo de otros organismos es imposible.

Los mecanismos de resistencia a metales pesados permiten el uso de microorganismos en la detoxificación de metales en suelos y aguas contaminados. Así, se han utilizado diversos géneros de bacterias para la biorremediación de metales pesados, que incluyen entre otros muchos los géneros *Pseudomonas*, *Geobacter*, *Ralstonia*, *Ochrobactrum*, etc., tanto en la bioadsorción de metales pesados como en movilización e inmovilización de metales (Valls y de Lorenzo, 2002; Malik, 2004; Silver y Phung, 2005). El conocimiento, cada vez más extenso, que se tiene acerca de los mecanismos moleculares subyacentes a la capacidad de tolerar o detoxificar metales pesados por parte de los microorganismos, es también una baza importante a la hora de diseñar microorganismos con capacidad de biorremediación incrementada (Valls *et al.*, 2000; Sripranget *al.*, 2002; Cases y de Lorenzo, 2005). A diferencia de la resistencia a los compuestos orgánicos, en la que la ruta de degradación de los mismos está compuesta de una gran cantidad de etapas enzimáticas, cada una catalizada por una enzima diferente, la resistencia a metales pesados está codificada por sólo unos cuantos genes. La mayoría de los operones de resistencia a metales pesados constan de 2 a 6 genes, con lo cual es fácil su transferencia a otros microorganismos (Hall, 2002). Además, en algunos casos todos los genes están contenidos en un plásmido, por lo que la transferencia a otros organismos es posible (Baracet *al.*, 2004; Lee *et al.*, 2006).

En resumen, los procesos microbiológicos se pueden explotar desde el punto de vista de la biorremediación y, sobre todo, si se conocen los genes implicados en estos procesos, se pueden manipular estos genes para diseñar microorganismos con las resistencias deseadas. Entre los microorganismos más frecuentemente usados

en biorremediación se encuentran *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, y *Rhodococcus*. Todas estas bacterias se han añadido a suelos o lodos para la biorremediación de Cd. Para la biorremediación de Cr se han utilizado *Alcaligenes* y *Pseudomonas*, mientras que algunas especies de *Escherichia* y *Pseudomonas* han empleado para detoxificar Cu.

## 1.6. Fitorremediación

Las plantas también han desarrollado mecanismos para sobrevivir en ambientes contaminados ya sea por compuestos orgánicos o inorgánicos. La utilización de plantas para la biorremediación del medio ambiente se conoce con el nombre de fitorremediación en la que las plantas son las que extraen, secuestran y/o detoxifican metales pesados basándose en distintas estrategias.

El término fitorremediación se acuñó por primera vez en 1983 y se refiere a una serie de tecnologías que se basan en la utilización de plantas (bien se trate de germoplasma nativo de plantas o de plantas modificadas genéticamente) para la eliminación de contaminantes del suelo, sedimentos o aguas superficiales, o su transformación en sustancias menos tóxicas o biodisponibles (Pajuelo *et al.*, 2011).

La fitorremediación posee grandes ventajas como son: aplicación *in situ*, tecnología verde basada en el uso de la energía solar, fácil de aplicar, uso frecuente a un amplio rango de metales, conocimiento de bases agrícolas, reciclado del metal tras mineralización con gran reducción de la masa del contaminante, etc. La fitorremediación ofrece la ventaja adicional de hacer los sitios contaminados estéticamente llamativos, lo que permite apoyo e interés público.

Actualmente, existe un mercado en expansión para la utilización de plantas y sus microorganismos asociados en la remediación de suelos contaminados (Abhilash *et al.*, 2009; Singh, 2009). En la Tabla 1 se muestran diferentes plantas

que presentan un enorme potencial en fitorremediación. La posibilidad de lograr el crecimiento de plantas en áreas contaminadas añade otros beneficios intangibles tales como el secuestro del carbono, la mejora del suelo, la producción de biomasa y biocombustibles, una apariencia estética y el mantenimiento de la biodiversidad (Abhilash *et al.*, 2009).

**Tabla 1.** Plantas naturales y modificadas genéticamente con interés en fitorremediación y otros beneficios adicionales <sup>a</sup> (Tomado de Abhilash *et al.*, 2012).

<b>Plantas naturales</b>	<b>Contaminante diana</b>	<b>Beneficios adicionales</b>
<i>Salix</i> spp. ( <i>Salix viminalis</i> , <i>Salix fragilis</i> )	Cd, Zn, Pb, Cu, PAH, herbicidas	Biomass for bioenergy, pulp, charcoal
<i>Populus</i> spp. ( <i>Populus deltoides</i> , <i>Populus nigra</i> , <i>Populus trichocarpa</i> )	Cd, Zn, Pb, Cu	Biomass for bioenergy, pulp, charcoal
Tall fescue ( <i>Festuca arundinacea</i> )	Atrazine, PAH	Bioethanol production
Jatropha ( <i>Jatropha curcas</i> L.)	Cd, Cu, Ni, Pb, HCH	Biodiesel production
Corn ( <i>Zea mays</i> )	Cd, Zn, Pb	Bioethanol production
Miscanthus ( <i>Miscanthus giganteus</i> )	PAH	Bioethanol production
Switch grass ( <i>Panicum virgatum</i> L.)	Atrazine, PAH	Bioethanol production
Castor ( <i>Ricinus communis</i> )	DDT, cadmium	Biodiesel production
<b>Plantas transgénicas</b>	<b>Contaminante diana</b>	<b>Posibles beneficios adicionales</b>
<i>Brassica juncea</i> with ATP sulfurylase from <i>Arabidopsis thaliana</i> and SeCys methyltransferase (SMT) from <i>Astragalus bisulcatus</i>	Enhance Se accumulation, tolerance and volatilization	Biodiesel production, carbon sequestration

Hybrid poplar ( <i>Populus seiboldii</i> , <i>Populus grandidentata</i> ) with manganese peroxidase (MnP) gene from <i>Trametes versicolor</i>	Increased degradation of bisphenol A	Biomass for bioenergy, pulp, charcoal, carbon sequestration
<i>Populus deltoides</i> with bacterial mercuric ion reductase ( <i>merA</i> ) gene	Enhanced mercuric ion reduction and resistance	Biomass for bioenergy, pulp, charcoal, carbon sequestration
<i>Populus canescens</i> overexpressing $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase	Tolerance to Zn stress	Biomass for bioenergy, pulp, charcoal, carbon sequestration
Hybrid aspen ( <i>Populus tremula</i> , <i>Populus tremuloides</i> ) expressing bacterial nitroreductase ( <i>pnrA</i> )	Enhanced bioremediation of TNT	Biomass for bioenergy, pulp, charcoal, carbon sequestration
Hybrid poplar ( <i>Populus tremula</i> , <i>Populus alba</i> )	Removal of TCE, vinyl chloride, CCl <sub>4</sub> , benzene and chloroform	Biomass for bioenergy, pulp, charcoal, carbon sequestration
<i>Populus trichocarpa</i> overexpressing $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase from poplar	Increased tolerance to chloroacetanilide herbicides	Biomass for bioenergy, pulp, charcoal, carbon sequestration

A Abreviaturas: PAH, polycyclic aromatic hydrocarbons; HCH, hexachlorocyclohexanes; DDT, dichlorodiphenyltrichloroethane; TCE, trichloroethylene.

Comparada con la mayoría de las técnicas de limpieza convencionales, la fitorremediación es un proceso dependiente de la luz solar que ofrece la posibilidad de una restauración medioambiental de bajo coste, estética y amigable con el medio ambiente (Pilon-Smits, 2005; Vangronsveld *et al.*, 2009). La fitorremediación incluye diferentes técnicas que implican diversos procesos en las plantas, de manera que cada una de ellas es más apropiada para una clase particular

de contaminantes. Así, podemos distinguir entre fitoextracción, fitoestabilización, fitovolatilización, fitodegradación y rizofiltración (Pilon-Smits, 2005; Mandal *et al.*, 2012; Moreno-Jiménez *et al.*, 2012).

### 1.6.1. Fitoextracción

La fitoextracción es un procedimiento útil para la eliminación de metales o metaloides que aprovecha la inusual capacidad que poseen algunas plantas de acumular (o hiperacumular) estos compuestos en sus tejidos. A la hora de su eliminación los metales están concentrados en un volumen mucho más pequeño de material vegetal que en el volumen inicial de suelo o sedimento contaminados, por lo que los residuos se pueden desechar adecuadamente.

Un grupo relativamente pequeño de plantas hiperacumuladoras tienen la capacidad de tolerar concentraciones elevadas de uno o varios metales y secuestrarlos en sus tejidos a concentraciones muy altas (Baker, 1981). En años recientes se han realizado grandes avances en el conocimiento y comprensión de los mecanismos fisiológicos de entrada y transporte de los metales en estas plantas (Verbruggen *et al.* 2009, Krämer 2010).

Entre los procesos más destacados implicados en la hiperacumulación de metales, se incluyen: a) aumento de la absorción de metales por células de la raíz por proteínas de la membrana plasmática; b) quelación de los metales en el citoplasma con varios ligandos; transporte limitado de los complejos metal-quelante a las vacuolas de la raíz; d) aumento de la transferencia de los complejos metal-quelante al xilema por una alta expresión de transportadores al xilema en la raíz; y e) confinamiento de los metales en vacuolas de la epidermis de las hojas a través de transportadores localizados en el tonoplasto (Krämer 2010, Sarma 2011).



Parece evidente que en plantas hiperacumuladoras no hay una cantidad mayor de fitoquelatinas que en otras plantas, sino que, por el contrario, los metales se unen preferentemente a ligandos débiles, principalmente ácidos orgánicos, en vez de ligandos fuertes (Küpper *et al.* 2004, Callahan *et al.* 2006). La histidina y la nicotinamida son agentes quelantes importantes en la hiperacumulación de Ni (Krämer *et al.* 1996, Mari *et al.* 2006). El control del estrés oxidativo es también un mecanismo crucial en la hipertolerancia e hiperacumulación (Srivastava *et al.* 2005, Krämer 2010). Hasta la fecha, se han descrito alrededor de 500 plantas hiperacumuladoras, lo que representa un 0,2% de todas las angiospermas (Baker 1981, Krämer 2010, Sarma 2011). Solo unas pocas leguminosas, pertenecientes al género *Astragalus*, hiperacumulan selenio, incluyendo *A. sinicus*, *A. bisulcatus* y *A. racemosus*, las cuales son capaces de acumular entre 5.600 y 10.000 ppm de Se (Freeman *et al.* 2006, Pilon-Smits y Quinn 2010). Por otra parte, Pastor *et al.*, (2003) indicaron que *Lupinus albus* era capaz de acumular más de 3.000 ppm de Zn en suelos ácidos contaminados.

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

### **1.6.2. Fitoestabilización**

La fitoestabilización de metales es una estrategia diferente que persigue la inmovilización de los metales en el suelo, impidiendo su dispersión y su entrada en la cadena trófica (Mendez y Maier 2008). La fitoestabilización resulta un método adecuado y barato para reducir de forma inmediata el impacto negativo de la contaminación. Se puede utilizar también en áreas contaminadas muy extensas o inaccesibles donde otros procedimientos de remediación son impracticables.

Esta estrategia utiliza plantas con gran tolerancia a metales cuyo mecanismo de resistencia consiste en disminuir la disponibilidad del metal en el suelo y restringir su entrada en los tejidos (Baker 1981). Los metales se acumulan en las raíces de la planta o son precipitados por exudados radicales. Precisamente, las leguminosas acumulan metales fundamentalmente en las raíces (Pajuelo *et al.*, 2007) por lo que son excelentes candidatas para su empleo como fitoestabilizadoras.

Normalmente, en los suelos contaminados, por ejemplo, minas y sus alrededores, es factible recolectar ecotipos de plantas resistentes a metales, mientras que los ecotipos originarios de lugares no contaminados suelen ser no tolerantes (Mahieu *et al.*, 2011). Una planta fitoestabilizadora ideal debería ser tolerante a metales y acumularlos principalmente en las raíces, presentando muy pocos factores de translocación (TFs). Puesto que esta técnica no persigue la extracción de los contaminantes sino su estabilización, requiere una monitorización periódica.

Se han propuesto muchas plantas para la inmovilización de metales, incluyendo hierbas, arbustos y árboles, de las familias *Poaceae*, *Compositae*, *Boraginaceae*, *Plantaginaceae* y *Cyperaceae* (Mendez y Maier, 2008). También se pueden incorporar leguminosas que sean tolerantes a metales como, por ejemplo, *Lupinus sp.*, (Vázquez *et al.*, 2006; Dary *et al.*, 2010), *Cytisus sp.* (Moreno-Jiménez *et al.*, 2009), *Retama spherocarpa* (Moreno-Jiménez *et al.*, 2012), *Sesbania rostrata* (Yang *et al.*, 1997), *Anthyllis vulneraria* (Mahieu *et al.*, 2011) o incluso árboles como *Acacia sp.* (Maldonado-Magaña *et al.*, 2011). Estas plantas desempeñan una función fundamental al aumentar el contenido en nitrógeno de los suelos, gracias a su interacción simbiótica con los rizobios (Graham y Vance, 2003; Olroyd y Downie, 2008). El proceso de nodulación es extremadamente sensible incluso a bajas concentraciones de contaminantes (Castro *et al.*, 1997; Broos *et al.*, 2004; Kopittke *et al.*, 2007; Wani *et al.*, 2007a; Pajuelo *et al.*, 2008; Lafuente *et*

al., 2010). Sin embargo, la nodulación en suelos contaminados es posible cuando están presentes cepas tolerantes de rizobios (Wani *et al.*, 2007b, 2008; Dary *et al.*, 2010; Mahieu *et al.*, 2011). Los colonizadores primarios pueden favorecer el crecimiento de otras plantas, incrementando así la biodiversidad y la regeneración de suelos contaminados a la vez que los metales son inmovilizados gracias a la cubierta vegetal (Lei y Duan, 2008).

### 1.6.3. Fitovolatilización

Esta técnica es útil cuando es posible convertir el metal en un compuesto volátil. Si esta conversión tiene lugar en el interior de la planta, se puede producir la evapotranspiración del compuesto volátil a través de las hojas. Esto ocurre, por ejemplo, con el selenio, que es complejado formando metilseleniocisteína y metilseleniometionina, las cuales son transportadas hasta las hojas. Una vez allí, estos compuestos se descomponen en metilselenio y dimetilselenio, los cuales son volatilizados en las hojas.

Leguminosas del género *Astragalus*, como *A. sinicus*, *A. bisulcatus* y *A. racemosus*, pueden acumular y volatilizar selenio (Freeman *et al.*, 2006; Pilon-Smits y Quinn 2010). Compuestos orgánicos volátiles como el tetracloroetileno (TCE) también pueden ser volatilizados (Doty *et al.*, 2003).

### 1.6.4. Fitodegradación

Las plantas poseen la capacidad innata de detoxificar compuestos xenobióticos. Dado que son organismos fotosintéticos, en comparación con los microorganismos, normalmente suelen carecer de la ruta completa de degradación de estos compuestos. En las plantas superiores, los xenobióticos pueden ser parcialmente transformados a través de varios procesos bioquímicos (Sanderman. 1994; Gerhardt *et al.*, 2009), que pueden agruparse en tres fases principales: 1)

Fase I o conversión, que consiste en una etapa de activación en la que se crea un grupo reactivo en el compuesto, con la participación de enzimas tales como las citocromo P450 monooxigenasas, una numerosa familia de enzimas que catalizan la mayoría de las etapas de oxidación del metabolismo secundario en plantas, y a la vez actúan sobre los xenobióticos mediante dealquilación de grupos N-, O- y S-, hidroxilación aromática y alifática, epoxidación, peroxidación, desulfuración oxidativa, sulfoxidación o reducción (Siminszky, 2006); 2) Fase II o conjugación, etapa en la que el compuesto xenobiótico activado se conjuga con ligandos pre-existentes en la planta tales como glutatión, glucosa, malonato, aminoácidos, etc. Las enzimas implicadas en estas reacciones son glutatión-S-transferasa (Brazier-Hicks *et al.*, 2008), glucosil C- y O-transferasas (Gandía-Herrero *et al.* 2008), malonyl-transferasas, etc.; y 3) Fase III o compartimentación/secuestro, etapa en la que se transporta el complejo xenobiótico-ligando hasta las vacuolas (complejo soluble) o hasta la pared celular (complejo insoluble) con la participación de transportadores específicos de membrana.

Las plantas pueden metabolizar un amplio rango de xenobióticos, incluyendo compuestos halogenados, cloroaromáticos, PCBs, PHAs, pesticidas, etc. Por ejemplo, *Glycine max* es capaz de detoxificar TNT mediante una reducción del grupo nitro catalizada por una nitrorreductasa (Adamia *et al.*, 2006). También la alfalfa, en combinación con microorganismos rizosféricos, puede detoxificar el aditivo MTEB de la gasolina (Zhang *et al.*, 2000). En algunos casos, la degradación incompleta del xenobiótico origina intermediarios que pueden llegar a ser más tóxicos incluso que el compuesto original. Como estos intermediarios se pueden acumular en los tejidos de la planta, debemos ser conscientes de la posibilidad de introducir así contaminantes en la cadena trófica. La cuestión de cómo deshacerse de plantas que acumulan xenobióticos preocupa seriamente. Por tanto, para la viabilidad de la fitorremediación como una aproximación real para remediar la contaminación ambiental, habrá que responder esa pregunta de forma adecuada (Gerhardt *et al.*, 2009). Por ejemplo, se ha producido la lixiviación de

contaminantes debido a la caída de las hojas de álamos tras la remediación de explosivos (Yoon *et al.*, 2006). En otros casos, algunos compuestos xenobióticos son letales para las leguminosas, por lo que resulta imposible utilizarlas en fitorremediación. De hecho, en ensayos en invernadero, las leguminosas han demostrado ser más sensibles a los hidrocarburos del petróleo, PCBs y TNT que las gramíneas (Dzantor *et al.*, 2000).

#### **1.6.5. Rizofiltración**

Se denomina rizofiltración al proceso de eliminación de contaminantes a través de la acumulación de metales o compuestos orgánicos en las raíces de plantas cuando éstas se encuentran sumergidas en aguas contaminadas.

En la Tabla 2 se muestran algunas plantas leguminosas propuestas en fitorremediación así como los mecanismos a través de los cuales se produce la eliminación de contaminantes.

#### **1.7. Rizorremediación**

El término rizorremediación hace referencia a la eliminación de contaminantes por medio de la interacción entre las raíces de la planta y los microorganismos rizosféricos asociados a éstas. Actualmente, se le considera como el proceso de biorremediación más evolucionado (Glick, 2003; Kuiper *et al.*, 2004; Gerhardt *et al.*, 2009; Wenzel, 2009).

La rizorremediación es un proceso atractivo, puesto que la raíz de la planta proporciona una gran superficie para la colonización microbiana, permitiendo a los microorganismos desplazarse en profundidad a través de las capas del suelo y, de esta forma, incrementar el contacto entre los microorganismos detoxificantes y

los contaminantes del suelo (Chaudhry *et al.*, 2005; Zhuang *et al.*, 2007; Wenzel, 2009).

En este proceso cada miembro de la interacción desempeña una función. Las plantas liberan una gran variedad de compuestos orgánicos en la rizosfera (aminoácidos, azúcares, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, metabolitos secundarios y moléculas de elevado peso molecular como celulosa, lignina, mucílagos y proteínas) (Bais *et al.*, 2006; Shuckla *et al.*, 2011), que se utilizan como fuente de carbono (C) por la comunidad microbiana rizosférica, incluidos hongos y bacterias. Más del 20% del carbono fijado por la planta puede liberarse a través de sus raíces (Hinsinger *et al.*, 2005). En consecuencia, la rizosfera presenta una densidad microbiana mucho más alta (de  $10^2$  a  $10^4$  veces) en comparación con la masa circundante del suelo. Los exudados radicales también afectan a la disponibilidad de los contaminantes en la rizosfera por la producción de biosurfactantes (Read *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2010).

Por su parte, los microorganismos rizosféricos desempeñan una función crucial en la adaptación de la planta al estrés medioambiental que provoca la presencia de contaminantes (Burd *et al.*, 2000; Khan, 2005; Khan *et al.*, 2009). El efecto de estos microorganismos puede visualizarse desde dos puntos de vista: por un lado, exhiben una amplia gama de actividades promotoras del crecimiento vegetal (PGP), como, por ejemplo, secreción de sideróforos, solubilización de fosfato, fijación de nitrógeno, defensa de la planta frente a patógenos (biocontrol) (Han *et al.*, 2005) y estimulación del crecimiento vegetal por la secreción de fitohormonas, como las auxinas, inhibiendo la acumulación de etileno a través de la expresión de actividad aminociclopropano desaminasa, etc. (Bernard, 2005; Avis *et al.*, 2008). La actividad PGP de los microorganismos rizosféricos, mitiga la toxicidad de los contaminantes, incrementa el tamaño de las raíces y la biomasa, aumenta el rendimiento de la planta y su biomasa, mejora la calidad del suelo, y eleva tanto el contenido de materia orgánica como el de nitrógeno en los suelos.

(Khan, 2005; Khan *et al.*, 2009 ; Wani *et al.*, 2008; Dary *et al.*, 2010). Por otro lado, en ambientes contaminados, la población rizosférica afecta a la movilidad y a la disponibilidad de los contaminantes en las proximidades de las raíces de la planta. Por ejemplo, la presencia de sideróforos, ácidos orgánicos, etc., secretados por microorganismos rizosféricos puede incrementar la movilidad y disponibilidad de los metales, haciendo al metal más accesible a la absorción por la planta (Whiting *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2005; Sheng y Xia, 2006; Zaidi *et al.*, 2006). En otros casos, la actividad de los microorganismos rizosféricos puede inmovilizar los metales en la rizosfera contribuyendo a su fitoestabilización (Dary *et al.*, 2010; El Aafi *et al.*, 2012).

Con respecto a los contaminantes orgánicos, las comunidades microbianas fomentan la degradación de xenobióticos en la rizosfera de las leguminosas, por ejemplo, PHA (Liste y Prutz, 2006), herbicidas (Shaw y Burns, 2004) y compuestos cloronitroaromáticos (Liu *et al.*, 2007). En la rizosfera de alfalfa se produce un aumento de la degradación de MTBE en comparación con el control (Zhang *et al.*, 2000). En otro experimento, se observó la degradación de hexaclorociclohexano por microorganismos rizosféricos en la leguminosa *Cytisus striatus* (Kidd *et al.*, 2008). Otro efecto es el aumento de la disponibilidad del contaminante por la producción de biosurfactantes, como los ramnolípidos (Bento *et al.*, 2005).

Las leguminosas son plantas capaces de establecer interacciones con un gran número de bacterias y micorrizas. Además de los rizobios que son los simbioses de las leguminosas más estudiados, otras muchas alfa-proteobacterias (por ejemplo, *Ochrobactrum cytisi* o *Methylobacterium*) y beta-proteobacterias (*Burkholderia*, *Ralstonia* o *Cupriavidus*) (revisado por Rivas *et al.*, (2009)) pueden nodular leguminosas. Algunos ejemplos de rizorremediación de metales y compuestos orgánicos se exponen en la Tabla 4. Por ejemplo, en el caso de los metales, la inoculación de leguminosas con rizobios resistentes al metal mitiga la fototoxicidad al mismo tiempo que disminuye la cantidad de metal en los tejidos de

la planta, ayudando a la fitoestabilización (Reichman, 2007; Wani *et al.*, 2008; Dary *et al.*, 2010; El Aafi *et al.*, 2012). Hay también algunos trabajos sobre la degradación de xenobióticos en la rizosfera de leguminosas, por ejemplo, hidrocarburos aromáticos policíclicos e hidrocarburos del petróleo (Liste y Prutz, 2006).

La interacción simbiótica de las leguminosas con las micorrizas tiene también una importancia determinante en el estatus nutricional de estas plantas. Se sabe que los hongos micorrízicos arbusculares (AMF) potencian el crecimiento y la salud de la planta al mejorar la nutrición mineral, especialmente de fósforo, o aumentando la resistencia o la tolerancia tanto al estrés biótico como al abiótico (Göhre y Paszkowski, 2006; Audet y Charest, 2007). La interacción entre plantas y AMF se ha denominada como Micorrizorremediación (Khan, 2006).

Los endofitos de leguminosas también desempeñan un importante papel en la degradación de compuestos orgánicos tóxicos, Así, por ejemplo, Germaine *et al.*, (2006) publicaron la degradación del herbicida 2,4-D por *Pseudomonas putida* en alfalfa.

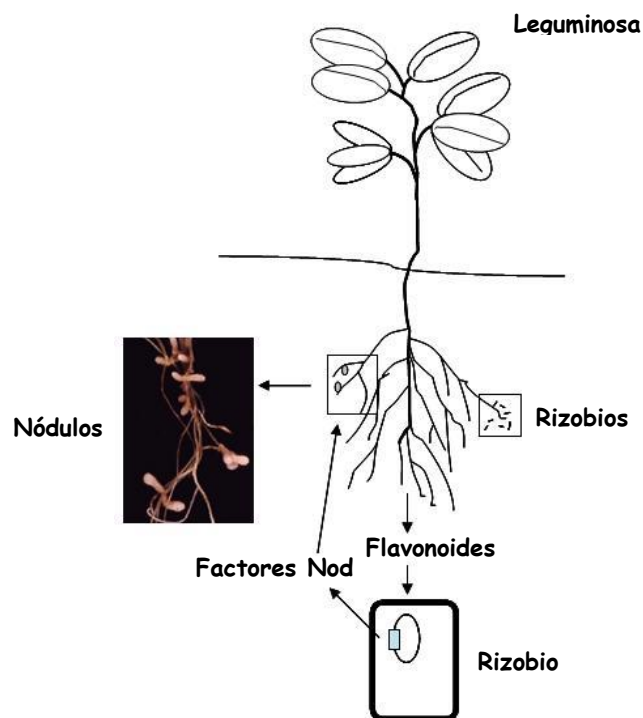
### **1.8. La simbiosis Rizobio-leguminosa**

Los cambios evolutivos adoptados por las plantas, a fin de obtener los nutrientes esenciales para su desarrollo, han dado lugar a una gran variedad de estrategias, entre las que destacan las interacciones simbióticas con microorganismos. Habida cuenta de que el nitrógeno (N) forma parte de un gran número de compuestos esenciales para la planta, y de que su deficiencia limita el desarrollo y productividad de la misma, es lógico pensar que la simbiosis mutualista con microorganismos fijadores de nitrógeno es una de las interacciones más importantes en plantas. Mientras que el N presente en la atmósfera está en forma de molécula inerte y no utilizable por la mayoría de los sistemas biológicos, las



plantas solo son capaces de asimilar nitrógeno combinado con otros elementos, en forma de iones. Sin embargo, estas formas más reactivas y biológicamente utilizables, sólo comprenden una pequeña fracción del N total presente en la tierra. (López-Bellido, 2006).

La más estudiada de este tipo de interacciones, es la simbiosis entre las plantas de la familia de las leguminosas (*Fabaceae*), y las bacterias de la familia *Rhizobiaceae*, denominadas comúnmente rizobios, y que comprenden géneros como *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, o *Bradyrhizobium* (Lloret y Martínez-Romero, 2005).



**Figura 2.** Esquema general del proceso de nodulación en leguminosas (tomada de Lafuente, 2011).

Durante esta interacción, la bacteria invade la raíz de la planta y se compartimenta en la región intracelular de un órgano especializado llamado nódulo. Será en él donde tendrá lugar la conversión de la molécula de nitrógeno ( $N_2$ ) en amonio ( $NH_4^+$ ), la forma asimilable por la planta (Oldroyd y Downie, 2008). La nitrogenasa, el complejo enzimático responsable de esta reducción, sufre inactivación irreversible en presencia de oxígeno, por lo que requiere condiciones

de anoxia. La planta desarrolla en el nódulo de la raíz el ambiente de microanaerobiosis ideal para la fijación biológica de nitrógeno (Gage, 2004).

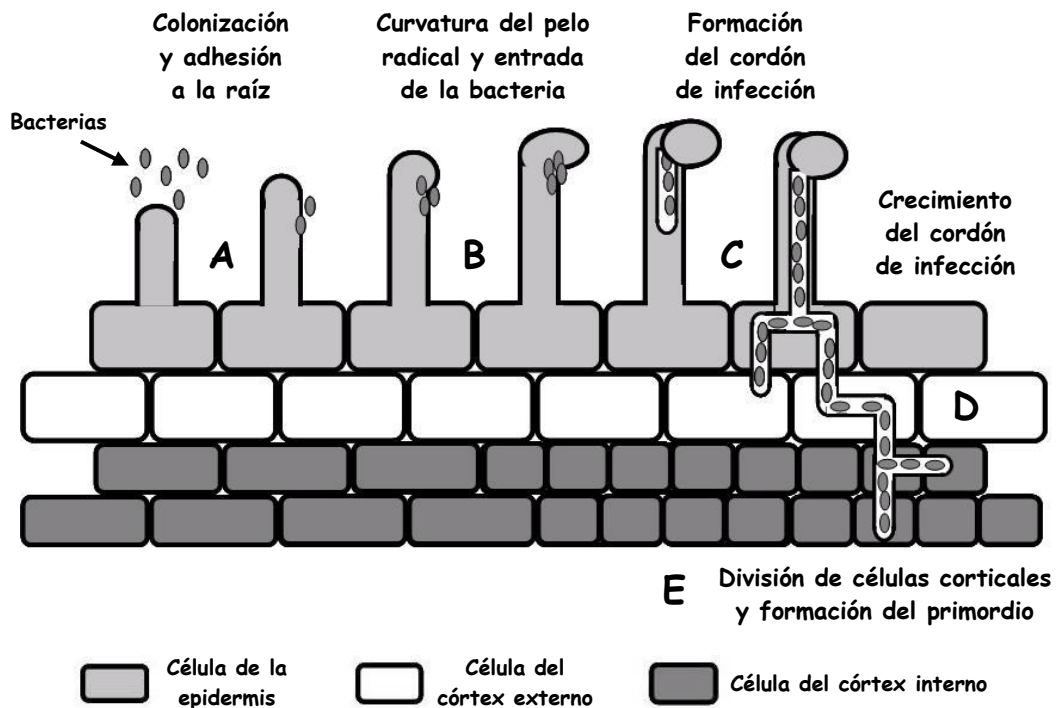
Se ha observado que las plantas reaccionan ante la presencia de su simbionte poniendo en marcha una batería de respuestas de defensa frente a patógenos, como si de una infección microbiana se tratase. Posteriormente, y solo si la comunicación *Rhizobium*-leguminosa supera la respuesta defensiva de la planta, se activarán los mecanismos de nodulación. Por tanto, la comunicación y el reconocimiento molecular entre el rizobio y la planta son factores esenciales en el proceso de formación del nódulo. El intercambio de señales específicas entre los simbiontes hace de la nodulación un proceso de alta especificidad, donde cada leguminosa tiene su complemento en una o pocas bacterias de su rizosfera (Stacey et al., 2006).

Los eventos que dan lugar al desarrollo de un nódulo fijador de nitrógeno en las raíces de las leguminosas pueden clasificarse en: 1) Reconocimiento e interacción Rizobio-leguminosa; 2) Invasión epidérmica y formación del cordón de infección; 3) Respuesta cortical a la infección; y 4) Desarrollo del nódulo.

1) Reconocimiento e interacción rizobio-leguminosa. Para iniciar el proceso de simbiosis, el rizobio debe reconocer y responder a la presencia de las raíces de la planta hospedadora. Durante su crecimiento en la rizosfera, el rizobio es atraído hacia la superficie radical mediante quimiotaxis (Aparicio-Tejo et al., 1996). Las sustancias exudadas por la planta, entre las que destacan flavonoides y betaínas, ejercen especificidad en los rizobios, y son capaces de activar sus genes de nodulación, *nod*. Estos genes codifican aproximadamente 25 proteínas requeridas para la síntesis y exudado de los factores de nodulación o factores Nod, que activarán a su vez el proceso de nodulación en la planta (Figura 2), induciendo la deformación del pelo radical, despolarización de la membrana, oscilaciones en el calcio intracelular o la iniciación de la división celular en el córtex (Gage, 2004;

Oldroyd y Downie, 2008). A pesar de compartir un esqueleto básico, los factores Nod presentan muchas modificaciones específicas que, junto al reconocimiento de moléculas de la pared bacteriana (lipopolisacáridos,  $\beta$ -glucanos y polisacáridos K), y sustancias producidas por la planta (lectinas y glucoproteínas), poseen gran importancia en la definición de la interacción específica rizobio-planta hospedadora (Oldroyd y Downie, 2008). Una fuerte adhesión de la bacteria a los pelos radicales, favorece una efectiva colonización de la raíz (Figura 3) en unas condiciones donde el acceso a la superficie radical y la presión de la competencia son muy intensas (Gage, 2004).

2) Invasión epidérmica y formación del cordón de infección. La epidermis de la raíz representa la primera barrera en la infección bacteriana. Esta barrera puede ser superada por el rizobio infectivo a través de las heridas de la epidermis, por las que consigue introducirse en la raíz ("crack-entry"); a través de tejido epidérmico intacto (infección intracelular), un proceso común en leguminosas arbóreas; o, principalmente, asociado a los pelos radicales (Aparicio-Tejo *et al.*, 1996; Madsenet *al.*, 2010) (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema de las etapas iniciales de la formación del nódulo. A) Colonización de la raíz por parte de la bacteria y adhesión de la misma a la superficie epidérmica de aquélla. B) Curvatura del pelo radical sobre el foco de infección y acceso de la bacteria al interior de la raíz. C) Formación del cordón de infección; D) Crecimiento del cordón de infección hasta alcanzar el primordio en formación; E) División de las células corticales. (Modificada de Lafuente, 2011).

El primer paso de esta invasión es la curvatura del pelo radical, que envuelve al rizobio y que constituye el punto de acceso al interior de la raíz (Figura 3). Tras la curvatura, y empezando desde el pelo, se forma el cordón de infección. La formación del mismo requiere cambios en el citoesqueleto de las células para crear un túnel transcelular, una invaginación de la pared celular vegetal, capaz de atravesar las fronteras celulares y que permite a la bacteria llegar a la zona cortical (Oldroyd y Downie, 2008) (Figura 3). Los factores Nod inducen la expresión de genes de nodulación temprana en plantas, genes *ENOD*, (Figura 2) que regularán los cambios morfológicos y fisiológicos en la planta, necesarios para la entrada de la bacteria.

3) Respuesta cortical a la infección y desarrollo del nódulo. Coincidiendo con la respuesta epidérmica a la infección bacteriana, en el córtex se activa la división mitótica. Esta división localizada en las células precedidas por el cordón de infección en crecimiento, dará lugar a la formación del primordio nodular (Oldroyd y Downie, 2008) (Figura 3). El cordón de infección crece dentro del primordio en desarrollo, y el rizobio, que viaja a través del cordón mediante divisiones continuas, se libera al interior de las células internas del nódulo como consecuencia de un proceso de endocitosis. Posteriormente, el rizobio y la membrana de origen vegetal que le rodea, sufren una diferenciación hacia una estructura similar a un orgánulo, denominada unidad peribacteroidal o simbiosoma. Dentro del simbiosoma, el rizobio diferenciado o bacteroide, alcanza un estado de plena adaptación a la vida simbiótica. Para ello, han sido necesarios cambios morfológicos, la expresión de la actividad nitrogenasa y citocromos, inexistente en la bacteria de vida libre, e incluso la pérdida de la capacidad de división (Aparicio-Tejo *et al.*, 1996). Es el

bacteroide, situado en el interior de cada simbiosoma, el responsable del proceso de fijación de nitrógeno.

4) Desarrollo del nódulo. El desarrollo del nódulo sigue dos patrones básicos dependiendo de la planta huésped de la que se trate. En las plantas de géneros como *Medicago*, *Pisum* o *Trifolium*, que poseen nódulos de crecimiento indeterminado, el cordón de la infección alcanza las células cercanas al cilindro vascular (córtez interno) y el proceso de infección continúa a lo largo de la existencia del nódulo. Sin embargo, en los géneros con nódulos de crecimiento determinado, como *Lotus*, *Glycine*, *Phaseolus* o *Vigna*, sólo algunas células del córtex externo son infectadas por los cordones de infección, y tanto las células como las bacterias se dividen activamente hasta conformar el nódulo funcional (Figura 2). En ambos casos, sin embargo, la formación de los primeros nódulos inhibe la formación de los nódulos subsiguientes, en un típico proceso de regulación por retro-alimentación negativa ("feedback") (Aparicio-Tejo *et al.*, 1996).

### **1.9. La simbiosis Rizobio-leguminosa como herramienta en rizadorremediación de metales pesados**

Debido a su capacidad para formar órganos especializados en simbiosis con bacterias, en los que se produce la fijación biológica de nitrógeno atmosférico (Gramham y Vance, 2003; de Hoff y Hirsch, 2003), las leguminosas se han utilizado tradicionalmente como un método ecológico para incrementar el contenido de nitrógeno de los suelos ya que su cultivo no precisa de la adición de fertilizantes nitrogenados. Por ello, también se han utilizado en la regeneración de suelos degradados (Requena *et al.*, 2002). Recientemente, y debido a la tolerancia de varios géneros de leguminosas a los metales pesados, se han propuesto también como una herramienta para la descontaminación de suelos.

En los últimos años se han publicado muchos trabajos en los que se propone el uso de leguminosas, en asociación simbiótica con rizobios, como metodología para la recuperación de suelos contaminados (Carrasco *et al.*, 2005; Frérot *et al.*, 2006; Wani *et al.*, 2007a, b; 2008; 2009; Dary *et al.*, 2010; El Aafi *et al.*, 2012).

También es frecuente la utilización de consorcios bacterianos que combinan los rizobios con otros microorganismos rizosféricos con propiedades PGPR ("Plant growth promoting rhizobacteria"). Por ejemplo, se han utilizado *Pseudomonas*, *Ochrobactrum*, *Bacillus*, y bacterias PGPR y hongos micorrízicos simultáneamente (Zhuang *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2009; Dary *et al.*, 2010). Puesto que las leguminosas acumulan concentraciones bajas de metal en la parte aérea y mayor concentración en la raíz, son útiles en fitoestabilización de metales (Frérot *et al.*, 2006, Vázquez *et al.*, 2006; Dary *et al.*, 2010). En cada caso se deberán seleccionar inoculantes que tengan propiedades inmovilizadoras de los metales, ya que lo que se persigue al utilizar leguminosas es inmovilizar el metal y revegetar el suelo contaminado (Méndez y Maier, 2008).

Además, no se debe perder de vista que la ingeniería genética es una herramienta adicional que permite diseñar o incrementar determinadas características en los inoculantes (Doty, 2008; de Lorenzo, 2008). Así, se han obtenido rizobios modificados genéticamente para incrementar la capacidad biorremediadora de la simbiosis (Sriprang *et al.*, 2002; 2003; Ike *et al.*, 2007). Sin embargo, en muchos países, por ejemplo, los europeos, la actual legislación medioambiental no permite la liberación de estos organismos modificados genéticamente.

#### **1.10. Resistencia bacteriana a los metales pesados**

Algunos metales ligeros como Ca, Na, y otros pesados como Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni o Zn juegan un papel fundamental en los procesos vitales de los

microorganismos: son esenciales como micronutrientes, componentes de enzimas, son usados en procesos redox y regulan la presión osmótica. Otros como Cd, Al, Hg o Pb no son esenciales, son tóxicos, se unen a grupos -SH inhibiendo la actividad de muchas enzimas, inhibiendo procesos celulares fundamentales como la transcripción y la traducción, y provocando daños en la membrana y el ADN.

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

La similitud química entre los diferentes metales divalentes (por ejemplo  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  entre los esenciales, pero también  $Cd^{2+}$ ) hace que a veces se transporten metales tóxicos al interior de la célula. También es muy similar la estructura de los oxianiones (por ejemplo el  $CrO_4^{3-}$  recuerda al  $SO_4^{2-}$  y al  $NO_3^-$ , y el  $AsO_4^{3-}$  es similar al  $PO_4^{3-}$ ), por lo que entran en la célula a través de los transportadores de metales esenciales. Como consecuencia de esto, los microorganismos han desarrollado sistemas para mantener la homeostasis de los metales esenciales y mecanismos de detoxificación o resistencia. Los genes microbianos de resistencia a metales pesados están organizados en operones y generalmente localizados en plásmidos. La expresión de estos genes de resistencia está finamente regulada y se induce por la presencia de los metales específicos. Estos mecanismos se basan, fundamentalmente, en bombear el metal hacia el exterior de la célula (mediante proteínas transportadoras específicas), o transformaciones enzimáticas del metal a otra forma química menos tóxica o menos disponible (reacciones redox, metilación, complejación, precipitación, etc.). Ocasionalmente, algunas bacterias pueden bioacumular los metales bien

intracelularmente o extracelularmente (en el espacio periplásmico o la superficie de la pared bacteriana). Algunos microorganismos pueden utilizar varios de estos mecanismos simultáneamente para optimizar su desarrollo en ambientes altamente contaminados.

### 1.11. Resistencia a arsénico en bacterias

La resistencia a As es una característica ampliamente distribuida entre las bacterias. Se han descrito cepas de *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Thiobacillus*, *Ralstonia*, *E. coli*, etc. resistentes a As. La resistencia a este metaloide se observa también en arqueas, aunque existen diferencias entre los genes de éstas y de las bacterias (Jackson y Dugas, 2003), lo que indica que la resistencia a As es un mecanismo antiguo y que ha ocurrido varias veces a lo largo de la evolución bacteriana (Oremland y Stolz, 2003).

El arseniato entra en las bacterias a través de los transportadores de fosfato. El mecanismo de detoxificación está basado generalmente en un sistema inducible para bombear As al exterior y así reducir la concentración intracelular. Este sistema de transporte hacia el exterior es capaz de transportar As (III) pero no As (V), por lo que las bacterias disponen además de la enzima arseniato reductasa, que cataliza la reducción de arseniato a arsenito, utilizando glutatión reducido o tiorredoxina reducida como donadores de electrones. También confiere resistencia a Sb. El arsenito también puede entrar en las células bacterianas vía aguaglicerol-porinas (Oremland y Stolz, 2003).

Los operones de resistencia a As se han encontrado en el cromosoma bacteriano, en plásmidos e incluso en transposones. La resistencia a As está determinada por un operón de 3 ó 5 genes: en bacterias Gram negativas suelen encontrarse operones de 5 genes, mientras que en Gram positivas se encuentran operones de 3 genes (Cervantes et al., 1994). El operón de resistencia a As de ciertas cepas de *E. coli* se localiza en el plásmido pR773, y consta de 5 genes: *arsA*,



*arsB*, *arsC*, *arsD* y *arsR*. *arsA* y *arsB* codifican proteínas que forman una bomba de arsenito, capaz de transportar esta forma del As fuera de la célula acoplado a la hidrólisis de ATP. *arsC* codifica la arseniato reductasa, que reduce As (V) a As (III), utilizando glutatión reducido como donador de electrones. *arsR* es un regulador de la expresión del operón. Además de este operón de resistencia a As plasmídico, otro operón cromosómico está presente en *E. coli*, constituido por tres genes (*arsBCR*). En las bacterias Gram positivas, por ejemplo en *Staphylococcus aureus*, el operón de resistencia a As está formado por tres genes *arsACR*, y localizado en el plásmido pI128 (Bröer *et al.*, 1993). Además, la tiorredoxina reducida es el donador de electrones para la actividad de la enzima arseniato reductasa.

Bacterias capaces de extraer arsénico de sus inmediaciones serían candidatas ideales para biorremediación, pudiendo constituir una alternativa o una ayuda para los métodos físico-químicos ya existentes. Aunque se ha conseguido modificar genéticamente algunos microorganismos (Kostal *et al.*, 2004), todavía no se ha establecido su posible utilidad en la eliminación de arsénico (Takeuchi *et al.*, 2007).

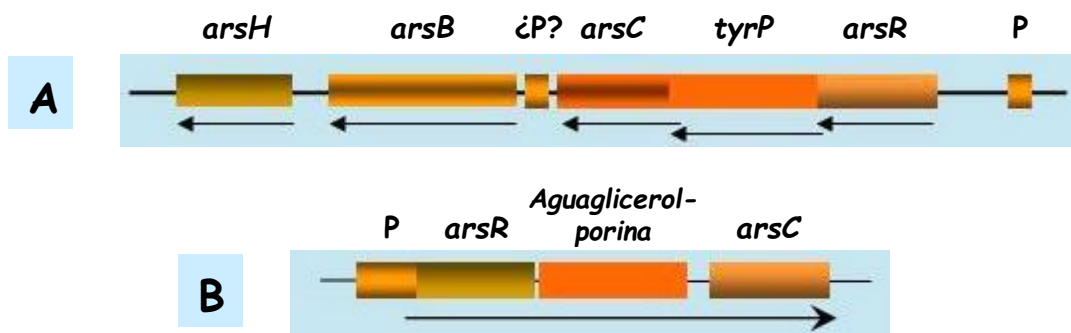
#### **1.12. Mecanismos de resistencia a arsénico en los rizobios**

Para poder utilizar con una base científica la simbiosis Rizobio-leguminosa en la biorremediación de metales pesados, es necesario conocer la tolerancia a As y metales pesados de los rizobios y utilizar cepas de estos con una alta resistencia a dichos contaminantes, pero al mismo tiempo con una elevada capacidad para nodular y fijar nitrógeno, incluso en condiciones de contaminación.

Se han descrito una gran variedad de rizobios resistentes a diversos metales pesados, pertenecientes a diversos géneros y especies, y aislados principalmente de suelos contaminados por metales pesados. Aunque los

mecanismos de resistencia a metales pesados en otros géneros de bacterias se han conocido desde hace tiempo, sólo recientemente se han empezado a dilucidar los genes de resistencia a algunos metales pesados y metaloides en especies de rizobios.

Al igual que en otros géneros bacterianos, el mecanismo de detoxificación de As en *Rhizobium* está basado generalmente en un sistema inducible para bombear As al exterior y así reducir la concentración intracelular. Este sistema de transporte hacia el exterior es capaz de transportar As (III) pero no As (V), por lo que los rizobios disponen además de la enzima arseniato reductasa, que cataliza la reducción de arseniato a arsenito. Basándose en homologías de secuencias se han encontrado genes u operones de resistencia a metales pesados y metaloides en algunos rizobios cuyos genomas se han secuenciado.



**Figura 4.** Esquemas de los operones de resistencia a arsénico de *Ensifermedicae* (A) y *Sinorhizobium meliloti* (B). Aguaglicerol-porina: canal de eflujo de arsenito; *arsB*: bomba de eflujo de arsenito; *arsC*: arseniato reductasa; *arsH*: FMNreductasa dependiente de NADPH; *arsR*: regulador; *P*: Región promotora; *tyrP*: tirosina fosfatasa, probablemente implicada en regulación.

Sin embargo, la demostración de la funcionalidad de los productos génicos está en muchos casos por establecer. Se ha descrito la presencia del gen *arsC* en *Rhizobium leguminosarum*, *Sinorhizobium loti* (Figura 4) y *Mesorhizobium loti* en una colección de aislamientos de suelos mineros (Sá-Pereira *et al.*, 2007). Sin embargo, la presencia de *arsA* acompañando a *arsC* no es general en esta población. La reducción de arseniato a arsenito parece ser un mecanismo general, pero no así

la expulsión del arsenito a través de una bomba con consumo de energía. En este sentido, se ha caracterizado en profundidad el operón de resistencia a As en *Sinorhizobium meliloti* 1021 (Yang et al., 2005). Esta bacteria presenta una baja resistencia a As, comparada con otros géneros, como *Rhizobium* y otras bacterias Gram negativas (Tabla 2). El operón de resistencia a As está compuesto por 3 genes (Figura 4): *arsC*, que codifica una proteína con actividad arseniato reductasa, que reduce arseniato a arsenito; *aqpS*, que codifica una aguaglicerol-porina; y un tercer gen, *arsR*, cuyo producto génico funciona como un regulador transcripcional. La principal diferencia de este operón de resistencia a As con otros previamente descritos, es la presencia de una aguaglicerol-porina en el lugar de un transportador de tipo *arsA*, que es una bomba dependiente de ATP que expulsa activamente el arsenito fuera de la célula. En cambio la aguaglicerol-porina es un canal que expulsa el arsenito, pero no tan eficientemente ni tan selectivamente.

**Tabla 2.** Comparación de la resistencia a As en distintos géneros de bacterias Gram negativas.

Bacteria	AsO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mM)	AsO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mM)	Genes <i>ars</i>	Referencia
<i>Escherichia coli</i> W3110(plásmid o R773)	4	5	<i>arsRDABC</i>	Carlin et al., 1995
<i>Mesorhizobium</i> <i>loti</i>	n.d.	n.d.	<i>arsC, arsA</i>	Sá-Pereira et al., 2007
<i>Ochrobactrum</i> <i>tritici</i> SCII24T	50	200	1. <i>arsRDAB</i> + dominio CBS 2. <i>arsR</i> (2) <i>arsC</i> (2) <i>Acr3arsH</i>	Branco et al., 2008
<i>Pseudomonas</i> sp. As-1	n.d.	65	<i>arsRBC</i>	Patel et al., 2007

<i>Rhizobium</i> p. (vigna)	2,8	n.d.	Sólo se ha identificado <i>arsR</i>	Mandal <i>et al.</i> , 2008
<i>Rhizobium</i> <i>leguminosarum</i>	n.d.	n.d.	<i>arsC</i>	Sá-Pereira <i>et al.</i> , 2007
<i>Ensifer</i> <i>medicae</i> WSM419	10	300	<i>arsHBCRTyrP</i>	Copeland <i>et al.</i> , 2007
<i>Sinorhizobium</i> <i>meliloti</i> 1021	n.d.	40	<i>arsHCRAqpS</i>	Yang <i>et al.</i> , 2005

### 1.13. Efecto de los metales pesados sobre las poblaciones de rizobios

El efecto de la presencia de contaminantes como los metales pesados sobre la nodulación y fijación de nitrógeno ha sido un tema de gran actualidad durante mucho tiempo. Una gran cantidad de trabajos científicos describen la disminución de la efectividad de la nodulación en presencia de metales pesados (Hirsch *et al.*, 1993; Broos *et al.*, 2004; 2005). Tradicionalmente, se había sugerido que las poblaciones de rizobios en suelos contaminados sufrían una gran reducción tanto en el número más probable (NMP) como en su diversidad genética, quedando sólo los rizobios más resistentes a los metales pesados. El NMP disminuye entre 2 y 4 órdenes de magnitud en suelos contaminados por Zn y Cd. Además, la población resultante tras una larga exposición a metales pesados estaba constituida por rizobios inefectivos desde el punto de vista de la fijación de nitrógeno (Chaudriet *et al.*, 1992; Castro *et al.*, 1997; Lakzian *et al.*, 2002; Broos *et al.*, 2004; 2005). La mayor parte de estas conclusiones se obtuvieron estudiando el efecto de la aplicación de metales pesados en poblaciones de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Sin embargo, estudios más recientes de otras especies de rizobios han demostrado una amplia biodiversidad de las poblaciones rizobianas en suelos contaminados, así como el aislamiento de cepas muy efectivas, tanto en nodulación

como en fijación de nitrógeno en estas condiciones. Parece ser que *Rhizobium leguminosarum* es especialmente sensible a la toxicidad de los metales pesados (Gilleret *et al.*, 1993), sin embargo, otras especies de rizobios son más resistentes, como es el caso de *E. medicae* o la recientemente descrita *Mesorhizobium metallidurans*, sp. nova aislada de nódulos de *Anthyllis vulneraria* que crecen en suelos mineros (Vidal *et al.*, 2009).

#### **1.14. Efecto de los metales pesados sobre la interacción Rizobio-leguminosa**

Desde hace tiempo se viene estudiando el efecto de diferentes metales pesados sobre la interacción simbiótica entre las leguminosas y los rizobios. En general, se describe una disminución del número de nódulos en presencia de diferentes metales. Por ejemplo, estudios previos han demostrado que en presencia de As la nodulación de *Vigna mungo* por la cepa VMA301 de *Rhizobium* se ve disminuida (Mandal *et al.*, 2011), al igual que ocurre en el sistema simbiótico *Sinorhizobium meliloti*-*Medicago sativa* donde la nodulación se reduce a la tercera parte (Carrasco *et al.*, 2005). Igualmente, la presencia de Cu, Cd o Hg provoca una disminución en la nodulación de las leguminosas (Ortega-Villasante *et al.*, 2005; Kopittke *et al.*, 2007). Esto se correlaciona con diversos efectos de los metales, como atrofia de los pelos radicales, o disminución de la zona susceptible para el rizobio, ya que se produce un claro acortamiento de la raíz, así como un descenso acusado en el número de infecciones.

Recientemente, nuevas investigaciones han demostrado que las primeras etapas del proceso de nodulación son las que más se afectan por la presencia de los metales pesados y el As. Una vez que se han superado las primeras etapas del proceso de nodulación, éste continúa hasta la formación de nódulos funcionales, si bien en menor número. Una gran parte de los cordones de infección formados en presencia de As abortan dentro del pelo radical, en un estadio muy inicial de su progresión (Pajuelo *et al.*, 2008).

Una vez que se establece la nodulación, la fijación de nitrógeno se ve afectada de diferentes formas, según el metal y por supuesto la concentración de metal utilizada en los estudios (Tabla 2). Por ejemplo, se ha descrito un incremento del estrés oxidativo y de la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS), así como un desequilibrio redox. Además, en nódulos de soja en presencia de aluminio las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa sufren una fuerte inactivación, lo que lleva a un mayor estrés oxidativo.

**Tabla 3.** Efecto de la presencia de metales pesados sobre la nodulación.

Interacción Rizobio-leguminosa	Metal/conc.	Efectos	Referencia
<i>Medicago sativa-Ensifermedicae</i>	As 25 $\mu$ M	Disminución del número de nódulos al 25%. Disminución del número de infecciones al 10%. La fijación de N <sub>2</sub> se afecta poco	Pajuelo <i>et al.</i> , 2008
<i>Glycine max-Bradyrhizobium japonicum</i> 109	Al 50-500 $\mu$ M	Disminución del número de nódulos. Disminución de las enzimas de asimilación de N <sub>2</sub> , pero no de la fijación de N <sub>2</sub> . Incremento estrés oxidativo	Gupta <i>et al.</i> , 2007
<i>Vigna unguiculata-Bradyrhizobium strain</i> CB756	Cu 2 $\mu$ M	Inhibición completa de la nodulación. Acortamiento e hinchamiento de la raíz, disminución de pelos radiculares	Kopittke <i>et al.</i> , 2007
<i>Medicago sativa</i>	Cd 30 $\mu$ M	Estrés oxidativo, necrosis, daño en los pelos radiculares	Ortega-Villasante <i>et al.</i> , 2005
<i>Medicago sativa</i>	Hg 30 $\mu$ M	Estrés oxidativo, necrosis, daño en los pelos radiculares	Ortega-Villasante <i>et al.</i> , 2005
<i>Pisum sativum-Rhizobium leguminosarum</i> RP 5	Cu (1.338 mg/kg de suelo)	Número de nódulos reducido en un 25%. La fijación de N <sub>2</sub> se afecta poco: contenido de nitrógeno en parte aérea disminuido en 20%.	Wani <i>et al.</i> , 2008
<i>Cicer arietinum</i>	Cd (23 mg/kg de	Número de nódulos reducido en un 69,2 %	Wani <i>et al.</i> , 2007

	suelo)		
<i>Cicer arietinum</i>	Pb (390 mg/kg de suelo)	Número de nódulos reducido en un 13,7%	Wani <i>et al.</i> ,2007

También se ha descrito un efecto negativo sobre las enzimas de asimilación de nitrógeno (GDH, GS, GOGAT) en el nódulo en presencia de aluminio, aunque no sobre la leghemoglobina ni sobre la actividad nitrogenasa. Igualmente, la presencia de As, aunque produce una disminución en el número de nódulos, tiene un efecto menor sobre la fijación de nitrógeno y la actividad nitrogenasa (Carrasco *et al.*, 2005; Pajuelo *et al.*, 2008).

La utilización conjunta de plantas y bacterias de la rizosfera mejora la capacidad de biorremediación de metales pesados y de arsénico. La adsorción del compuesto tóxico a la superficie de las bacterias rizosféricas, la acumulación, por diferentes vías, de los contaminantes dentro de las bacterias, la unión a péptidos u otras moléculas complejantes o la secreción de sustancias por parte de las bacterias que ayuden a la inmovilización de los metales, pueden ser mecanismos que eviten la acumulación de los metales en los tejidos de la planta a la vez que constituyen procesos importantes desde el punto de vista de la inmovilización de los contaminantes.

Por otra parte, el efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas en condiciones de estrés por metales pesados y arsénico mejora la cobertura vegetal de suelos contaminados y degradados. Para poder llevar a cabo esta estrategia es necesario seleccionar rizobios resistentes a metales pesados de la propia zona contaminada, de la rizosfera de leguminosas de esa zona, para asegurar su competitividad y la supervivencia del inóculo.

Teniendo en cuenta que las leguminosas acumulan estos compuestos tóxicos principalmente en las raíces, siendo pobre la translocación a la parte aérea de las plantas, su utilización preferente sería como fitoestabilizadoras de metales.

La inoculación de leguminosas con bacterias resistentes a metales pesados o arsénico parece una tecnología adecuada para su utilización en la fitoestabilización de estos elementos en el suelo, permitiendo la revegetación de zonas contaminadas (Mandal *et al.*, 2011; Pajuelo *et al.*, 2011). Para ello, sería necesario disponer de inoculantes eficientes desde el punto de vista de la biorremediación y adaptados a las condiciones de cada suelo (Pajuelo *et al.*, 2011). Por ejemplo, rizobios resistentes a elevadas concentraciones de arsénico que nodularan eficientemente su leguminosa específica manteniendo intacta su capacidad fijadora de nitrógeno.



## 2. OBJETIVOS

El Objetivo general de la Tesis es el desarrollo de una herramienta útil para la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados, aprovechando las interacciones simbióticas entre plantas leguminosas y bacterias rizosféricas.

Para conseguir este objetivo general, se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

1. Comprobar el efecto de algunos metales pesados sobre la interacción simbiótica *Rhizobium*-leguminosa.
2. Estudiar *in vitro* el efecto fitotóxico del arsénico sobre la nodulación de alfalfa (*Medicago sativa*) por la bacteria *Sinorhizobium* sp. MA11 (*Ensifer medicae* MA11), marcada con el gen *lacZ*, en comparación con la cepa de referencia *Sinorhizobium meliloti* 1021 (*Ensifer meliloti* 1021).
3. Valorar el efecto de la co-inoculación de *Rhizobium* junto a otras bacterias rizosféricas en el aumento de la biomasa vegetal y la nodulación en las leguminosas, a través de experimentos *in situ* realizados en suelos contaminados con metales pesados.
4. Evaluar la acumulación de metales pesados en tejidos de *Lupinus luteus* y su capacidad para la fitoestabilización *in situ*, cuando estas plantas se asocian a rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) autóctonas y resistentes a metales pesados, en un suelo contaminado por el vertido tóxico de la mina de Aznalcóllar (Sevilla).
5. Determinar la resistencia a metales pesados de la cepa *Ochrobactrum cytisi* Azn6.2 y su potencial en la bioadsorción y/o bioacumulación de cadmio.

6. Analizar la rizo-estabilización de metales en suelos mediante la utilización de plantas de *Lupinus luteus* inoculadas con la rizobacteria multirresistente a metales pesados *Serratia* sp. MSMC541.

### 3. PUBLICACIONES

- 3.1. Toxic effects of arsenic on *Sinorhizobium-Medicago sativa* symbiotic interaction.
- 3.2. In situ phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria.
- 3.3. Cadmium biosorption properties of the metal-resistant *Ochrobactrum cytisi* Azn6.2.
- 3.4. Rhizostabilization of metals in soils using *Lupinus luteus* inoculated with the metal resistant rhizobacterium *Serratia* sp. MSMC541.
- 3.5. Changing concepts on nitrogen fixing symbionts: *Ochrobactrum* sp., a nitrogen fixing  $\alpha$ -proteobacteria with bioremediation capability.
- 3.6. Biorhizoremediation of heavy metals toxicity using *Rhizobium*-legume symbioses.



## Toxic effects of arsenic on *Sinorhizobium*–*Medicago sativa* symbiotic interaction

Eloísa Pajuelo, Ignacio D. Rodríguez-Llorente\*, Mohammed Dary, Antonio J. Palomares<sup>1</sup>

Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Seville, 41012 Seville, Spain

Received 2 May 2007; received in revised form 27 September 2007; accepted 7 October 2007

*First steps of nodulation of alfalfa, in particular infection thread formation, are more sensitive to As than nitrogen fixation due to plant effects.*

### Abstract

Recently, the *Rhizobium*–legume symbiotic interaction has been proposed as an interesting tool in bioremediation. However, little is known about the effect of most common contaminants on this process. The phytotoxic effects of arsenic on nodulation of *Medicago sativa* have been examined *in vitro* using the highly arsenic resistant and symbiotically effective *Sinorhizobium* sp. strain MA11. The bacteria were able to grow on plates containing As concentrations as high as 10 mM. Nevertheless, as little as 25–35  $\mu$ M arsenite produced a 75% decrease in the total number of nodules, due to a 90% reduction in the number of rhizobial infections, as could be determined using the strain MA11 carrying a *lacZ* reporter gene. This effect was associated to root hair damage and a shorter infective root zone. However, once nodulation was established nodule development seemed to continue normally, although earlier senescence could be observed in nodules of arsenic-grown plants.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Alfalfa; Arsenic; Legumes; Nodulation; Phytotoxicity; *Sinorhizobium*

### 1. Introduction

Arsenic occurs naturally in the earth's surface and is widely distributed in the environment. Natural mineralization and activities of microorganisms enhance arsenic mobilization in the environment, but due to human intervention arsenic toxicity has become a global concern owing to the increasing contamination of water, soil and crops in many regions of the world (Duker et al., 2005). Environmental contamination with arsenic is mainly associated with mining and smelting activities, but arsenic is also used in a wide variety of industrial applications, from computers to fireworks (Jones, 2006). Although arsenic is useful for agricultural, medicinal or industrial

purposes, it exerts toxic effects for a variety of organisms, including humans.

Since arsenic, like heavy metals, cannot be destroyed, the pollution by this element can only be envisioned as their sequestration in a non-bioavailable form or their conversion into less toxic forms. Phytoremediation has emerged as a promising coremediation technology, which uses plants and their associated rhizosphere microorganisms to remove pollutants from contaminated environments (Kuiper et al., 2004; Pilon-Smits, 2005). Anthropogenically polluted soils often contain low levels of organic matter, and hence plant growth on such soils is often limited by nitrogen deficiency. Thus, revegetation strategies often utilise leguminous species to improve the soil's nitrogen content. The *Rhizobium*–legume interaction is a process that allows the growth of the plant in the absence of externally supplied nitrogen. This is a well-studied agronomical important process that is also used as a model to study general genetic aspects of plant–microbe interactions (Graham and

\* Corresponding author. Tel./fax: +34 954556924.

E-mail address: [irodri@us.es](mailto:irodri@us.es) (I.D. Rodríguez-Llorente).

<sup>1</sup> In memoriam.

Vance, 2003; Stacey et al., 2006). Recently, an increasing interest has risen on the use of legume plants associated with microorganisms for bioremediation of both, metals (Carrasco et al., 2005; Pastor et al., 2003; Sriprang et al., 2002) and organic pollutants (Barac et al., 2004). This system presents several advantages: (i) use of microorganisms, the major factor affecting metals solubility, bioavailability and mobility; (ii) use of plants, legumes (usually one of the first colonizers of poor or degraded soils, with varieties adapted to very different environments) for phytoremediation and (iii) use of the *Rhizobium*–legume symbiotic interaction as an efficient nitrogen soil improvement system. The combination of two approaches, phytoremediation and bioaugmentation, resulting in rhizoremediation, in which exudates derived from the plant, can help to stimulate the survival and action of bacteria, results in a more efficient degradation of pollutants (Glick, 2004; Kuiper et al., 2004; Zhuang et al., 2007).

Our aim is to develop a *Rhizobium*–legume system useful for bioremediation of contaminated soils. In order to use legumes for soil bioremediation or improvement, it is important to determine the effect of soil contaminants in the symbiotic interaction, but as far as we know only the toxic effects of low concentrations of Al (Brady et al., 1990; de Carvalho et al., 1982) and Cu (Kopittke et al., 2007) on nodulation have received some attention. In a previous work (Carrasco et al., 2005) we isolated around 100 strains from nodules and rhizosphere of native legumes grown on contaminated soils of the Guadiamar and Agrio riverbeds (Grimalt et al., 1999). The level of contamination by arsenic in these soils ranged from 100 to 500 ppm (Carrasco et al., 2005). Forty-one strains were selected on the base of their levels of heavy metal tolerance (Carrasco et al., 2005). Twenty-three strains (62%) were either isolated from nodules of *Medicago* sp. native plants, or being isolated from soil were able to nodulate alfalfa, thus suggesting that they belong to genus *Sinorhizobium*. One of the strains isolated from nodules of *Medicago* native plants was named *Sinorhizobium* sp. MA11. We have shown in this work that this strain is highly resistant to As and symbiotically effective. Furthermore, we have examined *in vitro* the phytotoxic effects of arsenic on nodulation of alfalfa (*Medicago sativa* L. ecotype Aragon) using the strain MA11 labelled with a *lacZ* reporter gene. A comparison has been established with the reference strain *Sinorhizobium meliloti* 1021, for which nodulation has been widely studied (Gage, 2004).

## 2. Methods

### 2.1. Isolation of *Sinorhizobium* sp. MA11

The strain MA11 was isolated from nodules of native *Medicago* sp. plants grown on soils contaminated by As and heavy metals after a toxic mine spill (Grimalt et al., 1999). The isolation protocol is described in Carrasco et al. (2005).

### 2.2. As sensitivity

The sensitivity of *Sinorhizobium* sp. MA11 strain and the control strains *S. meliloti* 1021 and Ism6 to As was determined by growth inhibition plate

assays in TY medium (Vincent, 1970) and in Bergersen minimal medium (Bergersen, 1961) containing 0.5–12 mM concentration series of arsenite ( $\text{NaAsO}_2$ ). Plates were incubated at 28 °C. Growth was scored after 48–72 h and was monitored for additional 72 h. The parameter used to evaluate the levels of resistance was the maximum tolerable concentration (MTC), which is the highest concentration of metal, which does not affect the viable count.

### 2.3. Growth of *Sinorhizobium* sp. MA11 in TY liquid medium containing As

Culture flasks of 25 ml containing sodium arsenite at concentrations 0, 6 and 8 mM were inoculated with 25  $\mu\text{l}$  of an overnight culture of *Sinorhizobium* sp. MA11 or *S. meliloti* 1021 or Ism6 as control (optical density at 600 nm is 0.8). Cultures were incubated in an orbital shaker at 200 rpm and 28 °C. Optical density at 600 nm was monitored for a period of 72 h.

### 2.4. Nodulation assays in Leonard jars

In order to get maximal nodulation efficiency, nodulation assays of *Sinorhizobium* sp. MA11 and *S. meliloti* strains 1021 and Ism6 were done in Leonard jars according to Serrano and Chamber (1990). Seeds of alfalfa (*M. sativa* L. ecotype Aragon) were surface sterilised on 70% ethanol for 10 min and exhaustively washed on distilled water. Seeds were potted in Leonard jars containing plant growth solution inoculated with the strains MA11 and 1021 or Ism6 as controls. A negative control without inoculation was also performed. Plants were cultivated in the greenhouse for two months. After this period, plants were harvested; shoots were excised and weighed, then dried at 60 °C for nitrogen content determination. Whole roots with nodules were used for nitrogenase activity determination, and afterwards nodules were counted. Determination of nitrogenase activity was done as described by Carrasco et al. (2005).

### 2.5. Construction of *Sinorhizobium* sp. MA11 (*lacZ*) as a marker for the nodulation process in the presence of As

*Sinorhizobium* sp. MA11 was electroporated using a Biorad *Escherichia coli* pulser electroporator. Electrocompetent cells were prepared according to the instructions of the manufacturer. The plasmid containing the *hemaA::lacZ* reporter gene fusion (Wopereis et al., 2000) was electroporated into competent cells at 1.8 kV for 3.8 ms. Cells were plated on TY medium containing tetracycline (5  $\mu\text{g/ml}$ ) and grown for 48 h at 28 °C. Individual colonies were stricken out on TY plates containing tetracycline (5  $\mu\text{g/ml}$ ) and X-gal (40  $\mu\text{g/ml}$ ) for selection of blue colonies.

### 2.6. Competitive assays in soil

Previously, we have evaluated the correlation between optical density (OD) at 600 nm and number of viable cells in cultures of *Sinorhizobium* sp. MA11 (*lacZ*) and *S. meliloti* 1021 at exponential growth in liquid medium, resulting in a double number of cells for 1021 compared with MA11 (OD = 0.4). Seeds of *M. sativa* were sterilised as previously described and potted in pots containing a sterilised mix of peat:sand:perlite (60:20:20) and 25 ppm As or without arsenic (control). Seeds were inoculated with a mix of *S. meliloti* MA11 (*lacZ*) and *S. meliloti* 1021 in the proportions 1:1 or 1:10. The 1:1 ratio is the most commonly used in competitive experiments, however we wanted to test the competitiveness of our strain in very unfavourable conditions so we used the 1:10 ratio. Every pot was placed in the green house on an independent tray, in order to avoid mix of As or bacteria, and watered every two days with 50 ml sterile distilled water. One month after inoculation plants were harvested, roots excised and total number of nodules counted. Whole roots with nodules were incubated with 0.2 M sodium phosphate buffer containing 1.5% formaldehyde for 10 min, and washed twice with 0.2 M sodium phosphate buffer. X-gal was added at 5  $\mu\text{g/ml}$  final concentration, and roots were incubated overnight at room temperature. Roots were cleared in 5% sodium hypochlorite and washed twice with water. Blue nodules (corresponding to nodulation by *Sinorhizobium* sp. MA11 (*lacZ*))

and white nodules (corresponding to nodulation by *S. meliloti* 1021) were counted in the presence or absence of As.

### 2.7. Microscopy of nodulation in the presence of As

Seeds of alfalfa (*M. sativa* L. ecotype, Aragon) were surface sterilised on 70% ethanol for 10 min, exhaustively washed on distilled water and placed in water-agar plates without As or supplemented with 12.5, 25, 30, 35 and 40  $\mu$ M sodium arsenite for 36 h at 22 °C in the dark. 0.5–1 cm root pre-germinated seedlings were carefully transferred to squared plates containing a slope of BNM-agar medium (Ehrhardt et al., 1992) containing concentration series of 12.5, 25, 30, 35 and 40  $\mu$ M sodium arsenite or without arsenite (control). Seedlings were inoculated with 100  $\mu$ l of an overnight culture of *Sinorhizobium* sp. MA11 (*lacZ*) or *S. meliloti* 1021 as control. Previously the optical density of both cultures at 600 nm was measured, and the dilution adjusted for the same number of c.f.u./ml, as indicated in next section. The lower part of the plate was covered with black paper in order to avoid the roots getting exposed to light. Plates were placed on an Ibercex G-28 plant growth cabinet at 22 °C with 16 h photoperiod. Plants (two plates containing 10 plants in every condition) were taken out of the plates at 3, 6, 10 and 28 days post-inoculation (dpi) for nodule counting and *lacZ* staining. Nodules were counted (at 10 and 28 dpi) and roots were excised and fixed in 1.5% formaldehyde in 0.2 M sodium phosphate buffer pH 7.2 for 10 min. After washing several times in 0.2 M sodium phosphate buffer pH 7.2, X-gal was added at 5  $\mu$ g/ml. After incubation overnight in the presence of X-gal, roots were cleared in 5% sodium hypochlorite for 15 min and washed with water. Stained roots were visualised by brightfield or darkfield microscopy using an Olympus BX41 microscope provided with an Olympus DP70 camera. Number of infections was counted at 3 and 6 days in 10 plants, five of each from a different plate. Number of nodules and primordia were counted for 20 plants at 10 and 28 dpi.

### 2.8. Statistical treatment

Statistical treatment of data was done using the software SPSS (1999) for Windows. Results of N-content in shoots of plants and nitrogenase activity are given as means of three independent replicates  $\pm$  standard deviations. Data of number of nodules, root length and trifolii number in the presence and in the absence of As are means  $\pm$  standard deviations of 20 plants (5 plants  $\times$  4 plates: 10 plants were grown in squared plates and only 5 central plants were counted). Competitive assays were done in triplicate. Data are means  $\pm$  standard deviations.

## 3. Results

### 3.1. Isolation and identification of *Sinorhizobium* sp. MA11 strain

The MA11 strain was isolated from nodules of native *Medicago* plants grown at the Guadamar and Agrio river valleys contaminated soils, close to the Aznalcóllar mine (Spain) affected by a toxic spill in 1998 (Grimalt et al., 1999), as described by Carrasco et al. (2005). Three different experiments were done to confirm that MA11 strain was a *Rhizobium*: (i) the strain was checked again for nodulation using *M. sativa* as host plant and functional nodules were formed (not shown), (ii) the presence of *nodC* gene was confirmed by PCR amplification as described in Carrasco et al. (2005) (not shown) and (iii) the 16S rDNA was amplified and partially sequenced (acc. no. EF587908). The sequence of a 1477 bp fragment showed a 99% identity with *S. meliloti* (*Ensifer meliloti*) and *Sinorhizobium medicae* (*Ensifer medicae*). The strain was called *Sinorhizobium* sp. MA11.

### 3.2. Characterisation of *Sinorhizobium* sp. MA11 resistance to As

In this work, we wanted to compare the level of resistance to As of our resistant strain *Sinorhizobium* sp. MA11 with that of the model *S. meliloti* 1021 in order to establish a basic level of resistance to As in a strain well known in all laboratories working with *Sinorhizobium*. Recently, an arsenic detoxification operon has been described for *S. meliloti* 1021 (Yang et al., 2005). In this comparison, we have also included the agricultural inoculant strain *S. meliloti* Ism6. When grown on TY or minimal media-agar plates supplemented with arsenic, *Sinorhizobium* sp. MA11 was able to grow at 10 mM As, whereas *S. meliloti* 1021 and Ism6 were only able to grow at 0.8 and 1 mM, respectively. On the other hand, the aspect of the strains were very different, being MA11 much more mucous; even in the presence of high concentrations of As the production of polysaccharide was very abundant (data not shown).

We wanted also to study the effect of the presence of As at high concentration on the growth of the strain MA11 in liquid medium. The growth curve of MA11 in the presence of 6 and 8 mM As in TY medium is shown in Fig. 1. The reference *S. meliloti* strains 1021 and Ism6 were used as control. In the case of MA11, at 6 mM As there was a lag phase of 24 h followed by a logarithmic growth, finally reaching the same optical density at 600 nm than the control curve in the absence of arsenic. At 8 mM As the lag period extended for 30 h and final density did not reach the maximal level, thus suggesting that the resistance in liquid medium was probably reaching the top. On the contrary, the control strains *S. meliloti* 1021 and Ism6 were unable to grow at 6 mM As.

### 3.3. Symbiotic properties of *Sinorhizobium* sp. MA11 and *S. meliloti* 1021 and Ism6

The nodulation and nitrogen fixation properties of the *Sinorhizobium* sp. MA 11 strain resistant to arsenic have been evaluated determining parameters such as number of nodules, shoot biomass, nitrogen content and nitrogenase activity compared to plants inoculated with control strains *S. meliloti* 1021 and Ism6 and to non-inoculated plants (Table 1). Shoot biomass and nitrogen content could be taken as indication of nitrogen provided to the plant via nitrogen fixation in nodules, since no external nitrogen supply was added. Plants inoculated with the strain MA11 showed a 7-fold increase in shoot biomass and 3-fold increase in nitrogen content compared with non-inoculated plants, indicating the nitrogen fixation efficiency of MA11 (Table 1). These values were comparable or even better than those of control strains, even the agricultural inoculant. It could be concluded that MA11 combines a high arsenic resistance with very good symbiotic properties compared with the control strains 1021 and Ism6.

### 3.4. Competitiveness of *Sinorhizobium* sp. MA11 vs. *S. meliloti* 1021

A competitive assay has been performed as described in Materials and Methods in order to test the behaviour of both

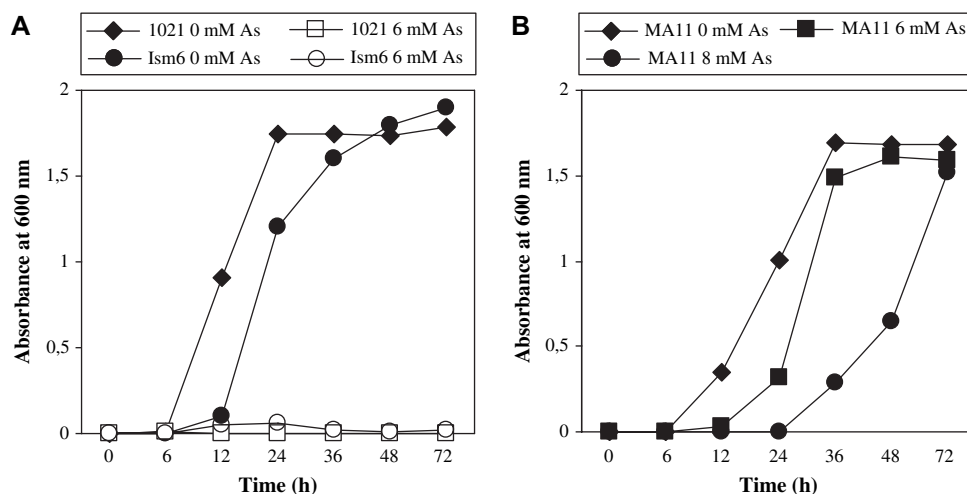


Fig. 1. Growth of *Sinorhizobium* sp. MA11 in liquid medium in the presence of arsenic. (A) Growth of *S. meliloti* 1021 and Ism6 control strains on TY liquid medium without As or containing 6 mM sodium arsenite. (B) Growth of MA11 in the presence of 6 and 8 mM sodium arsenite and in absence of As. Growth in liquid medium (optical density at 600 nm) was monitored for a total period of 72 h.

strains when inoculated together in the absence or the presence of As. Results from this experiment are shown in Table 2 and Fig. 2. In the absence of As the number of nodules formed by *Sinorhizobium* sp. MA11 was 220% compared to those formed by *S. meliloti* 1021 when inoculated together at a ratio 1:1. A typical root observed when inoculated both strains together is shown in Fig. 2A, where four blue nodules corresponding to occupancy by MA11 could be seen, and only one white nodule, infected by 1021. Even when inoculated at ratio MA11:1021 (1:10), the number of blue nodules exceeded white nodules by 140%. In the presence of 25 ppm As in soil, the total number of nodules formed per plant diminished. However, the number of nodules formed by MA11 was higher than those formed by 1021, both in the absence (140%) or the presence (110%) of As in the soil. Even when inoculated at ratio MA11:1021 1:10, still there were more blue nodules (formed by MA11) than white nodules (110%). Taken together, all these results indicate a higher competitiveness of the As-resistant MA11 strain.

### 3.5. Effect of arsenic in the *M. sativa* nodulation and growth

Experiments were performed using concentrations of As 12.5, 25, 30, 35 and 40  $\mu\text{M}$ . Ninety percent of seed germination

Table 1  
Symbiotic properties of *Sinorhizobium* sp. MA11 and *S. meliloti* 1021 and Ism6 strains

Inoculant	Number of plants	Nodules per plant	Shoot fresh weight (g) per plant	Nitrogen content in shoots (%)	$\text{N}_2$ -ase activity ( $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ plant}^{-1}$ )
MA11	24	11.2	0.240	3.70	3.880
1021	22	12.1	0.190	3.13	2.780
Ism6	23	12.0	0.255	2.24	3.210
N.i.	35	0	0.035	1.33	0

N.i. = non-inoculated.

was observed at 12.5, 25, 30 or 35  $\mu\text{M}$  As, whereas 40  $\mu\text{M}$  sodium arsenite produced a 60% inhibition in seed germination. No effect on nodulation or growth was observed at 12.5  $\mu\text{M}$  As, and no nodulation and severe toxicity symptoms were observed at 40  $\mu\text{M}$  (not shown). Similar results were observed at 25, 30 and 35  $\mu\text{M}$  As. Results of plant grown at 25  $\mu\text{M}$  As are presented in this and the following section.

Results were recorded 3, 6, 10 and 28 days post-inoculation (dpi) with the MA11 strain (Fig. 3). We could observe that plant growth was affected by the presence of arsenic, both in root length as well as in shoots, although root growth inhibition was more obvious, specially the first days (Fig. 3A, B). Concerning shoot growth, it was also significant that first trifolium developed around 18 dpi in plants grown on arsenic and only 5–6 dpi in control plants.

Concerning nodulation the number of rhizobial infections was determined by microscopic analysis. Infection threads were counted after staining of the roots. A 90% reduction in the number of infections was observed in plants grown on presence of As (Fig. 3). First nodules appeared 10 dpi both in control and in As-grown plants, although at very different frequency. We could observe a 75% reduction in the number of nodules and primordia at 10 and 28 dpi in plants grown in the presence of As (Fig. 3C, D).

A similar study performed with *S. meliloti* 1021 indicated a slightly lower nodulation by this strain in the presence of

Table 2  
Competitive assay of *Sinorhizobium* sp. MA11 vs. *S. meliloti* 1021 in the absence or the presence of As (25 ppm)

Inoculant	As (ppm)	Blue nodules in 10 plants	White nodules in 10 plants	Ratio blue:white nodules
MA11: 1021 (1:1)	0	20.6 $\pm$ 4.1	9.6 $\pm$ 4.9	2.1
	25 ppm	6.3 $\pm$ 2.5	4.3 $\pm$ 1.5	1.4
MA11:1021 (1:10)	0	19.8 $\pm$ 3.5	12.5 $\pm$ 2.3	1.6
	25 ppm	8.3 $\pm$ 4.0	7.3 $\pm$ 4.1	1.1



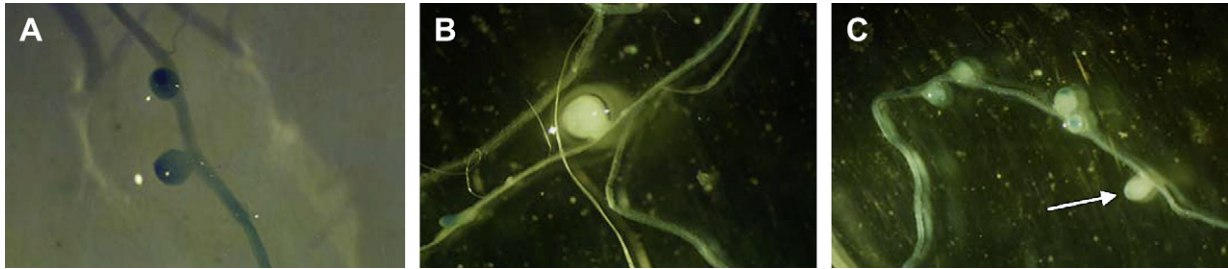


Fig. 2. Competitive assay of *Sinorhizobium* sp. MA11 (*lacZ*) vs. *S. meliloti* 1021. (A) Blue nodules due to infection by *Sinorhizobium* sp. MA11 (*lacZ*). (B) White nodule due to infection by *S. meliloti* 1021. (C) Competitive assay. Root showing four blue nodules and one white nodule (indicated by arrow).

As (0.5 nodules per plant in average, compared to 0.7 nodules per plant formed by MA11) and similar results in plant growth parameters (Fig. 3E, F). Since *S. meliloti* 1021 was able to grow on plates containing 0.8 mM As, the survival of this strain was not affected by As concentrations used in these experiments.

3.6. Detailed microscopic analysis of the effect of As in the *M. sativa*–*Sinorhizobium* symbiotic interaction

A detailed microscopic study of nodulation has been conducted using the arsenic resistant strain *Sinorhizobium* sp.

MA11 carrying *hemA::lacZ* reporter gene fusion, both in the presence and absence of As in the culture medium. Also the aspect of the roots was observed, looking for damage caused by the presence of As in root tissues or in root hairs (Fig. 4).

Roots showed deep symptoms of necrosis already 3 dpi (Fig. 4D). Also root hairs looked damaged by the presence of As, showing deformities specially at the root hair tips (Fig. 4B, C), compared to root hairs in the absence of As, which looked straight (Fig. 4A). Infection threads were seen 3 dpi both in the absence (Fig. 4E) and, at a lower frequency, in the presence of As (Fig 4F). At 6 dpi nodule primordia were

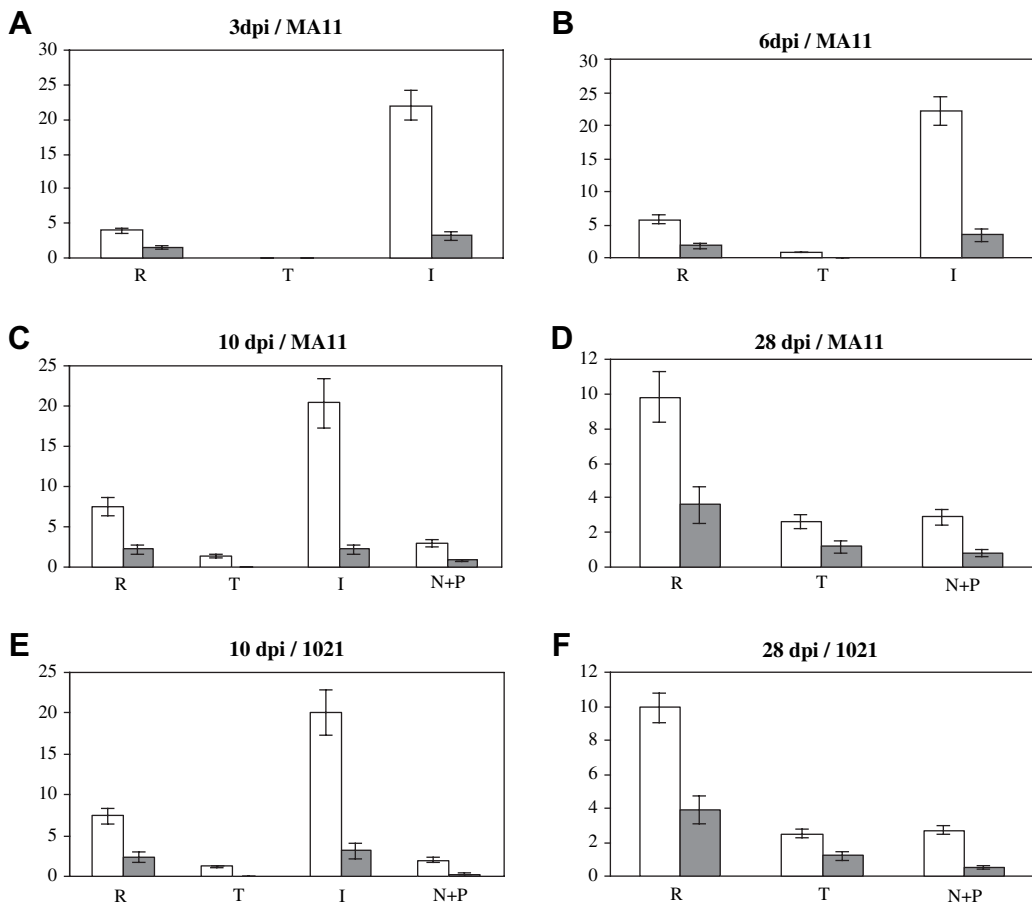


Fig. 3. Effect of the presence of arsenic on plant growth and nodule features during the symbiotic association *Sinorhizobium*–*M. sativa* using *Sinorhizobium* sp. MA11 (3, 6, 10 and 28 days post-inoculation, dpi; A–D) and *S. meliloti* 1021 (10 and 28 dpi; E and F). R: root length (cm); T: number of trifolii; I: number of rhizobial infections; N + P: number of nodules plus primordia. White bars: without As; dark bars: 25 μM As.

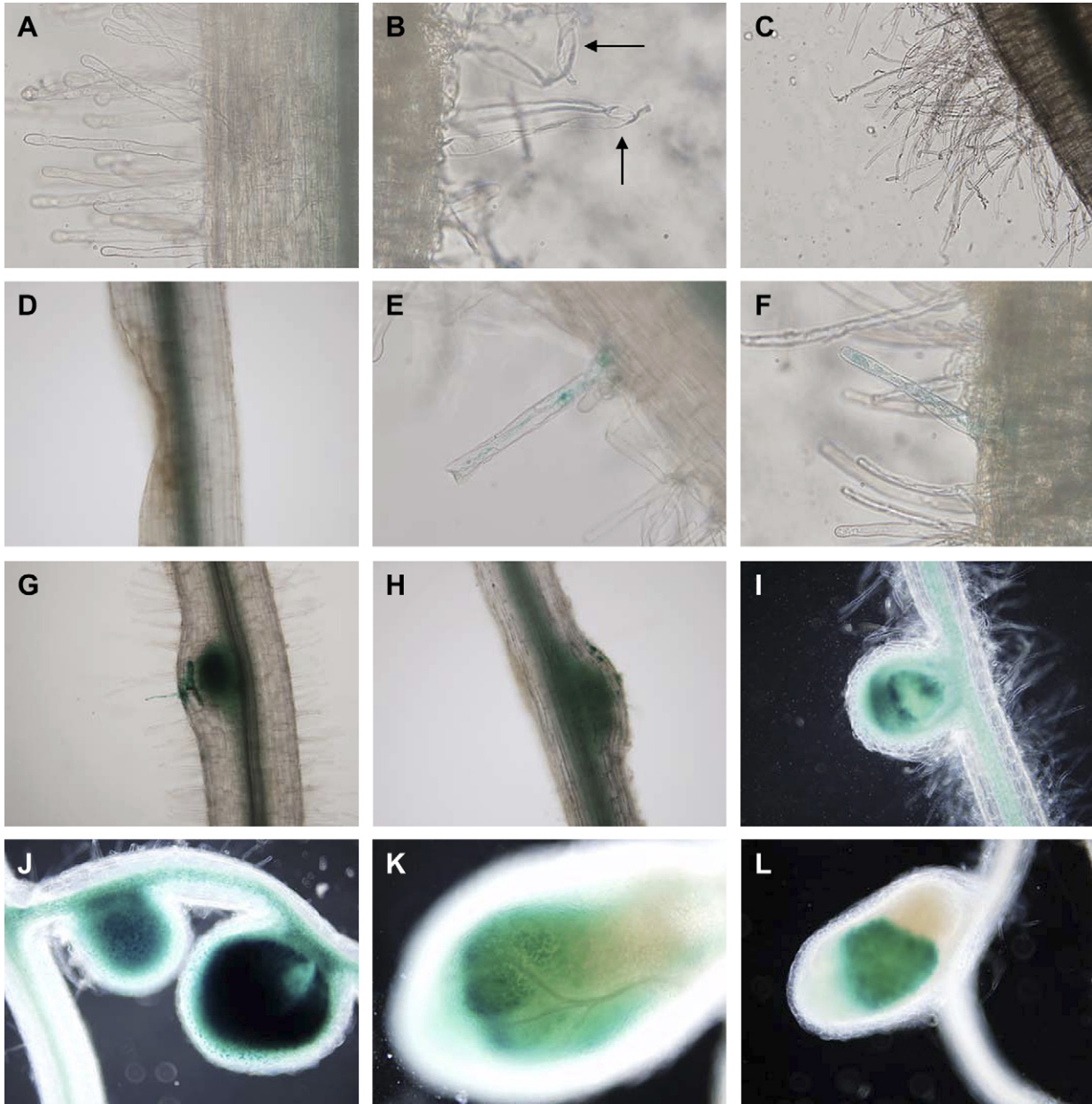


Fig. 4. Effect of arsenic in alfalfa nodule development. Alfalfa plants were inoculated with *Sinorhizobium* sp. MA11 (*hema::lacZ*) both in the absence (control) or in the presence of 25  $\mu$ M As. Plants were harvested at 3, 6, 10 and 28 dpi for microscopic observation of nodule development after  $\beta$ -galactosidase staining. (A) Aspect of root hairs in control plants (3 dpi). (B and C) Aspect of root hairs in As-grown plants (3 dpi). Root hairs tip are specially affected (arrows). (D) Necrotic zone in a root grown in the presence of As (3 dpi). (E) Infection thread (blue) growing through a root hair in a control plant (6 dpi). (F) Infection thread (blue) growing through a root hair in an As-grown plant (6 dpi). (G) Nodule primordia in control plant at 6 dpi. (H) Nodule primordia in As-grown plant at 6 dpi (note the difference in root hairs number compared to G). (I) Young nodule (still non-fixing) in control plant at 10 dpi. (J) Young white nodules in As-grown plant (10 dpi). (K) Mature fixing nodule (28 dpi) in control plant (note the  $\beta$ -galactosidase staining in almost all the nodule zones). (L) Mature fixing nodule (28 dpi) in the presence of As (note the big senescence zone without  $\beta$ -galactosidase staining).

observed, being primordia in the presence of As (Fig. 4H) more developed than those found in the absence of As (Fig. 4G). Notice the diminution in the number of root hairs in the presence of As (Fig. 4G vs. H). Furthermore, differences on nodule development can be seen between both conditions. At 10 dpi  $\beta$ -galactosidase staining revealed nodule occupancy by MA11 bacteroids both in the absence or the presence of As, with a very dark staining of  $\beta$ -galactosidase activity in the last case (Fig. 4J). A dense staining was

distributed through all the infected zone of mature nodules (28 dpi) found on control plants, with a darker staining in the pre-infection zone (zone II) containing cells that were being infected (Fig. 4K).  $\beta$ -galactosidase staining was many times localized in the prefixation and nitrogen fixation zones (II–III) of the mature nodules of As-grown plants (Fig. 4L), whereas no staining was detected in the proximal zone of the nodule (senescence zone IV), suggesting that this zone may be no longer functional in nitrogen fixation. These results

could be taken as indication of a faster development as well as an earlier senescence in As-nodules compared to control nodules, which did not show an apparent senescence zone at 28 dpi.

#### 4. Discussion

Plant–microbe interactions have been proposed to increase the bioremediation capacity of plants (Glick, 2004; Kuiper et al., 2004; Zhuang et al., 2007). Legumes, in association with different bacteria such as *Rhizobium* sp. and *Burkholderia cepacia*, are receiving increasing attention to be used in bioremediation of both, metals (Carrasco et al., 2005; Ike et al., 2007; Pastor et al., 2003; Sriprang et al., 2002) and organics (Barac et al., 2004). Recently, we have proposed the use of the *Rhizobium*–legume symbiotic interaction as a tool for bioremediation of As and heavy metals in soils (Carrasco et al., 2005). In future research we plan to study the use of legumes for phytoextraction and/or phytostabilisation. Since an additional important feature of using legumes as remediative plants is their ability to form nitrogen-fixing nodules in association with *Rhizobium*, a previous knowledge of the effect of contaminants in the symbiotic interaction is needed. In this work the effect of As, a widespread contaminant of waters and soils, on nodulation has been approached for the first time.

It is important to notice that contamination of soils not only affects legumes growth but also microbial survival, especially in the absence of the host plant (Broos et al., 2004, 2005; Chaudri et al., 1992). In this work we have used the *Sinorhizobium* sp. strain MA11, able to grow at 10 mM As. This MTC is more than 10 times higher than the concentration tolerated by control or agricultural strains and similar to the highest resistance found in other proteobacteria isolated from arsenic-contaminated soils (Anderson and Cook, 2004). In addition, MA11 strain was able to form a normal number of functional nodules on alfalfa plants, compared to the reference strains. Furthermore, this strain has proved to be more competitive than a non-resistant strain (*S. meliloti* 1021), both without As and in the presence of As, suggesting that this strain could be useful for field experiments in contaminated soils. Our results in nitrogen fixation of the As-resistant strain *Sinorhizobium* sp. MA11 clearly contrast with some previous reports of non-symbiotically effective *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* populations surviving in soils polluted by toxic metals (Castro et al., 1997; Chaudri et al., 1992; Giller et al., 1989). Nevertheless, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* has been reported to show a higher sensitivity to the presence of heavy metals than *S. meliloti* (Giller et al., 1993).

In addition, the use of MA11 labelled with the *lacZ* reporter gene allowed us to *in vivo* monitor the infection process in detail. Relatively low As concentrations produced a drastic reduction in nodule number. However, once nodulation is established, nodule development occurs normally, nodules were pink and functional. Furthermore, an earlier senescence in nodules of plants grown on As could be seen. Early nodule senescence is known to occur in legume plants under stress conditions, probably related to the presence of reactive oxygen

species (ROS) (Puppo et al., 2005). A more detailed microscopic study has revealed a decreased in the number of root hair infections on plants grown in presence of As. Although we have seen normal attachment of bacteria to root hairs, there was also a drastic reduction in the number of infection threads. The roots of As-grown plants showed very deep symptoms of toxicity, such as inhibition of root growth, necrosis and root hair damage. The induction of root hair damage by some heavy metals in legumes and/or the effect of these metals on nodulation have been reported for Al (Brady et al., 1990; de Carvalho et al., 1981, 1982), Cu (Kopittke et al., 2007) and Cd and Hg (Ortega-Villasante et al., 2005). These authors concluded that the nodulation process is directly affected by the metal inhibition of root hair formation. The decrease in rhizobial infections observed in our work is consistent with these results and could be then due to root hair damage, since damaged root hairs are probably not responsive to Nod factors, but also it is important to notice that root growth was more affected than shoot growth, with a reduction in the size of the infective zone that could also affect the number of infection threads. All these results indicate that early steps in nodulation are more affected by the presence of As than nitrogen fixation. In addition, we have reported that presence of As and heavy metals in soil reduce the total number of nodules in alfalfa plants, but it does not affect nitrogenase activity (Carrasco et al., 2005).

The As effect on the symbiotic interaction is clearly a plant effect, since the As-resistant *S. meliloti* strain is not affected on survival or symbiotic properties by the As concentrations used in this work. Abundant information is available on the As-resistance mechanism in prokaryotes, which is widespread within these microorganisms (Jackson and Dugas, 2003; Silver and Phung, 2005). Recently, an As-resistant operon has been characterised in *S. meliloti* 1021 (Yang et al., 2005). Besides, plants have also resistance mechanisms against As. In non-hyperaccumulator plants, arsenate can be bound to plant phytochelatins and subsequently stored in vacuoles or inert structures such as cell walls, lignin, etc. (Pilon-Smits, 2005). A different mechanism seems to operate in the As-hyperaccumulator *Pteris vittata* (Ma et al., 2001; Wang et al., 2002; Zhang et al., 2004).

Recently, the phytoextraction potential of several legume genera have been investigated (Pajuelo et al., 2007). Legumes can tolerate high concentrations of some heavy metals such as Cu and Pb. Furthermore, legumes are clearly root-accumulators, with low metal translocation to the shoot. Alfalfa accumulates As mainly in roots (up to 500–600 ppm in hydroponic cultures), being the accumulation in shoots around 10% of the level found in roots (Pajuelo et al., 2007). Nevertheless, As accumulation in field experiments was much lower (unpublished results), probably as a consequence of As availability in soils. These results suggest the possibility of using legumes for phytostabilisation or preventing leaching and soil erosion (Ghosh and Singh, 2005). Other authors have also proposed the use of legumes in phytostabilisation by targeting metal accumulation to the nodules (Sriprang et al., 2002; Ike et al., 2007). In addition, it is worth noting that, as established in this work, under moderate

contamination legumes are still able to establish an effective symbiotic interaction with *Rhizobium* when using the appropriate As-resistant strains isolated from contaminated soils. This allows the legume plant to provide nitrogen for the soil, since, in spite of number of nodules being decreased in the presence of As, nodulation is still efficient. This fact could open the possibility of using leguminous plants, together with other phytoremediative plants or in rotation with them, in long duration phytoremediation projects (Lasat, 2000).

## 5. Conclusions

The first steps of nodulation of alfalfa were more sensitive to As than nitrogen fixation. Concentrations ranging from 25 to 35  $\mu\text{M}$  sodium arsenite decreased to 25% the total number of nodules, due to a reduction in the number of rhizobial infections close to 90%, but once nodulation was established nodule development seemed to continue normally and nodules are effective, although earlier senescence could be observed in nodules of arsenic-grown plants. The reduction in the number of rhizobial infections was probably due to several plant effects that include root necrosis, root hair damage and a shorter infective root zone.

## Acknowledgments

This work has been financed by the Spanish Environmental Ministry (Project 611/2006/1-1.1), the Spanish Science and Education Ministry (Project BIO2006/02245) and the MEC-INIA-IFAPA (Project RTA 2006-00059-C02-02).

## References

- Anderson, C.R., Cook, G.M., 2004. Isolation and characterization of arsenate-reducing bacteria from arsenic-contaminated sites in New Zealand. *Current Microbiology* 48, 341–347.
- Barac, T., Taghavi, S., Borremans, B., Provoost, A., Oeyen, L., Colpaert, J.V., Vangronsveld, J., van der Lelie, D., 2004. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nature Biotechnology* 22, 583–588.
- Bergersen, F.J., 1961. The growth of *Rhizobium* in synthetic media. *Australian Journal of Biological Sciences* 14, 349–360.
- Brady, D.J., Hecht-Buchholz, C.H., Asher, C.J., Edwards, D.G., 1990. Effects of low activities of aluminium on soybean (*Glycine max*). In: van Beusichem, M.L. (Ed.), *Early Growth and Nodulation. Plant Nutrition-Physiology and Applications*. Kluwer Academic Publishers, Haren, Netherlands, pp. 329–334.
- Broos, K., Uyttendaele, M., Mertens, J., Smolders, E., 2004. A survey of symbiotic nitrogen fixation by white clover grown on metal contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 633–640.
- Broos, K., Beyens, H., Smolders, E., 2005. Survival of rhizobia in soil is sensitive to elevated zinc in the absence of the host plant. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 573–579.
- Carrasco, J.A., Armario, P., Pajuelo, E., Burgos, A., Caviedes, M.A., López, R., Chamber, M.A., Palomares, A.J., 2005. Isolation and characterization of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcóllar pyrite mine. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 1131–1140.
- Castro, I.V., Ferreira, E.M., McGrath, S.P., 1997. Effectiveness and genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* isolates in Portuguese soils polluted by industrial effluents. *Soil Biology and Biochemistry* 29, 1209–1213.
- Chaudri, A.M., McGrath, S.P., Giller, K.E., 1992. Survival of the indigenous population of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in soil spiked with Cd, Zn, Cu and Ni salts. *Soil Biology and Biochemistry* 24, 625–632.
- de Carvalho, M.M., Busby, H.V.A., Edwards, D.G., 1981. Survival of *Rhizobium* in nutrient solutions containing aluminium. *Soil Biology and Biochemistry* 13, 541–542.
- de Carvalho, M.M., Edwards, D.G., Asher, C.J., Andrew, C.S., 1982. Effects of aluminium on nodulation of two *Stylosanthes* species grown in nutrient solutions. *Plant and Soil* 64, 141–152.
- Duker, A.A., Carranza, E.J., Hale, M., 2005. Arsenic geochemistry and health. *Environmental International* 31, 631–641.
- Ehrhardt, D.W., Atkinson, E.M., Long, S.R., 1992. Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science* 256, 998–1000.
- Gage, D.J., 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68, 280–300.
- Ghosh, M., Singh, S.P., 2005. A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts. *Applied Ecology and Environmental Research* 3, 1–18.
- Giller, K.E., McGrath, S.P., Hirsch, P.R., 1989. Absence of nitrogen fixation in clover grown on soil subject to long-term contamination with heavy metals is due to survival of only ineffective *Rhizobium*. *Soil Biology and Biochemistry* 21, 841–848.
- Giller, K.E., Nussbaun, R., Chaudri, A.M., McGrath, S.P., 1993. *Rhizobium meliloti* is less sensitive to heavy-metal contamination in soil than *R. leguminosarum* bv. *trifolii* or *R. loti*. *Soil Biology and Biochemistry* 25, 273–278.
- Glick, B.R., 2004. Teamwork in phytoremediation. *Nature Biotechnology* 22, 526–527.
- Graham, P.H., Vance, C.P., 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology* 131, 872–877.
- Grimalt, J.O., Ferrer, M., Macpherson, E., 1999. The mine tailing accident in Aznalcóllar. *Science of the Total Environment* 242, 3–11.
- 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.
- Jackson, C.R., Dugas, S.L., 2003. Phylogenetic analysis of bacterial and archaeal *arsC* gene sequences suggests an ancient, common origin for arsenate reductase. *BMC Evolutionary Biology* 3, 18.
- Jones, F.T., 2006. A broad view of arsenic. *Poultry Science* 86, 2–14.
- Kopittke, P.M., Dart, P.J., Menzies, N.W., 2007. Toxic effects of low concentrations of Cu on nodulation of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Environmental Pollution* 145, 309–315.
- Kuiper, I., Lagendijk, E.L., Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J., 2004. Rhizoremediation: a beneficial plant–microbe interaction. *Molecular Plant Microbe Interaction* 17, 6–15.
- Lasat, M.M., 2000. Phytoextraction of metals from contaminated soil: a review of plant/soil/metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues. *Journal of Hazardous Substance Research* 2 (5), 1–21.
- Ma, L.Q., Komar, K.M., Tu, C., Zhang, W.H., Cai, Y., Kennelley, E.D., 2001. A fern that hyperaccumulates arsenic: a hardy, versatile, fast-growing plant helps to remove arsenic from contaminated soils. *Nature* 409, 579.
- Ortega-Villasante, C., Rellán-Álvarez, R., Del Campo, F.F., Carpena-Ruiz, R.O., Hernández, L.E., 2005. Cellular damage induced by cadmium and mercury in *Medicago sativa*. *Journal of Experimental Botany* 56, 2239–2251.
- Pajuelo, E., Carrasco, J.A., Romero, L.C., Chamber, M.A., Gotor, C., 2007. Evaluation of the metal phytoextraction potential of crop legumes. Regulation of the expression of O-acetylserine (thiol) lyase under metal stress. *Plant Biology* 9, 672–681.
- Pastor, J., Hernandez, A.J., Prieto, N., Fernandez-Pascual, M., 2003. Accumulating behaviour of *Lupinus albus* L. growing in a normal and a decalcified calcic luvisol polluted with Zn. *Journal of Plant Physiology* 160, 1457–1465.
- Pilon-Smits, E., 2005. Phytoremediation. *Annual Reviews in Plant Biology* 56, 15–39.

- Puppo, A., Groten, K., Bastian, F., Carzaniga, R., Soussi, M., Lucas, M.M., de Felipe, M.R., Harrison, J., Vanacke, H., Foyer, C.H., 2005. Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytology* 165, 683–701.
- Serrano, A., Chamber, M., 1990. Nitrate reduction in *Bradyrhizobium* sp (*Lupinus*) strains and its effects on their symbiosis with *Lupinus luteus*. *Journal of Plant Physiology* 136, 240–246.
- Silver, S., Phung, L.T., 2005. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *Journal Industrial Microbiology & Biotechnology* 32, 587–605.
- Sriprang, R., Hayashi, M., Yamashita, M., Ono, H., Saeki, K., Murooka, Y., 2002. A novel bioremediation system for heavy metals using the symbiosis between leguminous plant and genetically engineered rhizobia. *Journal of Biotechnology* 99, 279–293.
- Stacey, G., Libault, M., Brechenmacher, L., Wan, J., May, G.D., 2006. Genetics and functional genomics of legume nodulation. *Current Opinion in Plant Biology* 9, 110–121.
- Vincent, J.M., 1970. *A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria*. Blackwell, Oxford.
- Wopereis, J., Pajuelo, E., Dazzo, F.B., Jiang, Q., Gresshoff, P.M., de Bruijn, F.J., Stougaard, J., Szczyglowski, K., 2000. Short root mutant of *Lotus japonicus* with a dramatically altered symbiotic phenotype. *The Plant Journal* 23, 97–114.
- Wang, J., Zhao, F.J., Meharg, A.A., Raab, A., Feldmann, J., McGrath, S.P., 2002. Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata*. Uptake kinetics, interactions with phosphate, and arsenic speciation. *Plant Physiology* 130, 1552–1561.
- Yang, H.C., Cheng, J., Finan, M., Rosen, B.P., Bhattacharjee, H., 2005. Novel pathway for arsenic detoxification in the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* 187, 6991–6997.
- Zhang, W., Cai, Y., Downum, K.R., Ma, L.Q., 2004. Thiol synthesis and arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata* (Chinese brake fern). *Environmental Pollution* 131, 337–345.
- Zhuang, X., Chen, J., Shim, H., Bai, Z., 2007. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environmental International* 33, 406–413.





## Research article

## “*In situ*” phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria

M. Dary<sup>a</sup>, M.A. Chamber-Pérez<sup>b</sup>, A.J. Palomares<sup>a,b,1</sup>, E. Pajuelo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. c/Profesor García González, 2, 41012 Seville, Spain

<sup>b</sup> Centro Las Torres, IFAPA (Junta de Andalucía), 41200 Seville, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 15 July 2009

Received in revised form 26 October 2009

Accepted 6 December 2009

Available online 6 January 2010

## Keywords:

Mine spill

*In situ* phytostabilisation

Phytoextraction

Legume

*Bradyrhizobium*

PGPR

## ABSTRACT

The aim of this work is the evaluation of metal phytostabilisation potential of *Lupinus luteus* inoculated with *Bradyrhizobium* sp. 750 and heavy metal resistant PGPRs (plant-growth promoting rhizobacteria), for *in situ* reclamation of multi-metal contaminated soil after a mine spill. Yellow lupines accumulated heavy metals mainly in roots (Cu, Cd and especially Pb were poorly translocated to shoots). This indicates a potential use of this plant in metal phytostabilisation. Furthermore, As accumulation was undetectable. On the other hand, zinc accumulation was 10–100 times higher than all other metals, both in roots and in shoots. Inoculation with *Bradyrhizobium* sp. 750 increased both biomass and nitrogen content, indicating that nitrogen fixation was effective in soils with moderate levels of contamination. Co-inoculation of lupines with a consortium of metal resistant PGPR (including *Bradyrhizobium* sp., *Pseudomonas* sp. and *Ochrobactrum cytisi*) produced an additional improvement of plant biomass. At the same time, a decrease in metal accumulation was observed, both in shoots and roots, which could be due to a protective effect exerted on plant rhizosphere. Our results indicate the usefulness of *L. luteus* inoculated with a bacterial consortium of metal resistant PGPRs as a method for *in situ* reclamation of metal polluted soils.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Soils polluted by heavy metals represent an important environmental problem due to the toxic effects of metals, their accumulation throughout the food chain and the additional risk of groundwater contamination. The main options for reclamation of soil or sediments polluted by metals are *in situ* and *ex situ* techniques. The *in situ* remediation of soil aims at increasing the stabilisation of metals either on soil particles, or by other methods such as plants, so the potential mobility or bioavailability of the toxic metals to environment are lowered (e.g. immobilisation). On the other hand, *ex situ* techniques aim at extracting or separating metals from soil through a series of chemical, physical, or biological methods in a specially designed reactor [1].

Metal remediation through common physico-chemical techniques is expensive and unsuitable in the case of extensive areas. Therefore, biotechnological approaches have received a great deal of attention in recent years. Phytoremediation, the use of plants for metal reclamation, includes phytoextraction, rhizofiltration, phytostabilisation and phytovolatilisation [2,3]. Phytoextraction is based on the use of hyperaccumulator plants, which can tolerate

and accumulate high concentrations of metals. Ideal hyperaccumulators require the characteristics of deep rooted, rapid growth and a high amount of biomass. In fact, many hyperaccumulators are slow in growth, produce low biomass and cannot grow in every particular soil or climate. Furthermore, most metal polluted sites contain marginal, aged soil polluted with mixtures of metals. An optimal phytoremediation strategy would be to use plants with enhanced phytoextraction capacity for an array of metals [4]. The safe disposal of metal enriched plant residues is another disadvantage concerning phytoextraction [2]. A different possibility is *in situ* metal phytostabilisation. This technique uses metal tolerant plants for mechanical stabilisation of polluted land in order to prevent bulk erosion, reduce air-borne transport and leaching of pollutants. In contrast to phytoextraction, plants are required that take up only small amounts of metals in order to prevent transfer into the wildlife food chain [2,5]. Furthermore, phytostabilisation may be the most cost-effective treatment for metal polluted soils, especially in the case of extensive pollution.

Rhizoremediation, a specific type of phytoremediation that involves both plants and their associated rhizosphere microbes, can occur naturally, or can be actuated by deliberately introducing specific microbes. These microbes can be contaminant degraders and/or can promote plant growth under stress conditions [6–8]. For a long period, plant-growth promoting rhizobacteria (PGPR) were mainly used for assisting plants to uptake nutrients from the environment or preventing plant diseases. Recently, the applica-

\* Corresponding author. Tel.: +34 954559895; fax: +34 954556924.

E-mail address: [epajuelo@us.es](mailto:epajuelo@us.es) (E. Pajuelo).

<sup>1</sup> In the memory of Prof. Antonio J. Palomares.

tion of PGPR has been extended to bioremediation of both organic and metal pollutants [9,10]. The *Rhizobium*-legume symbiosis has been proposed as a tool for rhizoremediation of As and heavy metals in soils [11–14]. This naturally occurring symbiotic interaction has an extra advantage, the soil nitrogen enrichment due to dinitrogen fixation in plant root nodules [15].

Despite the genetic potential of plants to remove many toxic metals from the soil, phytoremediation is yet to become a commercially available technology. Contradictory results have been reported upon application of laboratory or green house systems in the field [8,16].

The aim of this work is the evaluation of the *in situ* metal phytostabilisation potential of *Lupinus luteus* plants in association with native metal resistant PGPRs in a polluted site affected by the toxic mine spill at Aznalcóllar (Seville, Spain) [17].

## 2. Materials and methods

### 2.1. Legume plant and bacteria for rhizoremediation

*L. luteus* cv. Aurea plants have been used for the *in situ* rhizoremediation experiment. *Bradyrhizobium* sp. 750 [18] was used as the inoculant for lupines, since no native strain isolated from contaminated soils was available. Other PGPRs were isolated from the rhizosphere of legume plants grown at contaminated area of Aznalcóllar [11], including, *Pseudomonas* sp. Az13 and *Ochrobactrum cytisi* Azn6.2 [19,20].

### 2.2. Determination of metal resistance in bacteria

The resistance of bacteria to As and heavy metals was evaluated on agar plates containing TY (tryptone-yeast extract) agar medium supplemented with increasing metal concentrations, according to [11]. Arsenic was provided as sodium arsenite; cadmium and zinc were added in the form of cadmium and zinc chloride, respectively; copper was added as copper sulphate, and lead was added as lead nitrate (including 5 mM EDTA in those plates in order to avoid lead precipitation). After incubation at 28 °C for 48–96 h, the growth was observed. The maximal tolerable concentration (MTC), defined as the maximal concentration of an element not affecting bacterial growth, is used to evaluate the resistance.

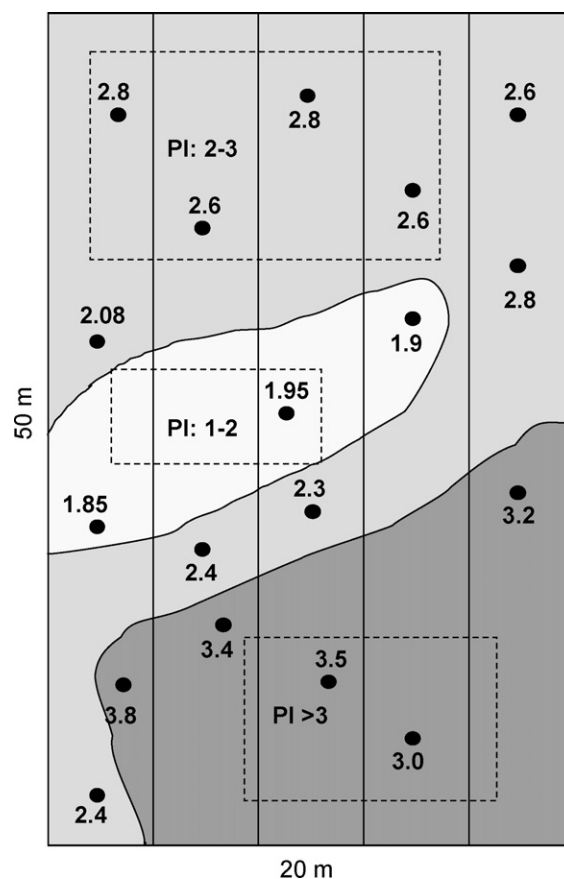
### 2.3. Determination of the concentration of arsenic and heavy metals in soil

Field experiments were carried out at the experimental plot El Vicario in the zone affected by the toxic spill of the Aznalcóllar mine [17], where a high level of contamination remains after several years [21].

Samples of soil (approx. 500 g) from the surface down to 30–35 cm were collected using a 5 cm diameter cylinder, transported to the laboratory and dried in an oven for 48–72 h at 60 °C. They were homogenised in a mortar, and sifted consecutively through three sieves from a pore size of 5 mm to a final size of 0.21 mm. A final sample of 1 g soil was used for metal determination. Toxic elements in soil samples were determined by inductively coupled plasma optical spectrophotometry (ICP-OES) after *aqua regia* treatment in a microwave according to [22].

#### 2.3.1. Evaluation of metal contamination and experimental setup

The experimental plot had an area of 1000 m<sup>2</sup> (20 m × 50 m). Since local levels of contamination by As and heavy metals could be very different, an exhaustive study of contamination was performed at the experimental plot. The concentration of the five most persistent elements (As, Cd, Cu, Pb and Zn) was determined in 18 locations following a random procedure within the experimental



**Fig. 1.** Map of contamination of the experimental plot. A map of contamination was drawn by grouping the sampling points with similar PIs, whose value is indicated at every position. Three zones with increasing contamination level were obtained, which comprised PI values within the intervals 1.0–2.0, 2.0–3.0, and over 3.0. The plots where the different experiments were conducted are indicated by dot lines squares.

plot. Data are shown in Table 1. The concentration of As were 3–10 times higher than the permissible levels for agricultural soils. It is interesting to note that the contaminated area was an agricultural zone. Cd concentrations were as well in all cases 4–6-fold above the threshold. The concentration of Cu was 1.1–2 times higher than threshold. On the contrary, the concentration of Pb and Zn were in general below the limits established by local environmental regulations (Pb was slightly over the limit in four spots). Since the contamination is due to several metals, a pollution index has been calculated as a parameter for pollution evaluation at each point. The pollution index is computed by averaging the ratios of metal concentration to the hazard criteria, which is the permissible level [23], i.e. maximum concentration of metals allowed by Andalusian regulations for agricultural soils. The pollution index is defined as:  $\text{pollution index} = \frac{\sum(\text{metal concentrations in soils}/\text{permissible level for each metal})}{\text{number of metals}}$  (more information in legend of Table 1). Values of the pollution index < 1 indicate average levels of metals below the selected standards, according to local regulations. A pollution index > 1 indicates that, on average, metal concentrations are above the permissible levels. In all the positions tested the pollution index is above 1, indicating that the zone was still polluted. Results allowed us to draw a map of contamination (Fig. 1), in which three different zones of the plot can be delimited, with increasing PI values (1.0–2.0, 2.0–3.0, and over 3.0).

#### 2.3.2. Experimental setup

Two experiments were carried out. The first one consisted in growing *L. luteus* plants inoculated only with *Bradyrhizobium* sp. 750 at



**Table 1**

Concentration of the most recalcitrant toxic metals and metalloids found at eighteen random positions within the experimental plot. Maximal allowed concentrations for agricultural soils according to Andalusian regulations. Numbers in bold indicate concentrations above the threshold. The pollution index was calculated from the following formula:  $PI = ([As]/20 + [Zn]/300 + [Pb]/200 + [Cd]/2.5 + [Cu]/100)/5$ , according to [23].

Sampling point	Concentration of toxic metals					Pollution index
	mg kg <sup>-1</sup> As	mg kg <sup>-1</sup> Zn	mg kg <sup>-1</sup> Pb	mg kg <sup>-1</sup> Cd	mg kg <sup>-1</sup> Cu	
B2	<b>200.00</b>	159.96	<b>203.67</b>	<b>11.54</b>	<b>171.95</b>	3.4
SR9	<b>69.45</b>	223.55	105.02	<b>10.29</b>	<b>110.70</b>	1.85
A1	<b>97.83</b>	178.36	129.15	<b>12.65</b>	78.75	2.4
B4	<b>134.06</b>	220.64	180.33	<b>11.05</b>	<b>117.63</b>	2.6
C3	<b>114.03</b>	201.26	135.96	<b>12.01</b>	<b>153.71</b>	2.3
SR19	<b>60.75</b>	127.83	168.21	<b>13.40</b>	<b>138.40</b>	2.08
SR40	<b>67.35</b>	266.02	95.60	<b>11.34</b>	<b>114.01</b>	1.95
SR37	<b>89.02</b>	166.03	128.99	<b>15.04</b>	<b>118.49</b>	2.6
E3	<b>106.63</b>	137.46	132.71	<b>14.15</b>	<b>185.44</b>	2.6
A5	<b>132.27</b>	176.10	<b>207.94</b>	<b>14.35</b>	<b>117.04</b>	2.8
SR29	<b>158.37</b>	196.60	<b>220.32</b>	<b>15.94</b>	<b>172.01</b>	3.5
SR38	<b>167.08</b>	164.62	165.18	<b>13.05</b>	<b>135.49</b>	2.8
D1	<b>165.04</b>	155.45	114.98	<b>12.78</b>	<b>137.99</b>	3.0
SR39	<b>102.67</b>	155.11	108.62	<b>11.09</b>	<b>101.04</b>	2.3
SR27	<b>73.90</b>	145.82	105.28	<b>13.45</b>	<b>178.68</b>	2.4
B2	<b>68.66</b>	231.62	108.03	<b>11.80</b>	<b>123.02</b>	1.9
E2	<b>147.78</b>	141.27	179.56	<b>14.17</b>	<b>193.72</b>	3.2
SR25	<b>192.55</b>	100.58	<b>241.49</b>	<b>16.01</b>	<b>147.72</b>	3.8
Maximum level for agricultural soils	<b>20</b>	<b>300</b>	<b>200</b>	<b>2-3</b>	<b>100</b>	1

three different positions corresponding to increasing PI. The second experiment was carried out at the zone with intermediate levels of pollution (PIs within the range 2.0–3.0), since no nodulation was observed at the highest pollution index. In this experiment, four inoculation treatments were done: (a) non-inoculated plants, used as control, (b) plants inoculated only with *Bradyrhizobium* sp. 750, (c) plants inoculated with *Bradyrhizobium* sp. 750 and *O. cytisi* Azn6.2, and (d) plants inoculated with *Bradyrhizobium* sp. 750, *Ochrobactrum* sp. Azn6.2 and *Pseudomonas* sp. Az13. In all cases we analysed plant biomass, nodulation efficiency and metal accumulation.

### 2.3.3. Preparation of soil for field rhizoremediation experiments

Field experiments were carried out at the season between November 2005 and May 2006. After tillage, small plots of 4 m<sup>2</sup> (2 m × 2 m) were prepared for seed sowing at zones with increasing PIs, with a safety distance of 2 m between plots to reduce potential inter-plot contamination. The experiment was laid out with 3 replicates, using a randomized block design. No nitrogen fertilization was applied to the soil.

### 2.4. Preparation of inoculants for field rhizoremediation experiments

For the inoculation of the seeds, peat base inoculants were prepared using peat adjusted to neutrality by adding CaCO<sub>3</sub> and sterilized by autoclaving [24]. *Bradyrhizobium* sp. 750 was grown for 7–9 days at 28 °C in YEM (yeast extract manitol) medium with continuous shaking at 200 rpm. Liquid cultures of other metal resistant PGPRs (*Pseudomonas* sp. Az13 and *O. cytisi* Azn6.2) were grown on TY (tryptone yeast extract) medium for 24–48 h at 28 °C with continuous shaking at 200 rpm. Cells were pelleted by centrifugation at 5000 × g for 15 min and resuspended in sterile water. Eight ml of bacterial suspensions were mixed aseptically with 40 g of sterile peat and immediately stored at 4 °C until use (as much one week of storage at 4 °C). For the co-inoculation treatment, equal amounts of bacterial inoculums were mixed. For uninoculated control, equal volume of sterile water was added to peat. Bacterial density of the inoculants using this procedure was previously reported to be around 10<sup>9</sup> u.f.c./ml [25].

At the time of sowing, seed of legumes without any previous treatment were mixed with the peat containing the appropriate inoculants and a few drops of an 8% sucrose solution were added.

Inoculated seeds were planted in rows and irrigated with water. The whole experiment was covered with nylon net during plant germination. Then, the mesh was removed and plants were allowed to grow for an additional five months.

### 2.5. Plant harvesting

Six months after sowing, five plants were harvested at random from the central part of each plot. Plants were brought to the laboratory, and roots and shoots cut separately. Shoot and root biomass were determined and the number of nodules was recorded. Shoots and roots were rinsed several times in water and dried with paper towel. Whole shoots (the above-ground biomass) and roots were dried in an oven at 60 °C for 48–60 h, cut in small pieces and mixed. Three samples of 100 g of shoot or root tissue were triturated and homogenised. A final sample of 1 g was further homogenised with mortar and pestle, and used for determination of As and heavy metals accumulation, as well as nitrogen content as described below.

### 2.6. Evaluation of nodulation and nitrogen fixation

Nodules were counted in five plants for each of the three replicates of each treatment. Since no nitrogen fertilizer was added to the soil, the determination of total nitrogen in dry matter of plants is usually taken as an indication of the effectiveness of dinitrogen fixation in the nodules of inoculated plants. Nitrogen content in shoots was determined using a Technicon 300B InfraAlyzer (Tarryton, NY, USA), as described in [11].

### 2.7. Determination of metal accumulation in plants

With regard to plants, final representative samples of 1 g (dry weight) of shoots or roots, prepared as described in Section 2.5, were used for determination of arsenic and heavy metal accumulation. Toxic elements in soil and plant samples were determined by inductively coupled plasma optical spectrophotometry (ICP-OES) after *aqua regia* treatment in a microwave according to [22].

### 2.8. Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA) was performed using the software program SPSS 13.0 (2004) for Windows. Results given are

means  $\pm$  standard deviations of three independent replicates. Analysis of variances was performed using the ANOVA post hoc test at  $P < 0.1$ . Previously, normality and homogeneity of variances was checked by using a Levene test. We have chosen 0.1 as the level of significance since several authors [8] suggest that, due to the inherent variability of field experiments, compared to laboratory experiments, it may be useful for members of the scientific community, industry, and regulatory bodies to establish a value of 10% ( $P < 0.1$ ) as the acceptable level of significance to demonstrate a statistically significant effect of phytoremediation.

### 3. Results

#### 3.1. Evaluation of metal resistance in bacterial inoculants

The resistance to As and heavy metals of the three bacteria used as inoculants has been evaluated on agar plates. Results are shown in Table 2. *Bradyrhizobium* sp. 750 showed low level of resistance to As and heavy metals, as compared to the other bacteria. On the contrary, *O. cytisi* Azn6-2 was resistant to the highest concentrations of As, Cd, Pb and Zn. Concerning *Pseudomonas* sp. Az13, it showed the highest resistance to Cu (up to 4.5 mM) together with an intermediate resistance to the rest of elements.

#### 3.2. Potential of the *L. luteus*-*Bradyrhizobium* symbiosis for metal rhizoremediation

In a first experiment, *L. luteus* plants were cultivated at three different positions, each one with a significantly different value of PI. Seeds had been previously inoculated with *Bradyrhizobium* sp. 750. Data of germination, biomass, and nodulation could be seen in Table 3. Germination did not seem to be affected at PI 1.0–2.0, plants looked healthy, with no apparent toxicity symptoms and a large biomass (Fig. 2A). Furthermore, nodules were red-coloured (not shown) and plants showed a high content of nitrogen in shoots (over 3.9%). In the zone with intermediate level of contamination, 64% of seeds were able to germinate and biomass was diminished by 30%. Functional nodules were present at lower number (approx. 40%) and the nitrogen content of shoots was intermediate, indicating that the bacteria was still able to fix nitrogen under moderate pollution levels. Furthermore, plants were able to set flowers and seeds (Fig. 2B), which is important concerning self-propagation. Finally, lupine plants were also cultivated at PI over 3.0. Under these conditions, germination decreased down to 47%. Plant growth was extremely impaired; plant biomass was about ten percent of biomass of yellow lupines grown in the less contaminated area (PI: 1.0–2.0). Furthermore, plants could not complete their life cycle, being unable to set flowers and seeds (Fig. 2C). Plants did not show nodules under these conditions, so the nitrogen content in shoots decreased to 1.7%.

**Table 2**

Evaluation of the resistance to As and heavy metals in bacterial inoculants. The resistance to the different elements was determined on TY (tryptone-yeast extract) agar plates supplemented with increasing concentrations of the corresponding element. The resistance was expressed as MTC (maximal tolerable concentration) which is the maximal concentration of an element that does not affect bacterial growth. Data corresponding to *Ochrobactrum cytisi* Azn6.2 have been submitted for publication [20].

Bacteria	Maximal tolerable concentration (mM)				
	As	Cd	Cu	Pb	Zn
<i>Bradyrhizobium</i> sp. 750	2	<0.5	1.5	2	<1
<i>Ochrobactrum cytisi</i> Azn6-2	8	1.5	3.5	6	10
<i>Pseudomonas</i> sp. Az13	4	1	4.5	5	3



**Fig. 2.** Growth of yellow lupines on soil with increasing Pollution Indexes. *Lupinus luteus* plants were inoculated with *Bradyrhizobium* sp. 750 and cultivated in zones at different PIs. Aspect of plants after 6 months of growth. A. *Lupinus luteus* plants grown at low level of metal pollution (PI 1.2–2.0). B. *Lupinus luteus* grown on moderately contaminated soil (PI: 2.0–3.0). C. *Lupinus luteus* grown on the most contaminated zone of the plot (PI >3.0).

Metal accumulation has been determined in roots and shoots of plants grown at different PIs (Table 4). With regard to arsenic accumulation, yellow lupine behaved as an excluder species, since no arsenic accumulation was detected even in the more contaminated area. Lupines accumulated Cd, Cu and Pb mainly in roots, with very low levels of translocation to shoots. These results indicate that these plants can be used for metal phytostabilisation. Nevertheless, zinc accumulation was much higher (10 times higher than Cu or Pb accumulation and up to 100 times as compared to the content of Cd). In fact, this species can be considered as a Zn accumulator, since the concentration of metal in plant tissues is superior to the concentration of this element in the soil (bioconcentration factor >1). Thus this plant–bacteria combination could be used for phytoextraction of Zn from the soil.

**Table 3**

Growth and nodulation of yellow lupines in soils with increasing levels of contamination by heavy metals. Plants were cultivated in soils with different pollution indexes and inoculated with the strain *Bradyrhizobium* sp. 750. Growth and nodulation parameters were evaluated after five months. Data are means  $\pm$  standard deviations in three independent plots. Different letters (a), (b), (c), etc., indicate significant differences at the level  $P < 0.1$ , as suggested for field experiments [8].

PI	Seed germination (%)	Plant tissue	Biomass (g/plant)	Nodules per plant	Nitrogen content (%)
1–2	95%	Roots	4.2 $\pm$ 0.6a	5.4 $\pm$ 2.1a	3.90 $\pm$ 0.8a
		Shoots	38.2 $\pm$ 7.7a		
2–3	64%	Roots	2.4 $\pm$ 0.7b	2.1 $\pm$ 0.7b	2.40 $\pm$ 0.4b
		Shoots	11.4 $\pm$ 3.6 b		
>3	47%	Roots	0.9 $\pm$ 0.2c	0c	1.70 $\pm$ 0.6c
		Shoots	3.7 $\pm$ 0.5c		

**Table 4**

Metal accumulation of yellow lupines in soils with increasing levels of contamination by heavy metals. Plants were cultivated in soils with different pollution indexes and inoculated with the strain *Bradyrhizobium* sp. 750. Aerial parts and roots were harvested after five months for heavy metal determination by ICP-OES. Data are means  $\pm$  standard deviations in three independent plots. Different letters a, b, c, etc., indicate significant differences at the level  $P < 0.1$ , as suggested for field experiments [8].

PI	Tissue	As (mg kg <sup>-1</sup> )	Cd (mg kg <sup>-1</sup> )	Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	Pb (mg kg <sup>-1</sup> )	Zn (mg kg <sup>-1</sup> )
1–2	Roots	<1.5	1.2 $\pm$ 0.2a	27.5 $\pm$ 4.3a	11.0 $\pm$ 2.2a	165.1 $\pm$ 17.9a
	Shoots	<1.5	0.6 $\pm$ 0.1a	12.6 $\pm$ 1.9a	<1.5	135.1 $\pm$ 10.0a
2–3	Roots	<1.5	4.1 $\pm$ 0.9b	64.7 $\pm$ 9.8b	26.6 $\pm$ 7.7b	642.0 $\pm$ 144.3b
	Shoots	<1.5	1.6 $\pm$ 0.4b	21.5 $\pm$ 3.6b	3.5 $\pm$ 1.5b	472.0 $\pm$ 156.8b
>3	Roots	<1.5	4.8 $\pm$ 1.7b	150.7 $\pm$ 17.9c	80.7 $\pm$ 23.0c	806.3 $\pm$ 24.4c
	Shoots	<1.5	2.0 $\pm$ 0.6b	52.1 $\pm$ 14.7c	35.3 $\pm$ 14.6c	748.3 $\pm$ 167.8c
		30*	10*	40*	100*	500*

\* Maximal concentration of metal recommended for domestic animal consumption [32].

The contents of heavy metals in plant tissues increased as metal soil concentrations did, especially in the roots. In the most contaminated area (PI > 3.0), metal accumulation was around 4–10 times higher than those of plants grown on the less contaminated area. Moreover, plants grown at PI > 3.0 showed a 90% biomass reduction. It must be pointed out that due to their toxic levels, only in the most contaminated area, the levels of Cu and Zn in shoots are over the limit recommended for livestock (Table 4).

### 3.3. Effect of metal resistant PGPRs on growth and metal accumulation of *L. luteus* plants

In the second experiment we studied the effect of inoculation with a consortium of PGPR resistant to heavy metals, on the phytoremediation capacity of *L. luteus*. This experiment was done at soils with an intermediate level of pollution, since nodulation was not observed at higher PI. Results are shown in Figs. 3 and 4. Inoculation with only *Bradyrhizobium* increased biomass yield by 29% (Fig. 3). Furthermore, inoculation with the consortium of metal resistant PGPRs increased biomass production by 109%, and the yield and the aspect of inoculated plants was much better than those without the PGPR inoculation treatment in adjacent plots (Fig. 4). Nitrogen content also showed a 40% increase with regard to uninoculated plants, due to nitrogen fixation in nodules of *Lupinus* plants, indicating that nodulation was still effective under a moderate level of contamination. The accumulation of heavy metals in those plants was determined, both in shoots and roots. Results are also presented in Fig. 3. We could observe a decrease in the accumulation of all the metals (between 25% and 40% depending on the metal), both in the root tissue as well as in shoots when plants were inoculated with *Bradyrhizobium*. This decrease in metal accumulation was enhanced upon co-inoculation with *Bradyrhizobium* and *Ochrobactrum*. Furthermore, co-inoculation with a consortium of the three bacterial species resistant to heavy metals produced a very significant diminution of the accumulation of all metals, especially in roots. More than 50% reduction in the accumulation of Pb, Cd and Zn in roots was observed. Furthermore, there was also a diminution of the amount of metal

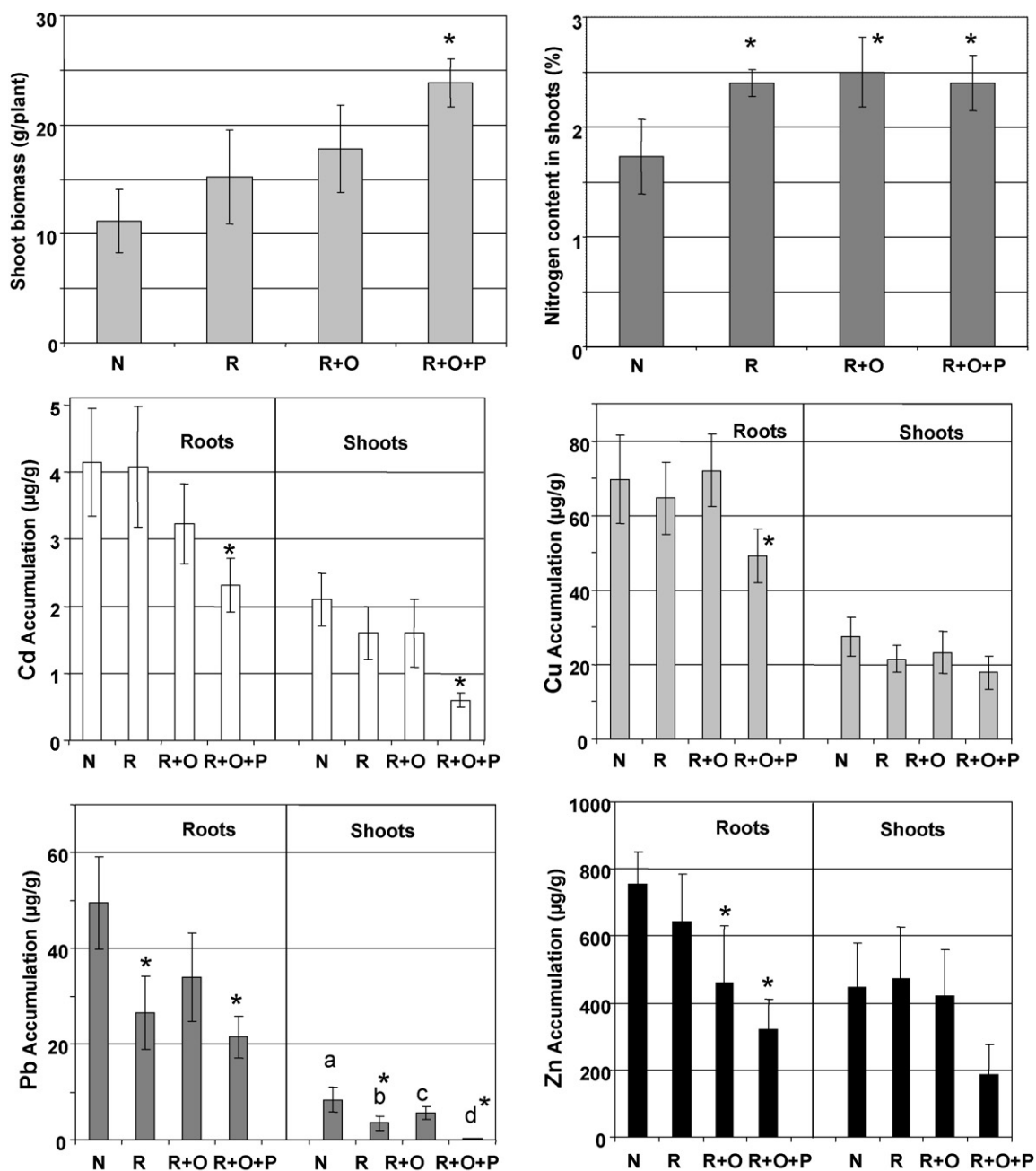
translocated to the shoot, which was between 30% and 60% depending on the metal, in plants inoculated with the consortium of three bacteria. In the case of Pb, shoot accumulation was undetectable upon inoculation with the metal resistant PGPR consortium. The ratio root/shoot of metal concentrations (Table 5, supplementary information) is increased upon inoculation with the bacterial consortia.

## 4. Discussion

Contamination of soils by heavy metals is a widespread problem that poses a great risk for environment, wild-life and human health. Phytoremediation emerges as a cost-effective, environmentally friendly biotechnology approach to clean local areas affected by contamination [1–5].

The toxic spill occurred at the Aznalcóllar mine in 1998 released over 5000 tons of sludge and acidic waters contaminated with extremely high concentrations of heavy metals and metalloids along the Guadiamar river, which runs 20 km away from Sevilla city [17] and is considered as one of the greatest environmental tragedies to happen in Europe. Residual contamination by As, Cd, Cu, Pb and Zn has been reported [21]. The regional government established an experimental plot for the development of research projects aimed to bring the levels of toxic elements below the limits established in Andalusian regulations.

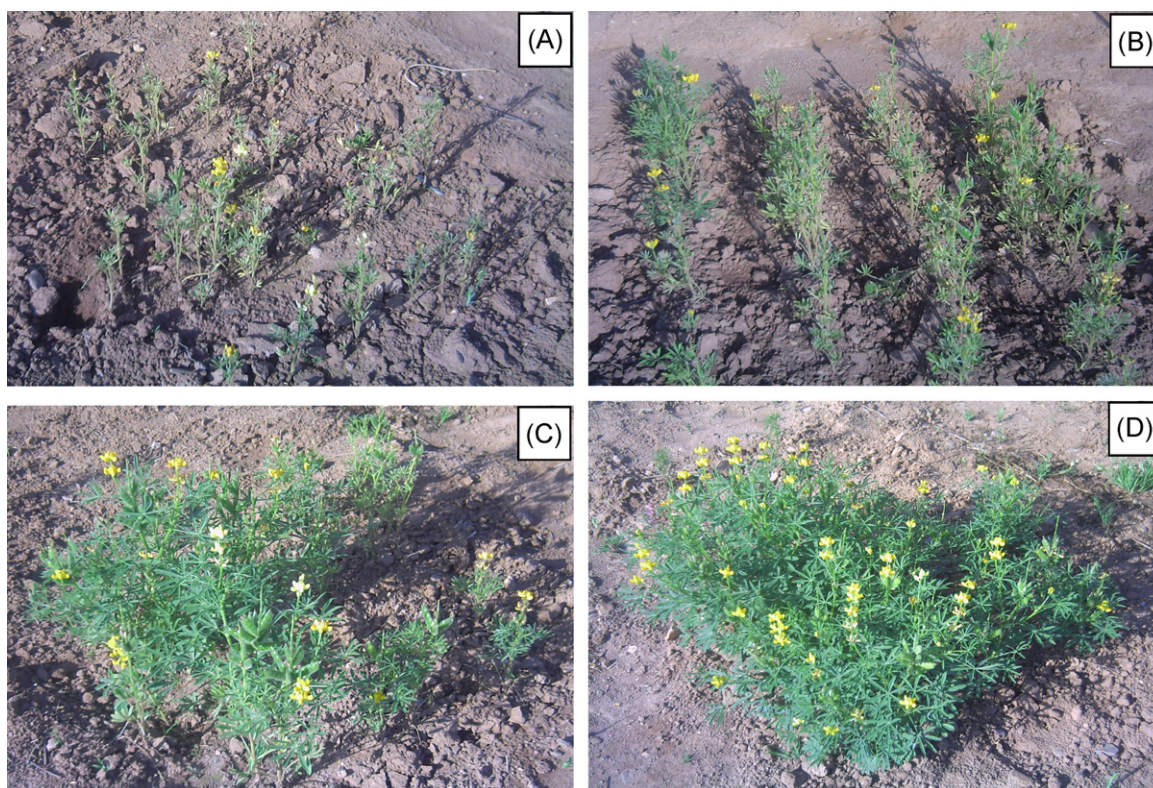
Legume plants have been found among the first colonisers after the toxic spill of Aznalcóllar [11,26]. In particular, *Lupinus angustifolius* was profusely found at the contaminated area (unpublished results). In agreement, it has been reported that several legumes are able to grow on heavy metals polluted soils [27]. Legumes in association with *Rhizobium* are getting increasing attention in metal phytoremediation [11–14,28,29]. Besides their capacity to tolerate heavy metals, legumes are able to establish symbiotic interaction with rhizobia, being a source of combined nitrogen for the biosphere and a model for microbe–plant interaction studies [15,30]. In particular, *Lupinus* species have been proposed for phytoremediation of metals [29,31] and organics [32].



**Fig. 3.** Effect of inoculation with heavy metal resistant PGPRs on shoot biomass, nitrogen content and metal accumulation of *Lupinus luteus* plants grown on metal polluted soils (PI: 2.0–3.0). N: non inoculated, R: *Bradyrhizobium* sp. 750, R+O: *Bradyrhizobium* sp. 750 + *Ochrobactrum* sp. Azn6.2, R+O+P: *Bradyrhizobium* sp. 750 + *Ochrobactrum* sp. Azn6.2 + *Pseudomonas* sp. Az13. Data are means of three independent determinations. Asterisks indicate significant differences at the level  $P < 0.1$  with regard to non-inoculated plants. This level of significance has been proposed for field experiments according to [8]. Arsenic accumulation was in all cases below the detection limit of the technique ( $< 1.5 \text{ mg kg}^{-1}$ ), both in roots and shoot samples. (The exact value of  $p$  (significance) is provided as supplementary information).

An *in situ* rhizoremediation experiment has been performed at the contaminated area, cropping yellow lupines inoculated with *Bradyrhizobium*. With regard to As, no accumulation of this element was detected, so yellow lupines behaved as an arsenic excluder. Furthermore, these plants accumulate heavy metals (Cd, Cu and Pb) mainly in roots, with low rates of metal translocation to the aerial part of the plants. These results indicate the usefulness of *L. luteus* for heavy metal phytostabilisation. The restoration of a dense vegetation cover is possibly the most useful and widespread method to physically stabilize mine wastes [33,34]. Nevertheless, Zn was the only heavy metal whose translocation to shoots was high, especially in severely contaminated soils. In this case, *Lupinus* actively accumulates Zn in plant tissues, even in shoots, slightly over the

limits recommended for domestic animal consumption. *Lupinus albus* has also been reported to be a zinc accumulator [29,31]. This should be taken into account when using this plant if phytostabilisation is the choice for soil reclamation [33]. Lupines were also grown at the most contaminated area. Our results suggest that lupines are not adequate for soil reclamation in severely contaminated soils (over  $200 \text{ mg kg}^{-1}$  As,  $16 \text{ mg kg}^{-1}$  Cd,  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  Cu and  $240 \text{ mg kg}^{-1}$  Pb), since plant viability is compromised under these conditions. It could be possible that the utilisation of a more metal resistant *Bradyrhizobium* sp. strain could improve nodulation in the most polluted soils, as it has been reported for other legumes [13]. Furthermore, metal accumulation increased 4–10 times and it can exceed the limit recommended for livestock, although slightly.



**Fig. 4.** Effect of inoculation with *Bradyrhizobium* sp. 750 and a consortium of PGPR resistant to As and heavy metals on the growth of *Lupinus luteus* on contaminated soil (PI 2.0-3.0). A: non inoculated, B: inoculated with *Bradyrhizobium* sp. 750, C: inoculated with *Bradyrhizobium* sp. 750 + *Ochrobactrum cytisi* Azn6.2, D: inoculated with *Bradyrhizobium* sp. 750 + *Ochrobactrum cytisi* Azn6.2 + *Pseudomonas* sp. Az13.

This could be a risk of other phytoremediation techniques, such as phytoextraction [5].

One of the objectives of our work was to study the effect of inoculation with metal resistant PGPRs on the phytoremediation capacity of yellow lupine. Many reports have been generated recently on the use of plants assisted by metal tolerant PGPRs for assisting metal phytoremediation (revised in [9,35]). The combined use of this legume with *Bradyrhizobium* and metal resistant rhizobacteria, could improve the phytoremediation capacity of the plant due to the rhizosphere activity of the bacteria [6–10]. In particular, the efficiency of phytoremediation can be enhanced by using the appropriate heavy metal resistant PGPRs, including symbiotic fixing organisms [35]. Nevertheless, most of these experiments have been done in pots, and not very many results from field experiments are available. Our results showed that under moderate contamination, inoculation with a bacterial consortium including *Bradyrhizobium* sp., *O. cytisi* and *Pseudomonas* sp. strongly increased plant yield and nitrogen content. A significant diminution of accumulated metals in plant tissues was observed in roots and in shoots. *O. cytisi* is capable of accumulating up to 2500 ppm Cu, 30,000 ppm Zn and 32,000 ppm Cd mainly bound to cell surface [20]. Recently, many reports were released on the use of bacterial biomass as an efficient metal biosorbent [36,37]. This could be a possible explanation for the protection effect exerted on the plant root, since metals can be bound to bacterial surface, rendering them unavailable for plant uptake. In fact, biotechnology approaches have been addressed by expressing mammalian metallothioneins on the bacterial cell surface in order to bind metals and protect plant roots from metal pollution [38]. Other mechanisms different from biosorption have been described for microbial resistance to heavy metals, including redox changes, metal complexation, metal precipitation, metal efflux or metal volatilisation following reduction in the case of Hg [39,40].

An additional problem concerning PGPR-assisted phytoremediation is the survival and the competitiveness of the inoculants against native populations [9]. The selection of native bacterial strains resistant to As and heavy metals isolated from the same area, as it is the case for *O. cytisi* Azn6.2 and *Pseudomonas* sp. Az13, could help the survival and competitiveness of these inoculants, although this point has not been addressed in the present study.

## 5. Conclusions

*L. luteus* are adequate for metal stabilisation of soils with moderate level of heavy metal pollution. Our results suggest a positive effect of co-inoculation with *Bradyrhizobium* and metal resistant PGPRs for phytostabilisation of metal polluted soils using this plant–rhizobacteria system, since it increases plant yield and nitrogen, and decreases plant metal accumulation, thus preventing the impact of metals in the food chain.

## Acknowledgments

Work financed by projects 1.1-415/2005/2-B and 611/2006/1-1.1, Spanish Ministry of Environment and RTA-2006-059-C02, INIA. Thanks are given to Antonio Carrión for technical assistance during the field experiment. Authors also acknowledge personnel of the Microanalysis Service of the CITIUS (University of Seville). Thanks are given to Drs. M.A. Caviedes and T. van Brussel for manuscript revision. Authors want to acknowledge Alejandro Lafuente for assistance with statistical analysis.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jhazmat.2009.12.035.

## References

- [1] J.F. Peng, Y.H. Song, P. Yuan, X.Y. Cui, G.L. Qiu, The remediation of heavy metals contaminated sediment, *J. Hazard. Mater.* 161 (2009) 633–640.
- [2] M. Ghosh, S.P. Singh, A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts, *Appl. Ecol. Environ. Res.* 3 (2005) 1–18.
- [3] E. Pilon-Smits, Phytoremediation, *Ann. Rev. Plant Biol.* 56 (2005) 15–39.
- [4] D.L. Le Duc, T. Terry, Phytoremediation of toxic trace elements in soil and water, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32 (2005) 514–520.
- [5] J.S. Angle, N.A. Linacre, Metal phytoextraction: a survey of potential risks, *Int. J. Phytorem.* 7 (2005) 241–254.
- [6] B.R. Glick, Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment, *Biotechnol. Adv.* 21 (2003) 383–393.
- [7] I. Kuiper, E.L. Lagendijk, G.V. Bloembergen, T.J.J. Lugtenberg, Rhizoremediation: a beneficial plant–microbe interaction, *Mol. Plant Microb. Interact.* 17 (2004) 6–15.
- [8] K.E. Gerhardt, X.D. Huang, B.R. Glick, B.M. Greenberg, Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: potential and challenges, *Plant Sci.* 176 (2009) 20–30.
- [9] X. Zhuang, J. Chen, H. Shim, Z. Bai, New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation, *Environ. Int.* 33 (2007) 406–413.
- [10] L. Nie, S. Shah, G.I. Burd, D.G. Dixon, B.R. Glick, Phytoremediation of arsenate contaminated soil by transgenic canola and the plant growth-promoting bacterium *Enterobacter cloacae* CAL2, *Plant Physiol. Biochem.* 40 (2002) 355–361.
- [11] J.A. Carrasco, P. Armario, E. Pajuelo, A. Burgos, M.A. Caviedes, R. López, M.A. Chamber, A.J. Palomares, Isolation and characterisation of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcóllar pyrite mine, *Soil Biol. Biochem.* 37 (2005) 1131–1140.
- [12] E. Pajuelo, J.A. Carrasco, L.C. Romero, M.A. Chamber, C. Gotor, Evaluation of the metal phytoextraction potential of crop legumes. Regulation of the expression of o-acetylserine (thiol) lyase under metal stress, *Plant Biol.* 9 (2007) 672–681.
- [13] E. Pajuelo, I.D. Rodríguez-Llorente, M. Dary, A.J. Palomares, Toxic effects of arsenic on *Sinorhizobium-Medicago sativa* symbiotic interaction, *Environ. Pollut.* 154 (2008) 203–211.
- [14] R. Sriprang, M. Hayashi, M. Yamashita, H. Ono, K. Saeki, Y. Murooka, A novel bioremediation system for heavy metals using the symbiosis between leguminous plant and genetically engineered rhizobia, *J. Biotechnol.* 99 (2002) 279–293.
- [15] P.H. Graham, C.P. Vance, Legumes: Importance and constraints to greater use, *Plant Physiol.* 131 (2003) 872–877.
- [16] N.A. Linacre, S.N. Whiting, J.S. Angle, The impact of uncertainty on phytoremediation project costs, *Int. J. Phytorem.* 7 (2005) 259–269.
- [17] J.O. Grimalt, M. Ferrer, E. Macpherson, The mine tailing accident in Aznalcóllar, *Sci. Total Environ.* 242 (1999) 3–12.
- [18] M.A. Chamber-Pérez, M. Camacho, A. Burgos, M.M. Lucas, M. Fernandez-Pascual, J.J. Manclús, M.R. de Felipe, Nitrate reductase isozymes in *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) bacteroids: localisation, biochemical and kinetic characteristics, *J. Plant Physiol.* 159 (2002) 525–533.
- [19] J.L. Zurdo-Piñeiro, R. Rivas, M.E. Trujillo, N. Vizcaíno, J.A. Carrasco, M.A. Chamber, A.J. Palomares, P.F. Mateos, E. Martínez-Molina, E. Velázquez, *Ochrobactrum cytisi* sp. nov., isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57 (2007) 784–788.
- [20] I.D. Rodríguez-Llorente, M. Dary, D. Gamane, A. El Hamdaoui, B. Doukkali, A. Lafuente, J. Delgado, M. A. Caviedes, E. Pajuelo, Cadmium biosorption properties of the metal resistant *Ochrobactrum cytisi* Azn6.2, *Engineering in Life Sciences*, doi:10.1002/elsc.200900060.
- [21] E. Galán, I. González, J.C. Fernández-Caliani, Residual pollution load of soil impacted by the Aznalcóllar (Spain) mining spill after cleanup operations, *Sci. Total Environ.* 286 (2002) 167–179.
- [22] J.M. Murillo, T. Marañón, F. Cabrera, R. López, Accumulation of heavy metals in sunflower and sorghum plants affected by the Guadiamar spill, *Sci. Total Environ.* 242 (1999) 281–292.
- [23] A. Kabata-Pendias, H. Pendias, Trace Elements in the Soil and Plants, CRC press, Boca Raton, Florida, 1984.
- [24] N.S. Subba Rao, Biofertilizers in Agriculture and Forestry, Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi, 1993, p. 242.
- [25] M. Albareda, D.N. Rodríguez-Navarro, M. Camacho, F.J. Temprano, Alternatives to peat as a carrier for rhizobia: solid and liquid formulations, *Soil Biol. Biochem.* 40 (2008) 2771–2779.
- [26] M. Del Río, F. Font, C. Almela, D. Vélez, M. Matoro, A. De Haro, Heavy metal and arsenic uptake by wild vegetation in the Guadiamar river area after the toxic spill of the Aznalcóllar mine, *J. Biotechnol.* 98 (2002) 125–137.
- [27] M.N.V. Prasad, H.M. Freitas, Metal hyperaccumulation in plants. Biodiversity prospecting for phytoremediation technology, *Electr. J. Biotechnol.* 6 (2003) 287–321.
- [28] A. Ike, R. Sriprang, H. Ono, Y. Murooka, M. Yamashita, Bioremediation of cadmium contaminated soil using symbiosis between leguminous plant and recombinant rhizobia with the MTL4 and the PCS genes, *Chemosphere* 66 (2007) 1670–1676.
- [29] J. Pastor, A.J. Hernández, N. Prieto, M. Fernández-Pascual, Accumulating behaviour of *Lupinus albus* L. growing in a normal and a decalcified calcic luvisol polluted with Zn, *J. Plant Physiol.* 160 (2003) 1457–1465.
- [30] M.K. Udvardi, T. Tabata, M. Parniske, J. Stougaard, *Lotus japonicus*: legume research in the fast lane, *Trends Plant Sci.* 10 (2005) 222–228.
- [31] S. Vázquez, E. Moreno, R.O. Carpena, Bioavailability of metals and As from acidified multi-contaminated soils: validation of several extraction methods by lupin plants, *Environ. Geochem. Health* 30 (2008) 193–198.
- [32] T. Barac, S. Taghavi, B. Borremans, A. Provoost, L. Oeyen, J.V. Colpaert, J. Vangrosveld, D. Van der Lelie, Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile organic pollutants, *Nat. Biotechnol.* 22 (2004) 584–588.
- [33] M.O. Mendez, R.M. Maier, Phytostabilisation of mine tailings in arid and semi-arid environments: an emerging remediation technology, *Environ. Health Perspect.* 116 (2008) 278–283.
- [34] E. Moreno-Jiménez, J.M. Peñalosa, R. Manzano, R.O. Carpena-Ruiz, R. Gamarra, E. Esteban, Heavy metals distribution in soils surrounding an abandoned mine in NW Madrid (Spain) and their transference to wild flora, *J. Hazard. Mater.* 162 (2009) 854–859.
- [35] M.S. Khan, A. Zaidi, P.A. Wani, M. Oves, Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils, *Environ. Chem. Lett.* 7 (2009) 1–19.
- [36] A. Malik, Metal bioremediation through growing cells, *Environ. Int.* 30 (2004) 261–278.
- [37] B. Volesky, Biosorption and me, *Water Res.* 41 (2007) 4017–4029.
- [38] M. Valls, S. Atrian, V. de Lorenzo, L.A. Fernández, Engineering a mouse metallothionein on the cell surface of *Ralstonia eutropha* CH34 for immobilization of heavy metals in soil, *Nat. Biotechnol.* 18 (2000) 661–665.
- [39] D.H. Nies, Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes, *FEMS Microbiol. Rev.* 27 (2003) 313–339.
- [40] S. Silver, L.T. Phung, A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32 (2005) 587–605.

Ignacio D. Rodríguez-Llorente

Djamila Gamane

Alejandro Lafuente

Mohammed Dary

Abdelaziz El Hamdaoui

Julián Delgadillo

Bouchra Doukkali

Miguel A. Caviedes

Eloísa Pajuelo

Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain

## Research Article

# Cadmium biosorption properties of the metal-resistant *Ochrobactrum cytisi* Azn6.2

The aim of this work was to establish the conditions for using *Ochrobactrum cytisi* Azn6.2 as a metal biosorbent. Azn6.2 is a novel strain from the legume symbiont *O. cytisi* that has been isolated from nodules of *Medicago polymorpha* plants grown on heavy metal-polluted soils. Compared with the strain ESC1, Azn6.2 showed some biochemical differences, as well as antibiotic susceptibility, Azn6.2 was multi-resistant to heavy metals, such as Cu, Cd and Zn, and bacterial pellets were able to biosorb high amounts of Cd and Zn. As shown by scanning electron microscopy coupled to energy dispersive X-ray, most of Cd was attached to the cell surface. Optimal conditions for Cd biosorption were established, being 1 mM Cd ions in solution and 2 h of contact with the biosorbent at room temperature. At these conditions, maximal Cd loading capacity reached 32–34 mg/g. Cd desorption from bacterial pellets was achieved after washing with EDTA or, at higher efficiency, at pH 1.0. These results indicated that biosorption/desorption on *O. cytisi* Azn6.2 biomass should be a cost-effective method for Cd recovery from contaminated solutions.

**Keywords:** Biosorption / Cadmium / *Ochrobactrum cytisi*

*Received:* July 28, 2009; *revised:* November 23, 2009; *accepted:* December 18, 2009

**DOI:** 10.1002/elsc.200900060

## 1 Introduction

Heavy metals released into the environment by human activities tend to persist for a long time, and their eventual accumulation throughout the food chain leads to serious ecological and health problems. Industrial effluents containing heavy metals drain into the rivers, contaminating the sources of human and animal drinking water. Although conventional physico-chemical processes to remove heavy metals can be adopted, they are not adequate to clean up industrial wastes contaminated by diluted metallic solutions. In addition, these processes are expensive in terms of energy and chemical products consumption [1]. Alternative methods of metal removal based on biological materials, known as bioremediation, have been proposed. In that way, microorganisms are an interesting solution for heavy metal remediation, since they show a number of responses to metal ions that include metal

biosorption, metal precipitation and enzymatic metal transformation [2].

Biosorption has been defined as the property of certain biomolecules (or types of biomass) to bind and concentrate selected ions or other molecules from aqueous solutions [3]. Bioremediation processes based on the biosorption of toxic heavy metals by various types of biomass, including bacteria, fungi and algae, are considered as environmentally friendly and cost-effective [4, 5]. Bacteria make excellent biosorbents because of their high surface-to-volume ratios and high content of potentially active chemisorption sites, mainly in the bacterial cell wall, that contains chemical compounds with sites capable of passively sequestering metals [6, 7]. Furthermore, microorganisms often secrete large amounts of viscous slime outside the cells for multiple reasons (adhesion to surfaces, protection, retention of water, etc.). The extracellular polymeric substances in the slime, usually composed of polysaccharides, have been utilized for heavy metal sorption [8]. An increasing number of reports on the potential use of different bacteria in the bioremediation of wastewaters by metal biosorption are being published [9]. Examples of these bacteria include genera *Bacillus* [10], *Enterobacter* [11], *Pseudomonas* [12, 13] or *Ochrobactrum* [14].

The genus *Ochrobactrum* belongs to Brucellaceae family comprising species including human pathogens, such as *Ochrobactrum anthropi* [15], rhizosphere bacteria such

**Correspondence:** Dr. Eloísa Pajuelo (epajuelo@us.es), Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Profesor García González 2, 41012-Sevilla, Spain

**Abbreviations:** ICP-OES, inductively coupled plasma-optical emission spectrometer; ITS, internal transcribed spacer; EDX, energy dispersive X-ray; SEM, scanning electron microscopy; TY, tryptone yeast

as *Ochrobactrum tritici* [16] and legume endosymbionts such as *Ochrobactrum lupini* [17] and *O. cytisi* [18]. Ozdemir *et al.* [14] have reported the use of the human pathogen *O. anthropi* dead biomass to remove chromium, cadmium and copper by heavy metal biosorption. Several authors have also reported the potential use of different *Ochrobactrum* sp. strains in bioremediation of chromium-contaminated wastewaters [19, 20].

In this work we report the characterization of *Ochrobactrum* sp. Azn6.2 as a new *O. cytisi* strain isolated from nodules of *Medicago polymorpha* plants grown on metal-contaminated soils. We have recently described a bacterial consortium, including this strain, that efficiently promotes plant growth and metal tolerance in a heavy metal-contaminated field [21]. The aim of this study was to determine the metal, especially cadmium, biosorption and bioaccumulation properties of *O. cytisi* Azn6.2 biomass and confirm its potential in bioremediation.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Isolation of *O. cytisi* Azn6.2 and ESC1

*O. cytisi* strains Azn6.2 and ESC1<sup>T</sup> [18] were isolated, respectively, from non-fixing white nodules of native *M. polymorpha* and *Cytisus scoparius* plants grown on soils contaminated by As and heavy metals after a toxic mine spill [22]. Bacteria were isolated basically as described by Carrasco *et al.* [23]. Nodules were surface-sterilized by immersing in 3% sodium hypochlorite for 5 min and washing five times with sterile distilled water. Nodules were squashed in a drop of sterilized water onto the surface of tryptone yeast (TY) extract medium [24] containing 250 µg/mL cycloheximide on Petri dishes and incubated at 28°C for 48 h. Isolates were streaked out on TY plates and a single colony picked.

### 2.2 PCR amplification and sequence analysis

Amplification and sequencing of the nearly complete 16S rRNA gene (1401 bp) was performed as described by Rivas *et al.* [25]. The PCR amplification was carried out using primers 8F (5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3') and 1522R (5'-AAGGAGGTGATCCANCCRCA-3'). The 16S-23S intergenic spacer internal transcribed spacer (ITS) region was amplified and sequenced as described by Leuhn *et al.* [26]. PCR of ITS1 was performed with primers O-ITS-1a-f (5'-TGCCGCGGTGAATACGTTCCC-3') and O-ITS-2a-r (5'-GCCAAGGCATCCACCAAATGCC-3'), amplifying a DNA fragment of around 1400 bp (from which 706 bp correspond to the ITS1 region). Sequences comparison was performed by using the BLASTN program [27].

### 2.3 Biochemical properties

Biochemical characteristics of *O. cytisi* ESC1 and Azn6.2 strains were determined using the commercial

system API 20NE (BioMérieux), following the instructions of the manufacturer. *O. anthropi* LMG3331<sup>T</sup> and *O. lupini* LUP21<sup>T</sup> were used as phylogenetically related control species.

### 2.4 Heavy metals and antibiotics resistance

Bacterial resistance to As and heavy metals was determined by growth inhibition plate assays in TY medium containing 1–8 mM concentration series of arsenite (NaAsO<sub>2</sub>) or zinc (ZnSO<sub>4</sub>) and 0.125–4.5 mM concentration series of cadmium (CdCl<sub>2</sub>) and copper (CuSO<sub>4</sub>). Plates were incubated at 28°C. Growth was scored after 48–72 h and was monitored for additional 72 h. The parameter used to evaluate the levels of resistance was the maximum tolerable concentration, which is the highest concentration that does not affect the viable count.

The susceptibility of *Ochrobactrum* species to antibiotics was determined by dilution antimicrobial susceptibility tests as described by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), in the M07 document, that addresses reference methods for the determination of minimal inhibitory concentrations of aerobic bacteria by broth macrodilution in tryptone soya broth (TSB) medium (Oxoid) ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)).

### 2.5 Determination of As and metal accumulation in *O. cytisi* cells

Accumulation of As, Cd, Cu or Zn in ESC1 and Azn6.2 dried cells was determined as follows: 250 mL of liquid TY medium containing 2 mM NaAsO<sub>2</sub>, 1 mM CdCl<sub>2</sub>, 2 mM CuSO<sub>4</sub>, 2 mM ZnCl<sub>2</sub> or without metal were inoculated with 5 mL of a saturated 24 h culture of Azn6.2. For every treatment, two independent flasks of 250 mL cultures, containing As, Cd, Cu or Zn, and one more without metal (growth control) were inoculated. Cultures were incubated for 5 days at 28°C and centrifuged at 10 000 g for 20 min at room temperature. One sample of cells of each metal treatment was washed twice for 5 min with water and another with 0.2 M EDTA, pH 8.0. Cells were centrifuged at 10 000 g for 20 min at room temperature between washing steps. Finally, cells were dried in the oven for 72 h at 60°C and As, Cd, Cu and Zn accumulation were determined in dried bacteria by inductively coupled plasma-optical emission spectrometer (ICP-OES) [28].

### 2.6 Cd biosorption in *O. cytisi* Azn6.2 biomass

Optimal conditions for Cd biosorption in *O. cytisi* Azn6.2 biomass were determined using a BioBundle Fermentation System (Applikon Biotechnology, The Netherlands), consisting on a 3 L autoclavable glass bioreactor coupled with an ADI 1010 Bio Controller and an ADI 1025 Bio Console. The effects of metal ion concentration, contact time and temperature on the biosorption of Cd were studied as follows. First, the bioreactor was filled with water amended with 0.25, 0.33, 0.5, 1.0, 1.5 or 2.0 mM CdCl<sub>2</sub> and containing the Azn6.2 biomass corresponding to 3 L of a stationary growth phase culture. Cd



biosorption was determined after 24 h at 28°C in dried cells by ICP-OES [28]. The effect of contact time on Cd biosorption was studied following the same protocol using a 1.0 mM CdCl<sub>2</sub> solution and taking samples of 250 mL after 30 min, 2, 6, 12 and 24 h at 28°C. Finally, to assess the effect of temperature, the contact between the metal and the cells took place at 15, 20, 28, 37 or 42°C for 2 h, using again a 1.0 mM CdCl<sub>2</sub> solution. The pH of the solutions was around 7.5. Ozdemir *et al.* [14] have described that maximal Cd loading capacity of *O. antropi* cells takes place at pH 8.0.

To study the desorption conditions for cadmium bound to Azn6.2 cells, the biomass corresponding to 1 L of a stationary growth phase culture was placed in the bioreactor containing 1.0 mM CdCl<sub>2</sub> at 28°C for 2 h. Five samples of 250 mL culture were centrifuged at 10 000 g for 20 min at room temperature, supernatant was removed and bacteria were washed for 5 min with 0.2 M EDTA, pH 8.0, or with water solutions containing reagent grade HCl at concentrations 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> and 10<sup>-4</sup> M (pH 1.0, 2.0, 3.0 or 4.0, respectively). Cd content in dried cells was measured by ICP-OES [28].

## 2.7 Scanning electron microscope

A scanning electron microscope equipped with an energy dispersive X-ray spectrometer (SEM-EDX) was used to observe the morphology of the cells and to analyze Cd content in dried cells. An Azn6.2 exponential phase culture was cultivated for 2 h in the presence of 1 mM CdCl<sub>2</sub>. Two aliquots of 1.5 mL were collected by centrifugation at 8 000 g for 10 min and rinsed twice for 5 min with deionized water or with 0.2 M EDTA, pH 8.0. Samples were fixed and dehydrated basically as described by El-Rab *et al.* [29]. Cells were fixed with glutaraldehyde (2.5%) in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) for 1 h at room temperature, washed with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) for 20 min and dehydrated in a series of ethanol-isoamyl

alcohol (50–99.5%) 10 min for each one. One aliquot of the same culture was also collected by centrifugation, diluted 100 times and stained with osmium following standard SEM protocols. The same protocol was developed for a bacterial sample growth in the absence of Cd as control of cell morphology. The samples were coated with gold and observed with an SEM (JEOL 6460 LV), equipped with an energy dispersive X-ray spectrometer (Oxford Inca Energy 350).

## 3 Results and discussion

### 3.1 Characterization of *O. cytisi* Azn6.2

*Ochrobactrum* sp. Azn6.2 was isolated from non-fixing white nodules of native *M. polymorpha* plants grown on soils contaminated by As and heavy metals after a toxic mine spill [22]. The nearly complete 16S rRNA gene (*rrn*) sequences were obtained by PCR amplification and sent to GeneBank database (EU817132). This sequence showed 100% similarity with *O. cytisi* ESC1<sup>T</sup>, which has been isolated from nodules of *Cytisus scoparius* grown in the same contaminated soils [18]. Sequence comparison of 16S–23S rRNA ITS regions provides a fast way of assessing relatedness between species of the genus *Ochrobactrum* because good correlations have been found among ITS1 and *rrn* sequences and DNA–DNA hybridization values [25]. A pairwise analysis of partial ITS sequence of Azn6.2 strain (FJ842650) showed 99.4% identity with *O. cytisi* ESC1<sup>T</sup>. These genotypic results strongly suggest that *Ochrobactrum* sp. strain Azn6.2 belongs to *O. cytisi* species. Biochemical differences have been found between the strain described in this work (*O. cytisi* Azn6.2) and the type strain ESC1 (see Table 1). These two strains also showed differences in susceptibility to several antibiotics (see Table 1). Azn6.2 strain showed very high levels of resistance to tetracycline and

**Table 1.** As and heavy metals resistance, antibiotic sensitivity and biochemical properties of *O. cytisi* strains ESC1 and Azn6.2 and phylogenetically related *Ochrobactrum* species.

Characteristics	ESC1	Azn6.2	LMG	LUP
<b>Resistance to metals (maximum tolerable concentration):</b>				
As (mM)	6	6	2	2
Cd (mM)	1.5	1.5	0.5	1
Cu (mM)	3.5	3.5	2	2
Zn (mM)	6	6	6	6
<b>Antibiotic sensitivity (CMI):</b>				
Ampicillin (µg/mL)	> 100	> 100	> 100	> 100
Tetracycline (µg/mL)	2.5	20	0.625	2.5
Nalidixic acid (µg/mL)	< 0.4	25	6.25	6.25
Rifampicin (µg/mL)	3.12	6.25	3.12	6.25
<b>Biochemical properties:</b>				
Nitrate reduction	+	+	+	–
Urease	–	+	+	+
Aldehyde dehydrogenase	–	+	nd	nd
α-Glucosidase	+	–	w	+

+, positive reaction; –, negative reaction; w, weakly positive reaction; nd, not determined. Species and strains: ESC1, *Ochrobactrum cytisi* ESC1<sup>T</sup>, Azn6.2, *O. cytisi* Azn6.2, LMG, *O. anthropi* LMG 3331<sup>T</sup>, LUP, *O. lupini* LUP21<sup>T</sup>.

nalidixic acid when compared with *O. cytisi* ESC1 strain and phylogenetically related control species. Since *O. anthropi*, the first species described within this genus is known to be a human pathogen, the susceptibility of *Ochrobactrum* strains to antibiotics is commonly used to classify *Ochrobactrum* isolates [17, 18]. Taken together, these results suggest that Azn6.2 is a novel strain of the *O. cytisi* species.

### 3.2 Resistance of *Ochrobactrum* to As and heavy metals

The resistance of *O. cytisi* ESC1 and Azn6.2 strains and related *Ochrobactrum* species to As and heavy metals was evaluated

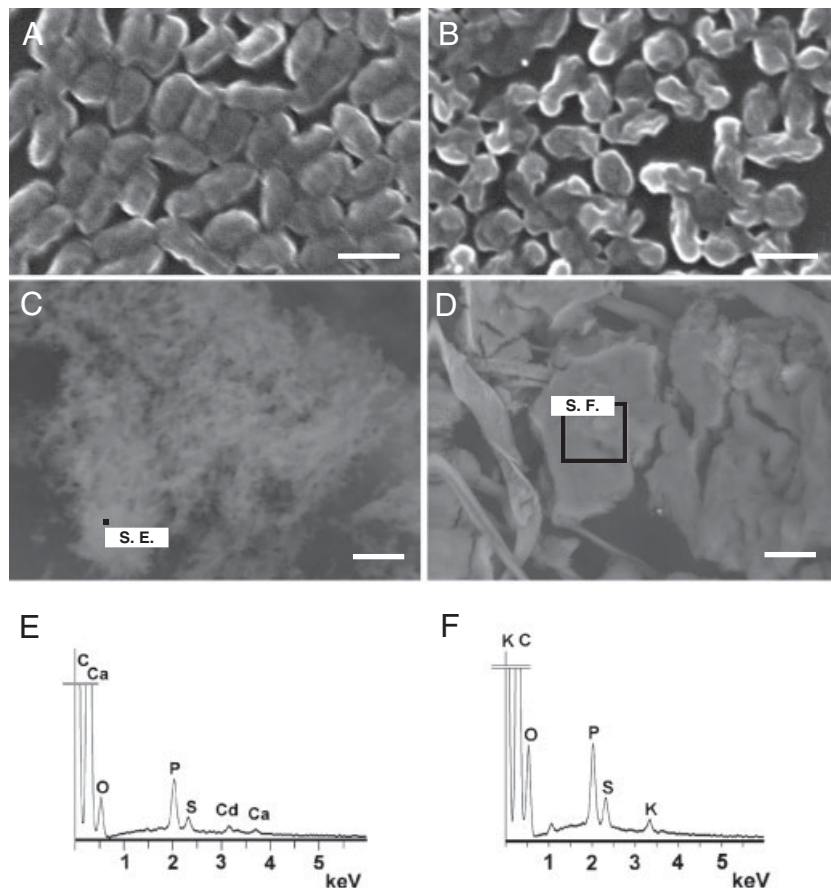
**Table 2.** Biosorption of As, Cu, Cd and Zn in cells of *Ochrobactrum cytisi* strains ESC1 (E1) and Azn6.2 (A2) incubated in the presence of 2 mM As, 2 mM Cu, 1 mM Cd or 2 mM Zn, and washed with water or 0.2 M EDTA. Data are mean of three independent determinations  $\pm$  SE.

Metal	Water (E1)	EDTA (E1)	Water (A2)	EDTA (A2)
As ( $\mu\text{g/g}$ )	1 047 $\pm$ 98	422 $\pm$ 76	1 083 $\pm$ 88	431 $\pm$ 69
Cd ( $\mu\text{g/g}$ )	25 304 $\pm$ 1 757	4 065 $\pm$ 305	26 201 $\pm$ 1 830	4 137 $\pm$ 376
Cu ( $\mu\text{g/g}$ )	3 499 $\pm$ 221	1 491 $\pm$ 152	3 185 $\pm$ 163	1 179 $\pm$ 128
Zn ( $\mu\text{g/g}$ )	28 617 $\pm$ 1 830	6 239 $\pm$ 687	30 604 $\pm$ 1 935	6 580 $\pm$ 732

(see Table 1). Three metals (Cd, Cu and Zn) together with arsenic are considered as persistent in soils affected by the Aznalcóllar mine spill even several years after the cleaning works were finished [30]. *O. cytisi* strains isolated from metal-contaminated soils (ESC1 and Azn6.2) showed higher metal resistance compared with phylogenetically related control species. The resistance to As, Cd and Cu was between 1.5 and 3 times higher for *O. cytisi* strains. Nevertheless the same level of Zn resistance was found for all species.

### 3.3 As and metals bioaccumulation and biosorption on *O. cytisi* cells

In order to assess the potential of the *O. cytisi* strains in bioremediation of metals, we measured As, Cd, Cu and Zn accumulation in dried biomass of ESC1 and Azn6.2 washed either with water, to determine total metal accumulation, or with 0.2 M EDTA, to establish the amount of metal bound to the cell surface by biosorption (see Table 2). Results indicated that both strains have a high capability to bind metals, especially Cd and Zn. Lower loading capacities were found for As (around 20 times) and Cu (eight to ten times). Furthermore, a great part of the metal (between 55 and 85% depending on the metal) was accumulated outside the cell, probably bound to the lipopolysaccharide of the cell wall, since washing with EDTA was able to extract part of the metal. According to



**Figure 1.** SEM of *O. cytisi* Azn6.2 cells after 2 h of Cd treatment; (A) control non-treated cells; (B) morphological aspect of Cd-treated cells. Aspect of the surface of Cd-treated bacterial pellet after washing with water (C) or 0.2 M EDTA (D). (E) Spectrum of EDX analysis of (C). (F) Spectrum of EDX analysis of (D). S. E. = point of determination for spectrum represented in (E); S. F. = area of determination for spectrum represented in (F). Note that spectrum area for EDX analysis in 9C) is a point while in (D) is delimited by a black box, which is larger. Bar = 1  $\mu\text{M}$  (A and B), 10  $\mu\text{M}$  (C), 50  $\mu\text{M}$  (D).

Volesky [3], biosorption of metals is a passive phenomenon based mainly on the “affinity” between the (bio-)sorbent and sorbate. The amount of metal remaining after washing with EDTA could be considered as the metal accumulated within the cells.

To further confirm this result we have analyzed the content of Cd in cells of Azn6.2 using a scanning electron microscope equipped with an energy dispersive X-ray spectrometer (SEM-EDX) (Fig. 1). We have first observed by SEM the morphological aspect of individual cells cultivated in the presence or absence of Cd (Figs. 1A and B). Morphological changes, mainly affecting the cell shape, were observed in cells treated with Cd. A semi-quantitative Cd determination in bacterial pellets containing approximately 1 mg of cells was performed using SEM-EDX (Figs. 1C and D). EDX analysis indicated that significant amounts of Cd were taken up by *Ochrobactrum* cells washed with water (Fig. 1E), while Cd was not detected once the precipitated cells were washed with EDTA (Fig. 1F). As seen on Fig. 1E, another divalent cation ( $\text{Ca}^{2+}$ ) was removed by EDTA washing, together with Cd. These results confirm that most of Cd is adsorbed to the cell surface.

### 3.4 Optimization of Cd biosorption conditions in *O. cytisi* Azn6.2 biomass

According to the United States Environmental Protection Agency (EPA), Cd is one of the inorganic compounds that usually contaminate drinking water. The maximal concentration level allowed for this metal is 0.005 mg/L (5 ppb). In addition, Cd is one of six substances banned by the European Union’s Restriction on Hazardous Substances (RoHS) directive, which bans certain hazardous substances in electronics. Due to its toxicity, the aim of this study was to determine the Cd biosorption and bioaccumulation properties of *O. cytisi* Azn6.2 biomass and assess its potential in bioremediation. Conditions for maximal Cd biosorption were determined. In particular, Cd concentration, time of contact between biomass and metal and temperature were optimized.

#### 3.4.1 Effect of initial concentration of Cd ions on the biosorption capacity

Increasing Cd concentrations, ranging from 0.25 to 2 mM, were assayed. The biosorption capacity of the biomass increased with increasing metal concentration and reached a saturation value. When the concentration increased from 0.25 to 1 mM, the loading capacity increased from 8 341 to 29 204 ppm. Higher Cd concentrations did not lead to significantly higher loading capacities (Fig. 2A).

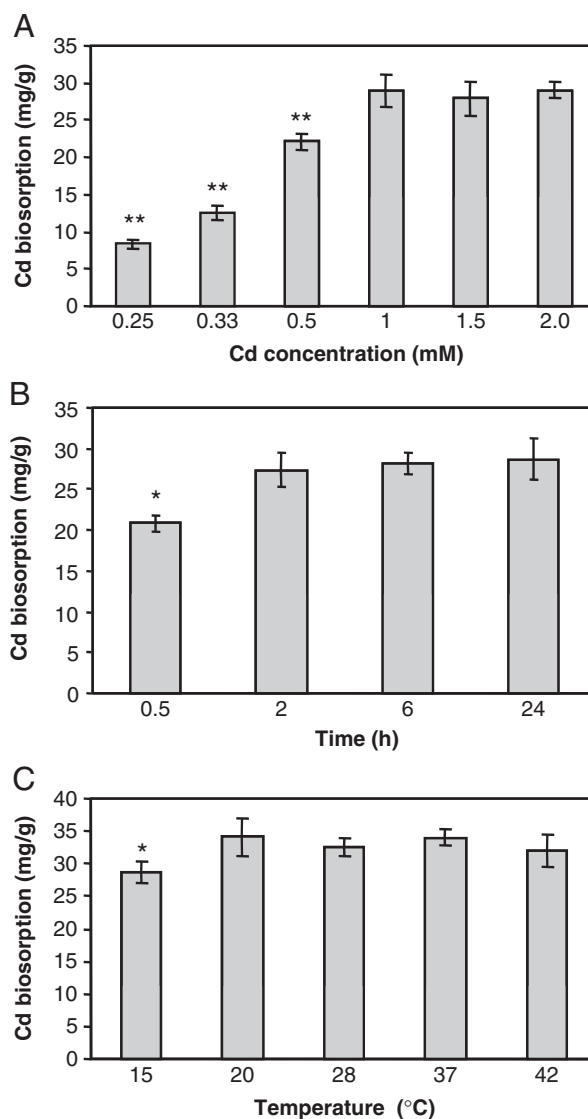
#### 3.4.2 Biosorption times

Maximal Cd loading capacity was achieved within the first 2 of contact between metal and *Ochrobactrum* cells. After this period the amount of absorbed metal did not significantly

increase (Fig. 2B). Our result is consistent with minimal contact time between Cd and biosorbents described in the literature, which ranges from 30 min to 2 h (see Table 3). Nevertheless, higher incubation times have also been described [31].

#### 3.4.3 Effect of temperature on Cd biosorption

The effect of temperature on Cd loading capacity was determined in an interval ranging from 15 to 42°C. Maximal loading capacity was found in a wide range of temperatures (from 20 to 42°C). Cd loading capacity at 15°C



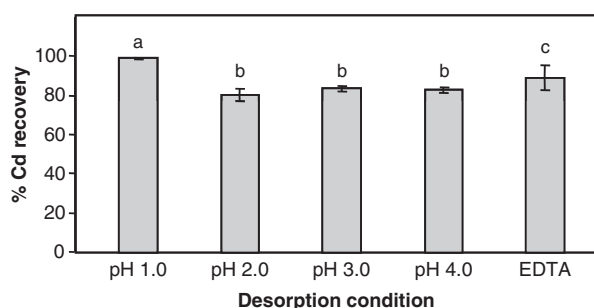
**Figure 2.** Optimization of Cd biosorption conditions on *O. cytisi* Azn6.2 cells. Cd ion concentration (A), time of contact between Cd and biosorbent (B) and temperature (C) were optimized in a 3 L bioreactor. Data are mean of three independent determinations  $\pm$  SD. Significant differences from the maximum Cd biosorption rates as determined by Student’s *t* test are indicated by \* ( $p < 0.05$ ) or \*\* ( $p < 0.01$ ).

**Table 3.** Comparison of Cd biosorption parameters of *O. cytisi* Azn6.2 with other biosorbents from selected literature.

Biosorbent	Operating conditions			Amount adsorbed (mg/g)	Ref.
	pH	Temp.(°C)	Time (h)		
<i>Bacillus circulans</i>	7	30	2	26.5 <sup>a)</sup>	[10]
<i>Enterobacter</i> sp. J1	6	30	1	46.2 <sup>b)</sup>	[11]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PU21	6	25	24	42.4 <sup>b)</sup>	[31]
<i>Pseudomonas putida</i>	6	30	1	8.0 <sup>b)</sup>	[32]
<i>P. stutzeri</i> KCCM 34719	5	30	0.5	43.5 <sup>b)</sup>	[12]
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	8	30	2	37.3 <sup>b)</sup>	[14]
<i>Ochrobactrum cytisi</i> Azn6.2	7.5	20–42	2	34.0 <sup>a)</sup>	This work

a) Experimental uptake.

b) Uptake predicted by the Langmuir model.

**Figure 3.** Cd recovery from *O. cytisi* Azn6.2 bacterial pellets. Cells were treated with Cd in optimal biosorption conditions determined as shown in Fig. 2. Different Cd desorption conditions, including washing at acidic pH (from 1.0 to 4.0) or with 0.2 M EDTA, were tested. Data are mean of three independent determinations  $\pm$  SD. Significant differences between the results as determined by Student's *t* test are indicated by different letters ( $p < 0.05$ ), except for "a" ( $p < 0.01$ ).

was approximately 15% lower (Fig. 2C). Most of the bacteria used as biosorbent showed a maximal biosorption capacity at 25–30°C (see Table 3). In our case the possibility to perform the biosorption process at room temperature makes it more cost-effective.

In summary, the optimal conditions for Cd biosorption to *O. cytisi* Azn6.2 cells were: 1 mM Cd<sup>2+</sup> for 2 h at room temperature. Once all the parameters were optimized, maximal Cd biosorption loading capacity was 32–34 mg/g. This adsorption capacity is of the same order of magnitude than what has been found using similar bacteria as biosorbents (see Table 3). In particular, similar Cd biosorption loading capacity has been previously described for *O. anthropi* biomass [14]. However, this *Ochrobactrum* species is a known human pathogen, an important disadvantage of using it for bioremediation, as compared with *O. cytisi*, which is a plant symbiont. The results described in this work together with the efficiency of *O. cytisi* Azn6.2 strain to promote plant growth in heavy metal contaminated soils, probably by metal biosorption at the rhizosphere level, suggest that these bacteria should be useful both in rhizoremediation in association with plants [21] or as metal biosorbent for wastewaters treatment.

### 3.5 Cd recovery

One advantage of the biosorption technique is the possibility of metal recovery from the bacterial biomass. We did study the optimal conditions for Cd desorption using two strategies, Cd chelation with EDTA and desorption at acidic pH (from 1.0 to 4.0). Results are shown in Fig. 3. Treatment with 0.2 M EDTA was able to desorb 90% of the metal. On the other hand, desorption at pH 1.0 was the most effective treatment for Cd recovery, being able to desorb more than 99% of total Cd. Desorption at higher pH was not so effective, with a metal recovery between 83 and 87%. Our results pointed to HCl at pH 1.0 as the most cost-effective method for Cd recovery from *O. cytisi* biomass. Desorption using mineral acids is a general method for metal recovery from biosorbents, having been used for example for Pb recovery from *Spirulina maxima* biomass [33], Cu and Zn recovery from *Pseudomonas putida* [34] or more recently Cd recovery from genetically modified *E. coli* [35]. In all these studies the percentage of metal recovery was lower than the 99% achieved in this study in only 5 min of washing.

## 4 Concluding remarks

Azn6.2 is a new strain of the *O. cytisi* species isolated from nodules of legumes grown on metal-contaminated soils. *O. cytisi* Azn6.2 is well suited for the removal of metals from aqueous solutions due to its rapid growth rate as well as its high capacity of biosorption. The optimal conditions for Cd biosorption were established: 1 mM Cd<sup>2+</sup> for 2 h at room temperature. In these conditions, maximal Cd loading capacity of Azn6.2 cells was 32–34 mg/g. More than 99% of the Cd can be recovered from bacterial cells after washing at pH 1.0. Finally, Cd biosorption/desorption to *O. cytisi* Azn6.2 cells should be an effective method to clean up contaminated effluents and to recover the metal.

## Acknowledgements

This work has been financed by Ministerio de Ciencia e Innovación (BIO-2006-02245), Junta de Andalucía (P06-CVI-

01850) and INIA (RTA-2006-059-C02). A.L. thanks Junta de Andalucía and J.D. thanks CONACYT for financial support. The authors also thank Central Research Services of the University of Sevilla (CITIUS) for the use of facilities and technical assistance by personnel of biology department and microscopy and microanalysis services.

### Conflict of interest

The authors have declared no conflict of interest

### References

- [1] B. W. Atkinson, F. Bux, H. C. Kusan, Considerations for application of biosorption technology to remediate metal-contaminated industrial effluents, *Water SA*. **1998**, *24*, 129–135.
- [2] M. Valls, V. de Lorenzo, Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution, *FEMS Microbiol. Rev.* **2002**, *26*, 327–338.
- [3] B. Volesky, Biosorption and me, *Water Res.* **2007**, *41*, 4017–4029.
- [4] R. H. S. F. Vieira, B. Volesky, Biosorption: a solution to pollution? *Int. Microbiol.* **2000**, *3*, 17–24.
- [5] A. Malik, Metal bioremediation through growing cells, *Environ. Int.* **2004**, *30*, 261–278.
- [6] T. J. Beveridge, The role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization, *Annu. Rev. Microbiol.* **1989**, *43*, 147–171.
- [7] J. Remacle, in B. Volesky (Ed.), *Biosorption of Heavy Metals*, CRC Press, Boca Raton, FL **1990**, 83–92.
- [8] D. L. Gutnick, H. Bach, Engineering bacterial biopolymers for the biosorption of heavy metals: new products and novel formulations, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, *54*, 451–460.
- [9] K. Vijayaraghavan, Y. S. Yun, Bacterial biosorbents and biosorption, *Biotechnol. Adv.* **2008**, *26*, 266–291.
- [10] E. I. Yilmaz, N. Y. Ensari, Cadmium biosorption by *Bacillus circulans* strain EB1, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 777–779.
- [11] W. B. Lu, J. J. Shi, C. H. Wang, J. S. Chang, and cadmium by an indigenous isolate *Enterobacter* sp. J1 possessing high heavy-metal resistance, *J. Hazard. Mater.* **2006**, *134*, 80–86.
- [12] S. H. A. Hassan, S. J. Kim, A. Y. Jung, J. H. Joo *et al.*, Biosorptive capacity of Cd(II) and Cu(II) by lyophilized cells of *Pseudomonas stutzeri*, *J. Gen. Appl. Microbiol.* **2009**, *55*, 27–34.
- [13] A. Uzel, G. Ozdemir, Metal biosorption capacity of the organic solvent tolerant *Pseudomonas fluorescens* TEM08, *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 542–548.
- [14] G. Ozdemir, T. Ozturk, N. Ceyhan, R. Isler, T. Cosar, Heavy metal biosorption by biomass of *Ochrobactrum anthropi* producing exopolysaccharide in activated sludge, *Bioresour. Technol.* **2003**, *90*, 71–74.
- [15] B. Holmes, M. Popoff, M. Kiredjian, K. Kersters, *Ochrobactrum anthropi* ge. nov., sp. nov. from human clinic specimens and previously known as group Vd, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1988**, *38*, 406–416.
- [16] M. Lebuhn, W. Achouak, M. Schloter, O. Berge *et al.*, Taxonomic characterization of *Ochrobactrum* sp. isolates from soil samples and wheat roots and description of *Ochrobactrum tritici* sp. nov. and *Ochrobactrum grignonense* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2000**, *50*, 2207–2223.
- [17] M. E. Trujillo, A. Willems, A. Abril, A. M. Planchuela *et al.*, Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 1318–1327.
- [18] J. L. Zurdo-Piñeiro, R. Rivas, M. E. Trujillo, N. Vizcaino *et al.*, *Ochrobactrum cytisi* sp. nov, isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2007**, *57*, 784–788.
- [19] N. K. Kiliç, J. L. Nielsen, M. Yüce, G. Dönmez, Characterization of a simple bacterial consortium for effective treatment of wastewaters with reactive dyes and Cr(VI), *Chemosphere* **2007**, *67*, 826–831.
- [20] Z. He, F. Gao, T. Sha, Y. Hu, C. He, Isolation and characterization of a Cr(VI)-reduction *Ochrobactrum* sp. strain CSCr-3 from chromium landfill, *J. Hazard. Mater.* **2009**, *163*, 869–873.
- [21] M. Dary, M. A. Chamber, A. J. Palomares, E. Pajuelo, *In situ* rhizoremediation of heavy metal contamination using *Lupinus luteus* and metal resistant PGPR inoculants, *J. Hazard. Mater.*, in press. DOI 10.1016/j.hazmat.2009.12.035.
- [22] J. O. Grimalt, M. Ferrer, E. Macpherson, The mine tailing accident in Aznalcóllar, *Sci. Tot. Environ.* **1999**, *242*, 3–11.
- [23] J. A. Carrasco, P. Armario, E. Pajuelo, A. Burgos, M. A. Caviedes, R. López, M. A. Chamber, A. J. Palomares, Isolation and characterisation of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcóllar pyrite mine, *Soil Biol. Biochem.* **2005**, *37*, 1131–1140.
- [24] J. M. Vincent, *A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria*, Blackwell, Oxford, **1970**.
- [25] R. Rivas, E. Velázquez, A. Willems, N. Vizcaino *et al.*, A new species of *Devosia* that forms a nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L. f.) Druce, *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 5217–5222.
- [26] M. Lebuhn, S. Bathe, W. Achouak, A. Hartmann, T. Heulin, M. Schloter, Comparative sequence analysis of the internal transcribed spacer 1 of *Ochrobactrum* species, *Syst. Appl. Microbiol.* **2006**, *29*, 265–275.
- [27] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman, Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410.
- [28] P. Madejón, J. M. Murillo, T. Marañón, F. Cabrera, Bioaccumulation of trace elements in a wild grass three years after the Aznalcóllar mine spill (South Spain), *Environ. Monit. Assess.* **2006**, *114*, 169–189.
- [29] S. M. F. G. El-Rab, A. A.-F. Shoreit, Y. Fukumori, Effects of cadmium stress on growth, morphology and protein expression in *Rhodobacter capsulatus* B10, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2006**, *70*, 2394–2402.

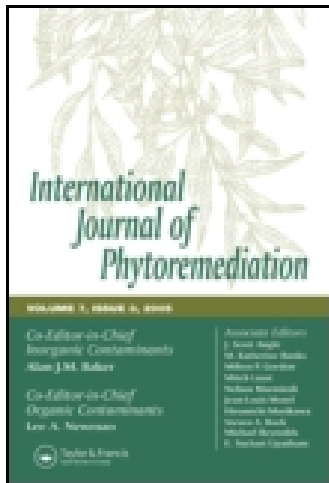
- [30] J. E. Martín, M. A. Respaldiza, J. González, The state of the Guadiamar riverbed after the environmental disaster of 1998 analysed by TTPIXE, *Nuc. Inst. Met. Physic. Res.* **2002**, *188*, 102–105.
- [31] J. S. Chang, R. Law, C. C. Chang, osorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU21, *Water Res.* **1997**, *31*, 1651–1658.
- [32] R. Pardo, M. Herguedas, E. Barrado, M. Vega, Biosorption of cadmium, copper, lead and zinc by inactive biomass of *Pseudomonas putida*, *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *376*, 26–32.
- [33] R. Gong, Y. Ding, H. Liu, Q. Chen, Z. Liu, Lead biosorption and desorption by intact and pretreated *Spirulina maxima* biomass, *Chemosphere* **2005**, *58*, 125–130.
- [34] X. C. Chen, Y. P. Wang, Q. Lin, J. Y. Shi, W. X. Wu, Y. X. Chen, Biosorption of copper and zinc from aqueous solution by *Pseudomonas putida* CZ1, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2005**, *46*, 101–107.
- [35] W. C. Kao, J. Y. Wu, C. C. Chang, J. S. Chang, Cadmium biosorption by polyvinyl alcohol immobilized recombinant *Escherichia coli*, *J. Hazard. Mater.* **2009**, *169*, 651–658.

This article was downloaded by: [Universidad de Sevilla]

On: 05 February 2015, At: 01:54

Publisher: Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



## International Journal of Phytoremediation

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/bijp20>

### RHIZOSTABILIZATION OF METALS IN SOILS USING LUPINUS LUTEUS INOCULATED WITH THE METAL RESISTANT RHIZOBACTERIUM SERRATIA SP. MSMC541

N. El Aafi <sup>a</sup>, F. Brhada <sup>a</sup>, M. Dary <sup>b</sup>, A. Filali Maltouf <sup>a</sup> & E. Pajuelo <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, University Mohamed V- Agdal, Faculty of Sciences, Rabat, MOROCCO

<sup>b</sup> Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, University of Sevilla, SPAIN

Published online: 30 Sep 2011.

To cite this article: N. El Aafi, F. Brhada, M. Dary, A. Filali Maltouf & E. Pajuelo (2012) RHIZOSTABILIZATION OF METALS IN SOILS USING LUPINUS LUTEUS INOCULATED WITH THE METAL RESISTANT RHIZOBACTERIUM SERRATIA SP. MSMC541, International Journal of Phytoremediation, 14:3, 261-274, DOI: [10.1080/15226514.2011.604693](https://doi.org/10.1080/15226514.2011.604693)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/15226514.2011.604693>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Taylor & Francis makes every effort to ensure the accuracy of all the information (the "Content") contained in the publications on our platform. However, Taylor & Francis, our agents, and our licensors make no representations or warranties whatsoever as to the accuracy, completeness, or suitability for any purpose of the Content. Any opinions and views expressed in this publication are the opinions and views of the authors, and are not the views of or endorsed by Taylor & Francis. The accuracy of the Content should not be relied upon and should be independently verified with primary sources of information. Taylor and Francis shall not be liable for any losses, actions, claims, proceedings, demands, costs, expenses, damages, and other liabilities whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with, in relation to or arising out of the use of the Content.

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden. Terms &





## **RHIZOSTABILIZATION OF METALS IN SOILS USING LUPINUS LUTEUS INOCULATED WITH THE METAL RESISTANT RHIZOBACTERIUM SERRATIA SP. MSMC541**

**N. El Aafi,<sup>1</sup> F. Brhada,<sup>1</sup> M. Dary,<sup>2</sup> A. Filali Maltouf,<sup>1</sup>  
and E. Pajuelo<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, University Mohamed V-  
Agdal, Faculty of Sciences, Rabat, MOROCCO

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, University of Sevilla, SPAIN

*The aim of this work was to test Lupinus luteus plants, inoculated with metal resistant rhizobacteria, in order to phytostabilise metals in contaminated soils. The resistance to heavy metals of strains isolated from nodules of Lupinus plants was evaluated. The strain MSMC541 showed multi-resistance to several metals (up to 13.3 mM As, 2.2 mM Cd, 2.3 mM Cu, 9 mM Pb and 30 mM Zn), and it was selected for further characterization. Furthermore, this strain was able to biosorb great amounts of metals in cell biomass. 16S rDNA sequencing positioned this strain within the genus Serratia. The presence of arsenic resistance genes was confirmed by southern blot and PCR amplification.*

*A rhizoremediation pot experiment was conducted using Lupinus luteus grown on sand supplemented with heavy metals and inoculated with MSMC541. Plant growth parameters and metal accumulation were determined in inoculated vs. non-inoculated Lupinus luteus plants. The results showed that inoculation with MSMC541 improved the plant tolerance to metals. At the same time, metal translocation to the shoot was significantly reduced upon inoculation. These results suggest that Lupinus luteus plants, inoculated with the metal resistant strain Serratia sp. MSMC541, have a great potential for phytostabilization of metal contaminated soils.*

**KEY WORDS:** enterobacteriaceae, gamma-proteobacteria, heavy metals, legumes, rhizoremediation, yellow lupines

## **INTRODUCTION**

Soil heavy metal pollution has accelerated dramatically since the beginning of the industrial revolution, as a consequence of mining and smelting of metalliferous ores, burning of fossil fuels, sewage, municipal wastes, fertilizers, and pesticides (Cunningham and Ow 1996). Main adverse consequences of pollution are erosion and leaching of metal ions, water contamination, uptake by plants, direct or indirect human intake and reduced biodiversity (McGrath et al. 1995).

Address correspondence to Eloisa Pajuelo, Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, University of Sevilla, Spain. E-mail: epajuelo@us.es

To survive under metal stress conditions, bacteria have developed mechanisms such as metal exclusion by permeability barrier, intra- and extra-cellular sequestration, active efflux pumps, enzymatic reduction, metal volatilization and bioprecipitation (Nies 1999). Genetic determinants conferring metal resistance are found both on plasmids and chromosomes (Silver and Phung 1996, 2005).

Plants have also evolved mechanisms to tolerate heavy metal contamination such as synthesis of metal binding peptides like metallothioneins and phytochelatins, vacuolar sequestration, immobilization of metals in cell walls, exclusion through the action of plasma membrane, phytovolatilization, etc. (Callahan et al. 2005; Memon and Schroder 2008; Pilon-Smits 2005).

These mechanisms play a key role not only in protecting living organisms from the adverse effects of metals but also in remediating heavy metals contaminated environment (Memon and Schroder 2008; Pilon-Smits 2005; Valls and de Lorenzo 2002). Indeed, current cleanup methods such as incineration, excavation and landfilling, thermal treatment, acid leaching and electro-reclamation are labor intensive, environmentally invasive, and very expensive. Thus, the search and development of alternative remediation strategies in a less expensive, safe and environmentally friendly way is required. Alternative methods are bioremediation and phytoremediation, respectively the use of microbes and plants to reduce, remove, degrade, immobilize, or clean up polluted soils (Cunningham and Ow 1996; Valls and de Lorenzo 2002; Vangronsveld et al. 2009). Main phytoremediation strategies are phytoextraction and phytostabilization. In phytostabilization, plants are used to reduce heavy metals' mobility through absorption and precipitation by plants, thus reducing their bioavailability (Mendez and Maier 2008; Peng et al. 2008). To further enhance the efficiency of metal remediation, the combination of both, phytoremediation and bioremediation, is proposed as a beneficial bioprocess (Glick 2003; Kuiper et al. 2004). Thus, rhizoremediation, i.e., the use of plants and rhizosphere interactions, offers a great potential to efficiently remediate contaminated soils (Abou-Shanab et al. 2003; Khan 2005; Khan et al. 2009; Weyens et al. 2009). In this regard, the symbiosis between legumes and metal-tolerant rhizobia has been proposed as a new rhizoremediation system (Dary et al. 2010; Reichman 2007; Vázquez et al. 2006). Using legumes plants has several advantages compared to other plant families: legumes are known for their agronomic potential, for enhancing soil fertility due to their capacity to fix nitrogen, and for their ability to grow on poor soils, and they have been widely used in soil regeneration (De Hoff and Hirsch 2003; Graham and Vance 2003). Legumes are also interesting for their ability to harbor large numbers of bacteria on their root systems, and to enhance the interactions with other organisms (Kuiper et al. 2004).

Recently, attention has been paid on rhizoremediation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) (Khan 2005; Khan et al. 2009; Lucy et al. 2004; Weyens et al. 2009), which are bacteria capable of promoting growth by colonizing the plant root. They synthesize particular compounds for the plants or facilitate the uptake of certain nutrients from the environment (Burd et al. 2000; Cakmakçi et al. 2006), and lessen or prevent the plants from diseases (Guo et al. 2004; Jetiyanon and Kloepper 2002). Also, multiple metal resistances in rhizobacteria seem to be the rule rather than the exception (Abou-Shanab et al. 2005). Therefore, rhizobacteria-assisted phytoremediation has recently emerged as a promising field to enhance phytoremediation efficiency (Weyens et al. 2009; Zhuang et al. 2007).

The aim of this work was to use the legume-rhizobacteria interaction, in particular *Lupinus luteus* plants, as a tool for remediation of metal contaminated soils. Thus, a

screening on strains isolated from *Lupinus* plant nodules has been performed in order to select metal resistant bacteria. The most resistant of them, MSMC541, was characterized for heavy metals tolerance. A rhizoremediation assay has been performed using *Lupinus luteus* plants inoculated with MSMC541, compared the results (regarding plant tolerance and metal accumulation) with non-inoculated control plants.

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial Strains

The strains used in this study were MSMC518, isolated from nodules of *Lupinus Luteus*, and MSMC541 and MSMC547, isolated from nodules of *Lupinus consentinii*. They were purified and maintained on YEM (Vincent 1970) agar plates supplemented with 25 µg/mL congo red and stored in a 25% glycerol YEM at -80°C.

### Resistance Test on Agar Plates

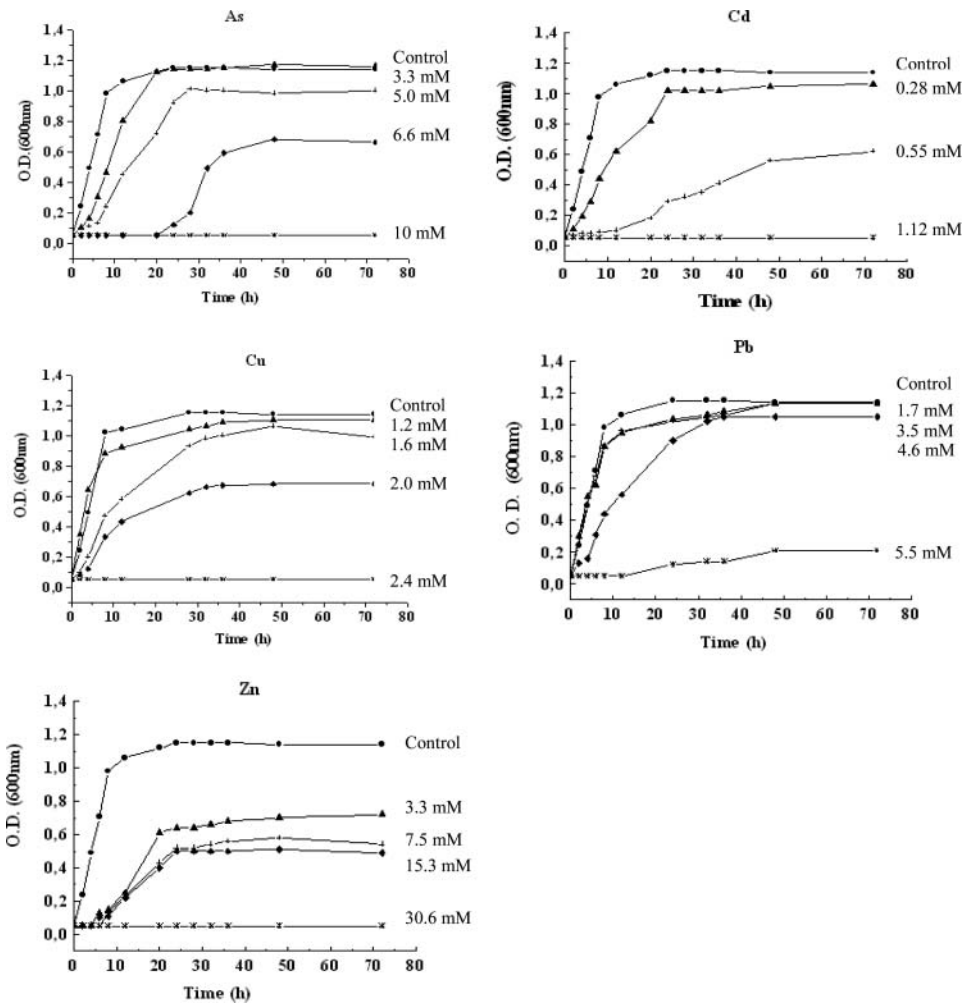
The tolerance to heavy metals was tested on agar plates containing TY medium (Vincent 1970), with increasing concentrations of arsenic (NaAsO<sub>2</sub>), cadmium (CdCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O), copper (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O), lead (PbNO<sub>3</sub>), or zinc (ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O). Plates were incubated at 28°C for 48 h to 72 h. The maximum tolerable concentration (MTC) was defined as the maximum metal concentration not affecting bacterial growth.

### Effect of Heavy Metals on Growth of Strain MSMC541

100 mL of TY medium supplemented with heavy metals were inoculated with a fresh culture of MSMC541 at OD 600 nm = 0.05. Arsenic (NaAsO<sub>2</sub>) or metals (CdCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> or ZnSO<sub>4</sub>) were added at the concentrations indicated in Figure 1. Cultures were incubated at 28°C for 72 h in an orbital shaker at 180 rev min<sup>-1</sup>. The growth of the bacteria was monitored for 80 h by measuring the absorbance at 600 nm.

### Bioaccumulation of Arsenic and Heavy Metals in Resistant Bacteria

Total bioaccumulation and biosorption were determined as previously described Carrasco et al. (2005). Cultures of 250 mL of the strain MSMC541 (two replicates for each metal) were grown for 48 h in TY liquid medium at 28°C, supplemented with either 6.6 mM NaAsO<sub>2</sub>, 0.55 mM CdCl<sub>2</sub>.7H<sub>2</sub>O, 2 mM CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 4.6 mM Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> plus 0.3 mM EDTA to avoid any metal precipitation, or 15.3 mM ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. After growth, the cultures were collected by centrifugation. One of the cultures (one of the replicates for each metal) was washed twice with distilled water (the metal remaining after water washing included both the metal bioaccumulated inside the cells plus the metal biosorbed on the cell surface), and the other culture was washed twice with 0.25 M EDTA (the metal remaining after EDTA washing corresponded only to metal bioaccumulated inside the cells, since EDTA washing removes metals adsorbed to cell surface). Bacterial pellets were dried at 60°C for 48 h and analyzed by ICP-MS after *aqua regia* digestion in a microwave oven (Murillo et al. 1999).



**Figure 1** Growth curves of MSMC541 in the presence of increasing concentrations of As, Cd, Cu, Pb and Zn. The strain was grown on liquid media supplemented with the indicated concentrations of toxic elements. The OD at 600 nm was determined at the indicated intervals. Values are means of three replicates.

### Sequencing of 16S rDNA PCR Products and Sequence Analysis

The most resistant strain MSMC541 was chosen for further sequencing of the 16S rDNA genes. Primers used for the amplification were 16S- F (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') and 16S- R (5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3'). PCR bands corresponding to 16S rDNA (1.5 kb) were extracted from the agarose gel using GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification Kit from GE Healthcare, according to the instructions of the manufacturer, and sequenced. Sequence analysis was made using programs Blast, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), EzTaxon (<http://www.Eztaxon.org>), and Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>), which is a specific database for 16S rDNA sequences.

### Detection of Arsenic Resistance Genes

**Southern blot hybridization.** Total DNA from MSMC541 was extracted using DNA extraction kit (Bioneer) and digested with *Bam*HI, *Eco*RI, or *Pst*I. The restriction fragments obtained were separated by electrophoresis on 1% agarose gel using TAE buffer, and transferred by capillary action to a nylon filter according to standard methods (Sambrook et al. 1989). DNA was fixed to the membrane by UV for 2 min. After prehybridization at 55°C for 12 h, the filter was hybridized with the radiolabelled *ars* operon from *E. coli* R773 (Owolabi and Rosen 1990). Washings were done at 55°C in 2xSSC, 0.1% SDS and in 0,2XSSC, 0.1%SDS. The membrane was exposed to an X-ray film at -80°C for 24 h.

**Amplification of *ars* resistance genes by PCR.** Primers for amplification of arsenic resistance genes were designed based on the sequences of the arsenic resistance operon from *Serratia proteamaculans* strain 568 [NC\_0009832]. The oligonucleotides used were 5'GCTCCC GCCG CAGGCGGTTATGCC3' (forward) and 5'GGCAGGCCGCCAGATGCTAGGGC3' (reverse). The size of PCR products was checked by agarose gel electrophoresis (1%) and stained in an aqueous solution of ethidium bromide (1 mg mL<sup>-1</sup>).

**Rhizoremediation assay.** A preliminary rhizoremediation pot experiment has been conducted in the green house in order to analyze the rhizosphere effect on plant (*Lupinus luteus*) growth and metal accumulation.

Seeds of *Lupinus luteus* were surface sterilized with 0.2% (w/v) HgCl<sub>2</sub> for 5 min and washed several times with sterile distilled water and germinated at 28°C in darkness on 0.75% (w/v) on solid agar medium. Seedlings were transferred to pots with sterile sand and irrigated with a sterile nitrogen-free nutritive solution (Broughton and Dilworth 1971) supplemented with 0.26 mM As, 0.053 mM Cd, 0.8 mM Cu, 0.46 mM Pb, or 3.0 mM Zn. The seedlings were inoculated with 1 mL of a suspension of the strain MSMC541. The negative controls were non-inoculated plants. Each treatment contained three replicates with 6 seeds per replicate. Inoculated and non-inoculated control plants were grown in green house with 16 h light:8 h dark photoperiod at 24°C: 21°C. After 8 weeks, plants were harvested, shoots and roots were separated, washed and dried at 70°C for 48 h, and the dry matter was measured. Heavy metal accumulation was determined by ICP-MS according to Murillo et al. (1999).

### Data Analysis

All the data were analyzed statistically with the SPSS software. When analysis of variance indicated differences, comparisons among treatment means were conducted with a Student test for each one of the treatments (different metals). Differences were considered significant at  $P \leq 0.05$ .

## RESULTS

### Characterization of the Resistance to Heavy Metals

The strains tested were isolated from native legumes belonging to the species *Lupinus luteus* and *Lupinus consentinii*. The three strains were investigated for their ability to grow at high concentrations of As, Cd, Cu, Pb, or Zn. The MTCs are shown in Table 1. All bacteria were resistant to heavy metals and showed resistance to several metals simultaneously

**Table 1** Resistance to As (mM) and heavy metals of the three strains isolated from *Lupinus* plants. MTC, i.e., the maximal tolerable concentration not affecting bacterial growth, was determined in TY-agar plates supplemented with increasing concentrations of either As or heavy metals

Element tested	MTC (mM)		
	MSMC518	MSMC541	MSMC547
As	6.6	13.3	13.3
Cu	1.6	2.3	2.3
Pb	7.0	9.0	7.0
Zn	7.5	30	15
Cd	2.2	2.2	2.2

(multi-resistance). The most resistant bacteria, MSMC541, was able to tolerate 13.3 mM As, 2.2 mM Cd, 2.3 mM Cu, 9.0 mM Pb, and 30 mM Zn.

### Effect of Heavy Metals on Growth of MSMC541

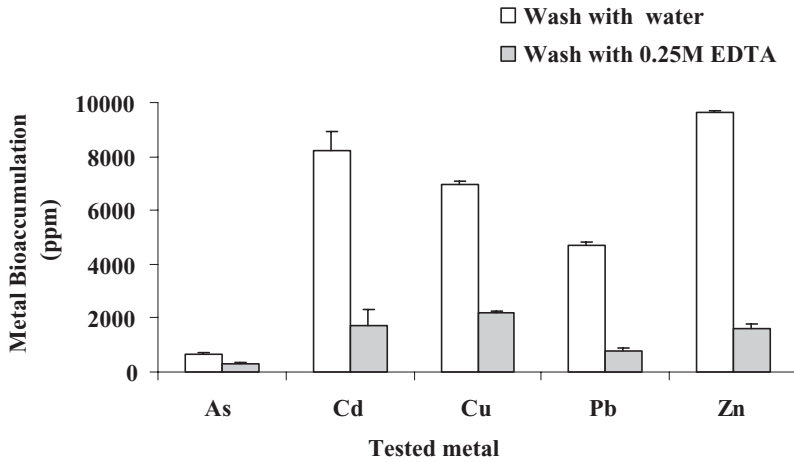
The growth kinetics of MSMC541 in liquid medium under As, Cd, Cu, Pb, and Zn stress have been determined (Figure 1). The growth was not altered by the presence of the lowest concentrations of the tested heavy metals (5mM As, 0.28mM Cd, 1.6mM Cu, 3.5mM Pb, or 7.5 mM Zn). However, the growth of the cultures progressively decreased as heavy metal concentrations increased; the strain was still able to grow at 6.6 mM As, 0.55 mM Cd, 2 mM Cu, 4.6 mM Pb, or 15.3 mM Zn, although with a significant effect on lag phase, on growth rates, and also on the final culture density after 72 h incubation. Cd and Cu were the most toxic elements, since they were able to impair bacterial growth at the lower concentrations.

### Bioaccumulation of Heavy Metals (As, Cd, Cu, Pb, Zn) in MSMC541

Metal accumulation in MSMC541 bacterial pellets were investigated at two levels; total metal accumulated (after washing bacterial pellets with water) and metal accumulated inside the cells (after washing pellets with EDTA, which removes the metal adsorbed at the cell surface). As shown in Figure 2, MSMC541 was able to accumulate up to 6,000–9,000 ppm depending on the different heavy metals. Furthermore, total metal accumulation was always much higher than accumulation inside the cell, indicating that the most part of the metal (65–80%) is adsorbed to the cell surface. On the contrary, arsenic accumulation was low (up to 800 ppm), and half the arsenic was accumulated inside the cells.

### Identification of the Strain MSMC541 by 16SDNA Sequencing

The most resistant isolate on the basis of the MTC has been identified. The gene coding for the 16S rDNA has been amplified by PCR and a partial sequence has been obtained (acc. number JF974140) (see supporting information, Figures S1-S2). The comparison of this sequence has been performed using sequence comparison tools (BLAST, Ez-Taxon and Ribosomal Database Project). The partial sequence presented a 99% identity with *Serratia proteamaculans* subs. *proteamaculans* and subs. *quinovorans*, and with *Serratia*

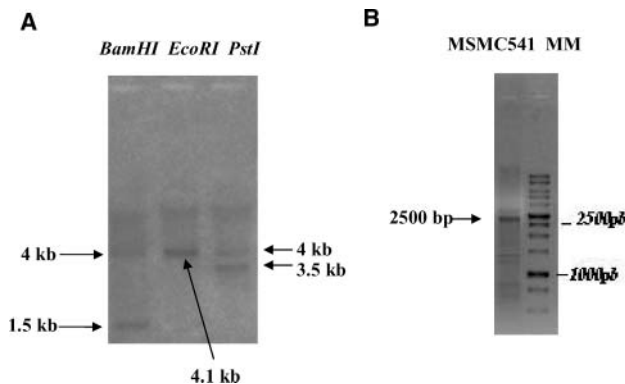


**Figure 2** Bioaccumulation of heavy metals in pellets of the resistant strain MSMC541. The strain was grown on liquid media supplemented with the indicated concentrations of toxic elements. After collecting bacterial cells by centrifugation, washing was done with water (to evaluate total metal bioaccumulation) or with 0.25mM EDTA (to evaluate metal biosorption). Data are means of three independent experiments.

sp. DAP-7 and *Serratia grimensi*, indicating that the strain most probably belongs to the genus *Serratia*.

### Detection of Arsenic Resistance Genes in MSMC541

The arsenic resistance operon from *E. coli* R773 (Owolabi and Rosen 1990) was used as heterologous probe for southern blot hybridization of total DNA from MSMC541 (Figure 3A). A hybridization signal was observed in the three cases: upon digestion with *Bam*HI two bands of approximately 1.5 and 4 kb were detected; a single band of 4.1 kb was observed upon digestion with *Eco*RI, and two bands of approximately 3.5 and 4 kb were seen in the lane containing DNA digested with *Pst*I. The presence of the resistance genes



**Figure 3** (A) Southern blot and hybridization of total DNA from MSMC541 strain with the arsenic resistance operon from *E. coli* R773 (Owolabi and Rosen 1990) (B) PCR amplification of a 2.5 kb fragment corresponding to the As resistance operon of MSMC541. MM: Molecular size marker: 1Kb.

for As in MSMC541 was also revealed by PCR amplification. A fragment of approximately 2,500 bp was obtained after the amplification of total DNA with the primers for the *ars* operon (Figure 3B), according to the expected size in other *Serratia proteamaculans* strain 568 (accession number NC\_0009832) (2449 bp).

### Evaluation of the *Lupinus luteus*-MSMC541 Interaction in Metal Phytostabilization

The objective of this study was to assess the rhizoremediation potential of *Lupinus luteus* inoculated with the metal resistant strain *Serratia* sp. MSMC541. First, we determined the amount of heavy metals that this legume plant can tolerate. Heavy metal stress had significant deleterious effects causing toxic symptoms on plants shoots like chlorosis and necrosis (not shown). Arsenic was the most stressful metal at the concentration used in this experiment and had the strongest effect on plant biomass of both shoots and roots (50% biomass reduction). The presence of Cd or Cu produced a reduction in shoots and roots plant biomass between 10% and 20% compared to the control grown without metal, whereas Pb had only minor effects. However, the presence of Zn did not show a negative effect on both shoots or roots biomass.

Inoculation with *Serratia* sp. MSMC541 improved plant tolerance in general, and especially, for As, Cd, and Cu, for which an increase of shoot biomass between 20–40% was observed (Figure 4A). A positive effect of the inoculation was also observed, although at lower rate, on plants grown in the presence of Pb or Zn (15–20% greater biomass). In the case of roots, only minor biomass increases were seen upon inoculation (Figure 4B).

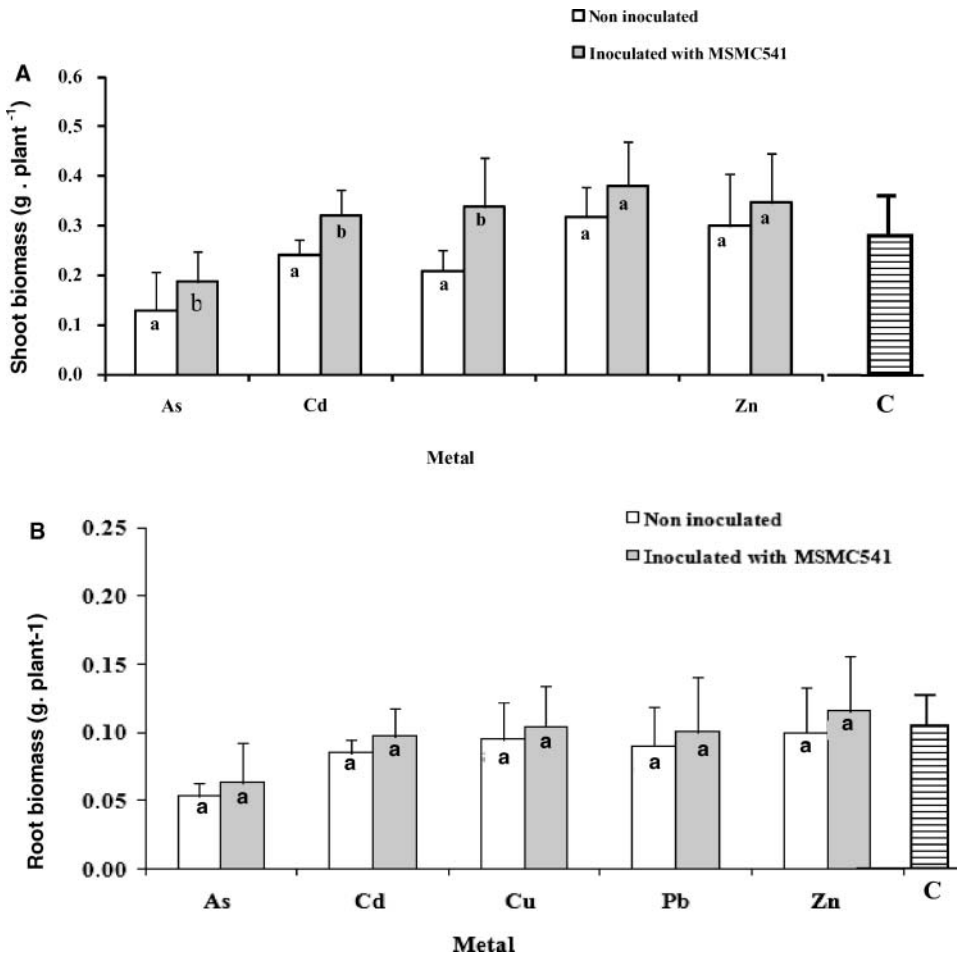
The total amount of metal in plant shoots and roots was measured (Figure 5). *Lupinus* plants accumulated heavy metals mainly in roots, especially Pb and Zn, followed by As and Cu. In shoots, total metal accumulation was significantly lower than in roots, about 10% of the metal accumulated in roots, exception made of Zn, for which a significant translocation to the shoots was observed. Upon inoculation with the metal resistant rhizobacterium *Serratia* sp. MSMC541, a significant decrease in metal accumulation in plants was observed, both in roots and shoots. The inoculated plants accumulated approximately 1/3 of the Pb concentration and 1/2 the concentration of As and Cu, with regard to non-inoculated plants. Conversely, the effect on the accumulation of Cd and Zn was not so apparent (10–20% reductions in the accumulation of these elements).

We have also calculated the root to shoot metal concentration ratio for non-inoculated and inoculated plants grown in the presence of heavy metals (see supporting information, Table S1). The inoculated plants showed higher root to shoot ratios than non-inoculated plants for As, Cd, and Cu indicating less metals translocation to the shoots (30–50% reduction in metal translocation), what means that inoculated plants tend to accumulate metals in the roots. On the other hand, Pb and Zn root to shoot ratio was less affected upon inoculation. The degree metal translocation followed the sequence  $As < Cu < Pb < Cd < Zn$ .

## DISCUSSION

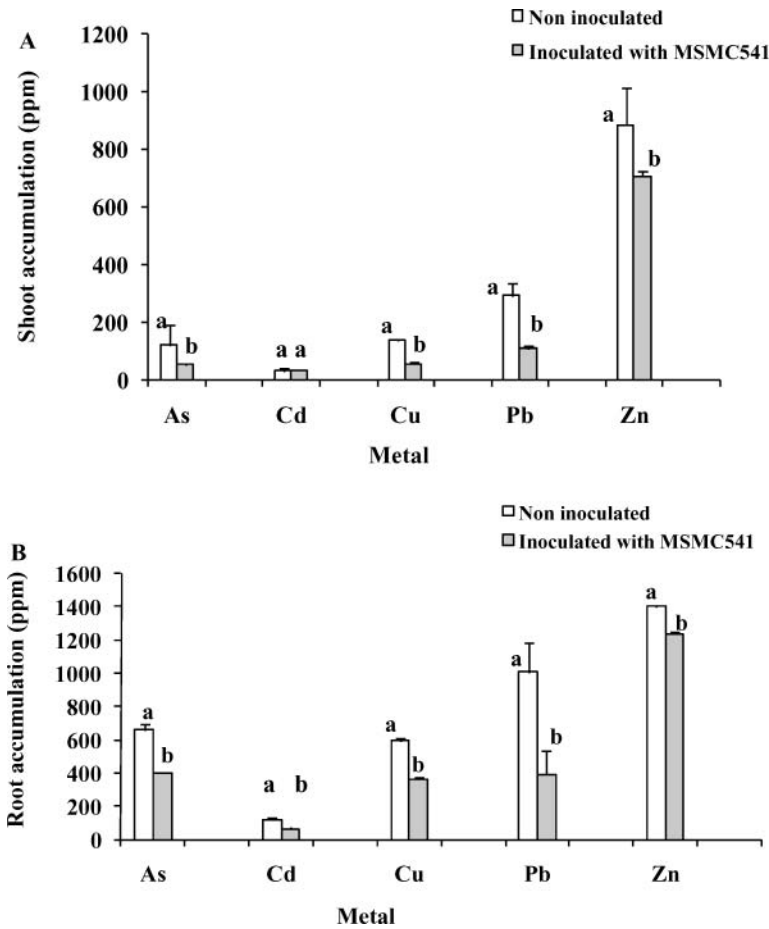
The objective of this work was to test the application of a rhizoremediation technique, based on the use of *Lupinus* plants and metal resistant rhizobacteria, in order to phytostabilize metals in soils. An initial screening on strains isolated from *Lupinus* nodules has been done. We found very high resistant strains, comparable to other gram negative bacteria from different genera, such as *Pseudomonas* and *Ochrobactrum* (Carrasco et al. 2005; Dary et al.





**Figure 4** Effects of arsenic and heavy metals on shoots (a) and roots (b) dry weight of *Lupinus luteus*. Stripped bars indicate the biomass of control plants grown in the absence of metals. Values are means ( $n = 3$ )  $\pm$  standard deviation. For each treatment, bars with the same letters do not differ significantly (Student' test,  $P > 0.05$ ).

2010; Rodriguez-Llorente et al. 2010; Silver 1996). Furthermore, strains were resistant to several metals simultaneously (multi-resistance), suggesting their good potential in bioremediation of multi-metal polluted soils (Lasat 2000). The strain MSMC541 was selected for a further characterization. The phenotypic resistance was confirmed by the determination of growth in liquid media supplemented with heavy metals. Furthermore, the MSMC541 has been identified by 16S rDNA sequencing. Our data indicate that the strain probably belonged to the genus *Serratia*, within the  $\gamma$ -proteobacteria. In the last few years, many reports have been produced on the nodulation of legumes by uncommon bacteria (non *Rhizobium*), such as *Methylobacterium nodulans*, *Burkholderia tuberum*, *Ralstonia taiwanensis*, etc. (reviewed in Sawada et al. 2003; Rivas et al. 2009). Nevertheless, to our knowledge, nodulation by  $\gamma$ -proteobacteria has not been described. Bai et al. (2002) demonstrated that *S. proteamaculans* (1–102) produced an inducible activator lipo-chitoooligosaccharide (LCO) analogue, which was responsible for the bacterial promotion of soybean plant growth and



**Figure 5** Accumulation of arsenic and heavy metals in the shoots (a) or roots (b) of *Lupinus luteus* plants inoculated with *Serratia* sp. MSMC541 compared to noninoculated controls. Values are means ( $n = 3$ )  $\pm$  standard deviation. For each treatment, bars with the same letters do not differ significantly (Student' test,  $P > 0.05$ ).

nodulation. Furthermore, co-inoculation with *S. proteamaculans* (1–102) increased nodule number by 30–81% compared to *Bradyrhizobium japonicum* alone (Bai et al. 2002). This may explain the presence of this strain among the isolates from *Lupinus* nodules. However, when the strain was inoculated on *Lupinus* seeds, no nodules were observed (not shown), indicating that this bacterium was most probably a secondary endosymbiont than the actual “symbiont” of *Lupinus* plants.

The presence of determinants for arsenic resistance in our strain was confirmed using hybridization and PCR approaches. The genome sequence of *Serratia proteamaculans* strain 568 has been completed (accession number NC\_0009832). A chromosomal arsenic resistance operon is present within this sequence, consisting in three genes *arsABR*. By contrast, the plasmidic arsenic resistance operon of *Escherichia coli*, other Enterobacteriaceae, encoded by plasmid pR773, is governed by five genes: *arsABCDR* (Ji and Silver 1995; Owolabi and Rosen 1990).

A deeper study has been done on the metal accumulation capacity of *Serratia* sp. MSMC541. The results indicated that it was not only able to tolerate, but to bioaccumulate high amounts of metals -between 65 and 80% depending on the element- especially on the cell surface. This characteristic points to an application of this bacterium in metal biosorption in waters. Dry bacterial biomass has been widely used as a useful and low-cost metal sorbent (Rodríguez-Llorente et al. 2010; Volesky 2007). Alternatively, bacteria can be inoculated on plant roots as a helper for plant tolerance on contaminated soils (Weyens et al. 2009; Zhuang et al. 2007). In particular, several works have been recently produced on the inoculation of legume plants with metal resistant rhizobacteria in metal polluted soils (Wani et al. 2007a, 2007b; Wani et al. 2009).

In this regard, a rhizoremediation assay has been conducted in order to assess the effect of the resistant strain MSMC541 in an integrated plant-bacteria remediation system, using plants of *Lupinus luteus*. At the concentrations used in this experiment, As was the most toxic element producing the most significant biomass reduction on both shoots and roots biomass (up to 50%), and greater toxicity symptoms. Cd and Cu have a less marked effect (10–20% biomass decrease). Zn and also Pb treatments showed not significant effects on shoots biomass, neither on roots biomass. Metal accumulation in plants was determined. Yellow lupines accumulated heavy metals mainly in roots; especially Zn and Pb, followed by As and Cu. In shoots, total accumulation was significantly lower, except for Zn. In the present work, the concentrations of metals accumulated in roots were significantly higher than in previous reports (Dary et al. 2010). However, since the bioavailability of metals in soils depends on multiple variables (pH, organic matter, water, resident microorganisms, etc.), these factors may account for differences found in metal accumulation of *Lupinus luteus* plants in soils (Dary et al. 2010) or in sand (this work). In any case, metal translocation to shoots is very low, always below the limits established for animal feeding (Mendez and Maier 2008). These results led to propose *Lupinus luteus* plants for metal phytostabilization (Dary et al. 2010). Other *Lupinus* species have been also proposed for phytostabilization of metal polluted soils (De la Cruz-Landero et al. 2010; Ehsan et al. 2009; Reichman 2007; Vázquez et al. 2006). An exception is Zn, for which a significant translocation to the shoots was observed. In fact, this plant can accumulate great amounts of zinc in shoots, though at acidic pH (Pastor et al. 2003).

Inoculation with *Serratia* sp. MSMC541 improved plant tolerance to metals in general, and especially for As and Cu, with shoot biomass increases between 10–40%. Many works have reported the synergy of plants and metal resistant rhizobacteria for improved remediation of contaminated soils (Abou-Shanab et al. 2003; Burd et al. 2000; Dary et al. 2010). Inoculation increased plant tolerance and affected metal accumulation (Dary et al. 2010; Khan et al. 2009; Weyens et al. 2009). In fact, the rhizosphere, with high concentrations of nutrients exuded from plants roots, increased bacterial density (Penrose and Glick 2001). On the other hand, these bacteria, some of them PGPR, stimulated the growth of the plant and protect it from metal toxicity (Weyens et al. 2009; Zhuang et al. 2007), affected metal mobility and bioavailability (Abou-Shanab et al. 2003; Burd et al. 2000), and improved plant growth by mitigating metal toxic effects on roots (Belimov et al. 2004) (Wani et al. 2007a, 2007b, 2009).

Upon inoculation of *Lupinus* plants with *Serratia* sp. MSMC541, metal accumulation was significantly lower than that of non-inoculated controls, both in roots and shoots (10–50% reduction in metal accumulation, depending on the metal and tissue). The ratios of root to shoot metal concentration increased in inoculated plants, indicating less metals translocation to the shoot (As, Cd, and Cu translocation to shoots were drastically reduced).

So, inoculated plants thereby seemed to be able to limit the translocation of toxic elements to shoots, which is a common characteristic of non-accumulators, such as legumes (Pajuelo et al. 2007). This is an important fact for legume plants to be used in metal phytostabilization, thus preventing the entrance of metal into the food chain and the dispersion in the environment (Mendez and Maier 2008).

The results showed in this paper led us to propose the combination of *Lupinus luteus* plants and the metal resistant rhizobacterium *Serratia* sp. MSMC541, as an effective and suitable method for metal phytostabilization. This rhizobacterium can be used as inoculant for *Lupinus* seeds, being an important additive to improve the efficiency of metal phytostabilization (Kuiper et al. 2004; Zhuang et al. 2007).

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by AECI (Project numbers 152/P/03, A/6232/06, and A/014772/07) and Project Aire Development IRD: 01/2–MAR–28–1. The Department of Microanalysis of the CITIUS (University of Sevilla, Spain) is acknowledged for analytical determinations.

## ABBREVIATIONS

ICP-MS: Inductively coupled plasma mass spectrometry; MTC: Maximum tolerable concentration; MSMC: Moroccan Symbiotic Microorganisms Collection; PGPR: Plant growth-promoting rhizobacteria; TAE: Tris-acetate EDTA buffer; TBE: Tris-borate-EDTA buffer; TY: Tryptone-yeast medium; YEM: Yeast extract mannitol medium

## REFERENCES

- Abou-Shanab RA, Angle JS, Delorme TA, Chaney RL, Van Berkum P, Moawad H, Ghanem K, Ghazlan HA. 2003. Rhizobacterial effects on nickel extraction from soil and uptake by *Alyssum murale*. *New Phytol.* 158: 219–224.
- Abou-Shanab RA, Ghazlan H, Ghanem K, Moawad H. 2005. Behaviour of bacterial populations isolated from rhizosphere of *Diplachne fusca* dominant in industrial sites. *World J Microbiol Biotechnol.* 21: 1095–1101.
- Bai Y, Souleimanov A, Smith L. 2002. An inducible activator produced by a *Serratia proteamaculans* strain and its soybean growth-promoting activity under greenhouse conditions. *J Exp Bot.* 53(373): 1495–1502.
- Belimov AA, Kunakova AM, Safronova VI, Stepanok VV, Yudkin LY, Aledseev YV, Kozhemyakov AP. 2004. Employment of rhizobacteria for the inoculation of barley plants cultivated in soil contaminated with lead and cadmium. *Microbiol.* 73: 99–106.
- Broughton WJ, Dillworth MJ. 1971. Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem J.* 125: 1075–1080.
- Burd GI, Dixon DG, Glick BR. 2000. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Can J Microbiol.* 46: 237–45.
- Cakmakçi R, Dönmez F, Aydın A, Şahin F. 2006. Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil Biol Biochem.* 38: 1482–1487.
- Callahan DL, Baker AJM, Kolev S, Wedd AG. 2005. Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *J Biol Inorg Chem.* 11: 2–12.

- Carrasco JA, Armario P, Pajuelo E, Burgos A, Caviedes MA, López R, Chamber MA, Palomares AJ. 2005. Isolation and characterisation of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcollar pyrite mine. *Soil Biol Biochem.* 37: 1131–1140.
- Cunningham SD, Ow DW. 1996. Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiol.* 110(5): 715–719.
- Dary M, Chamber MA, Palomares AJ, Pajuelo E. 2010. “In situ” phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. *J Hazard Mater.* 177: 323–330.
- De Hoff P, Hirsch AM. 2003. Nitrogen comes down to earth. Report from the 5<sup>th</sup> European Nitrogen Fixation Conference. *Mol Plant-Microbe Interact.* 16: 371–375.
- De la Cruz-Landero N, Hernandez VE, Guevara E, Lopez-Lopez MA, Santos AT, Ojeda-Trejo E, Alderete-Chavez A. 2010. *Lupinus versicolor* response in soils contaminated with heavy metals from a petroleum extraction field. *J Appl Sci.* 10: 694–698.
- Ehsan M, Santamaría K, Vázquez A, Alderete A, De la Cruz N. 2009. Phytostabilization of cadmium contaminated soils by “*Lupinus uncinatus*” Schldl. *Spanish J Agric Res.* 2: 390–397.
- Glick BR. 2003. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnol Adv.* 21: 383–393.
- Graham PH, Vance CP. 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* 131: 872–877.
- Guo JH, Qi HY, Guo YH, Ge HL, Gong L, Zhang LX. 2004. Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Biol Control.* 29: 66–72.
- Jetiyanon K, Kloepper JW. 2002. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. *Biol Control.* 24: 285–291.
- Ji G, Silver S. 1995. Bacterial resistance mechanisms for heavy metals of environmental concern. *J Ind Microbiol.* 14: 61–75.
- Khan AG. 2005. Role of soil microbes in the rhizosphere of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *J Trace Elem Med Biol.* 18: 355–364.
- Khan MS, Zaidi A, Wani PA, Oves M. 2009. Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. *Environ Chem Lett.* 7: 1–19.
- Kuiper I, Lagendijk EL, Bloemberg GV, Lugtenberg JJ. 2004. Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. *Mol Plant Microbe Interact.* 17: 6–15.
- Lasat MM. 2000. Phytoextraction of metals from contaminated soil: a review of plant/soil/metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues. *J Hazard Subs Res.* 2(5): 1–25.
- Lucy M, Reed E, Glick BR. 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* 86: 1–25.
- MacGrath SP, Chaudri AM, Giller KE. 1995. Long-term effects of metals in sewage sludge on soils, microorganisms and plants. *J Ind Microbiol.* 14: 94–104.
- Memon AR, Schroder P. 2008. Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. *Environ Sci Pollut Res Int.* 16: 162–175.
- Mendez MO, Maier RM. 2008. Phytostabilisation of mine tailings in arid and semiarid environments: an emerging remediation technology. *Environ Health Perspect.* 116: 278–283.
- Murillo JM, Marañón T, Cabrera F, Lopez R. 1999. Accumulation of heavy metals in sunflower and sorghum plants affected by the Guadiamar spill. *Sci Total Environ.* 242: 281–292.
- Nies DH. 1999. Microbial heavy metal resistance. *Appl Microbial Biotechnol.* 51: 730–750.
- Owolabi JB, Rosen BP. 1990. Differential mRNA stability controls relative gene expression within the plasmid-encoded arsenical resistance operon. *J Bacteriol.* 172: 2367–2371.
- Pajuelo E, Carrasco JA, Romero LC, Chamber MA, Gotor C. 2007. Evaluation of the metal phytoextraction potential of crop legumes. Regulation of the expression of O-Acetylserine (thiol) lyase under metal stress. *Plant Biol.* 9: 672–681.

- Pastor J, Hernandez AJ, Prieto N, Fernandez-Pascual M. 2003. Accumulating behaviour of *Lupinus albus* L. growing in a normal and a decalcified calcic luvisol polluted with Zn. *J Plant Physiol.* 160: 1457–1465.
- Peng JF, Song YH, Yuan P, Cui XY, Qiu GL. 2008. The remediation of heavy metals contaminated sediment. *J Hazard Mater.* 161: 633–640.
- Penrose DM, Glick BR. 2001. Levels of l-aminocyclopropane-l-carboxylic acid (ACC) in exudates and extracts of canola seeds treated with plant growth-promoting bacteria. *Can J Microbiol.* 47: 368–372.
- Pilon-Smits E. 2005. Phytoremediation. *Ann Rev Plant Biol.* 56: 15–39.
- Reichman SM. 2007. The potential use of the legume-*Rhizobium* symbiosis for the remediation of arsenic contaminated sites. *Soil Biol Biochem.* 39: 2587–2593.
- Rivas R, Garcia-Fraile P, Velazquez E. 2009. Taxonomy of bacteria nodulating legumes. *Microbiol Insights.* 2: 51–69.
- Rodríguez-LlLorente ID, Gamane D, Lafuente A, Dary M, El Hamdaoui A, Delgadillo J, Doukkali B, Caviedes MA, Pajuelo E. 2010. Cadmium biosorption properties of the metal resistant *Ochrobactrum cytisi* Azn6.2. *Eng Life Sci.* 10(1): 49–56.
- Sambrook J, Fritsch EF, Manniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sawada H, Kuykendall LD, Young JM. 2003. Changing concepts in the systematics of nitrogen-fixing legume symbionts. *J Gen Appl Microbiol.* 49: 155–179.
- Silver S, Phung LT. 1996. Bacterial heavy metal resistances: new surprises. *Ann Rev Microbiol.* 50: 753–789.
- Silver S, Phung LT. 2005. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J Ind Microbiol Biotechnol.* doi 10.1007/s10295-005-0019-6.
- Valls M, de Lorenzo V. 2002. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiol Rev.* 4: 327–338.
- Vangronsveld J, Herzig R, Weyens N, Boulet J, Adriaensen K, Ruttens A, Thewys T, Vassilev A, Meers E, Nehnevajova E, van der Lelie D, Mench M. 2009. Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environ Sci Pollut Res Int.* 16(7): 765–794.
- Vazquez S, Agha R, Granada A, Sarro MJ, Esteban E, Peñalosa JM, Carpena RO. 2006. Use of white lupine plant for phytostabilisation of Cd and As polluted acid soils. *Water Air Soil Pollut.* 177: 349–365.
- Vincent JM. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. IBP handbook. Oxford (England): Blackwell Scientific Publications, Ltd.
- Volesky B. 2007. Biosorption and me. *Water Res.* 41: 4017–4029.
- Wani PA, Khan MS, Zaidi A. 2007a. Effect of metal tolerant plant growth promoting rhizobium on the performance of pea grown in metal amended soil. *Arch Environ Contam Toxicol.* 55: 33–42.
- Wani PA, Khan MS, Zaidi A. 2007b. Effect of metal tolerant plant growth promoting *Bradyrhizobium* sp. (vigna) on growth, symbiosis, seed yield and metal uptake by greengram plants. *Chemosphere.* 70: 36–45.
- Wani PA, Zaidi A, Khan MS. 2009. Chromium reducing and plant growth promoting potential of *Mesorhizobium* species under chromium stress. *Biorem J.* 13: 121–129.
- Weyens N, van der Lelie D, Taghavi S, Newman L, Vangronsveld J. 2009. Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation. *Trends Biotechnol.* 10: 591–598.
- Zhuang X, Chen J, Shim H, Bai Z. 2007. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environ Int.* 33: 406–413.

# Changing concepts on nitrogen fixing symbionts: *Ochrobactrum* sp., a nitrogen fixing $\alpha$ -proteobacteria with bioremediation capability

M. DARY<sup>(1)</sup>, A. J. PALOMARES<sup>(1)</sup>, A. LAFUENTE <sup>(1)</sup>, B. DOUKKALI <sup>(1)</sup>, M. CHAMBER<sup>(2)</sup> AND E. PAJUELO<sup>(1)</sup>

**(1)** Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Profesor García González, 2, 41012-Sevilla

**(2)** CIFA Las Torres-Tomejil, IFAPA, Junta de Andalucía, Alcalá del Río, 41200-Sevilla

## Summary

We have isolated rhizosphere bacteria from plant legumes grown on soil contaminated by heavy metals. We have identified bacteria belonging to *Rhizobium*, *Pseudomonas* and *Ochrobactrum* genera using commercial identification procedures. ESC1 and ESC5 have recently been identified as new *Ochrobactrum* species phylogenetically related to *O. lupini* that nodulate *Lupinus* and *O. anthropi*, human pathogen species. Both strains are capable to nodulate legumes and present *nodD* and *nifH* genes phylogenetically related with those of bacteria that nodulate *Phaseolus*. Hybridizations analysis of total DNA, chemotaxonomy and phenotypic dates allowed us to include these two strains in a new species denominated *Ochrobactrum cytisi* sp. nov. In situ soil bioremediation using plant microbe interactions is a new technology gaining momentum as a low-cost and effective method for restoration of heavy metal polluted soils. The abovementioned *Ochrobactrum* strains showed high resistance to heavy metals, suggesting a potential in bioremediation.

Key words: *Ochrobactrum* sp.,  $\alpha$ -proteobacteria, symbiosis, legumes, heavy metal resistance

## Introduction

The ability to establish a symbiosis with legumes is more widespread in bacteria than anticipated, being confirmed for 12 genera grouped both within the  $\alpha$  and  $\beta$  subclass of proteobacteria (Sawada et al., 2003). Whereas *O. anthropi* is a human pathogen (Holmes et al., 1988), some other *Ochrobactrum* strains have probe interact with plants or to form nodules on legumes (Trujillo et al., 2005). *Ochrobactrum* sp. show moderate resistance both to metals and salinity, as well as to some antibiotics (Kesseru et al., 2002; Trujillo et al., 2005). The existence of metal resistance genes is widespread in bacteria (Silver and Phung, 2005), being the base for the use of these microorganisms in bioremediation. *Ochrobactrum* strains are included among the numerous microorganisms proposed in heavy metal bioremediation (Ozdemir et al., 2003). In this paper we describe the identification of *O. cytisi* sp. Nov. isolated from nodules of *Cytisus*. This bacterium has shown a good bioremediation potential in field experiments in polluted soils.

## Materials and Methods

Bacteria were isolated from metal polluted soils as reported Carrasco et al., (2005). Preliminary identification of *Ochrobactrum* strains was performed using the commercial

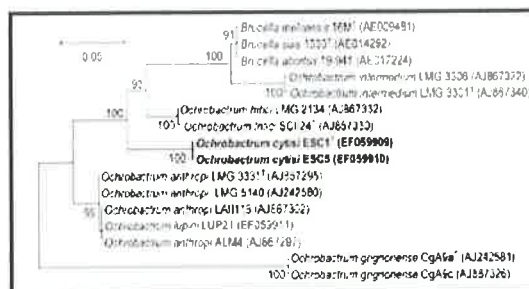
system API2ONE. Further confirmation was done on the base of 16S RNA and 16S-23S RNAs intergene sequences, DNA-DNA hybridization, DNA G+C content and chemotaxonomy data (Trujillo et al., 2005). The resistance of the bacteria to arsenic and heavy metals was evaluated using plate media supplemented with toxic elements. Susceptibility test to antibiotics was performed according to the recommendations of the CLSI. The rhizoremediation capacity of *Ochrobactrum* strains was evaluated in a field experiment. *Lupinus luteus* plants were inoculated with a consortium of resistant bacteria (*Rhizobium* + *Ochrobactrum* + *Pseudomonas*) and planted on contaminated soil (Aznalcóllar, Sevilla), compared to non inoculated control.

## Results and Discussion

### 1. Isolation and identification of rhizosphere bacteria from legume plants grown on contaminated soils

*Ochrobactrum* strains ESC1 and ESC5 were isolated from the rhizosphere of *Cytisus*, whereas Omed2.1g, Medz1.3, Azn 6-1 and Azn6-2 were isolated from *Medicago* plants found on a polluted area (Grimalt et al., 1999). We have identified bacteria using a commercial identification procedure (API2ONE) (Table I).

The 16S RNA and the intergenic sequences (ITS) between 16S-23S RNAs of ESC1 and ESC5 were sequenced. Bioinformatics analysis placed these strains phylogenetically related to *O. lupini* that nodulate *Lupinus* and *O. antropi*, human pathogen species. These results, together with DNA-DNA hybridization, DNA G+C content and chemotaxonomy data (not shown) allowed us to classify these bacteria into a new species within the genus *Ochrobactrum*, denominated *Ochrobactrum cytisi* sp. Nov. (Zurdo-Piñeiro et al., 2007).



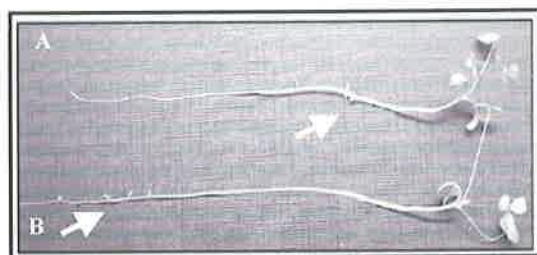
**Table I.** Identification of *Ochrobactrum* strains using the commercial system API2ONE

Especie	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG
<i>Ochrobactrum cytisi</i> Esc 1	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++
<i>Ochrobactrum cytisi</i> Esc 5	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++
<i>Ochrobactrum</i> sp. Azn 6.1	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++
<i>Ochrobactrum</i> sp. Azn 6.2	+++	-	-	+	+++	+++	+++	-
<i>Ochrobactrum</i> sp. OmedZ 2.1 g	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++
<i>Ochrobactrum</i> sp. MedZ 1.3	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++



## 2. Nodulation of legumes by Ochrobactrum

*Ochrobactrum cytisi* ESC1 and ESC5 are able to nodulate the legume plant *Cytisum scoparius*, nodules from where they were isolated. *Ochrobactrum* sp. Azn6-2 is able to form nodules on alfalfa plants (Fig. 2). However, nodulation kinetics is slower compared to *Rhizobium* inoculation. First nodule primordia appear after 20-25 days post inoculation (dpi) and at the very distal part of the root (10-13 cm from the hypocotyl) (Table 2).



**Table 2.** Comparison of nodulation features by *Rhizobium* and *Ochrobactrum*

## 3. Resistance to heavy metals and antibiotics

*Ochrobactrum* strains showed high levels of resistance to Cu, Hg, Zn, Cd and Pb simultaneously (multiresistance) (Table 3), suggesting a potential in bioremediation (Ozdemir et al., 2003). On the other hand, all the *Ochrobactrum* strains showed high resistance to  $\beta$ -lactamate antibiotics such as ampicillin, whereas the resistance to antibiotics like nalidixic acid was variable, being all sensitive to tetracyclins, gentamicine and erythromicine (Table 4).

## 4. Application of heavy metal resistant bacteria in agriculture

In order to test the potential of these heavy metal resistant strains in bioremediation, a field experiment was performed (Fig. 4A). *Lupinus luteus* plants were cultivated on contaminated soils and inoculated with a consortium of rhizosphere resistant bacteria (*Ochrobactrum*, *Rhizobium* and *Pseudomonas*). Inoculated plants (Fig. 4C) showed a higher biomass and lower toxicity symptoms compared to non inoculated plants (Fig. 4B). This result suggests a protection effect at the level of rhizosphere due to the resistant bacteria, similar to that previously reported by Vals et al., (2000).

**Table 3.** Resistance of *Ochrobactrum* strains to arsenic and heavy metals

Inoculant	Number of nodules	Distance 1 <sup>st</sup> nodule (cm)	Distance 2 <sup>nd</sup> nodule (cm)	Distancia 3 <sup>rd</sup> nodule (cm)	Primordia (dpi)	Nodules (dpi)
<i>S. meliloti</i>	2-3	1.5-3.5	3- 4,5	4-5.5	5-6	9-10
Azn6-2	1-2	7-9	8.5-13		20-21	24-26
ESC1	2-3	10-11.5	10.5-12	11-12	22-24	27-29

Bacteria	AMP	Tc	NA	Rif	Clf	Amx: Cla
<i>Ochrobactrum</i> sp. Azn6.1	>100	<0.31	6.25	6.25	25	100:20
<i>Ochrobactrum</i> sp. Azn6.2	>100	2.5	25	3.12	50	>100:20
<i>Ochrobactrum</i> sp. Medz1.3	>100	2.5	12.5	3.12	50	100:20
<i>Ochrobactrum</i> sp. Omedz2.1g	>100	2.5	12.5	6.25	50	>100:20
<i>Ochrobactrum cytisi</i> Esc1	>100	1.25	12.5	3.12	25	100:20
<i>Ochrobactrum cytisi</i> Esc5	>100	2.5	25	3.12	50	50:10
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	>100	0.625	6.25	3.12	25	>100:20
<i>Ochrobactrum lupini</i>	>100	2.5	6.25	6.25	25	>100:20

**Table 4.** Resistance of *Ochrobactrum* strains to antibiotics. CMI expressed in %/ml. *O. anthropi* and *O. lupini* used as controls. AMP: ampicillin, Tc: tetracycline, NA: nalidixic acid, Rif: rifampin, Clf: chloramphenicol, Amx:Clav: Amoxicillin-clavulanic acid.



**Fig. 4.** A. Cultivation of *Lupinus luteus* plants on contaminated soil (Aznalcóllar, Sevilla). B. Non inoculated plants. C. Effect of inoculation with a consortium of rhizosphere bacteria resistant to arsenic and heavy metals.

### Acknowledgments

Work financed by Ministerio de Medio Ambiente (project MMA-611/2006/1-1.1), INIA (project RTA2006-059-C02) and Junta de Andalucía (project P06-CVI-01850).

### Literature

- Carrasco J A, Armario P, Pajuelo E, Chamber M A, Palomares A J. 2005.** Soil Biology & Biochemistry 37: 1131-1140.
- Grimalt J, Ferrer M, MacPherson E. 1999.** The Science of the Total Environment 242: 3-11.
- Holmes B, Popoff M, Kersters K. 1988.** International Journal of Systematic Bacteriology, 38: 406-416.
- Kesseru P, Kiss I, Polyak B. 2002.** Journal of Basic Microbiology 42: 268-276.
- Ozdemir G, Ozturk T, Cesar T. 2003.** Bioresource Technology 90: 71-74.
- Trujillo ME, Willens A, Martínez-Molina E, Velázquez E. 2005.** Applied and Environmental Microbiology 71: 1318-1327.
- Sawada H, Kykendall L, Young JM. 2003.** Journal of General and Applied Microbiology 49: 155-179.
- Silver S, Phung LE. 2005.** Journal of International Microbiology and Biotechnology 32: 587-605.
- Vais M, Atrian S, De Lorenzo V, Fernández LA. 2000.** Nature Biotechnology 18: 661-665.
- Zurdo-Piñeiro JL, Rivas R, Palomares AJ, Chamber MA, Velázquez E. 2007.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57: 784-788.

## BIORHIZOREMEDIATION OF HEAVY METALS TOXICITY USING *RHIZOBIUM*-LEGUME SYMBIOSES

E. Pajuelo<sup>1</sup>, M. Dary<sup>1</sup>, A. J. Palomares<sup>1</sup>, I. D. Rodriguez-Llorente<sup>1</sup>,  
J. A. Carrasco<sup>2</sup> and M. A. Chamber<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Microbiology Department, Faculty of Pharmacy, University of Seville,  
Professor Garcia Gonzalez 2, 41012 Seville, Spain; <sup>2</sup>CIFA Las Torres,  
IFAPA, Junta de Andalucia, Alcala del Rio, 41200 Seville, Spain.  
(Email: mangel.chamber@juntadeandalucia.es or palomares@us.es)

Massive amounts of acidic waters and mud (pH~3) containing toxic metals, such as zinc, lead, arsenic, copper, cadmium, mercury and selenium, were released as a consequence of the mine tailings spill accident in Aznalcollar close to Seville in Spain along a 62-km stretch of the Guadiamar river (Grimalt et al., 1999). Approximately 2,000 ha of croplands were contaminated. In spite of work done to clean the area, contamination by heavy metals (HM) in the soil in the area is still high. Although mechanical and chemical processes can be adopted to deal with toxic spills, most traditional remediation methods do not provide acceptable solutions for the removal of metal from soils. Contamination by As and heavy metals, such as Cd, Cu, Pb and Zn, is persistent (Martín et al., 2002).

More recently, phytoremediation has emerged as a promising ecoremediation technology, which uses plants and their associated rhizospheric microorganisms to remove pollutants from contaminated environments (Kuiper et al., 2004; Click, 2004). In this context, we have recently proposed the use of the symbiotic *Rhizobium*-legume interaction as a bioremediation system to clean-up metals and metalloids from contaminated soils (Carrasco et al., 2005). An experimental highly polluted area has been established by Andalusia government for research and several *Rhizobium*-legume symbiosis interactions have been set up here in an *in situ* phytoremediation experimental plot at the Guadiamar riverbed near the Aznalcollar mine spills.

The levels of contaminating HM have been determined in the contaminated area and found to be well over the limits established by Andalusian environmental law (Table 1). Also, a wide collection of *Rhizobium* and some other bacteria (*Pseudomonas* sp. and *Ochrobactrum* sp.) have been isolated from the rhizosphere of legumes growing on the

polluted area (Table 2). Many of these *Rhizobium* strains showed very high resistance to As and high nitrogen-fixation effectiveness (Carrasco et al., 2005). Further, the number of nodules decreased in the presence of HM, but not the nitrogen-fixation activity.

Table 1. Determination of the concentration of toxic elements in soils (ppm).

<i>Element</i>	<i>Non-contaminated soil</i>	<i>Contaminated soil</i>		
		<u>Zone 0</u>	<u>Zone 1</u>	<u>Zone 2</u>
As	6.6	320	100	504
Pb	25.8	295	122	1,229
Cu	23.8	176	65	1,059
Zn	36.6	932	281	1,317
Cd	1.1	6.0	2.5	11.0
Ni	17.7	25.1	15.7	34.0
Cr	28.4	28.9	39.1	44.4

Table 2. Resistance of *Ochrobactrum* sp. and other rhizospheric strains to heavy metals.

<i>Isolate</i>	<i>As</i> (mM)	<i>Cd</i> (mM)	<i>Co</i> (mM)	<i>Cu</i> (mM)	<i>Hg</i> ( $\mu$ M)	<i>Ni</i> (mM)	<i>Pb</i> (mM)	<i>Zn</i> (mM)
<i>Rhizobium</i> sp.	1–10	0.1–1	0.1–4	0.5–2	5–20	0.25– 1	3–6	0.5–2
<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Az13</i>	3	<0.25	1	3.5	25	n.d.	2	2
<i>Ochrobactrum</i> sp.	2–3	1–1.5	1	2.5–3	50–75	0.5	6–7	10
<i>Acinetobacter</i> <i>rhizosphaerae</i>	2	0.25		4	75	n.d.	n.d.	10
<i>Chryseobacteriu</i> <i>m</i> sp.	4	2	0.5	4	150	n.d.	n.d.	12.5

An “*in situ*” pilot rhizoremediation experiment has been performed at the contaminated area. Several legume plants (native and commercial legumes) belonging to seven genera were grown at the contaminated area and inoculated with compatible *Rhizobium* and other rhizospheric bacteria that are resistant to As and several HM in order to establish the phytoremediation capacity of these legumes as well as the effect of the inoculated bacteria. Among the legume species studied, *Vicia sativa* showed the highest capability to accumulate and translocate HM, although lupines produced the largest biomass (Table 3).

Coinoculation of *Lupinus* plants with *Bradyrhizobium* sp. and other rhizospheric bacteria isolated from the contaminated area improved yields (Table 4), but decreased the accumulation of HM by plants (Table 5). *Ochrobactrum* sp. strains isolated from legumes roots at the polluted area showed high resistance to HM and were able to nodulate alfalfa (Table 6).

Table 3. Comparison of total phytoremediation capacity of native and commercial legumes (n.d., not detected).

<i>Legume</i>	<i>Inoculant</i>	<i>Total biomass</i>	<i>Total phytoremediation (mg/m<sup>2</sup>)</i>			
			Cu	Pb	Cd	Zn
<i>Lupinus albus</i>	<i>Bradyrhizobium sp. lupinus 750</i>	3,800	38	n.d.	n.d.	304
<i>Lupinus luteus</i>	<i>Bradyrhizobium sp. lupinus 750</i>	3,750	52.5	n.d.	3.7	562
<i>Vicia sativa</i>	<i>Vicz1.1</i>	1,300	32.5	19.5	5.2	1,040
<i>Trifolium subterraneum</i>	<i>RTL15</i>	800	20	11.2	2.6	200

Table 4. Effects of inoculation with *Rhizobium* and other rhizospheric bacteria on yields of lupines cropped on the polluted plot.

<i>Inoculant</i>	<i>Nitrogen Content (%)</i>	<i>Plant biomass (g)</i>	<i>Total biomass (g)</i>
Non inoculated	1.73	11.4	307
<i>Bradyrhizobium sp. Lupinus</i>	2.40 (139%)	17.1 (150%)	377
<i>Bradyrhizobium sp. Lupinus</i> + <i>Ochrobactrum sp. OmedZ 2.1</i>	2.50 (144%)	17.8 (156%)	515
<i>Bradyrhizobium sp lupinus</i> + <i>Ochrobactrum sp. OmedZ 2.1</i> + <i>Pseudomonas sp. Az13</i>	2.40 (139%)	23.8 (209%)	691

Table 5. Effect of co-inoculation with *Rhizobium* and other rhizospheric bacteria on metal accumulation by plants of lupines.

<i>Inoculant</i>		<i>Accumulation (ppm)</i>			
		Cd	Cu	Pb	Zn
<i>Non inoculated</i>	Shoots	2.1	27.5	8.4	447
	Roots	4.0	70.0	50.0	642
<i>Bradyrhizobium lupini</i>	Shoots	1.6	21.5	n.d.	472
	Roots	4.0	65.0	27.0	755
<i>Bradyrhizobium lupini</i> + <i>Ochrobactrum sp.</i>	Shoots	1.6	23.2	5,6	421
	Roots	3.0	72.0	34.0	462
<i>Bradyrhizobium lupini</i> + <i>Ochrobactrum sp.</i> + <i>Pseudomonas sp.</i>	Shoots	0.6	17.8	n.d.	185
	Roots	3.0	49.0	21.0	320

Table 6. Most important features of nodulation of *Medicago sativa* by *S. meliloti* and *Ochrobactrum* sp. strains resistant to HM.

<i>Inoculant</i>	<i>Number of nodules</i>	<i>1st nodule (cm)</i>	<i>2nd nodule (cm)</i>	<i>3rd nodule (cm)</i>	<i>Primordia (dpi)</i>	<i>Nodules (dpi)</i>
<i>Sinorhizobium meliloti</i> MA11	2–3	1.5–3.5	3–4.5	4–5.5	5–6	9–10
<i>Ochrobactrum</i> sp. Azn6-2	1–2	7–9	8.5–13	–	20–21	24–26
<i>Ochrobactrum</i> sp. ESC1	2–3	10–11.5	10.5–12	11–12	22–24	27–29

## Conclusions

1. *S. meliloti* strains isolated from polluted soils show high resistant to As and were symbiotically effective, however, the number of nodules decreased in HM-polluted soils.
2. *Ochrobactrum* sp. Strains are highly resistant to HM and possess *nifH* and *nod* rhizobial genes, being able to form late and ineffective nodules in alfalfa.
3. *Vicia sativa* was the legume with the higher accumulation and translocation capability, although lupines produced the largest biomass.
4. Co-inoculation of *Lupinus* plants with *Bradyrhizobium* sp. and other rhizospheric bacteria isolated from the contaminated area improved yields, but decreased accumulation of HM.

## References

- Carrasco et al. (2005) *Soil Biol. Biochem.* 37, 1131–1140.  
 Click (2004) *Nature Biotechnol.* 22, 526–527.  
 Grimalt et al. (1999) *Sci. Total Environ.* 242, 3–11.  
 Kuiper et al. (2004) *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17, 6–15.  
 Martín et al. (2002) *Nucl. Instrum. Method. Phys. Res.* 188, 102–105.

## 4. RESUMEN DE LOS RESULTADOS

### 4.1. Identificación de la cepa MA11, determinación de su resistencia a arsénico y evaluación de sus propiedades simbióticas

La cepa MA11 fue aislada a partir de nódulos de plantas de *Medicago* nativas de suelos contaminados de las riberas de los ríos Guadiamar y Agrio, próximos a la zona afectada por el accidente de la mina de Aznalcóllar (Sevilla).

Mediante tres experimentos diferentes (nodulación en *Medicago sativa*, confirmación por PCR de la presencia del gen *nodC* y amplificación y secuenciación del gen del ADN ribosómico 16S, se confirmó la inclusión de esta cepa en el género *Sinorhizobium* (actualmente nombrado como *Ensifer*).

*Sinorhizobium* sp. MA11 creció a una concentración de arsénico de 10 mM, en comparación con las cepas silvestres *Sinorhizobium meliloti* 1021 y *S. meliloti* Ism6 que sólo crecieron a concentraciones máximas de 0,8 mM y 1 mM, respectivamente.

Para conocer la tolerancia o resistencia al arsénico de *Medicago sativa* se llevaron a cabo varios ensayos de germinación de semillas y de nodulación de plantas inoculadas con MA11 a diferentes concentraciones del metaloide (12,5, 25, 30, 35 y 40  $\mu\text{M}$ ). El 90% de las semillas germinaron en las cuatro concentraciones más bajas, mientras que a 40  $\mu\text{M}$  sólo germinó el 40%. A 12,5  $\mu\text{M}$  no disminuyó la nodulación ni se observaron síntomas de toxicidad en las plantas. Sin embargo, en el resto de concentraciones se produjo una reducción drástica de la nodulación y aparecieron síntomas de elevada toxicidad en las plantas. Para determinar con más exactitud la causa de la ausencia de nodulación, se realizó un estudio microscópico para verificar si se producían o no cordones de infección, para lo cual se marcó la cepa *Sinorhizobium* sp. MA11 con un plásmido que contiene el gen de la  $\beta$ -

galactosidasa. Tras teñir las raíces en presencia de X-gal, se pudo apreciar una reducción del 90% en los cordones de infección formados en las raíces de plantas crecidas en presencia de arsénico. Asimismo, se observó una reducción del 75% de nódulos y de primordios a los 10 y a los 28 días después de inoculadas las plantas crecidas en presencia de arsénico. A la vista de estos resultados, se realizó un estudio microscópico más detallado utilizando la cepa MA11 marcada con el gen *lacZ*. Se observaron raíces de *M. sativa* inoculadas con dicha cepa en presencia o en ausencia de arsénico. Se observó el aspecto de las raíces buscando daños causados por el arsénico tanto en tejidos de la raíz como en los pelos radicales. Tres días después de la inoculación, las raíces ya mostraban síntomas de necrosis. A su vez, los pelos radicales mostraban deformidades, especialmente en el ápice de la raíz, en comparación con pelos de raíces no expuestas al arsénico. Resultados observados 6, 10 y 28 días después de la inoculación, mostraban claras diferencias en el desarrollo del nódulo en ambas condiciones, sugiriendo un desarrollo más rápido en los nódulos formados en presencia de arsénico, pero a la vez con una senescencia más temprana que la de los nódulos formados en ausencia del metaloide.

Comparando plantas inoculadas con *Sinorhizobium* MA11 resistente a arsénico con plantas no inoculadas o inoculadas con *S. meliloti* 1021 y *S. meliloti* Ism6, se pudo comprobar que en función del número de nódulos, la biomasa producida, el contenido en nitrógeno y la actividad nitrogenasa, la cepa MA11 mostraba unas excelentes propiedades simbióticas.

Asimismo, tras los estudios de competitividad realizados frente a la cepa *S. meliloti* 1021 tanto en presencia como en ausencia de arsénico, la cepa MA11 demostró ser más competitiva cuando se inoculaban juntas, sobre todo en presencia de As en el medio.



#### 4.2. Estudio del potencial de la simbiosis *Lupinus luteus*-*Bradyrhizobium* en rizadorremediación

Con el objetivo de evaluar la capacidad de fitoestabilización de metales *in situ* por parte de *Lupinus luteus*, en combinación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) resistentes a metales pesados y autóctonas de suelos contaminados con metales pesados, se realizaron una serie de experimentos en la parcela "El Vicario" cedida por la Junta de Andalucía, situada en terrenos afectados por el vertido de la mina de Aznalcóllar.

Primero se midió la resistencia a metales (As, Cd, Cu, Pb y Zn) que presentaban las tres cepas que iban a ser utilizadas en los ensayos: *Bradyrhizobium* sp. 750, *Ochrobactrum cytisi* Azn6.2 y *Pseudomonas* sp. Az13. La más resistente de las tres fue *O. cytisi* que creció en presencia de una concentración 6 mM de As, Pb y Zn, y de 1,5 mM de Cd. *Pseudomonas* mostró, en general, un nivel intermedio de resistencia, aunque creció a 4,5 mM de Cu, el valor más alto de las tres. La menos resistente fue *Bradyrhizobium* que mostró un nivel de resistencia bajo a todos los metales.

El primer ensayo consistió en sembrar plantas de *Lupinus* en tres zonas de la parcela que mostraban índices de contaminación diferentes. Previamente, las semillas fueron inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. 750. Se tomaron datos de germinación de las semillas, de biomasa y de nodulación.

En la zona donde la contaminación era menor no se encontraron diferencias en cuanto a los parámetros medidos cuando se comparaban estos resultados con los obtenidos con plantas inoculadas con la misma bacteria y crecidas en suelos no contaminados. Ni la germinación ni la nodulación parecían verse afectadas y las plantas eran saludables con una gran biomasa, no mostrando síntomas aparentes de toxicidad. En la zona con un nivel medio de contaminación, solo se un obtuvo un

porcentaje de germinación de semillas del 64% y la biomasa vegetal disminuyó un 30%. Además, solo el 40% de los nódulos presentes eran funcionales y el contenido en nitrógeno de la planta era intermedio, indicando que las bacterias eran capaces todavía de fijar nitrógeno en condiciones moderadas de contaminación. Por otra parte, las plantas fueron capaces de dar flores y producir semillas. En la zona con un nivel alto de contaminación la germinación disminuyó hasta el 47% y el crecimiento vegetal se vio drásticamente disminuido, llegando a alcanzar la biomasa solo el 10% de la biomasa de las zonas menos contaminadas. Además, las plantas fueron incapaces de completar sus ciclos vitales, al no poder producir flores ni semillas. En estas condiciones las plantas fueron incapaces de nodular por lo que el contenido en nitrógeno de los tejidos cayó hasta el 1,7%.

También se determinó la acumulación de cada uno de los metales tanto en raíces como en hojas de *Lupinus luteus*. Con respecto al arsénico, *L. luteus* se comportó como una planta excluyente del metal, ya que no fue posible detectar cantidad alguna acumulada ni siquiera en las plantas crecidas en la zona con mayor contaminación. Sin embargo, *L. luteus* acumuló Cd, Cu y Pb, principalmente en las raíces, con un nivel muy bajo de translocación de estos metales a las hojas. Estos resultados indicaban que estas plantas pueden ser utilizadas para la fitoestabilización de metales. No obstante, la acumulación de cinc fue mucho mayor (10 veces más alta que la cantidad de Cu o Pb y 100 veces más alta que la de Cd). De hecho, esta especie puede ser considerada como acumuladora de cinc ya que la concentración de metal alcanzada en los tejidos vegetales es superior a la concentración de este elemento en el suelo (factor de bioconcentración > 1). Por ello, esta combinación planta-bacteria podría ser utilizada para la fitoextracción de Zn de suelos contaminados o en biofortificación.

Las concentraciones de los metales en los tejidos aumentaron a medida que lo hacía su concentración en el suelo, principalmente en las raíces. En la zona más contaminada, la concentración de los metales fue entre 4 y 10 veces más alta que la

de las plantas crecidas en la zona menos contaminada. Además, las plantas crecidas en la zona más contaminada sufrieron una reducción de la biomasa del 90%.

En el segundo de los ensayos se estudió el efecto de la inoculación con un consorcio de bacterias PGPR resistentes a metales pesados sobre la capacidad de fitorremediación de *Lupinus luteus*. Tras los resultados obtenidos en el primer ensayo, el segundo se llevó a cabo en suelos de la parcela con un nivel intermedio de contaminación ya que a mayores concentraciones de contaminantes no se observó nodulación en las plantas.

Cuando la inoculación se realiza solo con *Bradyrhizobium* se produce un incremento de la biomasa del 29% con respecto a las plantas no inoculadas. Pero cuando se inocula con el consorcio de bacterias PGPR resistentes, se consigue un aumento de la biomasa del 109%, siendo mucho mejor el aspecto de las plantas inoculadas que el de las que no lo fueron. El contenido en nitrógeno, debido a la fijación producida en los nódulos de *Lupinus*, también aumento hasta un 40% con respecto a las plantas no inoculadas, indicando que la nodulación seguía siendo efectiva en niveles moderados de contaminación.

La acumulación de metales pesados en estas plantas también se midió tanto en raíces como en hojas. Cuando las plantas se inocularon sólo con *Bradyrhizobium* se produjo una disminución en la acumulación de los metales (entre un 25% y un 40% dependiendo del metal) tanto en raíces como en hojas. Cuando se produjo la co-inoculación con *Ochrobactrum* y *Bradyrhizobium*, la cantidad de metal acumulado fue aún menor. Al inocular con el consorcio bacteriano que incluía también a *Pseudomonas*, se produjo una disminución significativa de la acumulación de metales, especialmente en las raíces. En concreto, en raíces se observó una reducción de más del 50% de la acumulación de Pb, Cd y Zn. Además, se produjo también una disminución en la cantidad de metal trasladado a las hojas, entre el 30% y el 60% dependiendo del metal, en plantas inoculadas con el consorcio de las

tres bacterias. En el caso específico del plomo, la acumulación en hojas fue indetectable.

#### 4.3. Bioadsorción de cadmio por la bacteria *Ochrobactrum cytisi* Azn6.2

La cepa *Ochrobactrum cytisi* Azn6.2 fue aislada de nódulos blancos no fijadores de nitrógeno de plantas de *Medicago polymorpha* en suelos contaminados por arsénico y metales pesados cercanos a la zona del vertido de Aznalcóllar. Cuando se midió su tolerancia a algunos metales pesados se observó que era resistente a 6 mM de As y Zn, 3,5 mM de Cu y 1,5 mM de Cd.

Para poder evaluar la capacidad de *O. cytisi* Azn6.2 en la biorremediación de metales, se midió la acumulación de As, Cd, Cu y Zn en biomasa seca de Azn6.2 lavada o bien con agua, para determinar la acumulación total del metal, o bien con EDTA 0,2 M, para determinar la cantidad de metal unido a la superficie celular por bioadsorción. *O. cytisi* Azn6.2 mostró una gran capacidad de unión a metales, especialmente a Cd y Zn, y en menor medida a As y Cu. Además, una gran parte del metal (entre el 55% y el 85%, dependiendo del metal) se acumulaba en el exterior de la célula, probablemente unido al lipopolisacárido de la pared celular, puesto que el lavado con EDTA permitía extraer parte del metal. La cantidad de metal que permanece después del lavado con EDTA se puede considerar como el metal que se acumula dentro de las células. Para comprobar si esto era así, se analizó el contenido de Cd en células de Azn6.2 mediante microscopía electrónica de barrido equipada con un espectrómetro de rayos X (SEM-EDX), confirmándose que la mayoría del Cd estaba adsorbido a la superficie celular.

En otra serie de experimentos se determinaron las condiciones óptimas para obtener la máxima bioadsorción de cadmio en células de *O. cytisi* Azn6.2. Éstas quedaron establecidas en 1mM de Cd<sup>2+</sup> durante 2 horas a temperatura ambiente.

En estas condiciones, la capacidad máxima de bioadsorción de Cd fue de 32-34 mg/g.

Los resultados obtenidos en estos experimentos junto con los anteriores en los que se demostró la eficiencia de *O. cytisi* Azn6.2 para promover el crecimiento de plantas en suelos contaminados con metales pesados, probablemente por la bioadsorción del metal a nivel de la rizosfera, sugieren que esta bacteria podría ser útil tanto en rizadorremediación asociada a plantas, como en el tratamiento de aguas residuales como bioadsorbente de metales.

Una ventaja de la técnica de bioadsorción es la posibilidad de recuperar el metal de la biomasa bacteriana. Mediante dos estrategias, quelación con EDTA y desorción a pH ácido (de 1 a 4), se estudiaron las condiciones óptimas para la recuperación del cadmio de la biomasa. El método más efectivo y más económico resultó ser la desorción a pH 1. En estas condiciones se consiguió la desorción del 99% del cadmio total.

El sistema de bioadsorción/desorción de cadmio por parte de células de *O. cytisi* Azn6.2 podría constituir un método efectivo para la limpieza de efluentes contaminados y la recuperación del metal.

#### **4.4 Utilización de plantas de *Lupinus luteus* inoculadas con *Serratia* sp. MSMC541 para la rizo-estabilización de metales en suelos**

*Serratia* sp. MSMC541, una cepa multirresistente a metales pesados, se aisló de nódulos de *Lupinus consentinii*. Las concentraciones toleradas por dicha cepa fueron 13,3 mM de As, 2,2 mM de Cd, 2,3 mM de Cu, 9 mM de Pb y 30 mM de Zn. Cuando se estudió su cinética de crecimiento en medio líquido, en presencia de estos mismos elementos, se comprobó que su crecimiento no se alteraba a concentraciones bajas de los metales, pero a medida que se incrementaba la

concentración, el crecimiento disminuía. No obstante, a concentraciones de 6,6 mM de As, 0,55 mM de Cd, 2 mM de Cu, 4,6 mM de Pb, y 15,3 mM de Zn aún fue capaz de crecer aunque con una notable disminución de la tasa de crecimiento y de la densidad final del cultivo tras 72 horas de incubación, siendo el Cd y el Cu los elementos más tóxicos para esta cepa.

Por otra parte, se estudió la acumulación de estos mismos metales en dicha cepa, analizando la cantidad total de metal acumulado (tras el lavado del cultivo con agua) y la cantidad de metal acumulado en el interior de las células (tras el lavado del cultivo con EDTA que separa el metal adsorbido en la superficie celular). *Serratia* sp. MSMC541 fue capaz de acumular de 6.000 a 9.000 ppm dependiendo del metal. Además, la acumulación total siempre fue mucho mayor que la acumulación de metal en el interior, indicando que la mayor parte del metal (65-80%) se adsorbía a la superficie celular. Por el contrario, la acumulación de arsénico fue baja (alrededor de 800 ppm), pero la mitad se acumuló en el interior.

Mediante hibridación de ADN total de MSMC541, utilizando como sonda heteróloga el operon de resistencia a arsénico de *E. coli* R773, y posterior amplificación por PCR de los fragmentos hibridados, se pudo comprobar la existencia de genes de resistencia a arsénico en esta cepa.

Una vez comprobado que las características de la cepa MSMC541 podían ser útiles en experimentos de biorremediación, el objetivo del estudio se centró en evaluar la capacidad de rizorremediación de *Lupinus luteus* inoculada con dicha cepa.

En primer lugar se determinó la cantidad de metales pesados que esta leguminosa podía tolerar. A las concentraciones empleadas en este estudio, el arsénico resultó ser el metal más estresante, provocando los efectos más drásticos tanto en hojas como en raíces, disminuyendo la biomasa en un 50%.

La presencia de Cd o Cu produjo una reducción de la biomasa de hojas y raíces, comparado con el control sin metal, de entre el 10 y el 20%, mientras que con el Pb los efectos fueron mínimos. Sin embargo, la presencia de Zn no afectó negativamente a hojas ni a raíces.

La inoculación con *Serratia* sp. MSMC541 mejoró la tolerancia de la planta a los metales, especialmente, a As, Cd y Cu, aumentando la biomasa de las hojas entre un 20 y un 40%. También se observó un efecto positivo de la inoculación, aunque en menor medida, en las plantas crecidas en presencia de Pb o Zn (15-20% más de biomasa). En las raíces solo se observó un ligero incremento de la biomasa.

Tras medir la cantidad total de metal tanto en raíces como en hojas, se pudo concluir que, principalmente, *Lupinus luteus* acumulaba metales pesados en las raíces, especialmente Pb y Zn, seguidos de As y Cu. En hojas, la cantidad de metal acumulado fue significativamente menor, alrededor del 10% del metal acumulado en las raíces, con la excepción del Zn, para el que se produjo un traslado significativo hasta las hojas.

Cuando la planta se inoculó con la rizobacteria resistente *Serratia* sp. MSMC541, se observó una notable disminución de acumulación del metal en la planta, tanto en hojas como en raíces. Las plantas inoculadas acumularon, aproximadamente, un tercio de la concentración de Pb y la mitad de la concentración de As y Cu con respecto a las plantas no inoculadas. En cambio, el efecto sobre la acumulación de Cd y Zn no fue tan claro, mostrando apenas una reducción de entre el 10 y el 20% en la acumulación de estos elementos.

Se calculó también la ratio entre concentración de metal en la raíz y la de hoja, en plantas no inoculadas e inoculadas cultivadas en presencia del metal. Las plantas inoculadas presentaron ratios raíz/hoja mayores que las no inoculadas para As, Cd y Cu, indicando un menor traslado del metal a las hojas (30-50% de

reducción en la translocación del metal), lo que significa que las plantas inoculadas tienden a acumular los metales en las raíces. Por otro lado, la ratio para Pb y Zn se vio menos afectada por la inoculación. El grado de translocación del metal siguió la secuencia  $As < Cu < Pb < Cd < Zn$ .

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten proponer la combinación entre plantas de *Lupinus luteus* y la rizobacteria resistente a metales *Serratia* sp. MSMC541, como un método adecuado y eficaz para fitoestabilizar metales. Esta rizobacteria se puede utilizar como inoculante para las semillas de *Lupinus*, constituyendo un importante aditivo para mejorar la eficiencia de la fitoestabilización de metales.



## 5. DISCUSIÓN

La presencia de metales pesados en los suelos es consecuencia de procesos geoquímicos naturales, como la erosión, la solubilización de las rocas, etc. (Vansgronsveld et al., 2009; Wuana y Okiemen, 2011). Además de estos procesos, la actividad humana es la causa del mayor incremento de las concentraciones de metales pesados en suelos, aire y aguas (Järup, 2003; Mohamed et al., 2009).

Los organismos vivos, especialmente las bacterias, juegan también un papel determinante en la movilización de los metales y en el incremento de su biodisponibilidad (Faramarzi et al., 2004; Gadd, 2010; Korehi et al., 2013). En este sentido, las actividades bioquímicas de las bacterias llevan a la secreción de sideróforos para la captación de hierro, que pueden a su vez movilizar otros metales (Kalinowski et al., 2000; Glasauer et al., 2002); secreción de ácidos orgánicos que disminuyen el pH del suelo y contribuyen a la movilización de los metales (Gadd, 1999); formación de compuestos cianados que complejan estos elementos (Faramarzi et al., 2004), oxido-reducciones (Lloyd, 2003), metilaciones (Bentley et al., 2002), etc. También pueden segregar enzimas y otras sustancias extracelulares (péptidos) que afectan a la movilidad de los metales pesados, por lo que pueden ser utilizados en biominería (Matlakowska et al., 2014). Otras actividades contrarias conducen a la inmovilización de los metales, como la alcalinización del medio para formar óxidos e hidróxidos (Miyata et al., 2007), la producción de sulfuro por bacterias reductoras de sulfato (Lloyd y Macaskie, 1998) o la bioadsorción a grupos químicos extracelulares (Gadd, 2009).

En particular, la concentración del arsénico en la corteza terrestre es de 2 ppm como promedio, siendo el elemento número 22 en abundancia y estando presente en minerales como la arsenopirita ( $\text{FeAsS}$ ), rejalgar ( $\text{As}_2\text{S}_2$ ), oropimente ( $\text{As}_2\text{S}_3$ ), arsenolita ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) y cobaltina ( $\text{SAsCo}$ ) (Oremland y Stolz, 2003; Hoang et al., 2010). Las principales actividades que contaminan el medioambiente con As son

la minería (particularmente la extracción de metales como Au y Cu de las menas), el tratamiento de impermeabilización de la madera y la aplicación de plaguicidas (ATSDR, 2007). Las actividades de los microorganismos también contribuyen de manera preponderante a la movilización del As, mediante oxido-reducción, metilación, complejación, etc., (Drewniak y Sklodowska, 2013; Tomczyk-Żak et al., 2013; Drewniak et al., 2014). El As a elevadas concentraciones es letal, y en exposiciones a menos concentración pero continuadas provoca la aparición de manchas y verrugas en la piel, daños hepáticos y renales, daños neurológicos y varios tipos de cáncer (Celik et al., 2008; Brinkel et al., 2009). Se calcula que 50 millones de personas están expuestas a concentraciones elevadas de As en el agua en el sudeste asiático (Smith et al., 2000), siendo además un enorme problema el cultivo del arroz en aguas contaminadas y la entrada de este elemento a la cadena trófica a través de las plantas (Ma et al., 2008).

Las técnicas utilizadas para la recuperación de suelos pueden aplicarse *in situ* o *ex situ*. Las técnicas *in situ* generalmente conllevan la aplicación de correctores de pH como carbonatos, fosfatos de amonio, enmiendas para estabilizar los metales pesados, etc., (van Herwijnen et al., 2007; Kwon et al., 2010; O'Day et al., 2010). A menudo consiguen una estabilización de los metales en el suelo, pero no su eliminación definitiva, por lo que necesitan la monitorización continua, sobre todo para controlar la lixiviación de metales a los acuíferos. Las técnicas de "landfill", unas de las más utilizadas, también tienen la desventaja de que se produce la lixiviación de los metales (Aucot, 2008; Li et al., 2009). Las técnicas *ex situ* son las más caras y las que provocan una mayor distorsión en el medioambiente, ya que conllevan el uso de maquinaria para excavar y trasladar el suelo (Peng et al., 2009; Lasheen y Ammar, 2014), que es posteriormente tratado en otras instalaciones mediante técnicas como el lavado de suelos, etc., y finalmente devuelto a su lugar de origen u otro lugar. Estas técnicas, además de ser bastante caras, provocan la destrucción total de la estructura del suelo y de su microbiota.

Tras más de tres décadas desde que se propuso como técnica para la recuperación de suelos contaminados (Chaney, 1983), la fitorremediación ya se ha consolidado como una alternativa ecológica, más barata y más respetuosa con el medioambiente respecto a las técnicas fisicoquímicas tradicionales (Vansgronsveld et al., 2009). En el mundo, multitud de proyectos de fitorremediación se han llevado o se están llevado a cabo, tanto para la eliminación de compuestos orgánicos como de metales pesados (Sharma y Pandey, 2014).

Las dos principales técnicas de fitorremediación son la fitoextracción y la fitoestabilización. Para la primera, se prefiere la utilización de plantas hiperacumuladoras, capaces de concentrar grandes cantidades de metales pesados y de translocarlos a la parte aérea de la planta (Callahan et al., 2006). Estas plantas "cargadas de metal" son posteriormente recolectadas y tratadas convenientemente como un residuo contaminado. La otra alternativa, la fitoestabilización, se basa en el empleo de plantas tolerantes no hiperacumuladoras, las cuales acumulan preferentemente el metal en la raíz o en la rizosfera, evitando así la entrada del mismo a la cadena trófica (Méndez y Maier, 2008). Esta es frecuentemente la opción utilizada en fitorremediación, ya que su aplicación es más fácil, puesto que no necesita la recolección de la biomasa. Tiene la ventaja de la facilidad de su aplicación, y la desventaja de que no elimina el metal del suelo, sino que lo estabiliza, con lo que requiere un mayor control y monitorización (Epelde et al., 2014).

El uso conjunto de plantas y bacterias rizosféricas para la fitorremediación ha llevado a acuñar un nuevo término denominado rizorremediación (Glick, 2003), se considera una interacción planta-microorganismo beneficiosa y constituye la técnica más avanzada dentro de la fitorremediación (Kuiper et al., 2004; Glick, 2010; de Bashan et al., 2012). Son muy numerosas las diferentes interacciones entre plantas y microorganismos con resultados positivos para la fitoextracción de

metales pesados (Zaidi et al., 2003; Ma et al., 2009), así como para su fitoestabilización (Fatnassi et al., 2015; Jebara et al., 2015), no sólo con bacterias sino también con hongos (Gadd, 1999; Adriansen et al., 2001; Zhuang et al., 2007).

De entre las múltiples interacciones planta-microorganismo, la interacción entre las leguminosas y las bacterias colectivamente conocidas como rizobios aporta una ventaja añadida a la fitoestabilización, ya que incrementa el contenido de nitrógeno en las plantas como consecuencia de la fijación biológica de nitrógeno en los nódulos de las leguminosas (Graham y Vance, 2003; Abate y Orr, 2012). Tras la selección de las simbiosis leguminosa-rizobio adecuadas, esta interacción puede incrementar el contenido de nitrógeno y mejorar la calidad de los suelos, incluso en suelos contaminados (Wani et al., 2007; 2008; Mahieu et al., 2011; El Aafi et al., 2012). En este sentido, la interacción leguminosa-rizobio está despertando un interés creciente para la fitorremediación de suelos contaminados (Reichman, 2007; Pajuelo et al., 2011; Gómez-Sagasti y Marino, 2015). Las leguminosas se engloban dentro de la categoría de plantas no hiperacumuladoras, ya que acumulan el metal fundamentalmente en la raíz (Pajuelo et al., 2007), limitando su translocación a la parte aérea, por lo que su principal aplicación es en fitoestabilización (Pajuelo et al., 2011).

La presencia de metales pesados y metaloides tiene un efecto negativo sobre la simbiosis leguminosa-rizobio. Por una parte, se ha demostrado que la presencia de metales pesados disminuye tanto el tamaño de las poblaciones como la biodiversidad de las poblaciones de rizobios presentes en los suelos (Hirsch et al., 1993; Lakzian et al., 2002), particularmente en ausencia de la planta huésped (Broos et al., 2004; 2005). Otra consecuencia que se produce cuando no se encuentran rizobios resistentes, es que otras bacterias pueden nodular las leguminosas, formando nódulos ineficientes (Rivas et al., 2009; Gyaneshwar et al., 2011). Por ejemplo, *Ochrobactrum cytisi* se ha encontrado en nódulos de *Cytisus scoparius* en suelos contaminados de Aznalcóllar (Zurdo-Piñeiro et al., 2007). En un

estudio reciente, no se han encontrado rizobios simbióticamente efectivos en nódulos de plantas de *Anthyllis vulneraria* en suelos contaminados, sino que, por el contrario, diferentes géneros de alfa y gamma-proteobacterias nodularon esta planta (El Aafi et al., 2015), siendo las gamma-proteobacterias probablemente oportunistas, ya que no se ha descrito nunca la nodulación de leguminosas por estas bacterias en condiciones gnotobióticas. Estos y otros resultados revelan la importancia de seleccionar rizobios altamente resistentes y con elevada eficiencia para la fijación de N<sub>2</sub> en suelos contaminados (Carrasco et al., 2005).

Para analizar el efecto del arsénico sobre la interacción leguminosa-rizobio, se ha elegido el par formado por *Medicago sativa* y *Ensifer medicae* (Pajuelo et al., 2008). Dentro del género *Medicago*, la especie *M. sativa* es considerada como moderadamente tolerante a los metales pesados (Peralta-Videa et al., 2008), y se ha propuesto en fitorremediación debido a que es capaz de fitoestabilizar metales en suelos (Chen et al., 2008; Zribi et al., 2014). Nuestros resultados han determinado que el As afecta a la nodulación en la simbiosis entre *Medicago sativa* y *Ensifer*, produciendo una disminución del 75% en el número final de nódulos (Pajuelo et al., 2008). Del mismo modo, se ha reportado un efecto negativo de este metaloide sobre la simbiosis entre la soja (*Glycine max*) y bacterias del género *Bradyrhizobium*, disminuyendo el número de nódulos y retrasando la aparición de los mismos (Reichman, 2007). En nuestro estudio, hemos constatado que esta disminución del número de nódulos parece estar relacionada con una disminución drástica (del 90%) en el número de infecciones. Esto es debido a un daño a los pelos radiculares, los cuales estaban deformados y profundamente dañados cuando se observaron al microscopio (Pajuelo et al., 2008). Además, estudios de raíces divididas ("split-roots") han demostrado que el efecto del As es local, no sistémico, afectando sólo a la parte de la raíz que está en contacto con el As, pero no impidiendo la nodulación en la otra parte (Lafuente et al., 2014). También se ha descrito una disminución en el número de pelos radiculares susceptibles a la infección por rizobio en soja en presencia de As (Reichman, 2007). Otros

elementos como el Cu producen resultados similares; incluso a concentraciones tan bajas como 2  $\mu\text{M}$ , disminuye el número de nódulos en la interacción entre *Vigna unguiculata* y *Bradyrhizobium*, además de afectar al número de pelos radiculares (Kopitke et al., 2007). Respecto al As, por otra parte, se ha encontrado que hay una correlación entre la presencia de As y bajos niveles de expresión de diversas nodulinas, particularmente aquellas que se expresan en las células o tejidos más periféricos, en los cuales puede haber una mayor acumulación del tóxico (Lafuente et al., 2010; 2014).

A pesar de ello, en nuestro caso, una vez que comienza el proceso de infección, se forman nódulos eficientes en la fijación de  $\text{N}_2$ , probablemente debido a que se ha seleccionado una cepa de *Ensifer medicae* altamente resistente a As, ya que tolera concentraciones de arsenito superiores a 10 mM y concentraciones de arseniato superiores a 300mM (Pajuelo et al., 2008; Funes, 2011). De hecho, para que esta interacción sea efectiva en suelos contaminados es necesario seleccionar leguminosas tolerantes y rizobios altamente efectivos y resistentes a metales pesados. Entre las leguminosas tolerantes se encuentran *Anthyllis*, *Latyrus*, *Lupinus*, *Trifolium*, *Vicia*, *Astragalus*, etc. (Prasad y Freitas, 2003; Vázquez et al., 2006; Mahieu et al., 2011). Con respecto a los rizobios, se han descrito un gran número de trabajos en los que se han aislado rizobios resistentes a metales pesados de suelos contaminados (Reichman 2007; Wani et al., 2007; 2008; Vidal et al., 2009; Abd-Alla et al., 2012; Grison et al., 2015). Con las técnicas de secuenciación masiva de genomas, se están describiendo cada vez nuevos operones de resistencia a metales pesados presentes en rizobios (Giraud et al., 2007; Sá-Pereira et al., 2007; 2009; Rubio-Sanz et al., 2013).

Además de estudiar el efecto del As sobre la interacción simbiótica, en esta Tesis se ha realizado un experimento de campo en suelos contaminados para evaluar el potencial de la interacción simbiótica en fitorremediación de suelos contaminados. Para este propósito se ha elegido la leguminosa *Lupinus luteus* y la

bacteria *Bradyrhizobium* sp. En estudios anteriores, esta leguminosa ha demostrado que tiene una buena tolerancia a metales pesados, y además acumula estos elementos en las raíces, con lo cual es fundamentalmente fitoestabilizadora (Vázquez et al., 2006; Quiñones et al., 2013). Sin embargo, hay que tener en cuenta que en suelos ácidos, esta planta puede acumular elevadas cantidades de Zn (Pastor et al., 2003), con lo que este elemento podría estar más disponible y entrar en la cadena trófica a niveles por encima de los máximos permitidos en las plantas para el consumo por animales herbívoros (Mendez y Maier, 2008). Con respecto al otro miembro de la simbiosis, se ha utilizado *Bradyrhizobium* sp. 750, un rizobio con elevada capacidad para la nodulación y fijación de N<sub>2</sub>, si bien esta cepa no fue aislada de suelos contaminados, ya que no se encontró *Bradyrhizobium* entre los aislamientos iniciales que se obtuvieron de suelos contaminados de Aznalcóllar (Carrasco et al., 2005). Con respecto a la zona, los experimentos *in situ* se desarrollaron en una parcela contaminada en Aznalcóllar, para lo cual se solicitó un permiso a la Consejería de Medioambiente de la Junta de Andalucía. Este estudio ha tenido bastante relevancia, ya que si bien hay muchos trabajos a nivel de invernadero, no se realizan muchos experimentos *in situ* (Pajuelo et al., 2014).

Nuestros resultados indican que la inoculación de plantas de *Lupinus luteus* con *Bradyrhizobium* sp. 750 mejoró significativamente el crecimiento de las plantas, cuando éstas fueron cultivadas en suelos contaminados. Se produjeron incrementos de la biomasa de parte aérea y de la raíz de (Dary et al., 2010). Numerosos trabajos indican que el cultivo de leguminosas tolerantes a metales pesados en suelos contaminados mejora sustancialmente tras la inoculación con rizobios apropiados (Pajuelo et al., 2011; 2014; Ahemad y Kribet, 2014). Se ha demostrado un incremento del crecimiento, tanto de la parte aérea como de la raíz (Li et al., 2004; Pajuelo et al., 2007; Wani et al., 2007; 2008), un incremento en el número de nódulos y en la tasa de fijación de nitrógeno (Wani et al., 2007; 2008; Pajuelo et al., 2008) y una disminución en los parámetros relacionados con el estrés en general, y el estrés oxidativo en particular (Wang et al., 2011). Los resultados

en nuestro experimento "in situ" mejoraron aún más cuando se co-inocularon las plantas, además de con el rizobio, con las bacterias *Pseudomonas* sp. Az13 y *Ochrobactrum cytisi* Azn6.2, consiguiéndose en este caso incrementos de biomasa de la parte aérea y de la raíz del 29% y 109%, respectivamente (Dary et al., 2010). Este efecto positivo de la co-inoculación se observó también en la nodulación y en el contenido de nitrógeno de las plantas. En este sentido, resulta curioso que la presencia de otras bacterias tenga un efecto positivo sobre el número de nódulos formados y su eficiencia en la fijación de nitrógeno, aunque se han descrito resultados similares en diversas leguminosas (revisado en Morel et al., 2012). Estas bacterias mejoran el crecimiento vegetal mediante diferentes mecanismos, por lo cual se conocen como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, plant growth promoting rhizobacteria) (Gamalero et al., 2009; Glick 2012). Estos mecanismos incluyen: (1) producción de hormonas como ácido abscísico, giberelinas, citoquininas y auxinas, por ejemplo, IAA; (2) producción de enzimas esenciales, por ejemplo, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico deaminasa (ACC-deaminasa), la cual reduce el nivel de etileno, y por tanto el estrés en las raíces de las plantas en desarrollo; (3) fijación de nitrógeno; (4) producción de sideróforos; (5) solubilización y mineralización de nutrientes, particularmente fosfato; (6) mejora de la resistencia al estrés abiótico (Hayat et al., 2010; de Bashan et al., 2012). Estas propiedades se encuentran también en bacterias aisladas de suelos contaminados con metales pesados (Gamalero et al., 2009; Glick, 2010), e incluso se han encontrado algunas que mantienen estas propiedades o incluso las incrementan en presencia de estos elementos (Deshwal y Kumar, 2013; Serrano, 2014).

Respecto a la influencia en la acumulación de metales pesados, nuestros resultados revelan que se produce una disminución de la acumulación de varios metales (Cd, Cu, Pb y Zn) tanto en las raíces como en la parte aérea (Dary et al., 2010). De hecho, es importante destacar que la acumulación en la parte aérea disminuye más que la acumulación en las raíces. Esto lleva a una disminución de los factores de translocación (TF). El TF se define como la relación entre la



concentración de metales pesados en la parte aérea y la concentración en la raíz. En plantas no hiperacumuladoras, como son las leguminosas, este parámetro tiene siempre valores menores que la unidad, ya que las leguminosas acumulan el metal preferentemente en la raíz (Pajuelo et al., 2007; 2011). La inoculación de plantas de *Lupinus luteus* con *Bradyrhizobium* sp. 750 llevó a una disminución de los TFs desde valores de 25% a 40% dependiendo del metal. La co-inoculación con las tres bacterias disminuye aún más la acumulación de metales en tejidos vegetales y los TFs, hasta valores tan bajos como 30-60% (Dary et al., 2010). La inoculación con bacterias rizosféricas tiene un gran efecto sobre la acumulación de metales en las plantas, pudiendo seleccionarse inoculantes que aumenten (Ma et al., 2014) o disminuyan el contenido de metales (Rajkumar et al., 2013). Por lo general, en las leguminosas se ha descrito una disminución de la acumulación de metales pesados tras la inoculación con rizobios, sobre todo en la parte aérea, aunque a veces también en la raíz (Wani et al., 2007; 2008; El Aafi et al., 2012).

Con respecto a los mecanismos implicados en este proceso, las bacterias rizosféricas han adoptado diferentes estrategias de resistencia a los metales pesados, entre las que se encuentran la expulsión de metales por transportadores en la membrana plasmática, complejación, precipitación, metilación, volatilización, etc., (Nies y Silver, 2007; Gadd, 2010). Otro mecanismo pasivo es la adsorción de metales pesados en la superficie de las bacterias, sobre todo Gram negativas, como es el caso de *Pseudomonas* y *Ochrobactrum*. Nuestros resultados indican que esta última bacteria, utilizada en el consorcio bacteriano para la inoculación de plantas de *Lupinus luteus*, es capaz de acumular cadmio hasta  $32.000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de peso seco (Rodríguez-Llorente et al., 2010). De hecho, casi el 90% del metal se halla adsorbido sobre la superficie celular, con sólo una mínima parte acumulado dentro de las células bacterianas (Rodríguez-Llorente et al., 2010). Los metales se unen a diferentes grupos químicos de los componentes celulares, como carboxilos, aminos, sulfonatos, fosfatos, sulfhidrilos, etc. (Volesky, 2007). Se ha comprobado que diferentes microorganismos con diferentes paredes celulares (bacterias, algas y

hongos) pueden adsorber diferentes metales y metaloides en diferentes especies químicas cargadas positiva o negativamente (revisado en Das et al., 2008). Dado que las bacterias rizosféricas pueden formar una importante biopelícula sobre las raíces de las plantas, como consecuencia de los exudados radiculares secretados por las mismas (Dzantor, 2007), los metales pesados pueden quedar adsorbidos sobre la superficie de las bacterias, estando así menos disponibles para ser tomados por las plantas. Además de esta aplicación, la bioadsorción sobre diferentes tipos de biomasa se utiliza ampliamente como una alternativa económica para la eliminación de metales pesados e incluso elementos radioactivos de aguas contaminadas (Das et al., 2008; Macek y Mackova, 2011).

Este aspecto puede tener gran aplicación a la hora de cultivar estas plantas en suelos contaminados, ya que permite obtener plantas más seguras con menores niveles de metales en la parte aérea. En este sentido, se han desarrollado estrategias mediante ingeniería genética para bloquear la entrada del metal o su translocación desde la raíz a la parte aérea. Por ejemplo, la mutación en el transportador de arsenito (NiP) en plantas de arroz permite obtener cultivos más seguros cuando se cultivan en marismas con aguas contaminadas por arsénico (Ma et al., 2008). En este sentido, la inoculación con bacterias PGPR autóctonas y resistentes a metales pesados puede constituir una alternativa más ecológica a los cultivos modificados genéticamente en países en los que no se pueden cultivar transgénicos.

La aplicación de la simbiosis leguminosa-rizobio no se centra sólo en los suelos contaminados por metales pesados, sino que tiene repercusiones en otros tipos de problemas medioambientales que afectan a los suelos (Teng et al., 2015). Por ejemplo, se ha descrito que esta interacción también favorece el establecimiento y el crecimiento de las plantas leguminosas en suelos contaminados con compuestos orgánicos, como pesticidas (Teng et al., 2011), hidrocarburos aromáticos policíclicos (Askary et al., 2013), policlorobifenilos (Xu et al., 2010), etc.

También en suelos salinos, la inoculación con rizobios tolerantes a sal mejora la tolerancia a este estrés (Egamberdieva et al., 2013), así como la inoculación con rizobios y micorrizas seleccionados mejora la adaptación de las leguminosas a pHs alcalinos (Abd-Alla et al., 2014). Del mismo modo, se ha descrito que rizobios tolerantes a las microcistinas producidas por el florecimiento de cianobacterias en aguas, mejoran la nodulación y el crecimiento y reducen el estrés de plantas leguminosas regadas con aguas contaminadas por estas potentes neuro- y hepatotoxinas (Lahrounii et al., 2012; 2013).

Con estos ejemplos queremos significar el gran potencial que tiene esta herramienta para la remediación de suelos con diferentes tipos de problemas medioambientales. Por ello, y sobre todo a nivel de empresas de base tecnológica nacidas en el seno de grupos de investigación, ya se están desarrollando inoculantes de rizobios o consorcios de rizobios y otras bacterias PGPR para mejorar el crecimiento y la fijación de nitrógeno en leguminosas cultivadas en suelos afectados por estos distintos tipos de estrés (revisado en Trivedi et al., 2011 y Bashan et al., 2014). Para ello, los inoculantes bacterianos deben inmovilizarse sobre soportes adecuados que mejoren su estabilidad y supervivencia como carbón activado, carboximetil-celulosa, talco, perlita, vermiculita, etc., (revisado en Bashan et al., 2014). Lo importante de estas formulaciones es que sean estables, fáciles de aplicar, baratas y que se mantenga la viabilidad del inoculante durante largos periodos de almacenamiento e incluso a temperaturas que pueden oscilar entre  $-5$  y  $30^{\circ}\text{C}$  y, finalmente, que sean seguros desde el punto de vista de salud humana, animal y para el medioambiente (Bashan et al., 2014). Una mejor opción es presentar los inoculantes bacterianos atrapados en polímeros como alginato. Este polímero tiene varias ventajas como son la liberación lenta y progresiva del inoculante, y mantener una mayor viabilidad del mismo (hasta tres años), sobre todo cuando se suplementa con nutrientes que aseguren la supervivencia de las bacterias tras la liberación (Trivedy y Pandey, 2008). Cada vez se encuentran más empresas biotecnológicas que producen este tipo de inoculantes. La experiencia

acumulada en experimentos de campo ha llevado a la conclusión de que en estos proyectos es preferible utilizar plantas autóctonas adaptadas a las condiciones particulares de cada sitio y bacterias aisladas de los propios suelos contaminados, que también están adaptadas y son más competitivas en los propios suelos (Vangronsveld et al., 2009). En este sentido, los proyectos de fitorremediación son diseñados "a medida", lo que puede permitir el desarrollo de empresas biotecnológicas que lleven a cabo el diseño y el test de las técnicas de fitorremediación a escala piloto, antes de implantarlas a mayor escala en suelos contaminados (Pajuelo et al., 2014).

## 6. CONCLUSIONES

1. En suelos contaminados por metales pesados se han aislado cepas de *Sinorhizobium medicae* que presentan una elevada capacidad de resistencia a arsénico, pero mantienen sus propiedades simbióticas. Sin embargo, el número de nódulos producidos es menor cuando infectan leguminosas que crecen en suelos contaminados por metales pesados.
2. Las primeras etapas de la nodulación de alfalfa son más sensibles que las correspondientes a la fijación de nitrógeno. Concentraciones de arsenito sódico entre 25 y 35  $\mu\text{M}$  producen una disminución de hasta el 25% en el número total de nódulos debido a una reducción cercana al 90% del número de infecciones por los rizobios. Sin embargo, una vez que la nodulación se ha establecido, el desarrollo nodular parece continuar con normalidad y los nódulos son efectivos, aunque en las plantas crecidas en presencia de arsénico se pudo apreciar una senescencia más temprana.
3. La reducción en el número de infecciones por rizobios pudo deberse probablemente a ciertos efectos en la planta, que incluían necrosis de la raíz, daño en los pelos radicales y una zona infectiva de la raíz más corta.
4. La leguminosa *Lupinus luteus* es una planta adecuada para la estabilización de metales pesados en suelos contaminados cuando la cantidad presente de dichos metales es moderada.
5. Se ha constatado un efecto positivo en la fitoestabilización de metales en suelos contaminados cuando se co-inocula *Bradyrhizobium* junto con otras bacterias PGPR resistentes a metales puesto que, por una parte se incrementa la biomasa vegetal y el nitrógeno fijado, y por otra disminuye la acumulación del metal en la planta, lo que previene el impacto del metal en la cadena trófica.
6. La cepa *Ochrobactrum cytisi* Azn6.2 es adecuada para la eliminación de metales en soluciones acuosas debido a su alta tasa de crecimiento y su gran capacidad de bioadsorción del metal.

7. La bioadsorción y desorción de cadmio por las células de *O. cytisi* Azn6.2 podría constituir un método muy útil para limpiar efluentes contaminados con cadmio y recuperar el metal.
  
8. Se propone la utilización de plantas de *Lupinus luteus* inoculadas con la rizobacteria multirresistente a metales pesados *Serratia* sp. MSMC541 como un método eficaz para la fitoestabilización de metales pesados en suelos contaminados.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abate T., Orr A. 2012. Research and development for tropical legumes: Towards a knowledge-based strategy. *Journal of SAT Agricultural Research*, 10: 1-12.
- Abd-Alla M.H., Morsy F.M., Elsadek El-Enany A.W., Ohyama T. 2012. Isolation and characterization of a heavy-metal-resistant isolate of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* potentially applicable for biosorption of Cd<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup>. *Int. Biodet. Biodegr.*, 67: 48-55.
- Abd-Alla MH, El-Enany AW, Nafady NA, Khalaf DM, Morsy FM. 2014. Synergistic interaction of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and arbuscular mycorrhizal fungi as a plant growth promoting biofertilizers for faba bean (*Vicia faba* L.) in alkaline soil. *Microbiol Res.*, 169:49-58.
- Abhilash, P.C., S. Jamil and N. Singh. 2009. Transgenic plants for enhanced biodegradation and phytoremediation of organic xenobiotics. *Biotechnol. Adv.* 27: 474-488.
- Adamia, G., M. Ghogoberidze, D. Graves, G. Khatishashvili, G. Kvesitadze, E. Lomidze and et al. 2006. Absorption, distribution and transformation of TNT in higher plants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64: 136-145.
- Adriaensen, K., Vralstad, T., Noben, J. P., Vangronsveld, J. & Colpaert, J. V. (2005). Copper-adapted *Suillus luteus*, a symbiotic solution for pines colonizing Cu mine spoils. *Appl Environ Microbiol.*, 71: 7279-7284.
- Ali, M.A., Badruzzaman, A.B.M., Jalil, M.A., Hossain, M.D., Ahmed, M.F., Masud, A.A., Kamruzzaman, M.D. and Rahman, M.A. (2003). Fate of arsenic extracted with groundwater. In: *Fate of arsenic in the environment*. M.F. Ahmed (Ed.), pp. 7-20. Dhaka: ITN Int. Train. Netw.
- Aparicio-Tejo, P.M., Arrese-Igor, C. y Becana, M (1996). En: *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Azcón-Nieto J y Talón M (Eds.). Mc Graw-Hill interamericana. Madrid. ISBN: 84-486-0033-9.
- Arnesano R., Banci, L., Bertini, I., Mangani, S. and Thompsett, A.R. (2003). A redox switch in copC: an intriguing copper trafficking protein that binds copper (I)

- and (II) at different sites. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 100: 3814-3819.
- Askary M., Biegi F., Amini F., Zahedi M. 2013. *Rubinia pseudoacacia-Rhizobium* symbiosis for phytoremediation of petroleum polluted soil. *J. Cell Tissue*, 4: 1-12.
- ATSDR. 2007. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. Reseña Toxicológica del Arsénico. Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Servicio de Salud Pública. doi: [http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es\\_tfacts2.html](http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts2.html)
- Aucott M. 2008. The fate of heavy metals in landfills: A review. *The Tidal Exchange*, 21: 1-2.
- Audet, P. and C. Charest. 2007. Dynamics of arbuscular mycorrhizal symbiosis in heavy metal phytoremediation: Meta-analytical and conceptual perspectives. *Environ. Pollut.* 147(3): 609-614.
- Avis, T.J., V. Gravel, H. Antoun and R.J. Tweddell. 2008. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biol. Biochem.* 40: 1733-1740.
- Bais, H.P., T.L. Weir, L.G. Perry, S. Gilroy and J.M. Vivanco. 2006. The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. *Ann. Rev. Plant Biol.* 57: 233-266.
- Baker, A.J.M. 1981. Accumulators and excluders strategies in the response of plants to heavy metals. *J. Plant. Nutr.* 3 (-4): 643- 654.
- Banerjee, A.D. (2003). Heavy metal levels and solid phase speciation in street dusts of Delhi, India. *Environmental Pollution* 123: 95-105.
- Banerjee S, Datta S, Chattyopadhyay D and Sarkar P (2011) Arsenic accumulating and transforming bacteria isolated from contaminated soil for potential use in bioremediation. *J. Environ. Sci. and Health part A* 46, 1736-1747.
- Banwart, S. (2011) Save our soils. *Nature* 474, 151-152.
- Barac, T., S. Taghavi, B. Borremans, A. Provoost, L. Oeyen, J.V. Colpaert and et al. 2004. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water soluble, volatile, organic pollutants. *Nature Biotechnol.* 22: 583-588.



- Bashan Y., de-Bashan L.E., Prabhu S.R., Hernandez J.P. 2014. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant Soil*, 378: 1-33.
- Basta N.T., McGowen S.L. 2004. Evaluation of chemical immobilization treatments for reducing heavy metal transport in a smelter-contaminated soil. *Environ. Pollut.*, 127: 73-82.
- Bentley R & Chasteen TG (2002) Microbial methylation of metalloids: arsenic, antimony, and bismuth. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 250-271.
- Bento, F.M., F.A. de Oliveira Camargo, B.C. Okeke and W.T. Frankenberger. 2005. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel soil. *Microbiol. Res.* 160:249-255.
- Bernard, R.G. 2005. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiol. Lett.* 251: 1-7.
- Brammer H & Ravenscroft P (2009) Arsenic in groundwater: a threat to sustainable agriculture in South and South-east Asia. *Environ Int* 35, 647-654.
- Branco R, Chung AP & Morais PV (2008) Sequencing and expression of two arsenic resistance operons with different functions in the highly arsenic-resistant strain *Ochrobactrum tritici* SCII24T. *BMC Microbiol* 8, 95.
- Brazier-Hicks, M., K.M. Evans, O.D. Cunningham, D.R. Hodgson, P.G. Steel and R. Edwards. 2008. Catabolism of glutathione conjugates in *Arabidopsis thaliana*. Role in metabolic reactivation of the herbicide safener fenclorim. *J. Biol. Chem.* 283: 21102-21112.
- Brinkel J, Khan MH, Kraemer A. 2009. A systematic review of arsenic exposure and its social and mental health effects with special reference to Bangladesh. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 6:1609-1619.
- Br. Geol. Surv. (BGS/DPHE). (2001). Arsenic contamination of groundwater in Bangladesh. Vol. 1: Summary. Keyworth, UK: Br. Geol. Surv.
- Broer S, Ji G, Broer A & Silver S (1993) Arsenic efflux governed by the arsenic resistance determinant of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *J Bacteriol* 175, 3480-3485.

- Broos, K., M. Uyttendaele, J. Mertens and E. Smolders. 2004. A survey of symbiotic nitrogen fixation by white clover grown on metal contaminated soils. *Soil Biol. Biochem.* 36: 633-640.
- Broos K, Mertens J & Smolders E (2005) Toxicity of heavy metals in soil assessed with various soil microbial and plant growth assays: a comparative study. *Environ Toxicol Chem* 24: 634-640.
- Broos K., Beyens H., Smolders E. (2005). Survival of rhizobia in soil is sensitive to elevated zinc in the absence of the host plant. *Soil Biol. Biochem.*, 37: 573-577.
- Burd, G., Dixon, D.G. and Glick, B. (2000). Plant growth-promoting bacteria that decreases heavy metal toxicity in plants. *Canadian Journal of Microbiology*, 46: 237-245.
- Callahan, D.L., A.J.M. Baker, S.D. Kolev and A.G. Wedd. 2006. Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *J. Biol. Inorg. Chem.* 11: 2-12
- Cánovas D, Duran C, Rodríguez N, Amils R & de Lorenzo V (2003) Testing the limits of biological tolerance to arsenic in a fungus isolated from the River Tinto. *Environ Microbiol* 5, 133-138.
- Carlin A, Shi W, Dey S & Rosen BP (1995) The ars operon of *Escherichia coli* confers arsenical and antimonial resistance. *J Bacteriol* 177, 981-986.
- Carrasco, J.A., Armario, P., Pajuelo, E., Burgos, A., Caviedes, M.A. López, R., Chamber, M.A. and Palomares, A.J. (2005). Isolation and characterisation of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcóllar pyrite mine. *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 1131-1140.
- Cases I & de Lorenzo V (2005) *Genetically modified organisms for the environment: stories of success and failure and what we have learned from them.* *Int Microbiol* 8, 213-222.
- Castro, I.V., E.M. Ferreira and S.P. McGrath. 1997. Effectiveness and genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* isolates in Portuguese soils polluted by industrial effluents. *Soil Biol. Biochem.* 29: 1209-1213.

- Celik I, Gallicchio L, Boyd K, et al. 2008. Arsenic in drinking water and lung cancer: a systematic review. *Environ Res.* 108: 48-55.
- Cervantes C, Ji G, Ramirez JL & Silver S (1994) Resistance to arsenic compounds in microorganisms. *FEMS Microbiol Rev* 15, 355-367.
- Chaintreuil C., Rigault F., Moulin L., Jaffré T., Fardoux J., Giraud E., Dreyfus B., Bailly X. 2007. Nickel resistance determinants in *Bradyrhizobium* strains from nodules of the endemic New Caledonia legume *Serianthes calycina*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 8018-8022.
- Chaudhri, A.M., McGrath, S.P. and Giller, K.E. (1992). Survival of indigenous population of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in soil spiked with Cd, Zn, Cu and Ni salts. *Soil Biol. Biochem.* 24: 625-632.
- Chaudhry, Q., M. Blom-Zandstra, S. Gupta and E.J. Joner. 2005. Utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 12: 34-48.
- Chen, Y.X., Y.P. Wang, Q. Lin and Y.M. Luo. 2005. Effect of copper-tolerant rhizosphere bacteria on mobility of copper ions and copper accumulation by *Elsholtzia splendens*. *Environ. Int.* 31: 861-866.
- Chen B., Roos P., Zhu Y.G. Jakobsen I. 2008. Arbuscular mycorrhiza contribute to phytostabilization of uranium in uranium mining tailings. *J Environ Radioact.*, 99: 801-810.
- Chou CH & De Rosa CT (2003) Case studies--arsenic. *Int J Hyg Environ Health* 206, 381-386.
- Copeland A, Lukas S, Lapidus A, Barri K, Glavina del Río T, Dalin E, Tice H, Pitluck S, Chain P, Malfatti S, Shin M, Verguez L, Schmutz J, Larimer F, Land M, Hauser L, Kyrpides N, Mikhailova N, Reeve W and Richardson P (2007) Complete genome sequence of the *Medicago* microsymbiont *Ensifer* (*Sinorhizobium medicae*) strain WSM419, US DOE Joint Genome Institute, Accession Number CP000740.
- Crinnion, W.J. (2010). The CDC fourth national report on human exposure to environmental chemicals: what it tells us about our toxic burden and how it

- assist environmental medicine physicians. *Alternative Medicine Reviews* 15: 101-109.
- Cunningham SD & Ow DW (1996) Promises and Prospects of Phytoremediation. *Plant Physiol* 110, 715-719.
- Cullen, W.R. and Reimer, K.J. (1989). Arsenic speciation in the environment. *Chem. Rev.* 89: 713-764.
- Dary, M., Chamber-Pérez, M.A., Palomares, A.J. and Pajuelo, E. (2010). In situ phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. *Journal of Hazardous Materials*, 177: 323-330.
- Das, N., Vimala, R. & Karthika, P. (2008) Biosorption of heavy metals - an overview. *Indian J. Biotechnol.* 7: 159- 169.
- De Hoff P & Hirsch AM (2003) Nitrogen comes down to earth: report from the 5th European Nitrogen Fixation Conference. *Mol Plant Microbe Interact* 16, 371-375.
- de Bashan L.E., Hernandez J.P., Bashan Y. 2012. The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation - A comprehensive evaluation. *Appl. Soil Ecol.*, 61: 171- 189.
- de Lorenzo V (2008) Systems biology approaches to bioremediation. *Curr Opin Biotechnol* 19, 579-589.
- Deshwal V.K., Kumar P. 2013. Effect of Heavy metals on Growth and PGPR activity of Pseudomonads. *J. Acad. Ind. Res.*, 2: 286-290.
- Diaz, E. (2004). Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolism versatility. *International Microbiology*, 7: 173-180.
- Doty, S.L., Q.T. Shang, A.M. Wilson, A.L. Moore, L.A. Newman, S.E. Strand and et al. 2003. Metabolism of the soil and ground water contaminants ethylene-dibromide and trichloroethylene by the tropical leguminous tree *Leucaena leucocephala*. *Water Res.* 37: 441-449.
- Doty SL (2008) Enhancing phytoremediation through the use of transgenics and endophytes. *New Phytol* 179, 318-333.

- Drewniak L., Matlakowska R., Sklodowska A. 2008. Arsenite and arsenate metabolism of *Sinorhizobium* sp. M14 living in the extreme environment of the Zloty Stok gold mine. *Geomicrobiol. J.*, 25: 363-370.
- Drewniak L., Sklodowska A. 2013. "Arsenic-transforming microbes and their role in biomining processes," *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 20: 7728-7739.
- Drewniak L., Rajpert L., Mantur A., Sklodowska A. 2014. Dissolution of arsenic minerals mediated by dissimilatory arsenate reducing bacteria: estimation of the physiological potential for arsenic mobilization. *BioMed. Res. Int.*, Vol. 2014, Article ID 841892, 12 pages, doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/841892>
- Duker AA, Carranza EJ & Hale M (2005) Arsenic geochemistry and health. *Environ Int* 31, 631-641.
- Dzantor, E.K., T. Chekol and L.R. Vough. 2000. Feasibility of using forage grasses and legumes for phytoremediation of organic pollutants. *J. Environ. Sci. Health, Part A*. 35: 1645-1661.
- El Aafi, N., Brhada, F., Dary, M., Maltouf, A.F. and Pajuelo, E. (2012) Rhizostabilization of metals in soils using *Lupinus luteus* inoculated with the metal resistant rhizobacterium *Serratia* sp. MSMC54. *International Journal of Phytoremediation*, 14: 261-274.
- Egamberdieva D., Berg G., Lindström K., Räsänen L.A. 2013. Alleviation of salt stress of symbiotic *Galega officinalis* L. (goat's rue) by co-inoculation of *Rhizobium* with root-colonizing *Pseudomonas*. *Plant Soil*, 369: 453-465.
- EPA (1998) Arsenic, inorganic. Integrated risk information system. Environmental protection agency. EE.UU.
- Epelde L, Becerril JM, Alkorta I, Garbisu C. 2014. Adaptive long-term monitoring of soil health in metal phytostabilization: ecological attributes and ecosystem services based on soil microbial parameters. *Int. J. Phytorem.*, 16: 971-981.
- Faramarzi M.A., Stagars M., Pensini E., Krebs W., Brandl H. 2004. Metal solubilization from metal-containing solid materials by cyanogenic *Chromobacterium violaceum*. *J. Biotechnol.*, 113: 321-326.

- Fatnassi I.C., Chiboub M., Saadani O., Jebara M., Jebara S.H. 2015. Phytostabilization of moderate copper contaminated soils using co-inoculation of *Vicia faba* with plant growth promoting bacteria. *J. Basic Microbiol.* 55: 303-311.
- Fisher E, Dawson AM, Polshyna G, Lisak J, Crable B, Perera E, Ranganathan M, Thangavelu M, Basu P & Stolz JF (2008) Transformation of inorganic and organic arsenic by *Alkaliphilus oremlandii* sp. nov. strain OhILAs. *Ann N Y Acad Sci* 1125, 230-241.
- Freeman, J.L., L.H. Zhang, M.A. Marcus, S. Fakra, S.P. McGrath and E.A.H. Pilon-Smits. 2006. Spatial imaging, speciation, and quantification of selenium in the hyperaccumulator plants *Astragalus bisulcatus* and *Stanleya pinnata*. *Plant Physiol.* 142: 124-134.
- Fréot H, Lefèbvre C, Gruber W, Collin C, Dos Santos A and Escarre J (2006) Specific interactions between local metalicolous plants in prove the phytostabilization of mine soils. *Plant soil* 282, 53-65.
- Gadd, G.M. 1999. Fungal production of citric and oxalic acid: importance in metal speciation, physiology and biogeochemical processes. *Adv. Microb. Physiol.*, 41: 47-92.
- Gadd, G.M. 2009. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 84: 13-28.
- Gadd G.M. 2010. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiol.* 156: 609-643.
- Gage DJ (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 280-300.
- Gamalero E., Lingua G., Berta G., Glick B.R. 2009. Beneficial role of plant growth promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on plant responses to heavy metal stress. *Can. J. Microbiol.*, 55: 501-514.

- Gandía-Herrero, F., A. Lorenz, T. Larson, I.A. Graham, J. Bowles, E.L. Rylott and et al. 2008. Detoxification of the explosive 2,4,6- trinitrotoluene in Arabidopsis: discovery of bifunctional O and C-glucosyltransferases. *Plant J.* 56: 963-974.
- Gerhardt, K.E., X.D. Huang, B.R. Glick and B.M. Greenberg. 2009. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: potential and challenges. *Plant Sci.* 176: 20-30.
- Germaine, K.J., X. Liu, G.G. Cabellos, J.P. Hogan, D. Ryan, and D.N. Dowling. 2006. Bacterial endophyte-enhanced phytoremediation of the organochlorine herbicide 2,4- dichlorophenoxyacetic acid. *FEMS Microbiol. Ecol.* 57: 302-310.
- Giller, K.E., Nussbaun, R., Chaudri, A.M. and McGrath, S.P. (1993). *Rhizobium meliloti* is less sensitive to heavy-metal contamination in soil than *R. leguminosarum* bv. *trifolii* or *R. loti*. *Soil Biol. Biochem.* 25: 273-278.
- Glasauer, S., Langley, S. & Beveridge, T.J. 2002. Intracellular iron minerals in a dissimilatory iron-reducing bacterium. *Science* 295: 117-119.
- Glick BR (2003) Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnol Adv* 21, 383-393.
- Göhre, V. and U. Paszkowski. 2006. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta*, 223: 1115-1122.
- Gómez-Sagasti M.T., Marino D. 2105. PGPRs and nitrogen-fixing legumes: a perfect team for efficient Cd phytoremediation? *Front. Plant Sci.*, Vol. 6, Artículo 81.
- Gramham PH and Vance CP (2003) Legumes: importante and constraints to greater use. *Plant Physiol.* 131, 872-877.
- Grimalt JO, Ferrer M & Macpherson E (1999) The mine tailing accident in Aznalcollar. *Sci Total Environ* 242, 3-11.
- Grison C., Jackson S., Merlot S., Dobson A., Grison C. 2015. *Rhizobium metallidurans* sp. nov., a symbiotic heavy metal resistant bacterium isolated from the *Anthyllis vulneraria* Zn-hyperaccumulator. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, doi: 10.1099/ijs.0.000130

Gupta AK, Dwivedi S, Shina S, Tripathi RD, Rai UN, Shing SN (2007) Metal accumulation and growth performance of *Phaseolus vulgaris* grown in fly ash amended soil. *Bioresource technology* 98, 3404-3407.

Gyaneshwar P., Hirsch A.M., Moulin L., Chen W.M., Elliott G.N., Bontemps C., Estrada-de Los Santos P., Gross E., Dos Reis F.B., Sprent J.I., et al. 2011. Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24: 1276-1288.

---

Hall AH (2002) Chronic arsenic poisoning. *Toxicol Lett* 128, 69-72.

Han, J.G., L. Sun, X.Z. Dong, Z.Q. Cai, X.L. Sun, H.L. Yang and et al. 2005. Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain Delftia tsuruhatensis HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. *Sys. Appl. Microbiol.* 28: 66-76.

Hinsinger, P., G.R.Gobran, P.J.Gregory and W.W. Wenzel. 2005. Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New Phytol.* 168: 293-303.

Hirsch P.R., Jones M.J., McGrath S.P., Giller K.E. 1993. Heavy-metals from past applications of sewage-sludge decrease the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *Trifolii* populations. *Soil Biol. Biochem.*, 25(11):1485-1490.

Hoang T. H., Kim J.-Y., Bang S. 2010. Source and fate of As in the environment. *Geosystem Engineer.*, 13: 35-42.

Hockin S., Gadd G.M. 2007. Bioremediation of metals by precipitation and cellular binding. In: *Sulphate-reducing Bacteria: Environmental and Engineered Systems*, pp. 405-434. (Barton L. L., Hamilton W. A., Eds.) Cambridge: Cambridge University Press.

Hodson, M.E. (2010) The need for sustainable soil remediation. *Elements* 6, 363-368.

Huttermann, A. et al. (2009) Application of superabsorbent polymers for improving the ecological chemistry of degraded or polluted lands. *Clean Soil Air Water* 37, 517-526.



- 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.
- Int. Agency Res. Cancer. (2004). IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 84: Some drinking-water disinfectants and contaminants, including arsenic. Vienna: IARC.
- Jackson CR & Dugas SL (2003) Phylogenetic analysis of bacterial and archaeal *arsC* gene sequences suggests an ancient, common origin for arsenate reductase. *BMC Evol Biol* 3, 18.
- Järup L. 2003. Hazards of heavy metal contamination. *Brit. Med. Bull.*, 68: 167-182.
- Jebara S.H., Saadani O., Fatnassi I.C., Chiboub M., Abdelkrim S., Jebara M. 2015. Inoculation of *Lens culinaris* with Pb-resistant bacteria shows potential for phytostabilization. *Environ Sci. Pollut. Res. Int.*, 22: 2537-2545.
- Jeon, C.Y., Calver, A.D., Victor, T.C., Warren, R.M., Shin, S.S. and Murray, M.B. (2011). Use of fluoroquinolone antibiotics leads to tuberculosis treatment delay in a South African gold mining community. *International Journal of Tuberc and Lung Diseases* 15: 77-83.
- Kabata-Pendias, A. and Pendias, H. (1992). Trace elements in soils and plants. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Kalia K, Sharma K, Singh HP & Singh B (2008) Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of *Potentilla atrosanguinea* Lodd. and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC. *J Agric Food Chem* 56, 10129-10134.
- Kalinowski, B.E., Liermann, L.J., Givens, S., Brantley, S.L. 2000. Rates of bacteria-promoted solubilization of Fe from minerals: a review of problems and approaches. *Chem. Geol.*, 169: 357-370.

- Khan, A.G. 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 18: 355-364.
- Khan, A.G. 2006. Mycorrhizoremediation, an enhanced form of phytoremediation. *J. Zhejiang Univ. SCIENCE B*, 7: 503-514.
- Khan MS, Zaidi A, Wani PA, Oves M (2009) Role of plant growth promoting Rhizobacteria in the remediation of heavy metal contaminated soils. *Environ. Chem. Lett.* 7: 1-19.
- Kidd, P.S., A. Prieto-Fernández and C. Monterroso. 2008. Rhizosphere microbial community and hexachlorocyclohexane degradative potential in contrasting plant species. *Plant Soil*, 302: 233-247.
- Kopittke PM, Dart PJ & Menzies NW (2007) Toxic effects of low concentrations of Cu on nodulation of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Environ Pollut* 145, 309-315.
- Korehi H., Blöthe M., Sitnikova M. A., Dold B., Schippers A. 2013. Metal mobilization by iron- and sulfur-oxidizing bacteria in a multiple extreme mine tailings in the Atacama desert, Chile. *Environ. Sci. Technol.*, 47: 2189-2196.
- Kostal J, Yang R, Wu CH, Mulchandani A & Chen W (2004) Enhanced arsenic accumulation in engineered bacterial cells expressing ArsR. *Appl Environ Microbiol* 70, 4582-4587.
- Krämer, U., J.D. Cotter-Howells, J.M. Charnock, A.J.M. Baker and J.A.C. Smith. 1996. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* 379: 635-638.
- Krämer, U. 2010. Metal hyperaccumulation in plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* 61: 517-534.
- Kuiper I, Lagendijk EL, Bloemberg GV & Lugtenberg BJ (2004) Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. *Mol Plant Microbe Interact* 17, 6-15.
- Kumar, A., B.S. Bisht, V.D. Joshi and T.Dhewa . 2011. Review on Bioremediation of Polluted Environment: A Management Tool. *International Journal of Environmental Sciences* 1: 1079-1093.

- Küpper, H., A. Mijovilovich, W. Meyer-Klauck and P.M.H. Kroneck. 2004. Tissue- and age-dependent differences in the complexation of cadmium and zinc in the Cd/Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (Ganges ecotype) revealed by x-ray absorption spectroscopy. *Plant Physiol.* 134: 748-757.
- Kwon S, Thomas J, Reed B, Levine L, Magar VS, Farrar D, Bridges TS, Ghosh U. 2010. Evaluation of sorbent amendments for in situ remediation of metal-contaminated sediments. *Environ Toxicol Chem.*, 29:1883-1892.
- Lafuente A., E. Pajuelo, M.A. Caviedes and I.D. Rodríguez-Llorente. 2010. Reduced nodulation in alfalfa induced by arsenic correlates with altered expression of early nodulins. *J. Plant Physiol.* 167: 286-291.
- Lafuente A (2011) Alteraciones en el transcriptoma de *Medicago* inducidas por arsénico durante la interacción con *Sinorhizobium*. Búsqueda de genes diana para la mejora de la nodulación en presencia del metaloide. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla.
- Lahrouni M., Oufdou K., Faghire M., Peix A., El Khalloufi F., Vasconcelos V., Oudra B. 2012. Cyanobacterial extracts containing microcystins affect the growth, nodulation process and nitrogen uptake of faba bean (*Vicia faba* L., *Fabaceae*). *Ecotoxicol.*, 21: 681-687.
- Lahrouni M., Oufdou K., El Khalloufi F., Baz M., Lafuente A., Dary M., Pajuelo E., Oudra B. 2013. Physiological and biochemical defense reactions of *Vicia faba* L.-*Rhizobium* symbiosis face to chronic exposure to cyanobacterial bloom extract containing microcystins. *Environ Sci Pollut Res Int.*, 20: 5405-5415.
- Lasheen M.R., Ammar N.S. 2015. *Ex situ* remediation technology for heavy metals in contaminated sediment. *Desal. Water Treat*, DOI:10.1080/19443994.2014.979444.
- Lakzian A, Murphy P, Turner A, Beynon JL, Giller KE (2002) *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* populations in soils with increasing heavy metal contamination: abundance, plasmid profiles, diversity and metal tolerance. *Soil Biol. Biochem.* 34, 519-529.

- Lee YK, Chang HH, Lee HJ, Park H, Lee KH & Joe MH (2006) Isolation of a novel plasmid, pNi15, from *Enterobacter* sp. Ni15 containing a nickel resistance gene. *FEMS Microbiol Lett* 257, 177-181.
- Lei, D. and C. Duan. 2008. Restoration potential of pioneer plants growing on lead-zinc mine tailings in Lanping, southwest China. *J. Environ. Sci.* 20: 1202-1209.
- Liste, H.H. and I. Prutz. 2006. Plant performance, dioxygenase-expressing rhizosphere bacteria, and biodegradation of weathered hydrocarbons in contaminated soil. *Chemosphere* 62: 1411-1420.
- Liu, L., C.Y. Jiang, X.Y. Liu, J.F. Wu, J.G. Han and S.J. Liu. 2007. Plant-microbe association for rhizoremediation of chloronitroaromatic pollutants with *Comamonas* sp. strain CNB-1. *Environ. Microbiol.* 9: 465-473.
- Li Y., Richardson J.B., Mark Bricka R., Niu X., Yang H., Li L., Jiménez A. 2009. Leaching of heavy metals from e-waste in simulated landfill columns. *Waste Manag.*, 29: 2147-2150.
- Li Z., Ma Z., Hao X., Rensing C., Wei G. 2014. Genes conferring copper resistance in *Sinorhizobium meliloti* CCNWSX0020 also promote the growth of *Medicago lupulina* in copper-contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 80: 1961-1971.
- Lloret L & Martinez-Romero E (2005) [Evolution and phylogeny of rhizobia]. *Rev Latinoam Microbiol* 47, 43-60.
- López-Bellido L (2006) El papel de las leguminosas en la sostenibilidad de la agricultura mediterránea: ilusión o realidad. En: Nuevos retos y oportunidades de las leguminosas en el sector agroalimentario español. ISBN: CU-240-2006. Cuenca (España). De los mozos MG (Ed.)
- Lloyd, J. R., Macaskie, L.E. 1998. Enzymatic recovery of elemental palladium using sulfate-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4607-4609.
- Lloyd J.R. 2003. Microbial reduction of metals and radionuclides. *FEMS Microbiol. Rev.*, 27: 411-425.
- Ma J.F., Yamaji N., Mitani N., Xu X.Y., Su Y.H., McGrath S.P., Zhao F.J. 2008. Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain. *PNAS*, 105: 9931-9935.

- Ma Y., Rajkumar M., Freitas H. 2009. Isolation and characterization of Ni mobilizing PGPB from serpentine soils and their potential in promoting plant growth and Ni accumulation by *Brassica* spp. *Chemosphere*, 75: 719-725.
- Ma, Y. et al. (2011) Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnol. Adv.* 29, 248-258.
- Ma Y., Rajkumar M., Rocha I., Oliveira R.S., Freitas H. 2014. Serpentine bacteria influence metal translocation and bioconcentration of *Brassica juncea* and *Ricinus communis* grown in multi-metal polluted soils. *Front Plant Sci.*, 5: 757. doi: 10.3389/fpls.2014.00757
- Macek T., Mackova M. 2011. Potential of Biosorption Technology. En: P. Microbial Biosorption of Metals, Kotrba et al. (eds.), Springer Science+Business Media B.V., 7-17.
- Madsen LH, Tirichine L, Jurkiewicz A, Sullivan JT, Heckmann AB, Bek AS, Ronson CW, James EK and Stougaard J (2010) The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. *Nat. Commun* 12, 1-10.
- Mahieu S., Frérot H., Vidal C., Galiana A., Heulin K., Maure L., Brunel B., Lefèbvre C., Escarré J., Cleyet-Marel J.C. 2011. *Anthyllis vulneraria*/*Mesorhizobium metallidurans*, an efficient symbiotic nitrogen fixing association able to grow in mine tailings highly contaminated by Zn, Pb and Cd. *Plant Soil*, 342: 405-417.
- Maldonado-Magaña, A., E. Favela-Torres, F. Rivera-Cabrera and T.L. Volke-Sepulveda. 2011 Lead bioaccumulation in *Acacia farnesiana* and its effect on lipid peroxidation and glutathione production. *Plant Soil* 339: 377-389.
- Malik, A. (2004). Metal biorremediation through growing cells. *Environment International*, 30: 261-278.
- Mandal SM, Pati BR, Das AK and Ghosh AK (2008) Characterization of a symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic: isolated from the root of *Vigna mungo* (L.) Hepper grown in an arsenic-contaminated field. *J.Gen. App Microbiol.* 54, 93-99

- Mandal SM, Gouri SS, De D, Das BK, Mondal KC and Pati BR (2011) Effect of arsenic on nodulation and nitrogen fixation of blackgram (*Vigna mungo*). *Indian J. Microbiol.* 51, 44-47.
- Mandal A, Purakayastha TJ, Patra AK and Sanyal SK (2012) Phytoremediation of arsenic contaminated soil by *Pteris vittata* L. II. effect on arsenic uptake and rice yield *Int. J. Phytoremediation* 14, 621-628.
- Mari, S., D. Gendre, K. Pianelli, L. Ouerdane, R. Lobinski, J.F. Briat, M. Lebrun and P. Czernic. 2006. Root-to-shoot long-distance circulation of nicotianamine and nicotianamine-nickel chelates in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *J. Exp. Bot.* 57: 4111-4122.
- Matlakowska R., Włodarczyk A., Słomińska B., Skłodowska A. 2014. Extracellular elements-mobilizing compounds produced by consortium of indigenous bacteria isolated from kupferschiefer black shale - implication for metals biorecovery from neutral and alkaline polymetallic ores. *Physicochem. Probl. Miner. Process.* 50: 87-96.
- Mateos LM, Ordonez E, Letek M & Gil JA (2006) *Corynebacterium glutamicum* as a model bacterium for the bioremediation of arsenic. *Int Microbiol* 9, 207-215.
- McIlveen WD & Negusanti JJ (1994) Nickel in the terrestrial environment. *Sci Total Environ* 148, 109-138.
- Meagher RB & Heaton AC (2005) Strategies for the engineered phytoremediation of toxic element pollution: mercury and arsenic. *J Ind Microbiol Biotechnol* 32, 502-513.
- Mendez, M.O., Glenn, E.P., Maier, R.M. (2007). Phytostabilization potential of quailbush for mine tailings: growth, metal accumulation, and microbial community changes. *J Environ Qual.* 36: 245-253.
- Mendez MO and Maier RM (2008) Phytostabilization of mine tailings in arid and semiarid environments--an emerging remediation technology. *Environ Health Perspect* 116, 278-283.
- Milton AH & Rahman M (2002) Respiratory effects and arsenic contaminated well water in Bangladesh. *Int J Environ Health Res* 12, 175-179.

- Miyata N., Tani Y., Sakata M. & Iwahori K. 2007. Microbial manganese oxide formation and interaction with toxic metal ions. *J. Biosci. Bioeng.*, 104: 1-8.
- Mohammed A.S., Kapri A., Goel R. 2011. Heavy Metal Pollution: Source, Impact, and Remedies. En "Biomangement of Metal-Contaminated Soils", *Environmental Pollution*, Vol. 20, pp. 1-28. doi: 10.1007/978-94-007-1914-9\_1
- Mondal P, Majumder CB & Mohanty B (2008) Growth of three bacteria in arsenic solution and their application for arsenic removal from wastewater. *J Basic Microbiol* 48, 521-525.
- Morel M.A., Braña V., Castro-Sowinski S. 2012. Legume crops, importance and use of bacterial inoculation to increase production. En "Crop Plant" (A. Goyal, ed.), INTECH Editorial, pp. 217-240.
- Moreno-Jiménez, E., J.M. Peñalosa, R. Manzano, R.O. Carpena-Ruiz, R. Gamarra and E. Esteban. 2009. Heavy metals distribution in soils surrounding an abandoned mine in NW Madrid (Spain) and their transference to wild flora. *J. Haz. Mat.* 162: 854-859.
- Moreno-Jiménez E, Esteban E, Carpena-Ruíz RO, Lobo MC and Peñalosa JM (2012) Phytostabilisation with mediterranean shrubs and liming improved soil quality in a pot experiment with a pyrite mine soil. *J. Hazardous Materials* 201, 52-59.
- Nies DH (2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 27, 313-339.
- Nies DH and Silver S (2007) *Molecular microbiology of heavy metals*. ISBN: 1862-5576. Springer-Verlag. New York.
- O'Day P.A., Vlassopoulos D. 2010. Mineral-Based Amendments for Remediation. *Elements*, 6: 375-381.
- Oldroyd GE & Downie JA (2008) Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol* 59, 519-546.
- Oremland RS & Stolz JF (2003) The ecology of arsenic. *Science* 300, 939-944.
- Ortega-Villasante C, Rellan-Alvarez R, Del Campo FF, Carpena-Ruiz RO & Hernandez LE (2005) Cellular damage induced by cadmium and mercury in *Medicago sativa*. *J Exp Bot* 56, 2239-2251.

- Pagliano C, Raviolo M, Dalla Vecchia F, Gabbrielli R, Gonnelli C, Rascio N, Barbato R & La Rocca N (2006) Evidence for PSII donor-side damage and photoinhibition induced by cadmium treatment on rice (*Oryza sativa* L.). *J Photochem Photobiol B* 84, 70-78.
- Pajuelo, E, Carrasco J.A., Romero, L.C., Chamber, M.A. and Gotor, C. 2007. Evaluation of the metal phytoextraction potential of crop legumes. Regulation of the expression of *O*-acetylserine- (thyl)-lyase under metal stress. *Plant Biol.* 9: 672-681.
- Pajuelo E, Rodriguez-Llorente ID, Dary M & Palomares AJ (2008) Toxic effects of arsenic on Sinorhizobium-Medicago sativa symbiotic interaction. *Environ Pollut* 154, 203-211.
- Pajuelo E, Rodríguez-Llorente ID, Lafuente A and Caviedes MA (2011) Legume-rhizobium symbioses as a tool for bioremediation of heavy metals polluted soils. In: *Biomangement of Metal- contaminated Solis*. Khan MS, Zaidi A, Goel R, Musarrat J (Eds.). *Environmental pollution* 20 pp 95-123.
- Pastor J., Hernández A.J., Prieto N., Fernández-Pascual M. 2003. Accumulating behaviour of *Lupinus albus* L. growing in a normal and a decalcified calcic luvisol polluted with Zn. *J Plant Physiol.*, 160: 1457-1465.
- Patel PC, Goulhen F, Boothman C, Gault AG, Charnock JM, Kalia K & Lloyd JR (2007) Arsenate detoxification in a Pseudomonad hypertolerant to arsenic. *Arch Microbiol* 187, 171-183.
- Peng J.F., Song Y.H., Yuan P., Cui X.Y., Qiu G.L. 2009. The remediation of heavy metals contaminated sediment. *J. Haz. Mat.*, 161: 633-640.
- Pilon-Smits, E.A.H. (2005). Phytoremediation. *Annual Review Plant Biology.* 56: 15-39.
- Pilon-Smits, E.A.H. and C.F. Quinn. Selenium metabolism in plants. pp.225-241. In: R.Hell and R.R. Mendel [eds.] 2010. *Cell Biology of Metals and Nutrients* Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- Power, B., X. Liu, K.J. Germaine, D. Ryan, D. Braziland and D.N. Dowling. 2011. Alginate beads as a storage, delivery and containment system for genetically



- modified PCB degrader and PCB biosensor derivatives of *Pseudomonas fluorescens* F113. *J. Appl. Microbiol.* 110: 1351-1358.
- Prasad, M.N.V. 2011. A State-of-the-Art report on Bioremediation: its Applications to Contaminated Sites in India. Published by the Ministry of Environment and Forest, Government of India. India.
- Quartacci MF, Cosi E & Navari-Izzo F (2001) Lipids and NADPH-dependent superoxide production in plasma membrane vesicles from roots of wheat grown under copper deficiency or excess. *J Exp Bot* 52, 77-84.
- Quiñones M.A., Ruiz-Díez B., Fajardo S., López-Berdonces M.A., Higuera P.L., Fernández-Pascual M. 2013. *Lupinus albus* plants acquire mercury tolerance when inoculated with a Hg-resistant *Bradyrhizobium* strain. *Plant Physiol. Biochem.*, 73: 168-175.
- Rajkumar M., Ma Y., Freitas H. 2013. Improvement of Ni phytostabilization by inoculation of Ni resistant *Bacillus megaterium* SR28C. *J. Environ. Manag.*, 128: 973-980.
- Rascio N, Navari-Izzo F (2011) Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Sci.* 180, 169-181.
- Read, D.B., A.G. Bengough, P.J. Gregory, J.W. Crawford, D. Robinson, C.M. Scrimgeour and et al. 2003. Plant roots release phospholipids surfactants that modify the physical and chemical properties of soil. *New Phytol.* 157:315-326.
- Reichman, S. 2007. The potential use of the legume-*rhizobium* symbiosis for the remediation of arsenic contaminated sites. *Soil Biol. Biochem.*, 39: 2587-2593.
- Requena N, Pérez-Solís E, Azcon-Aguilar C, Jeffries P and Barea JM (2002) Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 495-498.
- Riojas-Rodriguez H, Schilman A, Marron-Mares AT, Maser O, Li Z, Romanoff L, Sjödin A, Rojas-Bracho L, Needham LL, Romieu I. (2011). Impact of the improved patsari biomass stove on urinary polycyclic aromatic hydrocarbon biomarkers and carbon monoxide exposures in rural Mexican women. *Environ Health Perspect.* 119:1301-1307.

- Rivas R., García-Fraile P., Velázquez E. 2009. Taxonomy of bacteria nodulating legumes. *Microbiology Insights*, 2: 51-69.
- Rosen BP (2002) Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Lett* 529, 86-92.
- Rubio-Sanz L., Prieto R.I. Imperial J., Palacios J.M., Brito B. 2013. Functional and expression analysis of the metal-inducible *dmeRF* system from *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*. *Appl Environ Microbiol.*, 79: 6414-6422.
- Sánchez-Andrea, I., Rodríguez, N., Amils, R. and Sanz, J.L. (2011). Microbial diversity in anaerobic sediments at Rio Tinto, a naturally acidic environment with a high heavy metal content. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 6085-6093.
- Sanderman, H. 1994. Higher plant metabolism of xenobiotics: the 'green liver' concept. *Pharmacogenetics* 4: 225-41.
- Sá-Pereira P, Rodrigues M, Videira e Castro I, Simoes F ( 2007) Identification of an arsenic resistance mechanism in rhizobial strains. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 1351-1356.
- Sá-Pereira P., Rodrigues M., Simões F., Domingues L., Videira e Castro I. 2009. Bacterial activity in heavy metals polluted soils: metal efflux systems in native rhizobial strains. *Geomicrobiol. J.*, 26: 281-288.
- Sarma, H. 2011. Metal Hyperaccumulation in Plants: A Review Focusing on Phytoremediation Technology. *J. Environ. Sci. Technol.* 4: 118-138.
- Sharma P., Pandey S. 2014. Status of phytoremediation in world scenario. *Int. J. Environ. Biorem. Biodegr.* 2(4): 178-191.
- Sgherri C, Cosi E & Navari-Izzo F (2003) Phenols and antioxidative status of *Raphanus sativus* grown in copper excess. *Physiol Plant* 118, 21-28.
- Shaw, L.J. and R.G. Burns. 2004. Enhanced mineralization of [U14-C] 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid in the soil from the rhizosphere of *Trifolium pratense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 4766-4774.
- Sheng, X.F. and J.J. Xia. 2006. Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium resistant bacteria. *Chemosphere*, 64: 1036-1042.

- Shröder, P. and Collins, C.D. (Eds.). 2011. *Organic xenobiotics and plants: from mode of action to ecophysiology*. Plant Ecophysiology 8. Springer Verlag. New York and Business Media B.V.
- Shukla, K.P., S. Sharma, N.K. Singh, V. Singh, K. Tiwari and S. Singh. 2011. Nature and role of root exudates: Efficacy in bioremediation. *African J. Biotechnol.* 10: 9717-9724.
- Silver, S. and Phung, L.T. (2005). *Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 599-608.
- Siminszky, B. 2006. Plant cytochrome P450-mediated herbicide metabolism. *Phytochem. Rev.* 5: 445-458.
- Singh OV, Labana S, Pandey G, Budhiraja R and Jain RK (2003) Phytoremediation: and overview of metallic-decontamination from soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 405-412.
- Smith A.H., Lingas E.O., Rahman M. 2000. Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency. *Bulletin of the World Health Organization*, 2000, 78 (9): 1093-1103.
- Sriprang R, Hayashi M, Yamashita M, Ono H, Saeki K & Murooka Y (2002) A novel bioremediation system for heavy metals using the symbiosis between leguminous plant and genetically engineered rhizobia. *J Biotechnol* 99, 279-293.
- Sriprang R, Hayashi M, Ono H, Takagi M, Hirata K and Murooka Y (2003) Enhanced accumulation of Cd<sup>2+</sup> by *Mesorhizobium* transformed with a gene for phytochelatin synthase from *Arabidopsis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1791-1796.
- Srivastava, M., L.Q. Ma and N. Singh. 2005. Antioxidant responses of hyperaccumulator and sensitive fern species to arsenic. *J. Exp. Bot.* 56: 1335-1342.
- Stacey G, Libault M, Brechenmacher L, Wan J & May GD (2006) *Genetics and*
- Takeuchi M, Kawahata H, Gupta LP, Kita N, Morishita Y, Ono Y & Komai T (2007) Arsenic resistance and removal by marine and non-marine bacteria. *J Biotechnol* 127, 434-442.

- Taylor, M.P. and Schniering, C. (2010). The public minimization of the risks associated with environmental lead exposure and elevated blood lead levels in children. Mount Isa, Queensland, Australia. *Archives Environmental Occupational Health* 65: 45-48.
- Teng Y., Shen Y., Luo Y., Sun X., Sun M., Fu D., Li Z., Christie P. 2011. Influence of *Rhizobium meliloti* on phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by alfalfa in an aged contaminated soil. *J. Haz. Mat.*, 186: 1271-1276.
- Teng Y., Wang X., Li L., Li Z., Luo Y. 2015. Rhizobia and their bio-partners as novel drivers for functional remediation in contaminated soils. *Front Plant Sci.*, 2015; 6: 32.
- Thomas DJ, Li J, Waters SB, Xing W, Adair BM, Drobna Z, Devesa V & Styblo M (2007) Arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase and the methylation of arsenicals. *Exp Biol Med (Maywood)* 232, 3-13.
- Tomczyk-Żak K., Kaczanowski S., Drewniak Ł., Dmoch Ł., Skłodowska A., Zielenkiewicz U. 2013. Bacteria diversity and arsenic mobilization in rock biofilm from an ancient gold and arsenic mine. *Sci. Total Environ.*, 461-462: 330-340.
- Trivedi P., Pandey A. 2008. Recovery of plant growth promoting rhizobacteria from sodium alginate beads after three years following storage at 4°C. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 35: 205-209.
- Trivedi P., Pandey A., Palni L.M.S. 2012. Bacterial inoculants for field applications under mountain ecosystem: Present initiatives and future prospects. In "Bacteria in agrobiolgy: Plant probiotics", D.K. Maheshwari (ed.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012, pp. 15-44.
- Valls M, de Lorenzo V, Gonzalez-Duarte R & Atrian S (2000) Engineering outer-membrane proteins in *Pseudomonas putida* for enhanced heavy-metal bioadsorption. *J Inorg Biochem* 79, 219-223.
- Valls, M. and de Lorenzo, V. (2002). Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiology Reviews*, 26: 327-338.

- Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., Thewys, T., Vassilev, A., Meers, E., Nehneva-jova, E., Van der Lelie, D., and Mench, M. 2009. Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 16: 765-794.
- van Herwijnen R., Hutchings T.R., Al-Tabbaa A., Moffat A.J., Johns M.L., Ouki S.K.: 2007. Remediation of metal contaminated soil with mineral-amended composts. *Environ. Pollut.*, 3: 347-354.
- Vázquez S, Agha R, Granado A, Sarro MJ, Esteban E, Peñalosa JM and Carpena RO (2006) Use of white lupin plant for phytostabilization of Cd and As pollute acid soil. *Water air soil pollut* 177, 349-365.
- Verbruggen, N., C. Hermans and H. Schat. 2009. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytol.* 181: 759-776.
- Vidal C, Chantreuil C, Berge O, Mauré L, Escarré J, Béna G, Brunel B, Cleyet-Marel JC. 2009. *Mesorhizobium metallidurans* sp. nov., a metal-resistant symbiont of *Anthyllis vulneraria* growing on metalicolous soil in Languedoc, France. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59:850-855.
- Volesky B. 2007. Biosorption and me. *Water Res.*, 41: 4017-4029.
- Voloudakis, A.E., Reignier, T.M. and Cooksey, D.A. (2005). Regulation of resistance to copper in *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 782-789.
- Wang S.H., Zhang H., Zhang Q., Jin G.M., Jiang S.J., Jiang D., He Q.Y., Li Z.P. 2011. Copper-induced oxidative stress and responses of the antioxidant system in roots of *Medicago sativa*. *J. Agron. Crop Sci.*, 197: 418-429.
- Wani PA, Khan MS & Zaidi A (2007a) Effect of metal tolerant plant growth promoting Bradyrhizobium sp. (vigna) on growth, symbiosis, seed yield and metal uptake by greengram plants. *Chemosphere* 70, 36-45.
- Wani PA, Khan MS & Zaidi A (2007b) Impact of heavy metal toxicity on plant growth, symbiosis, seed yeald and nitrogen and metal uptake in chickpea. *Aust. J. Exp. Agric.* 47, 712-720.

- Wani PA, Khan MS and Zaidi A (2008) Effect of heavy metals toxicity on growth, symbioses seed yield and metal uptake in pea grown in metal amended soil. *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 81, 152-158.
- Wani, P.A., Khan, M.S., Zaidi, A. 2008. Chromium-reducing and plant growth-promoting *Mesorhizobium* improves chickpea growth in chromium-amended soil. *Biotechnol. Lett.* 30: 159-163.
- Wani PA, Zaidi A and Khan MS (2009) Chromium reducing and plant growth promoting potential of *Mesorhizobium* species under chromium stress. *Biorem. J.* 13, 121-129.
- Watanabe T & Osaki M (2002) Role of organic acids in aluminum accumulation and plant growth in *Melastoma malabathricum*. *Tree Physiol* 22, 785-792.
- Wenzel, W.W. 2009. Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Plant Soil* 321: 385-408.
- Whiting, S.N., De Souza, M. and N. Terry. 2001. Rhizosphere bacteria mobilize Zn for hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Environ. Sci. Technol.* 35: 3144-3150.
- Wuana R.A., Okieimen F.E. 2011. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *ISRN Ecol.*, vol. 2011, Article ID 402647, 20 pages.
- Xu L., Teng Y., Li Z.G., Norton J.M., Luo Y.M. 2010. Enhanced removal of polychlorinated biphenyls from alfalfa rhizosphere soil in a field study: the impact of a rhizobial inoculum. *Sci. Total Environ.* 408: 1007-1013.
- Yang, Z.Y., J.G. Yuan, G.R. Xin, H.T. Chang and M.H. Wong. 1997. Germination, growth and nodulation of *Sesbania rostrata* grown in Pb/Zn mine tailings. *Environ. Manage.* 21: 617-622.
- Yang HC, Cheng J, Finan TM, Rosen BP & Bhattacharjee H (2005) Novel pathway for arsenic detoxification in the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 187, 6991-6997.
- Yoon, J.M., B. Van Aken and J.L. Schnoor. 2006. Leaching of contaminated leaves following uptake and phytoremediation of RDX, HMX, and TNT by poplar. *Int. J. Phytorem.* 8: 81-94.

- Zaidi S., Usmani S. Q., Singh B. R., Musarrat J. 2006. Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ-101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*. *Chemosphere*, 64: 991-997.
- Zhang, Q., L.C. Davis and L.E. Erickson. 2000. An experimental study of phytoremediation of methyl-tert-butyl ether (MTBE) in ground water. *J. Haz. Subs. Res.* 2: 4.1-4.19.
- Zhao, F.J., McGrath, S.P. and Meharg, A.A. (2010). Arsenic as a food chain contaminant: mechanisms of plant uptake and metabolism and mitigation strategies. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61: 535-559.
- Zhuang X., Chen J., Shim H., Bai Z. 2007. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environ. Int.*, 33: 406-413.
- Zribi K., Nouairi I., Slama I., Talbi-Zribi O., Mhadhbi H. 2014. *Medicago sativa*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis promotes the bioaccumulation of zinc in nodulated roots. *Int. J. Phytorem.*, 17: 49-55.