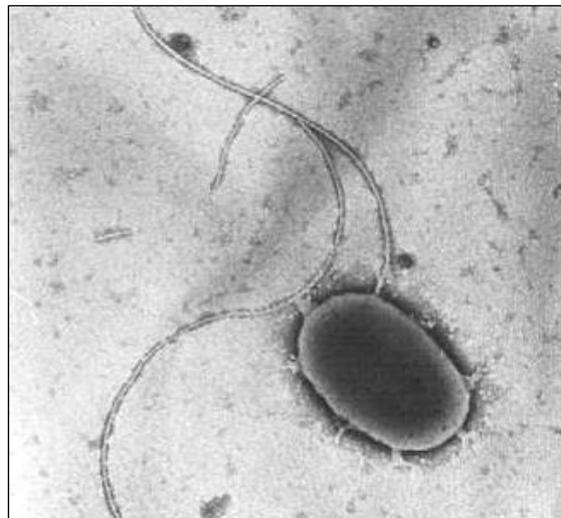
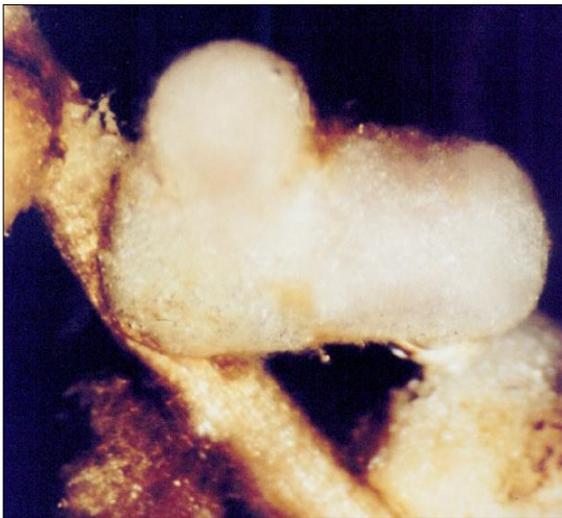


Proyecto fin de Máster Microbiología

(Itinerario Ambiental)

Universidad Autónoma de Madrid

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE RHIZOBIA DE
LEGUMINOSAS CRECIDAS EN SUELOS CONTAMINADOS CON
MERCURIO PARA SU USO EN BIORREMEDIACIÓN**



Lourdes Aguado Culebras

Supervisada por la Dra. Mercedes Fernández-Pascual

Instituto de Ciencias Agrarias, ICA-CSIC

Madrid, Septiembre 2013

Proyecto fin de Máster Microbiología

(Itinerario Ambiental)

Universidad Autónoma de Madrid

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE RHIZOBIA DE
LEGUMINOSAS CRECIDAS EN SUELOS CONTAMINADOS CON
MERCURIO PARA SU USO EN BIORREMEDIACIÓN**

Lourdes Aguado Culebras

Supervisada por la Dra. Mercedes Fernández-Pascual

Instituto de Ciencias Agrarias, ICA-CSIC

Madrid, Septiembre 2013

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que me han ayudado durante estos meses en la realización de este trabajo, en especial a mi directora de tesis Dra. Mercedes Fernández-Pascual por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo y sobre todo por la disposición de ayuda que me ha mostrado en todo momento.

También agradezco a Dra. Beatriz Ruiz-Díez por haberme inculcado sus buenas prácticas y gran parte de los conocimientos que he adquirido durante la realización de este trabajo. A Susana Fajardo, por su paciencia y dedicación a nivel experimental y a Dr. Miguel Ángel Quiñones y Miguel Angel López por su ayuda durante la recogida de muestras y el análisis de las mismas.

Por último, a mis compañeros de laboratorio por haber sido un apoyo fundamental durante estos meses y en general a todo el Grupo de Interacciones Beneficiosas Planta-Microorganismo del ICA-CSIC.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1. Fijación biológica de nitrógeno	2
2. Interacción <i>Rhizobium</i> -leguminosa	3
3. Fisiología del nódulo	5
4. Aplicación de la simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa en restauración de suelos y fitorremediación	6
OBJETIVOS	7
MATERIAL Y MÉTODOS	8
1. Recogida de muestras	8
2. Aislamiento de rhizobia	8
3. Caracterización fenotípica	9
3.1. Velocidad y curvas de crecimiento	9
3.2. Resistencia a la salinidad	10
3.3. Rango de temperatura	10
3.4. Rango de pH	10
3.5. Tolerancia al mercurio	10
4. Caracterización genética	11
4.1. Aislamiento del DNA genómico total	11
4.2. Amplificación por PCR	11
4.3. Análisis de restricción del DNA ribosómico amplificado por PCR (ARDRA)	12
4.4. Secuenciación del DNA ribosómico 16S	12
4.5. Análisis de las secuencias de DNA	12

RESULTADOS	13
1. Análisis de las zonas de estudio de la Huerta del Rey	13
2. Aislamiento de rizobia de nódulos de leguminosas de la Huerta del Rey	14
3. Caracterización fenotípica	15
3.1. Velocidad y curvas de crecimiento	16
3.2. Rango de temperatura	16
3.3. Resistencia a la salinidad	16
3.4. Rango de pH	16
4. Caracterización genética	17
4.1. Extracción de DNA	17
4.2. Análisis de restricción del DNA ribosómico amplificado por PCR (ARDRA)	18
4.3. Análisis de la secuencia del gen 16S rRNA	19
5. Análisis de tolerancia al Hg	22
5.1. Evaluación de la sensibilidad al Hg	22
5.2. Dinámica del crecimiento bacteriano durante la incubación con Hg	23
DISCUSIÓN	25
CONCLUSIONES	29
BIBLIOGRAFÍA	30
ANEXO	32

RESUMEN

Las leguminosas establecen una relación simbiótica con bacterias del suelo de diferentes géneros de la familia Rhizobiaceae. Gracias a esta asociación, estas plantas obtienen nitrógeno directamente de la atmósfera y esta fijación de nitrógeno tiene un efecto positivo sobre la fertilidad del suelo. La fijación del nitrógeno se lleva a cabo en unos órganos denominados nódulos que se forman por la entrada de los rizobios en las raíces de las leguminosas.

Actualmente se están estudiando las posibilidades de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa como una nueva herramienta en la fitorremediación de suelos contaminados por metales pesados.

En este trabajo se aíslan y estudian rizobios simbioses de leguminosas crecidas en suelos contaminados con altas concentraciones de mercurio (Almadén, Ciudad Real) con el objetivo de conseguir una colección de rizobios adaptados a las condiciones ambientales de dicha región y que podrían ser usados como inoculantes de leguminosas con fines de biorremediación. Se han aislado y caracterizado 14 cepas de rizobios de un total de 11 especies de leguminosas de los géneros *Medicago*, *Trifolium*, *Vicia*, *Lupinus*, *Retama*, *Phaseolus* y *Colutea*. La caracterización fenotípica se establece en base a pruebas de velocidad de crecimiento, salinidad, pH y temperatura. Además, como parte de la caracterización fenotípica, en base al crecimiento *in vitro* en medio suplementado con mercurio, se clasifican las cepas en tres grupos de tolerancia: tolerantes, intermedias y sensibles. Se determina la concentración mínima inhibitoria (CMI) para cada cepa y se realizan las curvas dosis-respuesta mostrando que 12 cepas son tolerantes al mercurio.

Los análisis genéticos del gen 16S rRNA dan lugar a tres patrones ARDRA diferentes y la posterior secuenciación directa muestran, que de 14 cepas, 9 de ellas corresponden a *Rhizobium leguminosarum*, 3 a *Ensifer medicae* y 2 a *Bradyrhizobium canariense*.

Finalmente, en base a su alta tolerancia al mercurio y su respuesta en cuanto al crecimiento, se proponen a las cepas TG-7H1 y Co-7HPT1 para usar como inoculantes con fines de restauración de suelos contaminados con mercurio.

INTRODUCCIÓN

Los efectos derivados de la contaminación del suelo recaen principalmente en la calidad del agua y en el medio ambiente, lo que provoca un serio riesgo para la salud humana. Uno de los mayores problemas que afecta a los ecosistemas terrestres es la contaminación por metales pesados. Este es el caso de la zona de Almadén, Ciudad Real (Figura 1), donde durante siglos hubo una explotación minera de cinabrio para la producción de mercurio, lo cual ha causado la dispersión de este metal, convirtiéndose en una de las zonas más contaminadas por Hg a nivel mundial (Molina et al., 2006).



Figura 1. Áreas de Almadén (Ciudad Real) donde se ha realizado el presente estudio. A) Huerta del Rey, Almadén, zona 1. B) Huerta del Rey, Almadén, zona 2.

La toxicidad y distribución de mercurio se ha estudiado en las plantas y en el suelo en la zona de Almadén (Molina et al., 2006), pero hasta el momento actual se conoce poco acerca de cómo afecta la contaminación por Hg a la diversidad de los microorganismos del suelo, lo cuales son esenciales para llevar a cabo los ciclos biogeoquímicos de los elementos más importantes. Dentro de los microorganismos del suelo son especialmente relevantes, en el ciclo del nitrógeno, los microorganismos simbiotes fijadores de N_2 . En este sentido se han descrito algunas cepas de rizobios tolerantes o sensibles a Hg, procedentes de la zona de Almadén (Ruiz-Díez et al., 2012b; Nonnoi et al., 2012)

1. Fijación biológica de nitrógeno

El nitrógeno es un elemento que a pesar de ser mayoritario en la atmósfera, es uno de los principales factores limitantes para el desarrollo de las plantas, ya que en su forma molecular no es asimilable por los seres vivos sino que para ser incorporado tiene que estar en moléculas combinadas como el nitrato o el amonio. Una práctica común en los sistemas agrarios es la adición al suelo de fertilizantes nitrogenados para conseguir un aumento en la productividad agrícola. Esta práctica, además del elevado coste económico, también provoca la acumulación de compuestos nitrogenados tóxicos en el medio ambiente, lo que supone una amenaza para la salud humana. Por ello, se ha propuesto la Fijación Biológica de N_2 como una alternativa natural y eficiente a los fertilizantes nitrogenados.

La Fijación Biológica de N_2 la llevan a cabo organismos procariontes, que son capaces, en vida libre o asociados de forma simbiótica con determinadas plantas, de reducir el nitrógeno molecular a amoniaco. Una de las asociaciones simbióticas más estudiadas y más importantes a nivel agronómico es la establecida entre diferentes géneros bacterianos de la familia Rhizobiaceae (Holt et al., 1994) y plantas de la familia Leguminosae. La familia Rhizobiaceae está constituida por bacterias del suelo con forma de bacilos móviles, Gram negativos, aerobios, con presencia de flagelos y sin endosporas.

La aplicación de métodos de taxonomía molecular ha revelado la existencia de una gran diversidad de simbioses rizobianas. Dentro de estos métodos, se estudia en primer lugar el gen 16S rRNA (16S RNA ribosómico) que codifica para la subunidad pequeña del ribosoma bacteriano. Este gen está muy conservado en todas las bacterias y permite la adscripción a los diferentes géneros e incluso a la especie concreta.

Los seis géneros más importantes dentro de esta familia que forman simbiosis con leguminosas son: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* (anteriormente *Sinorhizobium*), *Alorhizobium* y *Azorhizobium*; coloquialmente denominados rizobios. Dentro de estos géneros, *Rhizobium* presenta un crecimiento rápido y los genes relacionados con la fijación de N_2 se encuentran en plásmidos. Por el contrario, el género *Bradyrhizobium*, presenta un crecimiento lento y los genes relacionados con la fijación son cromosómicos. El resto de los géneros muestran características intermedias entre los dos primeros géneros.

2. Interacción *Rhizobium*-leguminosa

La interacción entre la planta y la bacteria (*Rhizobium*-leguminosa) se basa en el establecimiento de la simbiosis entre ambos, donde el simbionte vegetal es quien regula el proceso y los rizobios reconocen de forma específica la leguminosa huésped. En esta simbiosis, las plantas reciben el nitrógeno fijado por los rizobios y estos reciben los carbohidratos generados por la planta durante la fotosíntesis, así como un entorno favorable para la fijación de nitrógeno, mediante la formación de un nuevo órgano: el nódulo. La Figura 2 muestra diferentes leguminosas noduladas.



Figura 2. A) y B) Planta nodulada de *Lupinus albus*. C) Nódulos de *Trifolium repens*

Para la formación de este nuevo órgano, ocurre un intercambio de señales químicas entre la planta y la bacteria, conocido como diálogo molecular, durante el cual la planta excreta exudados radicales que contienen azúcares, aminoácidos y compuestos flavonoides, siendo estos últimos los que inducen la transcripción de los genes *nod* necesarios para la nodulación (Sánchez et al., 1991). El gen *nodD* es el regulador de la transcripción de los genes *nod* y los compuestos flavonoides excretados por la planta activan la proteína NodD que es la encargada de inducir la transcripción de los genes de nodulación *nodABC* y de mediar la síntesis de todos los factores Nod (Phillips et al., 1995).

Aunque existen otras formas de entrada del rizobio en la raíz de la leguminosa (González-Sama et al., 2004), la más común es a través de los pelos radiculares. Una vez que se ha establecido el reconocimiento químico entre la planta y el rizobio se produce una curvatura y desorganización del citoesqueleto en el ápice del pelo radicular donde se ha producido este reconocimiento (Figura 3). En la curvatura queda atrapado el rizobio. A continuación se forma el canal de infección por donde avanzan las bacterias. Cuando el canal llega a la raíz se produce una modificación hormonal y se reproducen las células del córtex. El canal de infección se bifurca y penetra en las células en división, (Cabezas de Herrera y Fernández-Pascual, 1982). Las células del córtex se diferencian y comienzan a sufrir divisiones que darán lugar al primordio nodular, que al desarrollarse constituirá el nódulo. Recientemente se ha comprobado que también se dividen los rizobios (Fedorova et al., 2007).

Las bacterias se liberan al citoplasma celular vegetal por endocitosis a través de una estructura característica denominada gota de infección. A partir de este momento las bacterias se transforman en bacteroides. Finalmente, se rodean del fluido peribacteroidal y de la membrana peribacteroidal, dando lugar al simbiosoma, que es la unidad fijadora de nitrógeno. A través de la membrana peribacteroidal se realiza el intercambio de nutrientes entre los dos simbiosomas (De María et al., 2007).

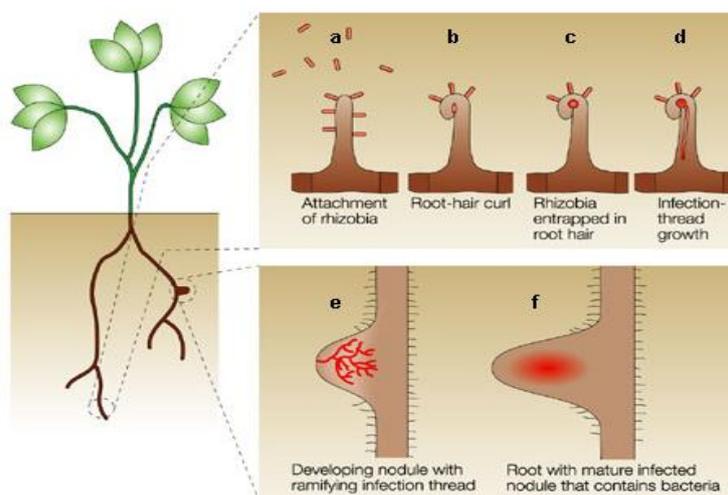


Figura 3. Esquema de la formación del nódulo en leguminosas. A) Adhesión de los rizobios al pelo radicular. B) Enrollamiento del ápice del pelo radicular. C) Inducción de la formación del canal de infección. D) Canal de infección formado. E) Infección de los espacios intercelulares de la raíz e inducción de la formación del nódulo. F) Nódulo formado. (Gage et al., 1996)

A partir de este momento, el nódulo es efectivo, es decir, es capaz de fijar nitrógeno molecular mediante la activación de los genes *nif* que codifican para la enzima nitrogenasa que reduce el nitrógeno molecular a amonio.

El amonio puede ser asimilado por las células vegetales en forma de amidas o de ureidos, según el tipo de nódulo vía GS/GOGAT. Los rizobios reciben los sustratos producidos por la planta mediante la fotosíntesis a través de los haces vasculares.

El llamado ciclo GS/GOGAT es el ciclo por el cual el nitrógeno reducido se asimila en una reacción catalizada por las enzimas glutamina sintetasa y glutamato sintasa. En un primer paso, se forma glutamina a partir de amonio y glutamato y en el segundo, de glutamina y cetoglutarato dos moléculas de glutamato. De ellas, una se utiliza para incorporar amonio, cerrando el ciclo, y la otra es transferida al xilema para su utilización por la planta, como amidas (asparagina y glutamina) o ureidos (alantoína y ácido alantoico).

3. Fisiología del nódulo

Una vez que la bacteria se diferencia a bacteroide en el interior de las células del nódulo, se crea un ambiente microaerobio (Soupène et al., 1995) óptimo para el funcionamiento de la enzima nitrogenasa. Esta enzima consta de dos proteínas: el componente I y II. El componente I denominado molibdoferredoxina (MoFe) está codificado por los genes *nifD* y *nifK* y usando los electrones donados por el componente II, reduce el nitrógeno molecular a amoníaco. El componente II es una proteína de hierro Fe, es el encargado de la donación de los electrones y está codificada por los genes *nifH*.

Además, se han identificado otras proteínas denominadas nodulinas que son sintetizadas por el hospedador y sólo aparecen en el nódulo. Las nodulinas contribuyen a la morfogénesis, desarrollo y funciones simbióticas del nódulo. La aparición de algunas de estas nodulinas es muy precoz y parece ser dependientes de la presencia de fitohormonas.

La fijación de N_2 es un proceso que conlleva un gasto energético muy elevado por lo que se necesita un sistema de obtención de ATP muy eficiente, como la fosforilación oxidativa. Mediante la respiración bacteroidal se consigue el ATP necesario para la reducción de nitrógeno a amonio. Debido a que la enzima nitrogenasa es muy lábil en presencia de O_2 , existen una serie de mecanismos que consiguen crear un ambiente microaerobio para que el O_2 no llegue a inactivar a la nitrogenasa (Becana y Rodríguez-Barrueco, 1989). Estos mecanismos son: una barrera de resistencia a la difusión de O_2 , una elevada tasa de respiración bacteroidal y un transportador específico de alta afinidad por el O_2 , la leghemoglobina.

La barrera de resistencia a la difusión del O₂ está compuesta por hasta 4 capas compactas de células en la corteza media. En función de las necesidades del nódulo, se secreta más o menos material glicoproteico mediante el cual se sellan los espacios intracelulares evitando la entrada de O₂ (De Lorenzo et al., 1993). Una vez que el O₂ ha entrado en la corteza, la leghemoglobina se encarga del transporte de O₂ a los bacteroides y controla la concentración de O₂ libre (Bergersen 1982). La leghemoglobina constituye el 25% del contenido proteico total y confiere el color rojo de los nódulos maduros.

Con estos mecanismos, los rizobios obtienen el O₂ necesario para conseguir altas cantidades de ATP sin que el O₂ entre en contacto con la enzima nitrogenasa pudiéndose reducir el nitrógeno molecular a amonio.

4. Aplicación de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa en restauración de suelos y fitorremediación.

Las leguminosas han demostrado su eficacia en la restauración de suelos por su función fertilizadora natural y su supervivencia a condiciones ambientales extremas por lo que pueden ser consideradas como pioneras (Fernández-Pascual et al., 2007). La restauración del suelo con leguminosas bajo condiciones ambientales limitantes requiere no sólo la selección de los rizobios compatibles sino que también estos rizobios sean capaces de resistir el agente estresante, que en este caso es la concentración de mercurio en el suelo. Una vez seleccionados los rizobios tolerantes, la explotación de los mismos como inoculantes podría ser usada como un método natural de detoxificación de suelos contaminados con mercurio.

La fitorremediación es una de las ramas de la biorremediación que utiliza plantas y microorganismos asociados a su raíz para remover, transformar o acumular sustancias contaminantes localizadas en suelos, sedimentos, acuíferos y cuerpos de agua.

En el caso del mercurio, se ha encontrado que la fitorremediación desarrollada por la simbiosis rizobio-leguminosa se produce mediante fitoestabilización (Quiñones et al., 2013). En este proceso, las plantas absorben el metal por sus raíces y lo retienen de manera que el Hg no queda biodisponible, no se transloca a la parte aérea y por lo tanto no se introduce en la cadena trófica. Considerando este hecho, y el importante papel en el suelo de la simbiosis rizobio-leguminosa, es importante estudiar en profundidad la abundancia, diversidad, y actividad de los rizobios autóctonos tolerantes a altas concentraciones de mercurio.

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo ha sido aislar y caracterizar rizobios asociados a leguminosas crecidas en suelos contaminados con mercurio en el área de Almadén. En concreto se ha estudiado la zona de la Huerta del Rey que estuvo dentro del centro metalúrgico de la mina de Almadén. Esta zona se caracteriza por tener una contaminación media-baja de Hg, en comparación con otros estudios realizados anteriormente en esta área. Esta zona ha tenido un uso agrícola y actualmente se dedica al pastoreo.

La caracterización genética de las cepas aisladas, se ha realizado examinando el gen 16S rRNA por análisis de restricción (ARDRA) combinando distintas enzimas endonucleasas de restricción y finalmente analizando las secuencias de dicho gen. La caracterización fenotípica incluye el análisis de su tolerancia al Hg así como la velocidad de crecimiento, la resistencia a altas temperaturas, pH extremos y salinidad. A partir de la caracterización genotípica y fenotípica, se seleccionarán aquellos aislados más eficientes y competitivos para ser usados en fitorremediación.

Los objetivos concretos son:

- 1) Aislamiento de rizobios a partir de nódulos de leguminosas crecidas en suelos contaminados con mercurio del área de Almadén, Ciudad Real.
- 2) Caracterización fenotípica.
 - a. Determinar la velocidad de crecimiento y analizar la resistencia a la salinidad, y pH extremos así como el rango de temperatura.
 - b. Estudiar la tolerancia al mercurio de los rizobios aislados.
- 3) Caracterización genotípica.
 - a. Identificar por métodos moleculares la diversidad de rizobios
 - b. Elaborar una base de datos de patrones de restricción del 16S rDNA y compararlos con patrones de datos existentes.
 - c. Secuenciar e identificar las secuencias del gen 16S rRNA por comparación con secuencias ya publicadas.
 - d. Analizar la diversidad de rizobios en suelos contaminados y no contaminados con Hg.
- 4) Seleccionar los rizobios más tolerantes a la contaminación de mercurio para rizerremediación.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Recogida de muestras

Se han recogido leguminosas noduladas de dos zonas de la Huerta del Rey, que corresponden a un centro metalúrgico situado en la ladera norte de la mina de cinabrio de Almadén. Las dos zonas se diferencian en cuanto al contenido de mercurio (Tabla 1). También se recogieron muestras de suelo para su análisis. Por cada punto de muestreo se toma un cilindro de suelo de 5x20cm en las proximidades de las especies de leguminosas presentes. En este cilindro quedan representadas las capas de humus y mineral del suelo. La determinación del pH y contenido en materia orgánica, carbono, carbonatos, Ca, K, Mg, Na, Cd, Cu, Zn así como la conductividad eléctrica (Tabla 1), se realizó en el Servicio de Análisis del Instituto de Ciencias Agrarias, siguiendo los Métodos Oficiales de Análisis, 1986.

La determinación de mercurio se llevó a cabo utilizando un analizador de mercurio LUMEX RA-915 en el Departamento de Ingeniería Geológica y Minera de la Escuela Universitaria Politécnica de Almadén (Universidad de Castilla La Mancha, Ciudad Real).

2. Aislamiento de rizobia

El aislamiento de rizobios se realizó a partir de leguminosas crecidas en la zona contaminada y a partir de plantas trampa, con objeto de conseguir mayor diversidad de rizobios de la zona a estudiar. Para las plantas trampa, los suelos recogidos de la zona anteriormente indicada se mezclan con vermiculita en proporción 1:1 y se colocan en macetas de 1L. Se siembran las semillas de diferentes leguminosas que no habían sido encontradas en la zona de estudio (Figura 5). Las semillas se esterilizan superficialmente sumergiéndolas en HgCl_2 al 1% (p/v) durante 5 minutos. A continuación se lavan con agua destilada estéril (5 lavados de 2 minutos cada uno).



Figura 5. Plantas trampa crecidas en invernadero.

Las leguminosas herbáceas se cultivaron durante un mes en invernadero y las leguminosas arbustivas durante dos meses y medio, regándose cada 48h con agua estéril.

La esterilización superficial de los nódulos se llevó a cabo sumergiendo los nódulos primero en agua corriente para eliminar todos los restos de suelo. A continuación se pasan a etanol al 96% durante 30 segundos, se realiza un lavado rápido con agua destilada estéril y se sumergen en HgCl₂ al 0,1% (p/v) durante 45 segundos seguido de varios lavados con agua destilada estéril. De esta forma se consigue eliminar toda la flora microbiana superficial.

Una vez los nódulos están estériles, se procede de dos formas para asegurar el crecimiento bacteriano. En el primer caso se realiza un corte con bisturí para acceder a la zona central del nódulo y con el asa de siembra se transfieren las bacterias a una placa con medio sólido que contiene manitol como fuente de carbono (Vincent 1970). En el segundo caso se homogeneizan en un mortero estéril y se transfiere una alícuota a una placa con el mismo medio. Las placas se cultivan a 28°C hasta la aparición de colonias.

Las colonias aisladas se obtienen por agotamiento de asa de siembra. Para estudiar la morfología de las bacterias se hacen frotis sobre portas y se examinan al microscopio óptico, previa tinción de Gram. A partir de las colonias aisladas se realizan cultivos líquidos y sólidos y se cultivan a 28°C. Una alícuota del cultivo se guarda en glicerol al 20% a una temperatura de -80°C para su conservación a largo plazo.

Rizobios aislados y caracterizados en estudios realizados previamente, se han usado como cepas de referencia (Tabla 2). Se han utilizado cepas de áreas del centro de España, como es el caso de ALF-2 o Co-1 pertenecientes a La Finca Experimental La Higuera-CSIC y Navamorcuende (Toledo), respectivamente (Ruiz-Díez et al., 2009 y 2012a). También se emplean cepas de rizobios aislados de zonas de Almadén con mayor contaminación por mercurio como L-7AH, J-7AH, J-7QC (Ruiz-Díez et al., 2012b) y R-7Q2 (Guerrouj et al., 2013).

3. Caracterización fenotípica

3.1. Velocidad y curvas de crecimiento

En la primera etapa de caracterización se evalúa el crecimiento a 28°C, sembrando a partir de una única colonia en medio Vincent sólido. Las cepas de rizobio se clasifican, de forma muy general y para facilitar el manejo, en cepas de crecimiento lento, medio y rápido.

Se realizan curvas de crecimiento durante 2-3 días para rizobios de crecimiento rápido y hasta 8 días para los rizobios de crecimiento lento. El crecimiento bacteriano se determina con el espectrofotómetro (BECKMAN, DU640) midiendo la densidad óptica de los cultivos a una absorbancia de 680 nm.

3.2. Resistencia a la salinidad

Se crecen los rizobios en tubos con 5ml de Vincent líquido con concentraciones crecientes de NaCl (0, 0,5, 1, 1,5, 2%) y por triplicado. En cada caso se evalúa el crecimiento a 28°C y 100rpm durante 10 días consecutivos midiendo la absorbancia a 680nm al décimo día.

3.3. Rango de temperatura

Se crecen las bacterias en placas de Vincent a 37°C y 40°C por duplicado y aquellos que sobreviven a estas temperaturas serán incubados a 45°C. Las placas se incuban un máximo de 10 días a la temperatura de selección. El objetivo es estudiar la tolerancia a altas temperaturas.

3.4. Rango de pH

El rango de pH del crecimiento de los aislados se mide en base al crecimiento en medio líquido Vincent, el cual se lleva a un pH de 4,5 tamponando con ácido 2,2-dimetilsuccínico 30mM y a pH 9 tamponando con 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (Trizma base) 50mM. Las cepas se crecen durante 10 días en un agitador orbital a 100rpm y a una temperatura constante de 28°C. Por último, la turbidez se mide con el espectrofotómetro a A= 680nm al décimo día.

3.5. Tolerancia al mercurio

La tolerancia al mercurio se determina por macrodilución en medio líquido Vincent suplementado con HgCl₂. La solución madre del HgCl₂ (HgCl₂ analysis grade ACS, Merck) se diluye a una concentración de 1mg/ml (10 veces la concentración más alta de trabajo) con agua destilada y se esteriliza por filtración (filtro de membrana 0,22µm Millex-GV PVDF, Millipore).

El experimento se realiza en tubos de ensayo Kimax con capacidad para 25ml. A estos tubos se les añaden 5ml de medio Vincent al que se le añaden concentraciones crecientes de HgCl₂ haciendo diluciones seriadas 1:10 a partir de la solución madre hasta alcanzar concentraciones finales de 0, 3, 6, 12,5, 25 y 30µM. A continuación se añaden 50µl del preinóculo de bacteria (cultivo en fase logarítmica), consiguiendo una densidad final de 10⁶ células/ml. Siempre se incluye un control de esterilidad y un control de crecimiento sin metal.

El experimento se incuba durante 7 días en un agitador orbital a 100rpm y 28°C. No se detecta volatilización de mercurio ni ningún tipo de adsorción del metal en la superficie de vidrio de los tubos en estas condiciones experimentales.

Se realiza un seguimiento del crecimiento de los cultivos cada 24 horas. Para ello se toman medidas de absorbancia con el espectrofotómetro a una absorbancia de 680nm de cada una de las tres réplicas de cada cepa. La fase logarítmica se determina en base a las curvas de crecimiento de cada cepa cuando tienen un tiempo de duplicación constante.

La CMI se define como la concentración más baja de metal que inhibe por completo el crecimiento bacteriano en el punto medio de la fase logarítmica. El experimento se realiza con tres réplicas para cada concentración de Hg con cada una de las cepas.

4. Caracterización genética

4.1. Aislamiento del DNA genómico total

El protocolo a seguir para el aislamiento del DNA genómico total comienza inoculando una colonia aislada del cultivo puro original en medio líquido Vincent. Se incuba a 28°C y 100rpm hasta llevar al cultivo a la saturación y posteriormente se lavan las células dos veces con el tampón estéril PBS para eliminar el polisacárido. A continuación se aísla el DNA genómico usando el kit "UltraClean TM Microbial DNA isolation" (MOBIO).

Mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% usando como tampón TAE (0,1M Tris-HCl, 12,5mM acetato sódico, 1mM EDTA), se realizan diluciones seriadas del fago lambda (500ng/μl) y de la muestra problema y se compara su intensidad de fluorescencia a la luz UV tras teñir el gel de agarosa durante 5 minutos con una solución de bromuro de etidio (1μg/ml). Los geles se fotografían con una cámara Kodak EDAS 290. Para conocer la concentración de DNA genómico, también se usa el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

Este DNA genómico fue el que se usó para todos los análisis genéticos que se realizan posteriormente.

4.2. Amplificación por PCR

El 16S rDNA ha sido amplificado por PCR siguiendo el proceso descrito previamente por Laguerre et al., (1994) con algunas modificaciones. Los primers usados han sido fd1 y rP2 (Weisburg et al., 1991) sintetizados por Genotek (España). La PCR fue realizada para un volumen final de 100μl.

Las concentraciones finales de los reactivos son: 200μM de cada nucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP); MgCl₂ 2mM; KCl 50mM; Tris-HCl (pH 8) 15mM; 0,5μM de cada oligonucleótido; 5 Unidades de enzima *Taq* polimerasa (Applied Biosystems) y 50-100ng de DNA genómico.

La amplificación se realiza en un termociclador (Veriti, Applied Biosystems). Las condiciones de PCR son: una desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, seguida de 35 ciclos de desnaturalización (95°C, 1 min), acoplamiento (55°C, 1 min) y extensión (72°C, 2 min), más una extensión final de 10 min a 72°C. Los amplificadores se analizan por electroforesis en geles de agarosa al 1% (Sambrook et al., 1989).

4.3. Análisis de restricción del DNA ribosómico amplificado por PCR (ARDRA)

Las endonucleasas de restricción *MspI*, *HinfI*, *DdeI* y *HhaI* se emplean en reacciones de digestión independientes con 15µl de cada uno de los amplificadores a 37°C de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (New England Biolabs). Las muestras digeridas se separan por electroforesis con una mezcla de agarosa MS-4 al 3% más agarosa D-1 low EEOO (ambos de Pronadisa) en tampón 1x TAE durante 5h a 40V. Las bandas con pesos menores a 50pb se descartan y no se tienen en cuenta en el análisis ARDRA.

4.4. Secuenciación del DNA ribosómico 16S

Las casi 1500 pb del DNA ribosómico 16S amplificado por PCR de los aislados seleccionados se purifican con el kit EZNA CYCLE-PURE (Omega) y posteriormente se mide su concentración con el espectrofotómetro NanoDrop 1000.

Las secuencias de los productos de PCR se obtienen usando el equipo ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems) que emplea el sistema de ciclo de terminación *Taq* dydeoxi con la química (Big Dye Terminator V3.1). La secuenciación se realizó en el Servicio de Secuenciación Automática (SECUGEN) del CIB, CSIC, Madrid, España. Las reacciones de secuencia se realizan usando como primers 1050R, 800R, 800F y IRF1 (Lane 1991), lo que permite determinar la secuencia del amplificado casi en su totalidad.

4.5. Análisis de las secuencias de DNA

El análisis de las secuencias de cada aislado se determinó alineando las secuencias por parejas empleando el Clustal W program (<http://www.ebi.ac.uk/>). Para comprobar las similitudes entre las secuencias, se compararon usando el programa BLASTN del GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Además, se calculó la similitud de cada cepa con su cepa más próxima del GenBank y con la cepa tipo de esa misma especie rizobiana lo cual queda resumido en la Tabla 4. Estas identidades se obtienen gracias al programa Clustal W multiple alignments (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/>).

RESULTADOS

1. Análisis de las zonas de estudio de la Huerta del Rey.

La zona de la Huerta del Rey se ha dedicado desde el siglo XVII al cultivo de frutas y hortalizas, aunque actualmente es una zona de paso de ganado. Relacionado con la actividad minera de la zona, a escasos metros del área estudiada, se encontraba una antigua escombrera de estériles (resto del mineral que se desecha una vez que se ha extraído el mercurio).

Las dos zonas elegidas difieren en cuanto al contenido de Hg (Tabla 1). Además en esta Tabla se muestran las características físico-químicas del suelo. Los valores de Hg medidos en la zona 1 y la zona 2 son, respectivamente, 567 mg kg⁻¹ suelo y 871 mg kg⁻¹ suelo, que corresponden a un contenido medio-bajo y medio, respectivamente. No se observan grandes diferencias en los resultados del análisis de suelo entre una zona y otra, exceptuando la cantidad de nitrato que es considerablemente mayor en la zona 1. El contenido en materia orgánica es alto al igual que el contenido en K, en contraste con la cantidad de carbonatos que es nula. Por otro lado nos encontramos en una zona que presenta un pH neutro que oscila entre 6,32 y 6,60.

Tabla 1. Características físico-químicas de los suelos de la zona de Huerta del Rey (Almadén, Ciudad Real) usados para el aislamiento de *Rhizobium* sp. a partir de nódulos de leguminosas.

Coordenadas	Zona 1		Zona 2	
	38°46.644'N	4°50.83'E	38°46.65'N	4°50.85'E
pH (H ₂ O)	6,32		6,60	
Materia Orgánica (g kg ⁻¹)	10,86		10,86	
C total (g kg ⁻¹)	6,28		6,28	
CO ₃ ²⁻ (g kg ⁻¹)	0		0	
Ca (mg kg ⁻¹)	2313		2553	
K (mg kg ⁻¹)	401		425	
Mg (mg kg ⁻¹)	302		386	
Na (mg kg ⁻¹)	18		20	
Hg (mg kg ⁻¹)	567		871	
Cd (mg kg ⁻¹)	0,55		0,85	
Cu (mg kg ⁻¹)	25,1		32,2	
Zn (mg kg ⁻¹)	62,5		76,0	
NO ₃ (mg kg ⁻¹)	42		3,9	
PO ₄ (mg kg ⁻¹)	11,6		25,1	
Cl ⁻ (mg kg ⁻¹)	24,4		31	
C.E. (μS cm ⁻¹)	226		219	

2. Aislamiento de rizobia de nódulos de leguminosas de la Huerta del Rey

Siguiendo la metodología descrita anteriormente, se aislaron 14 cepas de rizobios de un total de once especies de leguminosas (Tabla 2). En concreto, 7 cepas fueron aisladas de la zona 1 de Huerta del Rey y otras 7 cepas de la zona 2. Las cepas se nombran con las iniciales de la planta de la que proceden y el número de zona general de la que se aisló (7, Almadén), siguiendo la nomenclatura de la colección de microorganismos fijadores de nitrógeno del Instituto de Ciencias Agrarias. Las leguminosas traídas directamente de la Huerta del Rey fueron *Trifolium repens*, *Trifolium glomeratum*, *Medicago polymorpha* y *Medicago orbicularis*. Con el suelo recogido de las dos zonas de Huerta del Rey se pusieron plantas trampa de *Colutea arborescens*, *Trifolium subterraneum*, *Vicia sativa*, *Medicago sativa*, *Retama sphaerocarpa*, *Phaseolus vulgaris* y *Lupinus albus*.

Tabla 2. Cepas aisladas a partir de nódulos de plantas y suelos recogidos del suelo de Huerta del Rey (Almadén, Ciudad Real) y rizobios usados como control durante el estudio. Su origen geográfico, huésped original y caracterización genética basada en el gen 16S rRNA.

Cepas	Origen geográfico	Hospedador original	Caracterización genética ARDRA ^a				
			Patrones				Genotipo
			MspI	HinfI	DdeI	HhaI	
Co-7HPT1 ^c	Huerta del Rey 1/ 38°46.644' N 4°50.83'E	<i>Colutea arborescens</i>	1	1	1	1	1
Co-7HPT2	Huerta del Rey 2/ 38°46.65'N 4°50.85'E	<i>C. arborescens</i>	1	1	1	1	1
TS-7HPT1	Huerta del Rey 1	<i>Trifolium subterraneum</i>	1	1	1	1	1
TR-7H1	Huerta del Rey 1	<i>Trifolium repens</i>	1	1	1	1	1
TG-7H1	Huerta del Rey 1	<i>Trifolium glomeratum</i>	1	1	1	1	1
TR-7H2	Huerta del Rey 2	<i>T. repens</i>	1	1	1	1	1
V-7HPT1	Huerta del Rey 1	<i>Vicia sativa</i>	1	1	1	1	1
V-7HPT2	Huerta del Rey 2	<i>V. sativa</i>	1	1	1	1	1
MP-7H1	Huerta del Rey 1	<i>Medicago polymorpha</i>	2	2	1	1	2
ALF-7HPT2	Huerta del Rey 2	<i>Medicago sativa</i>	2	2	1	1	2
MO-7H2	Huerta del Rey 2	<i>Medicago orbicularis</i>	2	2	1	1	2
R-7HPT2	Huerta del Rey 2	<i>Retama sphaerocarpa</i>	3	3	2	2	3
J-7HPT1	Huerta del Rey 1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	1	1	1	1	1
L-7HPT2	Huerta del Rey 2	<i>Lupinus albus</i>	3	3	2	2	3

Cepas de referencia							
<i>Bradyrhizobium retamae</i> R-7Q2	San Quintín/ 38° 49.15'N 4° 16.31'O	<i>R. sphaerocarpa</i>	3	3	2	2	3
<i>Bradyrhizobium canariense</i> L-7AH	Almadenejos Hornos/ 38,1° 44.3'N 4° 42.5'O	<i>L. albus</i>	3	3	2	2	3
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> CECT^b 4116	EE.UU	<i>T. repens</i>	1	1	1	1	1
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i> GH-1	Navarmorcuende/ 40°4'N 4°50'W	<i>Pisum sativum</i>	4	1	3	3	4
<i>Mesorhizobium huakuii</i> Co-1	Navarmorcuende/ 40°4'N 4°50'W	<i>C. arborescens</i>	5	4	1	1	5
<i>Ensifer medicae</i> J-7AH/J-7QC	Almadenejos Hornos/San Quintín	<i>P. vulgaris</i>	2	2	1	1	2
<i>E. meliloti</i> ALF-2	Higueruela/ 40° 5'N 4° 25' W	<i>M. sativa</i>	2	2	1	1	2

^a Los cuatro números han sido asignados para representar los patrones obtenidos con las enzimas de restricción *MspI*, *HinfI*, *DdeI* y *HhaI*, respectivamente. Los números del genotipo han sido asignados para representar los grupos diferentes de ARDRA.

^b CECT Colección Española de Cultivos Tipo.

^c PT: Aislado de planta trampa.

3. Caracterización fenotípica

Las colonias crecidas en medio Vincent con agar son brillantes con aspecto pegajoso, translúcidas y circulares con márgenes suavizados (Figura 6). Tras observar las células al microscopio óptico, previa tinción de Gram, todas las cepas resultaron ser bacilos Gram negativos.

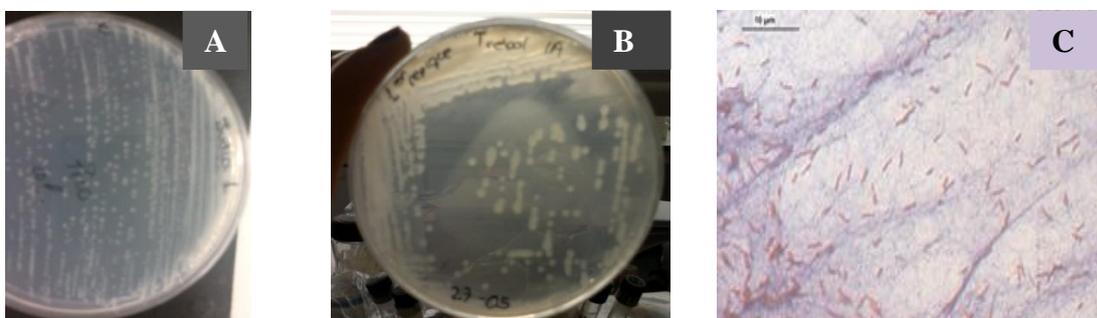


Figura 6. Colonias de rizobios aisladas en medio Vincent a partir de nódulos de plantas recogidas del suelo de Huerta del Rey. A) Siembra en placa a partir del interior del nódulo. B) Siembra en placa por agotamiento de asa. C) Resultado de tinción de Gram.

3.1. Velocidad y curvas de crecimiento

Las curvas de crecimiento en medio líquido Vincent se muestran en el estudio del efecto del Hg sobre el crecimiento de las bacterias (Figura 11). La mayoría de los aislados se clasificaron como de rápido crecimiento alcanzando la fase exponencial entre las primeras 24-48h y un diámetro mayor a 2 mm después de 5 días de su cultivo en placa. Dos aislados se identificaron como de crecimiento lento (R-7HPT2, L-7HPT2) ya que alcanzaban la fase exponencial entre las primeras 72-96h y las colonias tenían un diámetro menor a 1mm después de 7 días de cultivo en placa.

3.2. Rango de temperatura

El efecto de la temperatura, salinidad y pH se muestra en la Tabla 3. En cuanto a la temperatura, la mayoría de los aislados no crecieron a una temperatura mayor de 28°C, coincidiendo con la cepa de referencia *Bradyrhizobium canariense* L-3. Las cepas TS-7HPT1, MP-7H1, MO-7H2 y ALF-7HPT2 crecieron hasta los 37°C al igual que la cepa de referencia *Rhizobium etli* CECT 4651. Ninguno creció cuando se cultivaron en las placas a 40°C.

3.3. Resistencia a la salinidad

En cuanto a la tolerancia a la sal, la mayoría de los aislados no mostraron crecimiento al 0,5% NaCl, coincidiendo con las cepas de referencia *B. canariense* L-3 y *R. etli* CECT 4651 (Tabla 3).

La cepa L-7HPT2 se mostró capaz de crecer un 76% respecto al control al 0,5% de NaCl. Las cepas MP-7H1, ALF-7HPT2 MO-7H2, crecieron hasta el 2% de NaCl, aunque los porcentajes de crecimiento con respecto al control fueron inferiores al 30% en el caso de MP-7H1 y ALF-7HPT2. Finalmente, MO-7H2 mostró los valores más altos de tolerancia, creciendo en un 50% respecto al control al ser expuesto a una salinidad del 2%. Las cepas de referencia no crecieron a ninguna de estas concentraciones.

3.4. Rango de pH

En cuanto a las pruebas realizadas de crecimiento a distintos pH, todos los aislados crecieron a pH 7, ya que es el pH óptimo de crecimiento de los rizobios (Tabla 3). Además, todos excepto tres aislados (Co-7HPT1, R-7HPT2 y L-7HPT2), fueron capaces de crecer a pH básico (pH 9), coincidiendo con las cepas de referencia *B. canariense* L-3 y *R. etli* CECT 4651 y no hubo ningún aislado que creciera a pH ácido (pH 4,5) en contraste con la cepa de referencia *B. canariense* L-3.

Tabla 3. Efecto de las altas temperaturas, concentración de sal y pH extremos en el crecimiento de rizobios procedentes de nódulos de leguminosas recogidas en Huerta del Rey.

Cepas	Rango de temperatura (°C)	Tolerancia a Sal ^a (NaCl%)					Rango de pH (4,5-9)
		0,1	0,5	1	1,5	2	
Co-7HPT1	28	+++	-	-	-	-	7
Co-7HPT2	28	+++	-	-	-	-	7-9
TS-7HPT1	28-37	+++	-	-	-	-	7-9
TR-7H1	28	+++	-	-	-	-	7-9
MP-7H1	28-37	+++	++	++	+	+	7-9
TR-7H2	28	+++	-	-	-	-	7-9
V-7HPT1	28	+++	-	-	-	-	7-9
V-7HPT2	28	+++	-	-	-	-	7-9
TG-7H1	28	+++	-	-	-	-	7-9
MO-7H2	28-37	+++	++	++	++	++	7-9
ALF-7HPT2	28-37	+++	++	++	+	+	7-9
R-7HPT2	28	+++	-	-	-	-	7
L-7HPT2	28	+++	++	-	-	-	7
J-7HPT1	28	+++	-	-	-	-	7-9
Cepas de referencia							
<i>Bradyrhizobium canariense</i> L-3	28	+++	-	-	-	-	4.5-9
<i>Rhizobium etli</i> CECT 4651	28-37	+++	-	-	-	-	7-9

^a El crecimiento se representa como -, no crecimiento; + crecimiento medio (10-30% comparado con el control, en medio Vincent); ++, buen crecimiento (40-80% comparado con el control); +++, muy buen crecimiento (igual al control). Los valores representados son la media de tres réplicas por cada muestra.

4. Caracterización genética

4.1. Extracción de DNA

Para analizar la concentración del DNA extraído, se compara la intensidad de fluorescencia a la luz UV de las diluciones consecutivas del DNA comercial del fago λ con las diluciones seriadas del DNA obtenido de cada una de las muestras (Figura 7).



Figura 7. Comparación de la concentración de DNA de las cepas Co-7HPT1, Co-7HPT2, TS-7HPT1, TG-7H1, TR-7H2, V-7PT1 y V-7PT2 con concentraciones conocidas y seriadas del fago lambda λ ($\lambda_1=100\text{ng}/\mu\text{l}$, $\lambda_2=20\text{ng}/\mu\text{l}$, $\lambda_3=4\text{ng}/\mu\text{l}$, $\lambda_4=0,8\text{ng}/\mu\text{l}$)

4.2. Análisis de restricción del DNA ribosómico amplificado por PCR (ARDRA)

Se amplificó por PCR el 16S rDNA de los 14 aislados y se obtuvo una banda de aproximadamente 1500 pb como muestra la Figura 8.

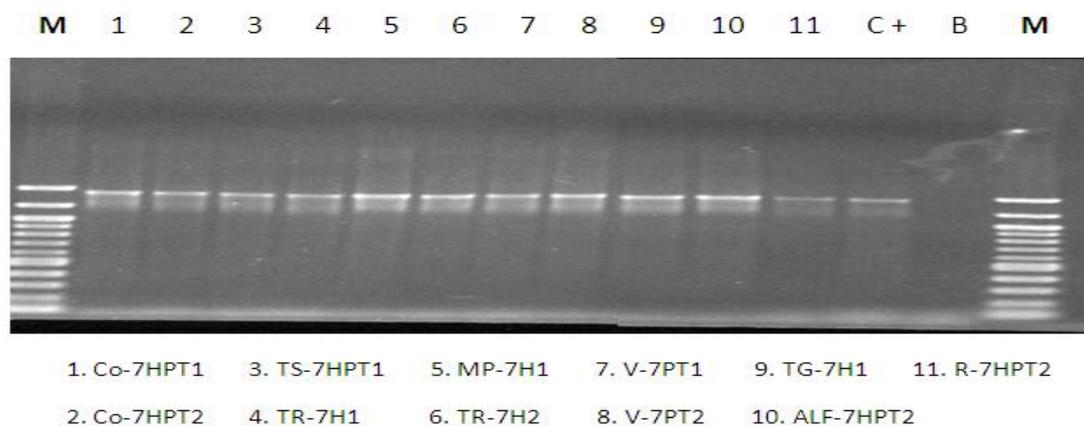


Figura 8. Amplificación por PCR del 16S rDNA. Las cepas están numeradas del 1 al 10 correspondiendo con los carriles en orden de izquierda a derecha. C+ hace referencia al control positivo (*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* CECT 4116) y B al control negativo. Los carriles marcados con una M corresponden al marcador 100pb (New England Biolabs).

El producto de la PCR fue digerido con las endonucleasas *MspI*, *HinfI*, *DdeI* y *HhaI* (Figura 9) y los análisis de restricción revelaron de 3 a 5 patrones para cada enzima usada. Se obtuvieron cinco genotipos ARDRA diferentes que representaban las combinaciones de los patrones (Tabla 2) con todas las cepas estudiadas incluidas las de referencia.

Los 14 aislados fueron agrupados en tres genotipos diferentes, siendo el genotipo 1 el mayoritario el cual corresponde con la cepa de referencia *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* CECT 4116. Tres fueron los aislados agrupados con el genotipo 2 (MP-7H1, ALF-7HPT2, MO-7H2) correspondiendo con las cepas de referencia *E. medicae* J-7AH/J-7QC y *E. meliloti* ALF-2 y sólo dos aislados (R-7HPT2 y L-7HPT2) se agruparon dentro del genotipo 3 que corresponde con la cepa de referencia *B. canariense* L-7AH. El resto de las cepas de referencia utilizadas mostraron patrones diferentes a los que mostraron los aislados.

Basándonos en este análisis ARDRA, se secuenció el gen 16S rRNA de los rizobios seleccionados con el mismo y diferente patrón con el objetivo de obtener su identidad genética (Tabla 4).

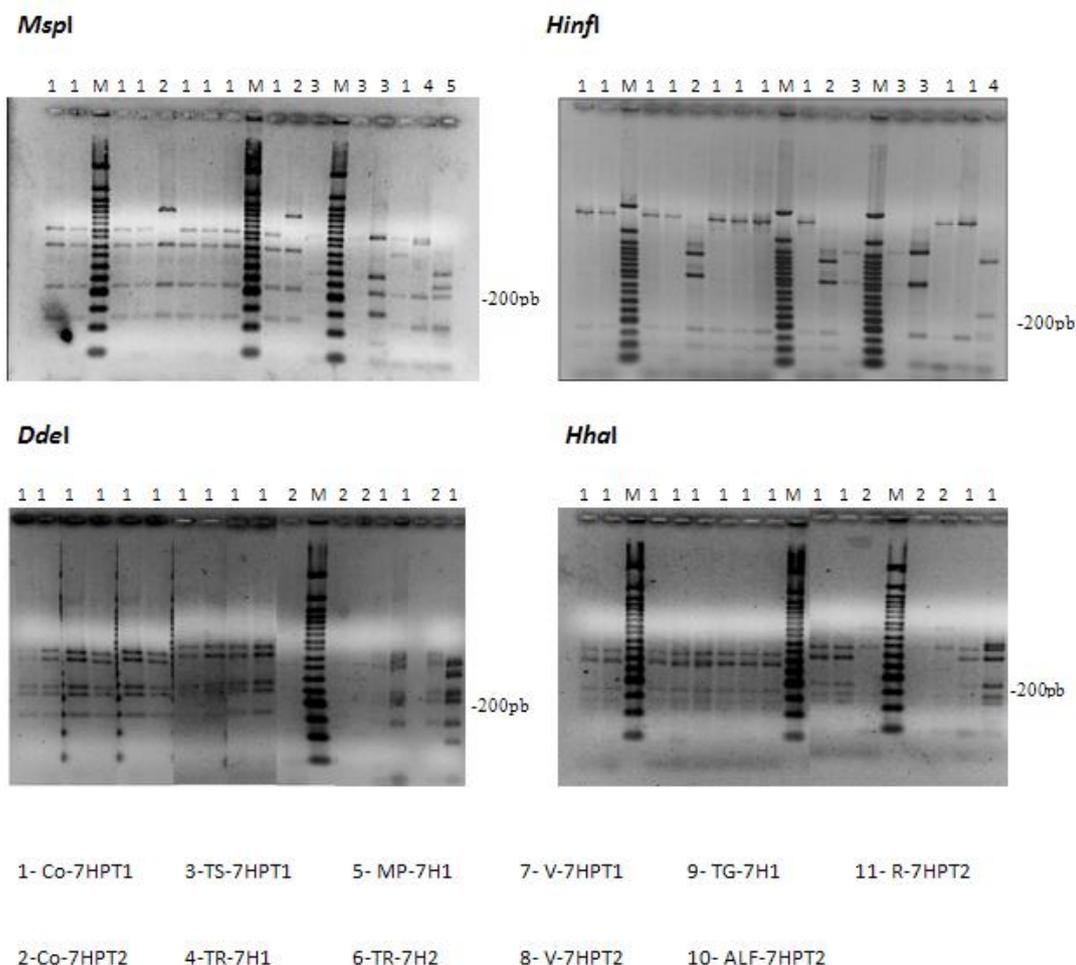


Figura 9. Tipos de patrones de restricción del amplificado por PCR del 16S rDNA digerido con *MspI*, *HinfI*, *DdeI* y *HhaI*, obtenido con las cepas usadas en este estudio. Los números se refieren al tipo de patrón de restricción generado con cada enzima como se muestra en la Tabla 2. Las cepas están numeradas del 1 al 10 correspondiendo con los carriles en orden de izquierda a derecha. Los carriles marcados con una M corresponden al marcador 50pb (New England Biolabs). Los carriles situados a continuación del último marcador corresponden de izquierda a derecha a las cepas de referencia R-7Q2, L-7AH, CECT 4116, GH-1 (excepto en *DdeI*) y Co-1 (excepto en *HhaI*). En adición se usó J-7AH (último carril) en la digestión con *DdeI*.

4.3. Análisis de la secuencia del gen 16S rRNA

Las secuencias de siete aislados se depositaron en la base de datos del GenBank con los números de acceso: KF468784-KF468790. Las secuencias de los aislados con el mismo genotipo ARDRA mostraron tener casi la misma composición de nucleótidos (Tabla 4). Los aislados del grupo genotípico 1 (TR-7H1, V-7HPT1, TG-7H1 y J-7HPT1), mostraron una homología del 99,8% con 1254 posiciones conservadas de un total de 1256 pb determinadas. Los aislados con el grupo genotípico 2 (MP-7H1 y ALF-7HPT2), mostraron una homología del 100% con 1407 posiciones conservadas de un total de 1407 pb.

El siguiente paso del análisis consistió en comparar las secuencias de los aislados con su cepa más próxima proporcionada por un análisis BLASTN (Tabla 4). El análisis BLASTN mostró que los aislados pertenecientes al genotipo 1 (TR-7H1, V-7HPT1, TG-7H1 y J-7HPT1), tenían una similitud de entre un 99,9-100% con su cepa más próxima. La cepa TR-7H1 mostraba una similitud del 100% con *Rhizobium* sp. cepa LNHC245A00 (código de acceso JX292482), V-7HPT1 con *R. leguminosarum* cepa ALM-2 (nº DQ660316), mostraba una similitud del 99,9%, TG-7H1 mostró con *R. leguminosarum* cepa LEN-4 (nº FJ593639), una similitud del 100% y J-7HPT1 cuya cepa más próxima es *R. leguminosarum* cepa HB-6 (nº GU306141) mostró una homología del 100%. Los aislados pertenecientes al genotipo 2 (MP-7H1 y ALF-7HPT2), mostraron ambos un porcentaje de homología de 100% con *E. medicae* cepa J-7AH (nº HQ396798). El único aislado del que se obtuvo un genotipo de tipo 3 (R-7HPT2) tuvo una similitud del 99,9% con *B. canariense* cepa L-7AH (nº HQ396795).

Por último, se identificaron mediante un análisis BLASTN las secuencias de las cepas tipo más próximas a cada uno de los aislados y a continuación se calculó el porcentaje de homología con dichas cepas tipo. Los aislados pertenecientes al genotipo 1, mostraron un porcentaje de identidad de entre un 99,4-99,6% con la cepa tipo *R. leguminosarum* USDA 2370^T (nº U29386), por otro lado los aislados pertenecientes al genotipo 2 mostraron una identidad del 100% con *E. medicae* A321^T (nº L39882.1) y por último, el aislado perteneciente al genotipo 3 mostró un 99,8% de identidad con *B. canariense* BTA-1^T (nº AJ558025).

Con estos análisis genéticos quedó demostrado que los siete aislados pertenecían a la familia Rhizobiaceae dentro de las alfa-proteobacterias, y géneros *Rhizobium*, *Ensifer* y *Bradyrhizobium*, adscribiéndose en concreto a las especies *R. leguminosarum* (TR-7H1, V-7HPT1, TG-7H1, J-7HPT1) *E. medicae* (MP-7H1, ALF-7HPT2) y *B. canariense* (R-7HPT2).

Tabla 4. Adscripción genética de las secuencias de los rizobios aislados de nódulos de leguminosas basado en el análisis del gen 16S rRNA

Cepa	Alineamiento nt ^a	Homología con la cepa más próxima ^b , número de acceso GenBank, % identidad ^d	Alineamiento nt ^a	Homología con la cepa tipo ^c (número de acceso), % identidad	16S rRNA/ n ^o acceso GenBank
TR-7H1	1256	<i>Rhizobium</i> sp. cepa LNHC245A00, JX292482, 100%	1258	<i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA 2370 ^T (U29386), 99.6%	<i>R. leguminosarum</i> / KF468784
V-7HPT1	1434	<i>R. leguminosarum</i> cepa ALM-2, DQ660316, 99.9%	1409	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T (U29386), 99.5%	<i>R. leguminosarum</i> / KF468785
TG-7H1	1428	<i>R. leguminosarum</i> cepa LEN-4, FJ593639, 100%	1413	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T (U29386), 99.6%	<i>R. leguminosarum</i> / KF468786
MP-7H1	1415	<i>Ensifer medicae</i> cepa J-7AH, HQ396798, 100%	1410	<i>E. medicae</i> A321 ^T (L39882.1), 100%	<i>E. medicae</i> / KF468788
ALF-7HPT2	1428	<i>E. medicae</i> cepa J-7AH, HQ396798, 100%	1420	<i>E. medicae</i> A321 ^T (L39882.1), 100%	<i>E. medicae</i> / KF468787
R-7HPT2	1387	<i>Bradyrhizobium canariense</i> cepa L-7AH, HQ396795, 99.9%	1386	<i>B. canariense</i> BTA-1 ^T (AJ558025), 99.8%	<i>B. canariense</i> / KF468789
J-7HPT1	1430	<i>R. leguminosarum</i> cepa HB-6, GU306141, 100%	1416	<i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 ^T (U29386), 99.44%	<i>R. leguminosarum</i> / KF468790

^a Número de nucleótidos del gen 16S rRNA utilizados en los dos alineamientos realizados con las secuencias de la base de datos del GenBank, respectivamente.

^b Homología de las cepas secuenciadas con la secuencia de la cepa más próxima disponible en las bases de datos públicas, mediante un análisis BLASTN disponible en (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

^c Identidad obtenida con la cepa tipo de las especies bacterianas más cercanas.

^d Identidad obtenida mediante análisis “Clustal W multiple alignments” disponible en (<http://www.npsa-pbil.ibcp.fr/>).

5. Análisis de la tolerancia al Hg

5.1. Evaluación de la sensibilidad al Hg.

El efecto del Hg en el crecimiento de las cepas en vida libre se representa como un porcentaje de crecimiento (determinado en la mitad de la fase logarítmica) en medio de cultivo suplementado con Hg respecto al control sin metal (Figura 10). Esto permite identificar a las bacterias en relación a la tolerancia al Hg y clasificarlas en tres grupos de tolerancia (Tabla 5).

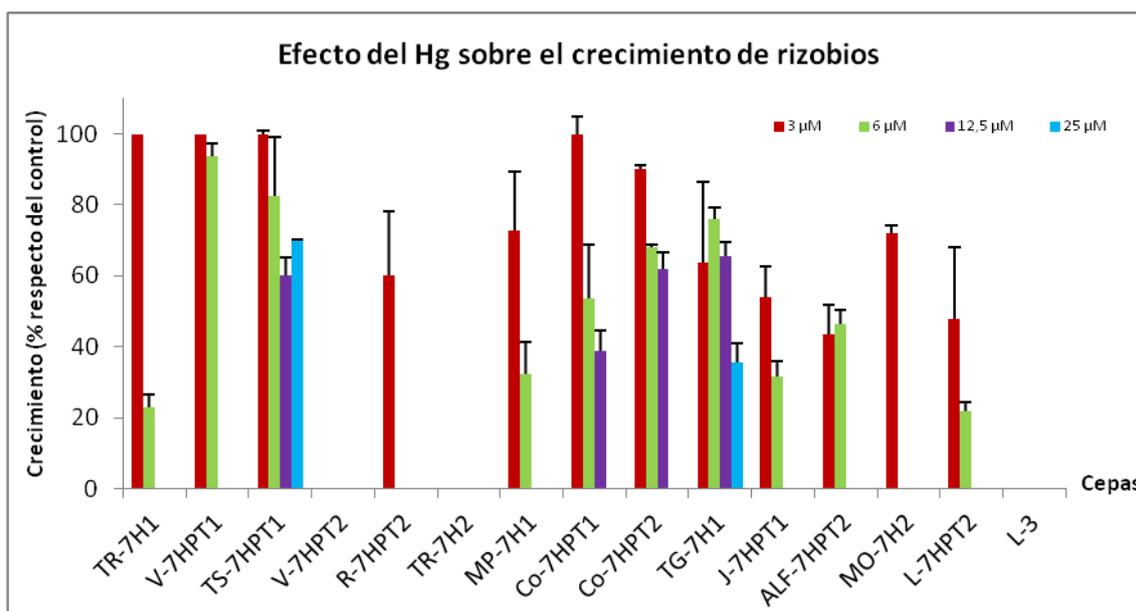


Figura 10. Efecto de la concentración del Hg (3, 6, 12,5 y 25 μM HgCl_2) en el crecimiento de los rizobios aislados en fase logarítmica. Los resultados se expresan como el porcentaje de crecimiento en comparación con el control, el cual es medio de cultivo con bacterias sin suplementar con HgCl_2 . Los datos mostrados son la media y la barra de error corresponde con la desviación típica de tres réplicas por experimento.

Se cataloga como grupo sensible a aquellas cepas que presentan un crecimiento de entre 0-2% respecto al control a una concentración final de 3 μM de HgCl_2 (Figura 10). Dentro de este grupo se encuentran V-7HPT2, TR-7H2 y la cepa de referencia L-3 (procedente de un área próxima sin contaminación por Hg) presentando una CMI ≤ 3 (Tabla 5).

Las cepas clasificadas como grupo intermedio, presentan crecimiento respecto al control a una concentración final de 3 μM y 6 μM de HgCl_2 y sin embargo muestran crecimiento nulo a 12,5 μM (Figura 10). A este grupo pertenecen las cepas TR-7H1, V-7HPT1, R-7HPT2, MP-7H1, J-7HPT1, ALF-7HPT2, MO-7H2 y L-7HPT2. Las CMI de las cepas que pertenecen a este grupo oscilan entre 6 μM y 12,5 μM . Es destacable el caso de V-7HPT1 que a una concentración final de 6 μM muestra unos valores de absorbancia casi idénticos al control sin Hg.

Por último, quedan clasificados como cepas tolerantes cuatro aislados (TS-7HPT1, Co-7HPT1, Co-7HPT2, TG-7H1) presentando unas CMI de entre 25µM y 30µM. Dentro de este grupo destacan TS-7HPT1 y TG-7H1 al mostrar crecimiento a una concentración de HgCl₂ 25 µM y siendo su CMI 30µM. Por último, se considera a la cepa TG-7H1 como la cepa más tolerante ya que hasta una concentración de 12,5µM no reduce su crecimiento con respecto al control, lo que indica que esta cepa no se ve afectada por el mercurio hasta esa concentración. A este hecho, hay que añadir que a 25µM sigue mostrando crecimiento viéndose reducido su crecimiento un 50% respecto al control sin Hg.

Tabla 5. Patrones de tolerancia al Hg de las cepas aisladas de nódulos de leguminosas recogidas en dos suelos diferentes de la zona de Huerta del Rey (Ciudad Real) y una cepa usada de referencia.

Cepa	Especie	CMI (µM) ^a	Grupos de tolerancia ^b
TR-7H1	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	12,5	TI
V-7HPT1	<i>R. leguminosarum</i>	12,5	TI
TS-7HPT1	<i>R. leguminosarum</i>	30	T
V-7HPT2	<i>R. leguminosarum</i>	≤3	S
R-7HPT2	<i>Bradyrhizobium canariense</i>	6	TI
TR-7H2	<i>R. leguminosarum</i>	≤3	S
MP-7H1	<i>Ensifer medicae</i>	12,5	TI
Co-7HPT1	<i>R. leguminosarum</i>	25	T
Co-7HPT2	<i>R. leguminosarum</i>	25	T
TG-7H1	<i>R. leguminosarum</i>	30	T
J-7HPT1	<i>R. leguminosarum</i>	12,5	TI
ALF-7HPT2	<i>E. medicae</i>	12,5	TI
MO-7H2	<i>E. medicae</i>	6	TI
L-7HPT2	<i>B. canariense</i>	12,5	TI
Cepa de referencia			
L-3	<i>B. canariense</i>	≤3	S

^a La concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como la concentración más baja de metal HgCl₂ que inhibe por completo el crecimiento bacteriano en el punto medio de la fase logarítmica. ^b T: tolerante, TI: tolerancia intermedia, S: sensible.

5.2. Dinámica del crecimiento bacteriano durante la incubación con Hg

La dinámica del crecimiento de los rizobios en presencia de mercurio se estudió en todas las cepas, realizando mediciones de absorbancia con el espectrofotómetro a 680 nm cada 24 horas. La Figura 11 representa las curvas de crecimiento obtenidas mostrando dos ejemplos de cepas seleccionadas de cada grupo de tolerancia al Hg y el resto de las curvas se muestran en el Anexo 1. Las gráficas A y B hacen referencia a Co-7HPT1 y a TG-7H1 respectivamente, como ejemplos de cepas tolerantes. Las gráficas C y D, corresponden a dos cepas catalogadas como intermedias (L-7HPT2 y V-7HPT1) y por último las gráficas E y D, pertenecen al grupo de las sensibles al mercurio y hacen

referencia a las cepas TR-7H2 y V-7HPT2. En las gráficas A y C (Co-7HPT1 y L-7HPT2) se puede observar cómo a medida que aumenta la concentración de Hg, disminuye progresivamente el crecimiento mientras que en las gráficas B y D (TG-7H1 y V-7HPT1), se observa cómo hasta una concentración de 12,5µM y 6µM respectivamente, los datos de crecimiento se igualan al control al final de la fase estacionaria. Esto mismo ocurre en las cepas TR-7H1 y MO-7H2 (Anexo 1).

Las curvas dosis-respuesta demuestran que la cepa más tolerante a altas concentraciones de Hg es TG-7H1 (gráfica B), ya que su crecimiento en presencia de HgCl₂ iguala al control hasta una concentración de 12,5µM en la fase estacionaria, disminuyendo su crecimiento sólo un 36% al ser expuesta 25µM al final de la fase estacionaria. También la cepa Co-7HPT1 decrece un 38,6% a 25µM al final de la fase estacionaria.

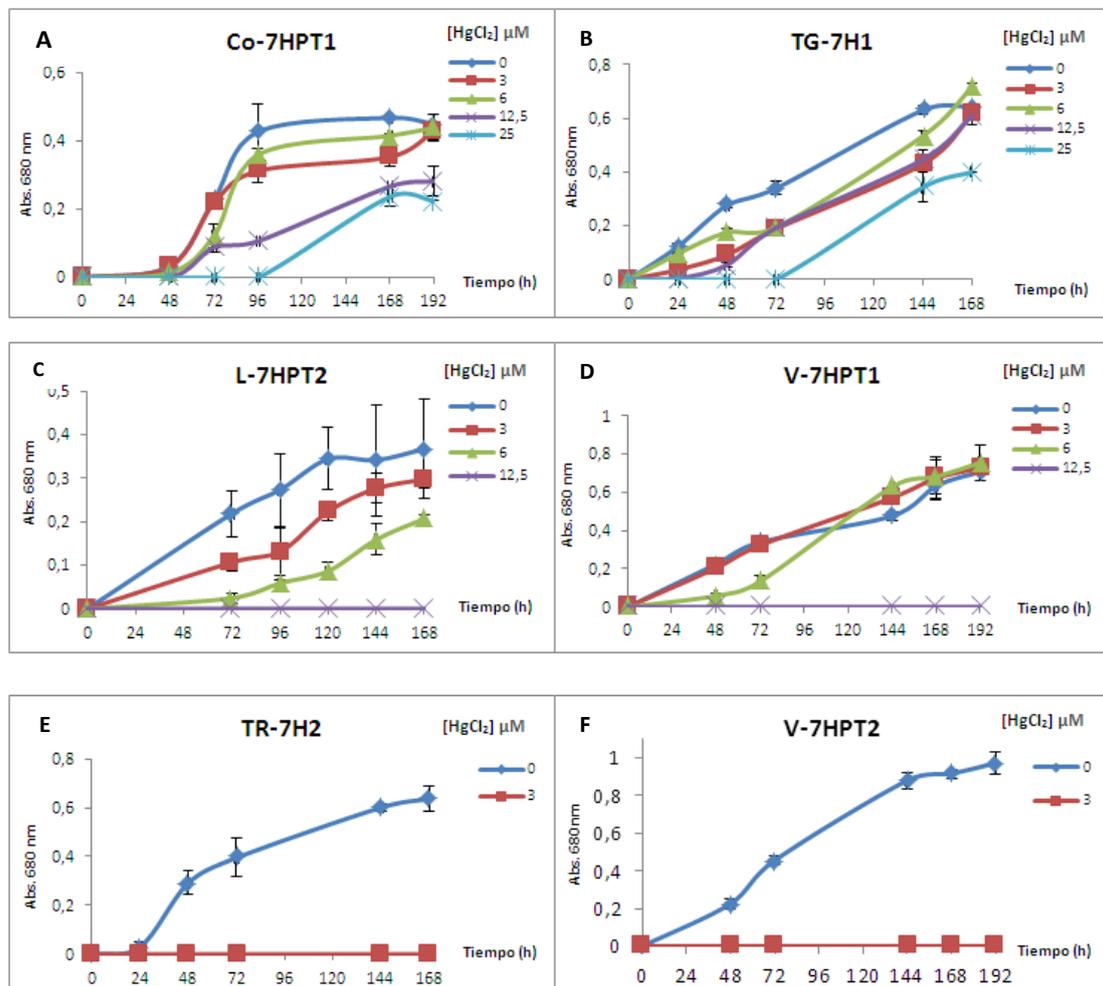


Figura 11. Crecimiento de los rizobios en función del incremento de la concentración de mercurio (0, 3, 12,5 y 25µM HgCl₂). En cada tratamiento se usaron tres réplicas y los datos mostrados son el resultado de la media de las tres réplicas, con su desviación estándar (± D.E.).

DISCUSIÓN

En este estudio, se ha realizado el aislamiento y caracterización de rizobios a partir de nódulos de leguminosas de la zona correspondiente a la ladera norte de la mina de Almadén, conocida como la Huerta del Rey. Según los resultados obtenidos de los análisis de suelo, el contenido en mercurio de los suelos de la Huerta del Rey muestra concentraciones medias con respecto a estudios anteriores realizados en Almadén (Ruiz-Díez et al., 2012b). Esta zona se utilizó durante la explotación de la mina como una escombrera de estériles, que son la parte del material extraído sin valor económico y que contiene cantidades menores y variables de mercurio. Para nuestro estudio, se ha dividido en dos zonas (1 y 2) diferenciadas entre sí por el contenido de Hg del suelo.

El análisis de los suelos muestra altos valores de nitratos y K, lo cual indica que son suelos capacitados para el cultivo. No obstante, la ausencia de carbonatos podría explicar la baja cantidad de leguminosas encontradas creciendo de manera natural, ya que estas plantas demandan una gran cantidad de carbonatos durante su crecimiento. Como ya se ha citado anteriormente, la Huerta del Rey actualmente es una zona de paso de ganado, lo que explica los altos valores de materia orgánica y nitratos obtenidos. La diferencia en relación a la cantidad de nitratos determinados entre la zona 1 y 2, podría deberse a que la pendiente de la Huerta del Rey provoca que la escorrentía favorezca la acumulación de nitratos en la zona 1. La mayoría de las leguminosas noduladas encontradas en estas zonas pertenecen a los géneros *Trifolium* y *Medicago*. Para aumentar la diversidad de los rizobios aislados de la zona se utilizaron plantas trampa, con especies que no estaban presentes de forma natural en las zonas bajo estudio.

El aislamiento y caracterización de rizobios a partir de leguminosas crecidas en zonas de Almadén contaminadas con Hg, ha sido realizado con anterioridad (Ruiz-Díez et al., 2012b; Nonnoi et al., 2012). En estos trabajos se ha utilizado el gen 16S rRNA como herramienta de caracterización. En el presente estudio, el gen 16S rRNA demostró la existencia de tres especies diferentes de rizobios (*R. leguminosarum*, *E. medicae* y *B. canariense*) de entre las catorce cepas aisladas. Estos datos muestran una baja diversidad de las especies de rizobios obtenidos, lo que podría ser debido a que es un suelo que tradicionalmente ha sido cultivado con las mismas plantas, de forma que los rizobios se han ido seleccionando de forma natural y progresiva. Entre las zonas 1 y 2 se ha encontrado poca variabilidad genética, a pesar de tener diferente contenido de mercurio. Esta similitud entre las dos zonas puede ser debida a que se encuentran muy próximas.

En trabajos anteriores realizados en una zona con concentraciones muy bajas de mercurio (Ruiz-Díez et al., 2012b), también se había encontrado baja variabilidad genética de rizobios. Además, comparando este trabajo de Ruiz-Díez con nuestros

datos actuales, se han encontrado especies rizobianas diferentes que provienen de la misma especie de leguminosa. Por ejemplo, se había aislado una cepa de *Rhizobium radiobacter* de nódulos *R. sphaerocarpa*, muy resistente a mercurio. En nuestro trabajo, donde la concentración de mercurio es considerablemente superior, se ha aislado *B. canariense* de esta misma leguminosa, confirmando que la alta concentración de mercurio limita la presencia de las cepas más resistentes (*R. radiobacter*), al verse disminuida su capacidad infectiva (Van Beelen y Doelman 1997). Asimismo, sólo encontramos *B. canariense* en la zona más contaminada (zona 2), mientras que en la zona menos contaminada (zona 1), no se ha encontrado esta especie. Además, cabe destacar la obtención de dos cepas de *R. leguminosarum* nodulando *C. arborescens* en ambas zonas. En ninguno de los trabajos anteriores (Ruiz-Díez et al., 2012b; Nonnoi et al., 2012) se obtuvieron nódulos de dicha leguminosa. Hasta el momento, sólo se ha encontrado en un estudio una cepa de *R. leguminosarum* nodulando *C. arborescens* (Ourarhi et al., 2011).

En cuanto a la caracterización fenotípica, los experimentos realizados de salinidad, pH y temperatura muestran la diversidad que presentan las cepas de rizobios estudiados. La mayoría de los aislados no son capaces de sobrevivir a altas temperaturas. La baja capacidad de supervivencia a altas temperaturas está relacionado con la capacidad infectiva de los rizobios, de forma que aquellos aislados más tolerantes a altas temperaturas muestran una eficiencia simbiótica menor (Rodrigues et al., 2006). Esto puede explicarse debido a que la respiración de las plantas se incrementa con el aumento de la temperatura lo que implica que se destine menos carbono a la simbiosis. La mayoría de los aislados se mostraron poco resistentes al estrés provocado por la concentración de sal. Esta baja tolerancia a la sal podría deberse a la baja salinidad que presentan los suelos de los que se recogieron las muestras. Aunque el pH óptimo de crecimiento para los rizobios es 7, tras las pruebas de pH realizadas a las distintas cepas, la mayoría de ellos fueron capaces de crecer a pH 9 y ninguno mostró crecimiento a pH 4,5. Ante los resultados de las pruebas de pH, se debe matizar que las características del crecimiento en medio de cultivo difieren de las características del suelo, ya que en el suelo las cargas de las partículas coloidales podrían neutralizar parcialmente la acidez del suelo, que en este caso es ligeramente ácido (pH 6). Se sabe que la tolerancia de los aislados a la salinidad, acidez y alcalinidad es más específica de cepa que de especie (Amarger et al., 1997; Ruiz-Díez et al., 2009). Sin embargo, en este trabajo se muestra como aquellas cepas provenientes de la misma especie de leguminosa, muestran los mismos valores de resistencia frente al estrés causado por la salinidad, acidez y alcalinidad. La degradación del suelo debida a la salinidad o alcalinidad es uno de los mayores problemas que afectan a la fertilidad de los suelos, especialmente en áreas semiáridas como es el caso de Almadén. Por tanto, la reinoculación con las cepas de rizobios más resistentes a altas concentraciones de sal o a pH extremos (MO-7H2, MP-7H1 y ALF-7HPT2), podría proporcionar resistencia a las leguminosas huésped de este área.

El estudio de la toxicidad por Hg a distintas concentraciones ensayadas para cada una de las cepas sirve para demostrar de forma específica la tolerancia de dichas cepas al metal y determinar las CMI. Las curvas dosis-respuesta, representan diferentes grados de inhibición en todas las cepas, pudiéndose dividir en dos grupos: por un lado, aquellas cepas cuyo crecimiento se ve reducido a medida que aumenta la concentración de Hg añadido al medio de cultivo hasta la CMI, y por otro lado, aquellas cepas que alcanzan el mismo crecimiento que el control sin Hg en la fase estacionaria y sólo presentan inhibición del crecimiento a concentraciones iguales/superiores a la CMI. Este segundo grupo indica que hay un efecto de hormosis (Calabrese 2005), que hace referencia a aquellas respuestas favorables a bajas exposiciones al contaminante y que se inhiben a altas dosis de dicho contaminante.

Atendiendo a los datos de CMI y las curvas de dosis-respuesta, se puede sugerir al aislado TG-7H1 como posible inoculante de leguminosas herbáceas con propósitos fitorremediadores en base a la alta tolerancia al Hg. También se puede considerar un buen candidato como inoculante a la cepa TS-7HPT1 aunque en menor medida que TG-7H1, ya que su respuesta al Hg en medio de cultivo es peor. Además, se sugiere Co-7HPT1 para inoculante de *Colutea* como leguminosa arbustiva por su alta CMI y su elevado porcentaje de crecimiento a la máxima concentración utilizada. No obstante, la concentración de Hg presente en el suelo no se puede comparar con las dosis empleadas *in vitro* debido a que gran parte de la concentración medida en el suelo no está biodisponible para los seres vivos. Para que los metales pesados puedan ejercer su toxicidad, estos deben encontrarse disponibles para ser captados, es decir, el metal debe estar biodisponible. La biodisponibilidad se encuentra íntimamente relacionada con las condiciones físico-químicas del suelo, y uno de los factores que más afecta es el pH. En el caso del Hg, la biodisponibilidad aumenta cuanto más básico sea el medio, de forma que en el caso de los suelos de la Huerta del Rey (pH 6), gran parte del Hg no está biodisponible. De forma conjunta con el pH, la materia orgánica actúa de quelante de metales, por lo que los altos valores presentes en el suelo podrían también limitar la biodisponibilidad del mercurio para las plantas.

Este estudio muestra la existencia de rizobios capaces de sobrevivir en áreas contaminadas con Hg. Los análisis genéticos concluyen que hay poca diversidad de rizobios en esta zona de Almadén. En general, la diversidad genética de las comunidades de bacterias adaptadas a ambientes contaminados con Hg es relativamente baja. La exposición continua a concentraciones de Hg en el suelo de origen, incluso a bajas concentraciones, disminuye dicha diversidad, favoreciendo el crecimiento de aquellas cepas tolerantes al Hg (Rasmussen y Sorensen et al., 2001). Los análisis fenotípicos indican que la mayoría de las cepas presentes en suelos contaminados tienen cualidades para tolerar distintas concentraciones de Hg, lo cual no ocurre en cepas estudiadas de otros ambientes no contaminados que han sido utilizadas en este trabajo como cepas control y coincide con estudios previos (Ruiz-

Díez et al., 2012a y b). Además, hay cierta correlación entre la tolerancia al Hg y la tolerancia a la sal y al pH, de forma que aquellos aislados más resistentes a altas concentraciones de sal y pH básico, se encuentran en el grupo de tolerancia intermedia-alta al Hg (ALF-7HPT2 y MP-7H1).

En conclusión, la diversidad de rizobia aislados de una zona contaminada con mercurio, como es la Huerta del Rey, no es muy elevada, aunque se han podido identificar 14 cepas de tres especies diferentes, muchas de ellas altamente tolerante a Hg. Se sugieren las cepas TG-7H1 y Co-7HPT1 como mejores candidatas para ser usadas en biorremediación.

CONCLUSIONES

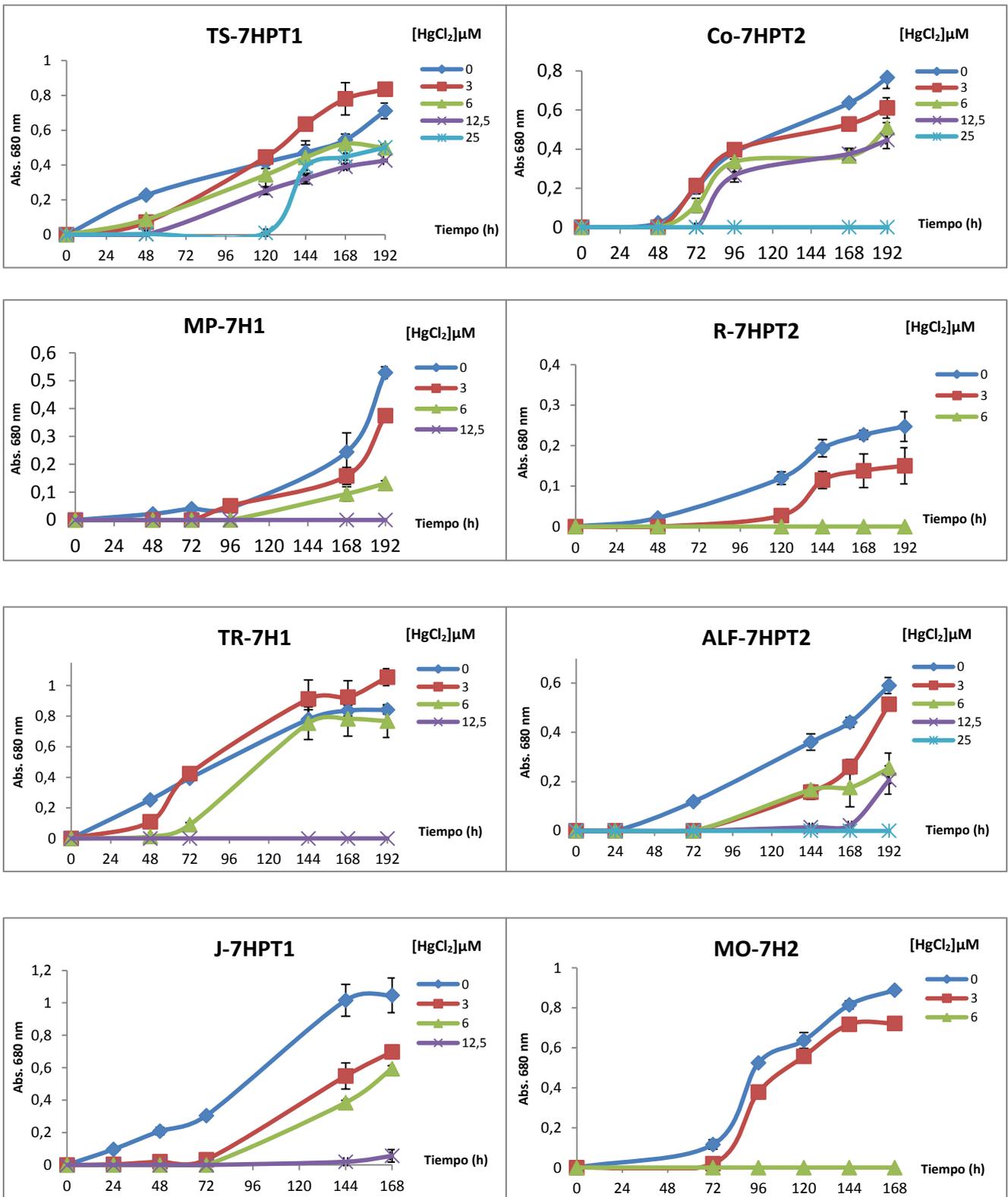
- En este trabajo se han aislado 14 cepas de rizobios capaces de sobrevivir en áreas contaminadas con mercurio. El análisis del gen 16S rRNA (primero por ARDRA y después por secuenciación directa) ha demostrado que de 14 cepas, 9 de ellas corresponden a *Rhizobium leguminosarum*, 3 a *Ensifer medicae* y 2 a *Bradyrhizobium canariense*.
- Los análisis genéticos demuestran que la diversidad de los rizobios depende de las condiciones ambientales, los usos y características del suelo. Se observa una baja diversidad de rizobios debido por un lado a la selección natural y progresiva como consecuencia del cultivo sistemático de las mismas especies de plantas y por otro lado a la exposición al mercurio, lo cual favorece el crecimiento de las especies tolerantes al metal en detrimento de aquellas que no lo son.
- Los análisis fenotípicos indican que los rizobios aislados muestran distintos niveles de tolerancia a condiciones estresantes de temperatura y salinidad, observándose que las cepas que provienen de una misma especie de leguminosa se comportan de forma homogénea respecto al estrés aplicado.
- En base al crecimiento en un medio suplementado con mercurio, se calcula la CMI y se clasifican las cepas en tres grupos de tolerancia: tolerantes, intermedias y sensibles.
- Basándose en las curvas dosis-respuesta, las cepas pueden clasificarse en dos grupos: primero, aquellas cepas cuyo crecimiento se ve reducido a medida que aumenta la concentración de Hg añadido al medio de cultivo hasta la CMI, y segundo, aquellas cepas que alcanzan el mismo crecimiento que el control sin Hg en la fase estacionaria y sólo presentan inhibición del crecimiento a concentraciones iguales/superiores a la CMI.
- Se proponen a las cepas TG-7H1 y Co-7HPT1 como mejores candidatas para ser usadas en técnicas de fitorremediación, en base a su tolerancia a altas concentraciones de mercurio y su crecimiento en presencia de este metal.

BIBLIOGRAFÍA

- Amarger N, Macheret V, Laguerre G (1997). *Rhizobium gallicum* sp. Nov and *Rhizobium giardinii* sp. Nov, from *Phaseolus vulgaris* nodules. International Journal of Systematic Bacteriology 47: 996-1006.
- Becana M, Rodriguez-Barrueco C (1989). Protective mechanism of nitrogenase against oxygen excess and partially-reduced oxygen intermediates. Physiologia Plantarum 75: 429-438.
- Bergersen FJ (1982). Anatomy and structure of nodules. En: Root Nodules of Legume: Structure and Function. Research Studies Press. Eds. John and Wiley Sons Ltd., Chichester, pp. 23-50.
- Cabezas de Herrera E, Fernández-Pascual M (1982). Ultrastructural changes produced during the development of soybean root nodules. Phytopathologische Zeitschrift-Journal of Plant Pathology 106: 173-185.
- Calabrese EJ (2005). Paradigm lost, paradigm found: the re-emergence of hormesis as a fundamental dose response model in the toxicological sciences. Environmental Pollution 138: 378-411.
- De Lorenzo C, Iannetta PPM, Fernández-Pascual M, James EK, Lucas MM, Sprent JI, Witty JF, Minchin FR, de Felipe MR (1993). Oxygen diffusion in lupin nodules II. Mechanisms of diffusion barrier operation. Journal of Experimental Botany 44: 1469-1474.
- De María N, Guevara A, Serra MT, García-Luque I, González A, de Felipe MR, Fernández-Pascual M (2007). Putative porin of *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) bacteroids induced by glyphosate. Applied and Environmental Microbiology 73: 5075-5082.
- Fedorova EE, de Felipe MR, Pueyo JJ, Lucas MM (2007). Conformation of cytoskeleton elements during the division of the infected cells of *Lupinus albus* nodules. Journal of Experimental Botany 58:2225-2236.
- Fernández-Pascual M, Pueyo JJ, de Felipe MR, Golvano MP, Lucas MM (2007). Singular features of the *Bradyrhizobium-Lupinus* symbiosis. Dynamic Soil, Dynamic Plant 1: 1-16.
- Gage DJ, Bobo T, Long SR (1996). Use of green fluorescent protein to visualize the early events of symbiosis between *Rhizobium meliloti* and alfalfa (*Medicago sativa*). Journal of Bacteriology 178: 7159-7166.
- González-Sama A, Lucas MM, de Felipe MR, Pueyo JJ (2004). An unusual infection mechanism and nodule morphogenesis in white lupin (*Lupinus albus*). New Phytologist 163: 371-380.
- Guerrouj K, Ruiz-Díez B, Chahboune R, Ramírez-Bahena MH, Abdelmoumen H, Quiñones MA, El Idrissi MM, Velázquez E, Fernández-Pascual M., Bedmar EJ, Peix A (2013). Definition of a novel symbiovar (sv. *retamae*) within *Bradyrhizobium retamae* sp. nov., nodulating *Retama sphaerocarpa* and *Retama monosperma*. Systematic and Applied Microbiology 36: 218-223.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST (1994). En: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th edition. Eds. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT Williams ST. Publisher Williams & Wilkins: A Waverly Company.
- Laguerre G, Allard MR, Revoy F, Amarger N (1994). Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. Applied and Environmental Microbiology 60:56-63.
- Lane DJ (1991). 16S/23S rRNA sequencing. En: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. Eds. Strackebrandt E, Goodfellow M. Willey, Chischester, pp 115-175.

- Molina JA, Oyarzun R, Esbri JM, Higuera P (2006). Mercury accumulation in soils and plants in the Almadén mining district, Spain: one of the most contaminated sites on Earth. *Environmental Geochemistry and Health* 28: 487-498.
- Nonnoi FA, Chinnaswamy A, García de la Torre VS, Coba de la Peña T, Lucas MM, Pueyo JJ (2012). Metal tolerance of rhizobial strains isolated from nodules of herbaceous legumes (*Medicago* spp. and *Trifolium* spp.) growing in mercury-contaminated soils. *Applied Soil Ecology* 61: 49-56.
- Ourarhi M, Abdelmoumen H, Guerrouj K, Benata H, Muresu R, Squartini A, Missbah M (2011). *Colutea arborescens* is nodulated by diverse rhizobia in Eastern Morocco. *Archives of Microbiology* 193:115-124.
- Phillips DA, Kapulnik Y (1995). Plant isoflavonoids, pathogens and symbionts. *Trends in Microbiology* 3: 58-64.
- Quiñones MA, Ruiz-Díez B, Fajardo S, López-Berdonces MA, Higuera PL, Fernández-Pascual M (2013). *Lupinus albus* plants acquire mercury tolerance when inoculated with an Hg-resistant *Bradyrhizobium* strain. *Plant Physiology and Biochemistry* (En prensa).
- Rasmussen LD, Sorensen S (2001). Effect of mercury contamination on the culturable heterotrophic, functional and genetic diversity of the bacterial community in soil. *FEMS Microbial Ecology* 36:1-9.
- Rodrigues CS, Laranjo M, Oliveira S (2006). Effect of heat and pH stress in the growth of chickpea Mesorhizobia. *Current Microbiology* 53:1-7.
- Ruiz-Díez B, Fajardo S, Puertas-Mejía MA, de Felipe MR, Fernández Pascual M (2009). Stress tolerance, genetic analysis and symbiotic properties root-nodulating bacteria isolated from Mediterranean leguminous shrubs in Central Spain. *Archives of Microbiology* 191: 35-46.
- Ruiz-Díez B, Fajardo S, de Felipe MR, Fernández-Pascual M (2012a). The characterization of rhizobia from legumes of agronomic interest grown in semi-arid areas of Central Spain relates genetic differences to soil properties. *Journal of Basic Microbiology* 52: 66-78.
- Ruiz-Díez B, Quiñones MA, Fajardo S, López-Berdonces MA, Higuera P, Fernández-Pascual M (2012b). Mercury-resistant rhizobial bacteria isolated from nodules of leguminous plants growing in high Hg-contaminated soils. *Applied Microbiology and Biotechnology* 96: 543-554.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (eds) (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sánchez F, Padilla JE, Pérez H, Lara M (1991). Control of nodulin genes in root nodule development and metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 507-528.
- Soupène E, Foussard M, Boistard P, Truchet G, Batut J (1995). Oxygen as a key developmental regulator of *Rhizobium meliloti* N₂ fixation gene expression within alfalfa root nodules. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92: 3759-3763.
- Van Beelen P, Doelman P (1997). Significance and application of microbial toxicity tests in assessing ecotoxicological risks of contaminants in soil and sediment. *Chemosphere* 34: 455-499.
- Vincent JM (1970). *En: A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria*. Blackwell, Oxford.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173: 697-703.

ANEXO 1. Curvas dosis-respuesta



Crecimiento de los rizobios en función del incremento de la concentración de mercurio (0, 3, 6, 12,5 y 25 μM HgCl_2). En cada tratamiento se usaron tres réplicas y los datos mostrados son el resultado de la media de las tres réplicas, con su desviación estándar (\pm D.E.).