

ABSORCIÓN DE COBRE Y CARACTERÍSTICAS DE *Leucaena leucocephala* ASOCIADA CON *Glomus* spp. y *Rhizobium* EN SUELO CONTAMINADO DEL RÍO LERMA, MÉXICO

Copper Absorption and Characteristics of *Leucaena leucocephala* Associated with *Glomus* spp. and *Rhizobium* in Polluted Soil of the Lerma River, Mexico

Abdul Khalil Gardezi^{1†}, Icela D. Barcelo-Quintal², Víctor Manuel Cetina-Alcalá³, Anne Laure Bussy², Joel Pérez-Nieto⁴ y Manuel A. Borja-Salín¹

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar (a) la capacidad de absorción de Cu por *Leucaena leucocephala* y (b) el efecto en sus características agronómicas al inocularse con hongos endomicorrízicos arbusculares y *Rhizobium* como alternativa para la fitorremediación de suelos agrícolas contaminados. El trabajo se realizó en condiciones de invernadero en suelo contaminado por Cu procedente de la parte alta de la cuenca del río Lerma, estado de México. Las plantas de *Leucaena* crecieron en bolsas de polietileno negro con 3 kg del suelo contaminado esterilizado o no esterilizado. Se aplicaron 0, 20 y 200 mg de Cu kg⁻¹ de suelo contaminado tratado con *Glomus* sp. Zac-19, *Glomus intraradices* o sin *Glomus*, e inoculado con *Rhizobium* o sin *Rhizobium*. Se evaluaron la acumulación de Cu en las plantas, sus características agronómicas y el contenido final de Cu en el suelo. La acumulación de Cu en las plantas fue mayor en tallos que en hojas y se asoció a la disminución de su concentración en el suelo a través del tiempo. No hubo efecto de la esterilización del suelo sobre la acumulación de Cu, ni sobre las características agronómicas de las plantas, excepto sobre el número de nódulos de *Rhizobium*. Se observó significativamente ($P < 0.05$)

mayor acumulación de Cu al incrementarse su concentración en el suelo, destacando un efecto positivo de 20 mg de Cu kg⁻¹ de suelo al mejorar las características agronómicas. Las plantas con mejores características agronómicas disminuyeron su tendencia a la absorción de Cu en presencia simultánea de *Glomus* spp. y *Rhizobium*. Esto demuestra un efecto interactivo positivo de la doble inoculación endomicorriza más *Rhizobium* en la absorción de Cu por las plantas de *Leucaena* y aumenta su papel en el diseño de estrategias de reforestación y fitorremediación de suelos agrícolas contaminados por cobre.

Palabras clave: leguminosa arbórea, fitorremediación, hongos endomicorrízicos.

SUMMARY

The purpose of this investigation was to evaluate (a) the absorption capacity of Cu by *Leucaena leucocephala* and (b) the effect on agronomic characteristics of inoculation with arbuscular endomycorrhizal fungi and *Rhizobium*, as an alternative for phytoremediation of contaminated agricultural soil. The work was done under greenhouse conditions in agricultural soil from the upper region of the Lerma River watershed in the State of Mexico contaminated by Cu. The *Leucaena* plants were grown in black polyethylene bags filled with 3 kg of contaminated soil that was sterilized or not sterilized. Treatments of 0, 20, and 200 mg of Cu kg⁻¹ of contaminated soil were inoculated with *Glomus* sp. Zac-19, *Glomus intraradices*, or without *Glomus* and inoculated with *Rhizobium* or without *Rhizobium*. Accumulation of Cu in the plant, agronomic characteristics, and final content of Cu in the soil were valued. The accumulation of Cu in the plant was higher in stems than in leaves and was associated with the reduction of its concentration in

¹ Instituto Tecnológico de Toluca, División de Postgrado e Investigación en Ciencias en Ingeniería Ambiental. Apartado Postal 890, 52140 Metepec, estado de México.

[†] Autor responsable (kabdul@colpos.mx)

² Universidad Autónoma Metropolitana-Azcapotzalco, Departamento de Ciencias Básicas. Azcapotzalco, México, D. F.

³ Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. 56230 Montecillo, estado de México.

⁴ Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Fitotecnia. 56230 Chapingo, estado de México.

the soil over time. Sterilization of the soil did not affect the accumulation of Cu nor the agronomic characteristics of the plants, except for the number of *Rhizobium* nodules. Significantly ($P < 0.05$) greater accumulation of Cu was observed as its concentration in the soil increased, especially at the level of 20 mg Cu kg⁻¹ soil, with improvement of agronomic characteristics. The plants with better agronomic characteristics diminished their tendency to absorb Cu in the presence of *Glomus* and *Rhizobium*. This demonstrates an interactive positive effect of the double inoculation of endomycorrhiza and *Rhizobium* on the absorption of Cu by the *Leucaena* plants and increases its role in the design of strategies for reforestation and phytoremediation of agricultural soil contaminated by copper.

Index words: legume tree, phytoremediation, endomycorrhiza fungi.

INTRODUCCIÓN

El conocimiento del contenido total de los metales pesados presentes en los horizontes del suelo provee una información limitada sobre su comportamiento potencial y biodisponibilidad (Kabala y Ram Singh, 2001). Los metales pesados están asociados con varios componentes del suelo de diferentes maneras y esas asociaciones determinan su movilidad y disponibilidad (Kabata-Pendias y Pendias, 1992; Singh, 1997; Ahumada *et al.*, 1999).

Los microorganismos juegan un papel dual con relación a la actividad de los metales en el suelo, por una parte participan aumentando la concentración de ellos, debido al consumo de compuestos orgánicos que los contienen; por otra, reducen la actividad debido a que en su crecimiento poblacional los incorporan a su biomasa, aun cuando no sean esenciales para su desarrollo. De acuerdo con Kabata y Pendias (1986), esta inmovilización de metales es importante puesto que impide que las formas asimilables se incrementen substancialmente. En este caso, debe considerarse la resistencia de los propios organismos a tolerar diferentes concentraciones de metales. Smith (1991) citó que un incremento en las cantidades de metales en el suelo puede reducir la composición y diversidad de la población microbiana del suelo, propiciando una selección de especies resistentes, como la micorriza (Smith y Read, 1997), que tienen la característica de ser más tolerantes. El efecto benéfico de la inoculación

con micorrizas y *Rhizobium* asociados, en plantas cultivadas en suelos contaminados con metales pesados, como un componente de control biológico, ha sido documentado ampliamente (Habte y Asis, 1991; Urzua *et al.*, 1993; Dahlin *et al.*, 1997; Dev *et al.*, 1997; Tarafdar y Rao, 1997; Davies *et al.*, 2001).

La contaminación por metales pesados en el suelo es un problema real y latente. Numerosos trabajos desarrollados en el Mundo (Kabata-Pandias y Pendias, 1986, 1992; Zhenbin y Suman, 1996; Sinh, 1997; Ahumada *et al.*, 1999), muestran que parte de los sistemas naturales: agua, suelo, planta y aire ya están contaminados, o bien, van a estarlo dentro de algunos años, si no se toman medidas preventivas. Dichos trabajos han evaluado el impacto que tiene la presencia de concentraciones crecientes de productos químicos, entre ellos los elementos traza, en los sistemas naturales, en la salud del hombre y los animales, y, en algunos casos, en la cadena alimenticia. El uso y desecho de sustancias minerales por el hombre es una de las principales causas de la contaminación ambiental y de la destrucción de la biosfera (Kabata-Pendias y Pendias, 1986).

Es importante señalar que, en la actualidad, los mecanismos de adaptación a la presencia de metales tóxicos en el suelo son complejos y no totalmente entendidos (Fassbender y Bornemisza, 1987). Estos metales pesados son absorbidos como iones por las plantas a través de su sistema de raíces y son translocados a los sitios metabólicamente activos en la planta donde ejercen sus efectos tóxicos, por lo que es necesario conocer sus variaciones en cuanto a su reactividad química y a su movilidad en el suelo y en las plantas. Las diferencias que presentaron han sido de utilidad para evaluar la fitotoxicidad del cobre en las plantas de *Leucaena leucocephala*.

Estudios previos sobre la capacidad de adsorción, la distribución geoquímica de los contaminantes y la asociación química de metales pesados han demostrado la existencia de contaminación por Cu en la cuenca del Río Lerma.

El objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad de absorción de Cu por *Leucaena leucocephala* y el efecto en sus características agronómicas al asociarse con hongos endomicorrizicos arbusculares y *Rhizobium* como alternativa para el aprovechamiento y la fitorremediación de los suelos agrícolas contaminados que rodean la presa José Antonio Alzate, en la cuenca alta del río Lerma.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en condiciones de invernadero, con suelo procedente de la parte alta del río Lerma ($19^{\circ} 35' 24'' - 19^{\circ} 04' 12''$ N y $99^{\circ} 54' 36'' - 99^{\circ} 18' 36''$ O) en el valle de Toluca, estado de México (Figura 1). El río Lerma recibe aguas residuales municipales e industriales y de fertilizantes y pesticidas, de sus ríos tributarios. Las aguas residuales presentan gran cantidad de sedimentos altamente contaminados que se introducen a la presa José Antonio Alzate, cuyos sedimentos se emplean como fertilizante en los suelos del valle de Toluca como fuente de materia orgánica, donde el Cu se encuentra en cantidades regulares como contaminante.

De acuerdo con Gardezi *et al.* (2000), las semillas de *Leucaena leucocephala* se esterilizaron con hipoclorito de sodio a 2% durante 4 min, se enjuagaron cuatro veces con agua de la llave, se hidrataron sobre papel filtro en cajas de plástico durante 48 h y se pregerminaron en almácigos de unicel usando tezontle como sustrato. Las plantas se trasplantaron a bolsas de polietileno negro con 3 kg del suelo en estudio como sustrato.

El suelo provino de un muestreo (Figura 1) a la profundidad de 0 a 30 cm, cuyas características son: textura arcillo arenoso (Bouyoucos) a la profundidad de 0 a 5 cm y franco arenoso en el resto del perfil; pH 5.6, materia orgánica 5.33%, N 0.12% (microkjeldahl), P_2O_5 43.3 mg kg^{-1} (Bray-1), K 400 mg kg^{-1} (acetato de amonio NH_4OAc pH 7.0 1N por fotometría de la flama) y Cu 2.83 mg kg^{-1} (DTPA- $CaCl_2$). La mitad del suelo se esterilizó con bromuro de metilo y la otra se usó sin esterilizar, generando dos niveles para el factor suelo: (1) suelo estéril y (2) suelo no estéril.

Se aplicaron tres dosis del factor cobre: 1) 0, 2) 20 y 3) 200 mg de Cu kg^{-1} de suelo contaminado por Cu,

adicionados artificialmente 20 días antes del trasplante cuando el suelo contenía 50% de humedad. La fuente usada de Cu fue el $CuSO_4 \cdot 5H_2O$. Aunque el suelo estaba medianamente contaminado, presenta un alto potencial de contaminación por aguas residuales y lodos provenientes de desechos industriales y municipales.

Se usaron tres niveles del factor hongo endomicorrízico arbuscular *Glomus* spp.: 1) sin *Glomus*, 2) *Glomus* sp. Zac-19 y 3) *Glomus intraradices*. El suelo inoculante se produjo en condiciones controladas en plantas de sorgo (como cultivo trampa) usando arena como sustrato (donado por el Área de Microbiología de Suelos, Colegio de Postgraduados). Previo a su uso, se observó que las raíces de las plantas de sorgo presentaron 90% de colonización total, 23.3% de arbusculos y 10% de vesículas con *Glomus* sp. Zac-19; y 78, 13 y 23% con *Glomus intraradices*, respectivamente. Se aplicaron 10 g de suelo inoculante por cada kg de suelo usado como sustrato en el momento del trasplante. La cantidad observada de esporas mediante la técnica de decantación y tamizado en húmedo (Gerdermann y Nicolson, 1963) fue de 35 y 160 esporas en *Glomus* sp. Zac-19 y *Glomus intraradices*, respectivamente.

Se utilizaron dos niveles del factor cepas de *Rhizobium*: 1) sin *Rhizobium* y 2) con *Rhizobium*. Se usó la cepa de *Rhizobium* denominada TAL 995², la cual se desarrolló en un caldo de extracto de levadura manitol (CELM), durante tres días. Los cultivos se agitaron a una densidad aproximada de 10^9 células mL^{-1} . Se inoculó con 1.5 mL de suspensión bacteriana al pie de cada plántula tratada 10 días después del trasplante.

Se utilizó un diseño experimental de bloques completamente al azar con 36 tratamientos ($2 \times 3 \times 3 \times 2$) en arreglo factorial con cuatro repeticiones. La prueba de comparación de medias se hizo con el método de Tukey ($P < 0.05$).

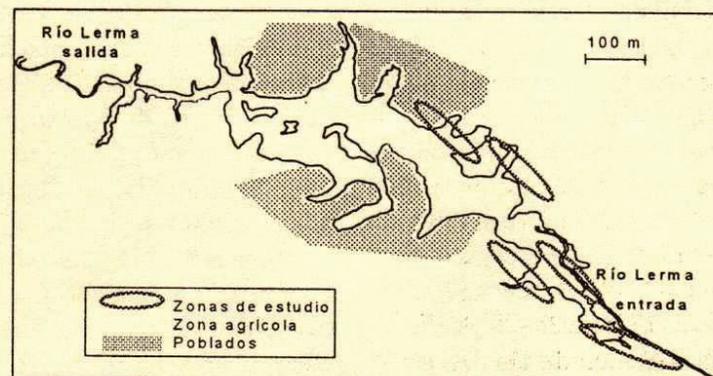


Figura 1. Zonas de estudio donde se muestrearon los suelos.

El experimento duró 180 días después del trasplante. La absorción de Cu por las plantas de *Leucaena* se determinó mediante el método DTPA-CaCl₂ en muestras de tallos y hojas tomadas a 30, 60, 90 y 180 días después del trasplante. El contenido final de Cu en el suelo usado como sustrato se determinó a 180 días para realizar el balance de entradas y salidas. Las variables agronómicas evaluadas en las plantas de *Leucaena* fueron: altura de planta (cm), ramas (número), diámetro de tallo (mm), hojas por planta (número), foliolos (número), longitud de hojas (cm), ancho de hojas (cm), longitud de raíz (cm), volumen radical (cm³), peso seco de hojas (g), peso seco de tallo (g), contenido de Cu en tallo (mg kg⁻¹), contenido de Cu en hojas (mg kg⁻¹), área foliar (cm²), nódulos en la raíz (número) y peso seco de nódulos (mg).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capacidad de Absorción de Cu

La Figura 2 muestra la dinámica de acumulación del Cu en tallo y hojas de las plantas de *Leucaena leucocephala* en suelo estéril, sin y con tratamientos adicionales de Cu, comparados con la dinámica de disminución del Cu en el suelo a través del tiempo. La acumulación de Cu en la planta fue mayor en tallos que en hojas y el patrón de acumulación fue de tipo lineal, al principio, y cuadrática, al final, en ambos órganos. La acumulación de Cu en tallo y hojas se asoció a una disminución presumiblemente lineal de su concentración en el suelo a través del tiempo. Esta disminución fue proporcional a la tasa de absorción de Cu por la planta, excepto por la pérdida por lixiviación no cuantificada.

En el suelo estéril (control absoluto) con una concentración nativa de Cu (3 mg de Cu kg⁻¹ de suelo), la acumulación de este metal por la planta de *Leucaena* fue baja con un ligero incremento en su concentración hasta llegar a 1.5 mg kg⁻¹ en tallo y 0.75 mg kg⁻¹ en hojas (Figura 2a). Se observó que la acumulación de Cu en la hoja fue mayor de 60 a 90 días que de 90 a 180 días, indicando una acumulación máxima o de saturación, lo cual pudo deberse a una menor tasa de crecimiento de la planta en el período de 60 a 90 días, atribuible quizás a una menor disponibilidad de Cu en el suelo.

En el suelo estéril tratado con 20 mg de Cu kg⁻¹ de suelo sin *Rhizobium* y sin micorriza (Figura 2b), la planta de *Leucaena* mostró mayor acumulación de Cu que en el suelo estéril sin tratar (Figura 2a). Se observó que

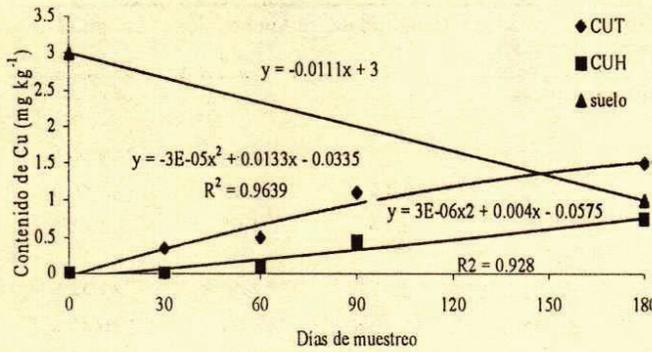
hubo una concentración mayor de 0.5 mg kg⁻¹ de Cu en tallo y hojas en los primeros 30 días. Después, la acumulación de Cu en tallo y hojas mostró una curva típica de saturación. Puede inferirse que el punto crítico de absorción del Cu estuvo en el intervalo de 2.7 a 3.2 mg kg⁻¹ en tallo y de 1.5 a 2.0 mg kg⁻¹ en hojas, es decir, la concentración de 20 mg de Cu kg⁻¹ de suelo está cercana al punto crítico de crecimiento de *Leucaena leucocephala*, después del cual el crecimiento se verá disminuido a mayor concentración de Cu (Cuadro 1).

En la Figura 2c, suelo estéril con 200 mg de Cu kg⁻¹ de suelo sin *Rhizobium* y sin micorriza, se observó claramente que la tasa de absorción de Cu aumentó al incrementarse en diez veces la concentración del Cu en el suelo, hasta llegar a 10.25 mg kg⁻¹ en tallo y 6.85 mg kg⁻¹ en hojas.

En el tratamiento suelo estéril con 200 mg de Cu kg⁻¹ de suelo con *Glomus* sp. Zac-19 (Figura 2d), se observó que la acumulación de Cu disminuyó comparada con el tratamiento suelo estéril con 200 mg kg⁻¹ de Cu sin micorriza (Figura 2c), ocurriendo una acumulación máxima de 9.5 mg kg⁻¹ en tallo y 6.75 mg kg⁻¹ en hojas. Esta disminución en la concentración de Cu, tanto en tallo, como en hojas de la planta de *Leucaena*, puede atribuirse a la presencia de la endomicorriza *Glomus* sp. Zac-19, es decir, a pesar de que la micorriza incrementó la superficie de contacto con el suelo (George *et al.*, 1994) y, por ende, la superficie de contacto con el Cu disponible, lo que implicaría un incremento en la absorción y acumulación de estos elementos; sin embargo, se observó lo contrario, debido, posiblemente, a que la endomicorriza arbuscular retuvo el Cu en la rizosfera.

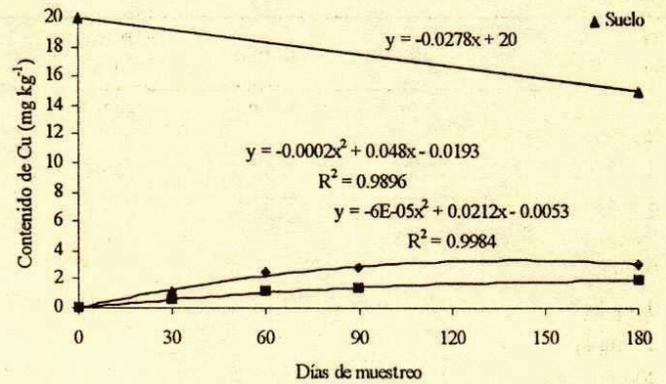
La micorriza posiblemente retuvo la absorción de Cu por *Leucaena leucocephala*, sobre todo en los primeros 30 días (Figura 2d). En exposiciones a altas concentraciones de Cu (200 mg kg⁻¹) por un período mayor que 30 días, la micorriza tiende a disminuir su actividad inhibitoria ("protectora") al grado que después de 90 días se determinó un incremento agudo en la concentración de Cu sobre todo en las hojas.

Por otra parte, la absorción de Cu por *Leucaena leucocephala* se inhibe aún más mediante el efecto combinado de *Glomus intraradices* y *Rhizobium*. La acumulación final de Cu en el tallo y en hojas de *Leucaena* inoculadas con *Glomus intraradices* y *Rhizobium* en suelo estéril, tratado con 200 mg de Cu kg⁻¹ de suelo (Figura 2e), fue menor (9.7 mg de

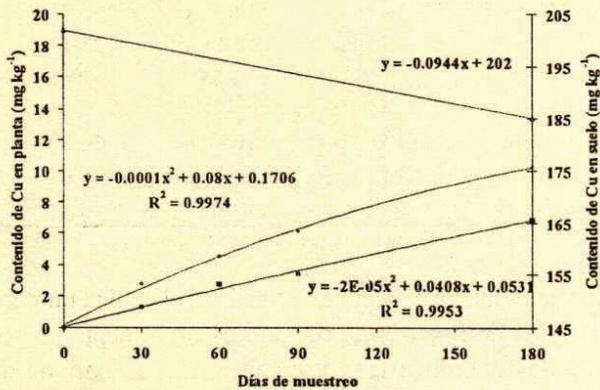


(a) Suelo estéril

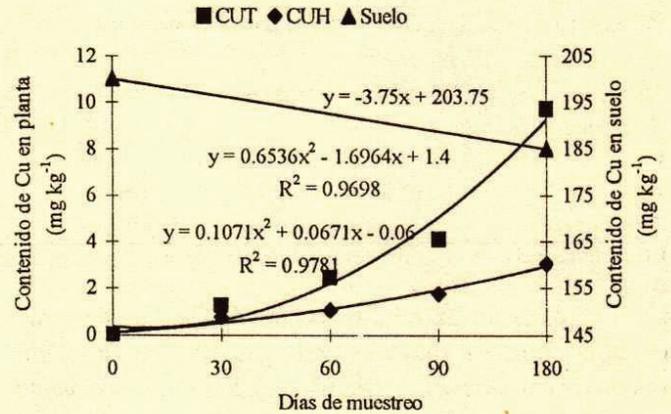
◆ CUT ■ CUH ▲ Suelo



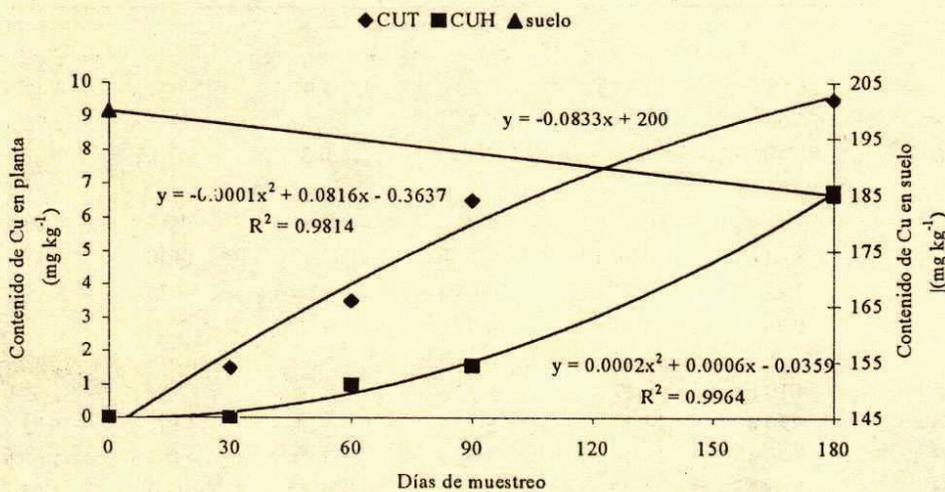
(b) Suelo estéril con 20 mg de Cu por kg de suelo



(c) Suelo estéril con 200 mg de Cu por kg de suelo



(d) Suelo estéril con 200 mg de Cu por kg de suelo más *Glomus intraradices* y *Rhizobium*



(e) Suelo estéril con 200 mg de Cu por kg de suelo más *Glomus sp. Zac 19*

CUT: contenido de cobre en tallo; CUH: contenido de cobre en hojas; Suelo: contenido de Cu en suelo
 Y = contenido de Cu, en planta o suelo, x = días de muestreo y R²= coeficiente de determinación

Figura 2. Absorción de Cu²⁺ por plantas de *Leucaena leucocephala* en suelo estéril contaminado y tratado con Cu²⁺ proveniente del río Lerma, estado de México.

Cuadro 1. Características agronómicas de *Leucaena leucocephala* asociada con *Glomus* spp. y *Rhizobium* en suelos contaminados y tratados con Cu provenientes del río Lerma, estado de México.

Factores y niveles	Altura	Ramas	Diámetro de tallo	Hojas por planta	Foliolos	Longitud de hoja	Ancho de hoja	Longitud de raíz
	cm	número	mm	- - - - número - - - -	- - - -	- - - -	cm - - - -	- - - -
Suelo (S)								
S. estéril	59.33 a	3.62 a	7.89 a	3.63 a	19.03 a	12.18 a	11.58 a	33.29 a
S. no estéril	59.26 a	3.62 a	7.60 a	3.72 a	19.20 a	12.15 a	12.40 a	31.69 a
DHS	1.36	0.11	0.43	0.13	0.93	1.16	1.05	1.69
Cobre								
0 mg kg ⁻¹	61.73 b	3.77 b	8.25 b	3.73 b	19.71 b	12.94 b	12.60 b	33.48 b
20 mg kg ⁻¹	65.02 a	4.04 a	9.23 a	3.99 a	21.36 a	15.40 a	15.04 a	36.42 a
200 mg kg ⁻¹	51.15 c	3.04 c	5.75 c	3.29 c	16.27 c	8.17 c	8.33 c	27.58 c
DHS	2.00	0.16	0.63	0.19	1.37	1.70	1.54	2.48
<i>Glomus</i> (G)								
Sin <i>Glomus</i>	51.25 b	2.92 b	5.54 b	3.13 b	15.33 b	8.10 b	8.47 b	26.60 b
<i>G. Zac- 19</i>	63.69 a	4.02 a	9.10 a	4.02 a	20.84 a	14.46 a	14.35 a	35.71 a
<i>G. intraradices</i>	62.97 a	3.92 a	8.58 a	3.86 a	21.16 a	13.94 a	13.15 a	35.17 a
DHS	2.00	0.16	0.63	0.19	1.37	1.70	1.54	2.48
<i>Rhizobium</i> (R)								
Sin <i>R</i>	56.58 b	3.42 b	7.03 b	3.57 b	17.68 b	10.60 b	10.88 b	29.89 b
Con <i>R</i>	62.01 a	3.81 a	8.46 a	3.82 a	20.55 a	13.74 a	13.11 a	35.09 a
DHS	1.36	0.11	0.43	0.13	0.93	1.16	1.05	1.69

DHS = diferencia significativa honesta. Medias con igual letra en la misma columna son estadísticamente iguales (Tukey, P < 0.05).

Cu kg⁻¹ de suelo en tallo y 3.05 mg de Cu kg⁻¹ de suelo en hoja) que en suelo estéril con 200 mg kg⁻¹ sin micorriza ni *Rhizobium* (Figura 2c). Esto fue congruente

con lo ocurrido en el suelo no estéril, en el cual el número de nódulos de *Rhizobium* fue significativamente mayor (P < 0.05) debido a la presencia de cepas nativas de

Cuadro 1. Continuación.

Factores y niveles	Volumen radical	Peso seco de hoja	Peso seco de tallo	Contenido Cu en tallo	Contenido Cu en hoja	Área foliar	Nódulos	Peso seco de nódulos
	cm ³	- - - - g - - - -	- - - -	- - - - mg kg ⁻¹ - - - -	- - - -	cm ²	número	mg
Suelo (S)								
S. estéril	160.63 a	6.68 a	13.33 a	5.48 a	3.97 a	927 a	4.19 b	0.0218 a
S. no estéril	151.29 a	6.66 a	13.23 a	5.36 a	3.69 a	962 a	5.75 a	0.0234 a
DHS	10.27	0.50	1.00	1.18	0.86	57.15	0.70	0.0053
Cobre								
0 mg kg ⁻¹	162.19 b	7.35 b	14.17 b	2.04 c	1.04 c	1031 b	6.03 a	0.0245 b
20 mg kg ⁻¹	179.77 a	8.44 a	16.92 a	4.17 b	2.42 b	1168 a	6.41 a	0.0335 a
200 mg kg ⁻¹	125.92 c	4.22 c	8.77 c	10.04 a	8.04 a	635 c	2.45 b	0.0096 c
DHS	15.08	0.74	1.47	1.74	1.27	83.91	1.03	0.0078
<i>Glomus</i> (G)								
Sin <i>Glomus</i>	109.15 b	4.10 b	8.47 b	5.67 a	4.08 a	624 b	4.32 b	0.0169 b
<i>G. Zac- 19</i>	181.85 a	8.20 a	16.29 a	5.17 a	3.58 a	1125 a	5.72 a	0.0268 a
<i>G. intraradices</i>	176.88 a	7.70 a	15.08 a	5.42 a	3.83 a	1184 a	4.87 b	0.0241 a
DHS	15.08	0.74	1.47	1.74	1.27	83.91	1.03	0.0078
<i>Rhizobium</i> (R)								
Sin <i>R</i>	135.38 b	5.86 b	11.68 b	5.39 b	3.75 a	829 b	2.29 b	0.0076 b
Con <i>R</i>	176.54 a	7.86 a	14.89 a	5.44 a	3.92 a	1060 a	7.64 a	0.0376 a
DHS	10.27	0.50	1.00	1.18	0.86	57.15	0.70	0.0053

DHS = diferencia significativa honesta. Medias con igual letra en la misma columna son estadísticamente iguales (Tukey, P < 0.05).

Rhizobium que contiene un suelo agrícola (Gardezi et al., 1990). Esto se asoció de manera negativa con una mayor absorción de Cu, tanto en tallo, como en hojas en términos numéricos (Cuadro 1).

Características Agronómicas

El Cuadro 1 presenta los resultados de las características agronómicas de *Leucaena leucocephala* asociada con *Glomus* spp. y *Rhizobium* en suelos contaminados y tratados con Cu. El análisis de varianza indica que no hubo diferencias significativas en todas las variables agronómicas evaluadas ($P < 0.05$) por efecto de suelo estéril y no estéril, excepto para la variable número de nódulos formados por cepas de bacterias de *Rhizobium*. Este resultado indica que la esterilización previa al experimento del suelo con bromuro de metilo disminuyó significativamente el número de nódulos al eliminar las cepas nativas que contiene un suelo agrícola (Gardezi et al., 1990) y no influyó sobre el resto de variables.

Asimismo, se encontró un efecto significativo de los niveles de los factores cobre, endomicorriza *Glomus* spp. y *Rhizobium* sobre todas las características de la planta de *Leucaena* evaluadas.

Cobre. Los resultados muestran diferencias significativas en el efecto de los tres niveles estudiados del factor Cu sobre todas las características de las plantas de *Leucaena* (Cuadro 1). La dosis de 20 mg de Cu kg⁻¹ de suelo mostró mayor efecto positivo que el contenido nativo en todas las características estudiadas, con excepción de las variables contenido de Cu en el tallo y en la hoja, mientras que la dosis de 200 mg de Cu kg⁻¹ de suelo mostró un mayor impacto negativo sobre las características agronómicas. Esto se explica porque el Cu es un elemento esencial para el desarrollo fisiológico de las plantas en dosis pequeñas (20 mg kg⁻¹), pero su absorción por las plantas de *Leucaena* se incrementa significativamente cuando su contenido en el suelo es alto (200 mg kg⁻¹), causando toxicidad.

Glomus. Con relación al factor hongo endomicorrízico arbuscular *Glomus* spp., los resultados muestran diferencias significativas ($P < 0.05$) en el efecto de los niveles estudiados sobre todas las características de las plantas de *Leucaena* (Cuadro 1), mostrando mayores valores con *Glomus* spp. que sin *Glomus*. Entre especies de hongos, el efecto del endófito *Glomus* sp. Zac-19 fue numéricamente mejor en comparación con *Glomus intraradices* en todas las características

agronómicas evaluadas, destacando su superioridad significativa ($P < 0.05$) en la variable número de nódulos y su inferioridad numérica en el contenido de Cu en tallo y hojas (Cuadro 1). Esto puede explicarse por la mayor proporción de colonización total promedio observada (47.3%) con *Glomus* sp. Zac-19 que con *Glomus intraradices* (42.3%). Por otro lado, se observó que a mayor contenido de Cu en el suelo, las plantas de *Leucaena* disminuyeron su tendencia a la absorción de Cu en presencia de *Glomus* (Figuras 2c y d) manteniendo sus características agronómicas, por lo que la inoculación con *Glomus* puede ser un componente de aprovechamiento y fitorremediación de suelos contaminados con Cu, además de la capacidad de absorción de P que estos hongos confieren a las plantas como *Acacia saligna* (Gardezi y Ferrera-Cerrato, 1989). **Rhizobium.** Los resultados muestran significativamente ($P < 0.05$) mayor valor en todas las características agronómicas evaluadas en las plantas de *Leucaena* inoculadas con *Rhizobium* que en las plantas no inoculadas (Cuadro 1) y menor acumulación de Cu en tallo más hojas con *Rhizobium* (12.75, Figura 2e) que sin *Rhizobium* (16.25, Figura 2d). Por lo que la inoculación con *Rhizobium* también puede ser un componente de fitorremediación en suelos contaminados con Cu, además de la capacidad ya conocida de fijación biológica de N que estas bacterias tienen (Gardezi et al., 1990).

Finalmente, cabe destacar que las plantas de *Leucaena* con mejores características agronómicas disminuyeron su tendencia a absorber Cu a medida que era mayor el contenido de Cu en el suelo, en presencia simultánea de *Glomus* spp. y *Rhizobium* (Figura 2e), lo que demuestra un efecto interactivo positivo de la doble inoculación endomicorriza más *Rhizobium* en la absorción de Cu por las plantas de *Leucaena* e incrementa su papel conjunto en la fitorremediación de suelos agrícolas contaminados por Cu. El efecto biorremediador de la triada de hongos-bacteria-planta de *Leucaena leucocephala* representa un componente importante en el balance de entradas y salidas de elementos potencialmente tóxicos en los suelos agrícolas, desde el punto de vista de la ingeniería ambiental.

CONCLUSIONES

Las dosis bajas de cobre estimulan el crecimiento de la planta de *Leucaena leucocephala*, pero las dosis altas causan un efecto tóxico. En la parte aérea, las hojas

acumulan menor contenido de cobre que los tallos, lo cual disminuye en ambos órganos en especial en presencia de hongos micorrízicos y *Rhizobium*. Esto puede ayudar a diseñar estrategias con fines de aprovechamiento y fitorremediación, por lo que se sugiere la doble inoculación con *Glomus* spp. y *Rhizobium* en *Leucaena leucocephala* como parte del manejo de suelos agrícolas contaminados para su aprovechamiento en la producción de biomasa aun con altos contenidos de cobre.

LITERATURA CITADA

- Ahumada, I., J. Mendoza, e I. Ascar. 1999. Sequential extraction of heavy metals in soil irrigated with wastewater. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 30: 1507-1519.
- Dahlin, S., E. Witter, A. Martensson, A. Turner y E. Baath. 1997. Where's the limit? Changes in the microbiological properties of agricultural soils at low levels of metal contamination. *Soil Biol. Biochem.* 29 (9/10): 1405-1415.
- Davies Jr., F. T., J. T. Puryear, R. J. Newton, J. N. Egilla, y J. A. S. Grossi. 2001. Mycorrhizal fungus enhance accumulation and tolerance of chromium in sunflower (*Helianthus annuus*). *J. Plant Physiol.* 158: 777-786.
- Dev, A., R. K. Gour, R. K. Jain, P. S. Bisen y L. K. Sengupta. 1997. Effect of vesicular arbuscular mycorrhiza-*Rhizobium* inoculation interaction on heavy metal (Cu, Zn and Fe) uptake in soybean (*Glycine max* var. JS-335) under variable P doses. *Int. J. Trop. Agric.* 15 (1-4): 75-79.
- Fassbender, H. W. y E. Bornemisza. 1987. Química de suelos con énfasis en suelos de América Latina. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica.
- George, E., V. Romheld y H. Marschner. 1994. Contribution of mycorrhizal fungi to micronutrient uptake by plants. pp. 93-109. In: J. A. Manthey, D. E. Crowley y D. G. Luster (eds.). *Biochemistry of metal micronutrients in the rhizosphere*. CRC Press. Boca Raton, FL, USA.
- Gerdermann, J. W. y T. H. Nicolson. 1963. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *British Mycological Soc.* 46: 235-244.
- Gardezi, A. K. y R. Ferrera-Cerrato. 1989. The effect of four levels of phosphorus on mycorrhizal colonization, dry root weight, and nitrogen and phosphorus content of *Acacia saligna* inoculated with *Rhizobium* sp. and endomycorrhiza in a Mexican andosol. *Nitrogen Fixing Tree Res. Rep.* 7: 43-45.
- Gardezi, A. K., R. Ferrera-Cerrato, J. Kohashi-Shibata, E. M. Engleman y M. Larqué-Saavedra. 1990. Potencial diferentes variedades de *Phaseolus vulgaris* de alta eficiencia en la fijación de nitrógeno en asociación con *Rhizobium leguminosarum* Biovar *Phaseoli*. *Agrociencia* 1(4): 25-39.
- Gardezi, A. K., V. M. Cetina-Alcalá, D. Talavera-Magaña, R. Ferrera-Cerrato, F. Rodríguez-Neave y M. Larqué-Saavedra. 2000. Efecto de inoculación con endomicorriza arbuscular y dosis creciente de fertilización fosfatada en el crecimiento de Chapulixtle (*Dodonaea viscosa*). *Terra* 18: 153-159.
- Habte, M. y T. Aziz. 1991. Relative importance of Ca, N, and P in enhancing mycorrhizal activity in *Leucaena leucocephala* grown in an oxysol subjected to simulated erosion. *J. Plant Nutr.* 14: 429-442.
- Kabala, C. y B. Ram Singh. 2001. Fractionation and mobility of copper, lead, and zinc in soil profiles in the vicinity of a copper smelter. *J. Environ. Qual.* 30: 485-492.
- Kabata-Pendias, A. y H. Pendias. 1986. Trace elements in soils and plants. CRC Press. Boca Raton, FL, USA.
- Kabata-Pendias, A. y H. Pendias. 1992. Trace element in soils and plants. 2nd ed. CRC Press. Boca Raton, FL, USA.
- Singh, B. R. 1997. Soil pollution and contamination. pp. 279-299. In: R. Lal (ed.). *Methods for assesment of soil degradation*. CRC Press. Boca Raton, FL, USA.
- Smith, S. R. 1991. Effects of sewage sludge application on soil microbial processes and soil fertility. *Adv. Soil Sci.* 16: 191-212.
- Smith, S. E. y D. J. Read. 1997. Mycorrhizal symbiosis. Structure and development of ectomycorrhizal roots. Academic Press. San Diego, CA, USA.
- Tarafdar, J. C. y A. V. Rao. 1997. Response of arid legumes to VAM fungal inoculation. *Symbiosis-Revohot.* 22: 265-274.
- Urzua, H., P. Muñoz y F. Borie. 1993. Efecto de micorrizas V-A sobre la fijación de N₂ en trébol blanco en suelos de la zona sur de Chile. *Ciencia e Investigación Agraria* 20: 47-54.
- Zhenbin, L. y L. M. Shuman. 1996. Heavy metal movement in metal-contaminated soil profiles. *Soil Sci.* 161: 656-666.