

¿Es funcional la biorremediación en la eliminación de níquel en un suelo contaminado?

Jesica Araceli Alonso-Arena¹, Adriana Carbajal-Armenta¹, Dolores Castañeda-Antonio^{2*}, Yolanda Elizabeth Morales-García², María del Rocío Bustillos-Cristales², Paulina Itzel Morales-Sandoval³, Juana Deysi Santamaría-Juárez⁴, Ricardo Munguía-Pérez².

¹Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). Edificio Multilaboratorios 6, Ciudad Universitaria, San Manuel, Puebla, México. C.P. 72570.

²ICUAP (Instituto de Ciencias Universidad Autónoma de Puebla)- Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana. Ciudad Universitaria, San Manuel, Puebla, México. C.P. 72570.

*lolisjessy@yahoo.com.mx

³Jardín Botánico Universitario, BUAP. Ciudad Universitaria, San Manuel, Puebla, México. C.P. 72570.

⁴Facultad de Ingeniería Química. Laboratorio de análisis Instrumental. 18 sur y Av. San Claudio. C.P. 72590

Alonso-Arena, J.A., Carbajal-Armenta, A., Castañeda-Antonio D.*, Morales-García Y.E., Bustillos-Cristales M.R., Morales-Sandoval P. I., Santamaría-Juárez J.D., Munguía-Pérez R., ¿Es funcional la biorremediación en la eliminación de níquel en un suelo contaminado?

Artículo Original

Alianzas y Tendencias-BUAP. 2019, 4 (14): 30-48.

Recibido: 30 mayo 2019.

Aceptado: 12 junio 2019.

RESUMEN

La contaminación por metales pesados representa un problema creciente en la cultura industrializada. Representan una amenaza biológica, pues no son biodegradables, aunque existen mecanismos que poseen los organismos para acumular, trasladar, transformar, inmovilizar o estabilizarlos. El níquel es un metal pesado presente en descargas mineras, en la industria de la fundición, refinación de elementos metálicos, entre otras. Es conocido que la asociación de plantas con algunas bacterias benéficas ayuda a las plantas a tolerar niveles de estrés como la contaminación por metales pesados. En el presente trabajo se propuso remediar suelo contaminado con níquel, con ayuda de *Medicago sativa*, una planta hiperacumuladora, en asociación con la cepa promotora de crecimiento y biorremediadora *Pseudomonas putida* KT2440. Se establecieron tratamientos semi-hidropónicos donde se trasplantaron germinados de *M. sativa* inoculados y no con la cepa bacteriana. Se determinó la concentración del metal en el suelo a distintos tiempos de tratamiento por medio de espectrofotometría de absorción atómica. La cepa bacteriana, 15 días posteriores al montaje del experimento, no fue posible detectarla, tampoco se observó tolerancia al estrés por la planta. Sin embargo, hubo un establecimiento prolífico de hongos y los ensayos de absorción atómica revelan una disminución significativa en los niveles de concentración de níquel en el suelo.

Palabras clave: Contaminación de suelo, *Medicago sativa*, Metales pesados, Microorganismos mesófilos, Plantas hiperacumuladoras, *Pseudomona putida* KT2440.

ABSTRACT

Heavy metal pollution represents a growing problem in the industrialized culture. They represent a biological threat, because they are not biodegradable, although there are mechanisms that the organisms possess to accumulate, translocate, transform, immobilize or stabilize them. Nickel is a heavy metal present in mining discharges, in the foundry industry, refining of metallic elements, among others. It is known that the association of plants with some beneficial bacteria helps plants to tolerate stress levels such as heavy metal contamination. In the present work it was proposed to remedy soil contaminated with nickel, with the help of *Medicago sativa*, a hyperaccumulating plant, in association with the growth promoter and bioremediator strain *P. putida* KT2440. Semi-hydroponic treatments were established where germinated *M. sativa* inoculated were transplanted and not with the bacterial strain. The concentration of the metal in the soil at different treatment times was determined by means of atomic absorption spectrophotometry. The bacterial strain, 15 days after the assembly of the experiment, it was not possible to detect it, nor was tolerance to stress by the plant observed. However, there was a prolific establishment of fungi and the atomic absorption

tests reveal a significant decrease in the concentration levels of nickel in the soil.

Keywords: Heavy metals, Hyperaccumulative plants, *Medicago sativa*, Mesophilic microorganisms, *Pseudomona putida* KT2440, contaminated soil.

INTRODUCCIÓN

La contaminación por metales pesados es un problema que ha ido en aumento en los últimos años debido al incremento en las actividades antropogénicas tales como la minería, la metalurgia, la agricultura o el aumento en el número de vehículos que transitan por México [1]. Esta contaminación es debida a dispersión de sólidos, líquidos o partículas finas liberadas a la atmósfera que entonces se depositan en cuerpos de agua, sedimentos y suelos [2].

Entre los contaminantes, el níquel es uno de los metales pesados presentes en descargas mineras, en la industria de la fundición, refinación de elementos metálicos, entre otras industrias que utilizan este metal como materia prima. Su presencia en lodos residuales utilizados como fertilizantes es una de las causas de la contaminación en suelos y plantas [2].

Está reportado, desde 1988, que el níquel es un elemento esencial para las plantas [3] pero de igual forma es fitotóxico cuando está presente en altas concentraciones [4] al igual que disminuye la biodisponibilidad de otros nutrientes necesarios para la absorción y translocación a los diferentes

órganos de las plantas provocando deficiencias serias en su crecimiento y desarrollo [5].

Algunas plantas son capaces de acumular grandes cantidades de metales pesados, y se les conocen como "hiperacumuladoras" [6]. Estas generalmente tienen poca biomasa debido a que utilizan más energía en los mecanismos que son necesarios para adaptarse a las altas concentraciones de metal en sus tejidos [7]. Esta capacidad varía dependiendo de la especie vegetal y su metabolismo, el metal pesado, el suelo de cultivo y la interacción planta-raíz-metal [8].

Asimismo, los microorganismos son vitales en la transformación de compuestos ya que influyen en su biodisponibilidad y remediación, pueden alterar la toxicidad, solubilidad en agua y la movilidad del elemento [9]. Los microorganismos modifican la concentración de metales pesados en el ambiente, ya que cuentan con mecanismos enzimáticos y no enzimáticos para remover metales en suspensión [10]. Entre las transformaciones enzimáticas de los metales realizadas por microorganismos se encuentran la oxidación, reducción, metilación y desmetilación, las cuales como resultado pueden dar compuestos poco solubles en agua o compuestos volátiles [11].

En base a lo anterior y en un esfuerzo por comprender mejor las bases fisiológicas de la toxicidad del níquel en los diferentes ensayos, el objetivo de este trabajo fue: evaluar el efecto del níquel a 3000 ppm sobre la especie *Medicago sativa* L., la capacidad de *P. putida* KT2440 de

crecer en suelo contaminado con níquel y la simbiosis entre la planta y la bacteria para la eliminación del metal pesado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo de suelo.

El procedimiento de muestreo se llevó a cabo de la siguiente manera: Se seleccionaron 3 puntos de muestreo de forma aleatoria (Figura 1) dentro de Ciudad Universitaria de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).

- En cada uno de los tres puntos, se tomó, con ayuda de una espátula y un bieldo pequeños, aproximadamente 1 kg de suelo y se depositó en una tina de plástico limpia. En total se obtuvo un peso de muestra compuesta de aproximadamente 3 kg de suelo.
- Posteriormente, se tamizó la muestra de suelo con ayuda de coladores de plástico. Una vez tamizada la muestra compuesta, se colocó en bolsas de plástico y se transportó al laboratorio.

Determinación de pH.

La medición de pH del suelo se llevó a cabo siguiendo algunos de los lineamientos de la NOM-021-RECNAT-2000 que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos.

Se determinó el pH con un potenciómetro portátil (USA, ATC). Se obtuvo una muestra compuesta total de 1g de suelo de cada uno de los

tratamientos (Suelo sin contaminar, suelo con níquel, suelo con níquel + *M. sativa*, suelo con níquel + *P. putida* KT2440, suelo con níquel + *M. sativa* + *P. putida* KT2440). Por separado cada gramo de muestra compuesta se colocó en un recipiente plástico y se añadieron 10 mL de agua destilada. Se mantuvieron en agitación constante a intervalos de 5 minutos durante media hora. Se dejó reposar 15 minutos y se procedió a tomar la medida con el potenciómetro.

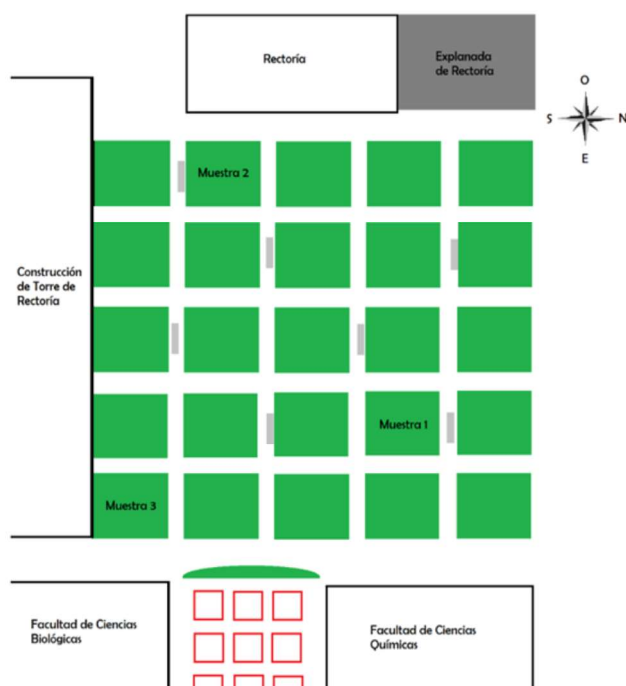


Figura 1. Croquis de la zona de muestreo en Ciudad Universitaria BUAP.

Determinación de materia orgánica del suelo.

La determinación de la materia orgánica del suelo muestreado se evaluó de acuerdo con la NOM-021-RECNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudios, análisis y muestreo.

La NOM propone el método Walkley y Black, este método detecta entre un 70-80% del carbono orgánico total, más un factor de corrección variable para cada tipo de suelo. En México, dicho factor es de 1.298.

Tabla 1. Clasificación del suelo de acuerdo con su pH extraído en conformidad con la NOM 021 RECNAT 2000

Clasificación	pH
Fuertemente ácido	< 5.0
Moderadamente ácido	5.1-6.5
Neutro	6.6-7.3
Medianamente alcalino	7.4-8.5
Fuertemente alcalino	>8.5

Primeramente, se pesaron 0.25 g de suelo seco y se colocaron en un matraz de 500 mL, se procesó un blanco a la par. Se adicionaron 5 mL de $K_2Cr_2O_7$ y se mezcló con el objetivo de que entrase en contacto con toda la muestra de suelo. Se agregaron 10 mL de H_2SO_4 por las paredes. Se agitó por 1 minuto y posteriormente se dejó reposar 30 min. Una vez pasado el tiempo de reposos, se añadieron 10 mL de agua destilada, se agregaron 2.5 mL de H_3PO_4 concentrado, y 5 gotas de indicador difenilamina. Por último, se procedió a titular con $FeSO_4$ gota a gota con ayuda de una bureta hasta observar el viraje a color esmeralda.

De acuerdo con la NOM-021-RECNAT-2000,

$$\%C \text{ orgánico} = ((B-T)/g)(N)(0.39) \text{ mcf}$$

Germinación de semillas de alfalfa (*Medicago sativa* L.).

Con el objetivo de obtener germinados de la planta *M. sativa* y poder utilizarla como modelo de biorremediación de níquel en este experimento, se seleccionaron 66 semillas, cuyo primer filtro de selección fue dejarlas en agua para descartar aquellas que flotaran debido a algún daño físico de la semilla. Se llevó a cabo en condiciones de esterilidad bajo campana de flujo laminar, un proceso de desinfección con lavados con etanol al 70% y con NaClO al 0.15% [12].

Una vez realizada la desinfección, se procedió a colocar, en una placa Petri, algodón estéril y se humedeció con agua en la misma condición. Se colocaron de 15 a 20 semillas de alfalfa en cada caja con ayuda de pinzas estériles, y se sellaron. Por último, se incubaron en oscuridad a 30°C durante 6 días [12].

Cuenta total de microorganismos mesófilos.

Se tomó 1 gramo de muestra compuesta de cada uno de los tratamientos. Se homogenizó en 9 mL de agua destilada estéril y se procedió a realizar diluciones 1:10 de las mismas. Anteriormente, se había preparado medio sólido para "Método estándar" que se dejó enfriar sin gelificar. En cajas Petri estériles se inoculó 1 mL de las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} de cada uno de los tratamientos. Posteriormente se agregó el medio que se encontraba a una temperatura templada y se homogenizó con el inóculo (6 giros en sentido de las manecillas del reloj y 6 giros en sentido

donde:

B=Volumen de sulfato ferroso gastado para valorar el blanco de reactivos (mL)

T=Volumen de sulfato ferroso gastado para valorar la muestra (mL)

N=Normalidad exacta del sulfato ferroso

g=Peso de la muestra empleada

mcf= $1/0.77=1.298$

mfc es el factor de corrección de humedad, ya que como con este procedimiento se detecta entre un 70-84% del carbono orgánico total, es necesario introducir este factor de corrección, el cual puede variar entre suelo y suelo de acuerdo con la condición geográfica. Finalmente se compara con la tabla 2 para establecer la clasificación de materia orgánica.

Tabla 2. Valores de referencia para clasificar la concentración de la materia orgánica en los suelos minerales y volcánicos.

Clase	Materia orgánica (%)	
	Suelos volcánicos	Suelos no volcánicos
Muy bajo	<4.0	<0.5
Bajo	4.1-6.0	0.6-1.5
Medio	6.1-10.9	1.6-3.5
Alto	11.0-16.0	3.6-6.0
Muy alto	>16.1	>6.0

contrario a las manecillas del reloj)), y se dejó gelificar el medio. Todo esto bajo condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar. Por último, se incubaron por 72 horas a 30°C, con monitoreo cada 24 h [15].

Análisis de la concentración de níquel por espectrofotometría de absorción atómica.

De acuerdo con la NOM-147-SEMARNAT/SSAI-2004 que establece los criterios para determinar las concentraciones de metales en suelos contaminados con arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio, se debe llevar a cabo una digestión ácida de la muestra para poder medir la concentración del metal de interés en un espectrofotómetro de absorción atómica (marca PerkinElmer *AAnalyst 400*). El procedimiento modificado se describe en la figura 2.

Cálculo para la concentración de Níquel

$$Ni = (X) (\text{factor de dilución}) (0.05)/0.001$$

donde

X = concentración en mL/L

Factor de dilución = 1

0.05 = volumen de aforo en L (50 mL)

0.001 = muestra digestada en Kg (1 g)

Diseño experimental

Preparación de la cepa.

La cepa *P. putida* KT2440 fue sembrada en medio de cultivo sólido Luria Bertani con una concentración de 100 µg/mL de antibiótico

Cloranfenicol. La cepa fue resembrada de forma masiva. Se incubó durante 24 horas a 30 °C.

A las 24 horas, se prosiguió a recoger el crecimiento en la placa mediante la adición de 5 mL de agua destilada estéril y un posterior raspado sobre la placa para recolectar todo el crecimiento de la cepa sobre la placa. Se transfirió el raspado de la placa a un tubo Falcon estéril de 50 mL y se aforó la solución bacteriana hasta 40 mL con agua destilada estéril [32].

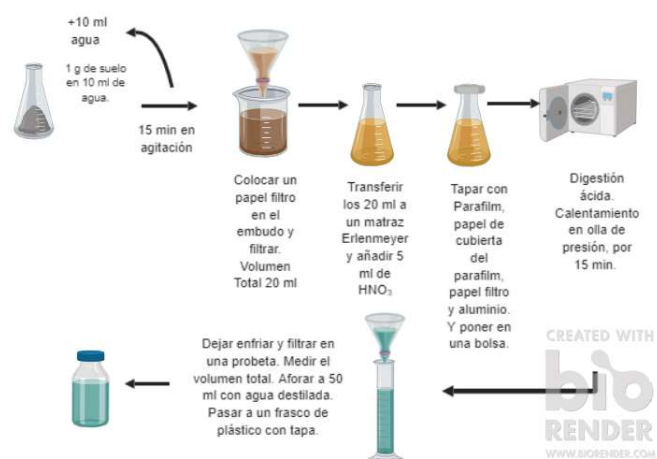


Figura 2. Procedimiento para llevar a cabo la digestión ácida de las muestras de suelo. Elaboración propia con herramienta didáctica Biorender (<https://app.biorender.com/>)

Preparación de las Jarras de Leonard.

Para montar el experimento, se eligió el sistema hidropónico conocido como Jarras de Leonard [13], con algunas modificaciones. Dado que el suelo resultó ser rico en materia orgánica, la parte inferior de la botella se utilizó para sistema de drenaje. Las Jarras de Leonard se prepararon con botellas PET de 1.5 L cortadas a la mitad. Se les colocó una cuerda de algodón como conexión

entre la parte superior e inferior y se colocó una gasa de algodón en la boquilla para detener la cuenda. Se esterilizaron por 20 minutos en luz UV en condiciones de flujo laminar [14].

Contaminación de suelo.

De acuerdo con la NOM-147-SEMARNAT/SSAI-2004, que establece los criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados con arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio, el límite máximo permisible de concentración de níquel en suelo para uso agrícola comercial es de 1600 mg/Kg, mientras que, para uso industrial, el límite máximo permisible es de 20000 mg/Kg.

Primeramente, el suelo muestreado y tamizado se esterilizó a 15 libras de presión y 121 °C por 15 minutos. Se preparó 1L de una solución de 3000 ppm de NiSO₄ con agua destilada estéril en condiciones de esterilidad bajo campana de flujo laminar. Posteriormente se procedió a agregar 100 mL de la solución contaminante a 10 de las 13 jarras que contenían un volumen de 200 cm³ de suelo, de acuerdo con la tabla 3. Cabe aclarar que 3 jarras con 200 cm³ de suelo, no se les adicionó solución contaminante se usaron como control.

A cada una de las jarras de Leonard preparadas previamente, se les agregó un volumen de 200 cm³ de suelo. Se les agregó 100 mL de la solución de NiSO₄ a 10 de las jarras y se dejó impregnar el suelo por dos días. Posteriormente, se trasplantaron 3 germinados de *M. sativa*, en cada

una de las botellas destinadas a tratamiento con planta como se indica en la tabla 3: (suelo + *M. sativa*, suelo + níquel + *M. sativa*, suelo + níquel + *P. putida* KT2440 + *M. sativa*). Con respecto a los tratamientos con la cepa KT2440, se añadieron 9 mL por jarra a los tratamientos de Suelo + *P. putida* KT2440, suelo + níquel + *P. putida* KT2440, suelo + níquel + *P. putida* KT2440 + *M. sativa* . En los tratamientos con planta en combinación con la cepa bacteriana, se trasplantó primero el germinado, y la cepa bacteriana se añadió posteriormente en los puntos donde se colocó el germinado [14].

Tabla 3. Número de réplicas por tratamiento

Tratamiento	Número de réplicas
Suelo sin contaminar (blanco)	3
Suelo + níquel	3
Suelo + <i>P. putida</i> KT2440	3
Suelo + <i>M. sativa</i>	3
Suelo + níquel + <i>P. putida</i> KT2440	3
Suelo + níquel + <i>M. sativa</i>	3
Suelo + níquel + <i>P. putida</i> KT2440 + <i>M. sativa</i>	3

Montaje de los ensayos.

El montaje de las jarras de Leonard y de los trece ensayos se puede observar en la figura 3.

Determinación de materia orgánica del suelo.

Ejemplo de cálculo:

$$\%C \text{ orgánico suelo} =$$

$$((9\text{ml}-6.1)/0.25\text{g})(1N)(0.39)(1/0.77)=5.872 \%$$

Para obtener el % de materia orgánica, se multiplica el % C por el factor 1.724, que es el factor de relación de contenido de carbono en la materia orgánica

$$\% \text{materia orgánica} = (\%C \text{ orgánico})(1.724)$$

$$\% \text{materia orgánica suelo} = (5.8721\%)(1.724)$$

$$\% \text{materia orgánica suelo} = 10.123\%$$

De acuerdo con los resultados obtenidos, el suelo analizado contiene un 10.123% de materia orgánica, lo cual, de acuerdo con la NOM-021-RECNAT-2000, indican que es un suelo con muy alto contenido de materia orgánica.

Porcentaje de germinación de semillas de alfalfa (*Medicago sativa* L.) y supervivencia a condiciones de estrés por contaminación con níquel.

De las 66 semillas puestas a germinar, únicamente germinaron 48 semillas (Figura 4), obteniéndose así un porcentaje de germinación de 72.72%.

Ningún germinado de alfalfa, una vez trasplantado a suelo contaminado, logró desarrollar hojas verdaderas ni sobrevivió como en el ensayo mostrado en la figura 5 y 6. Se observó supervivencia a los 7 días, pero no desarrollo ni crecimiento de la plántula.



Figura 3. Jarras de Leonard realizadas con botellas PET de 1 L.

RESULTADOS

Determinación de pH.

Los resultados obtenidos en la medición de pH para cada muestra compuesta de cada tratamiento se resumen en la tabla 4, destacando que el suelo se acidifica en presencia de la solución de Níquel.

Tabla 4. Resultados de pH de las muestras de suelo de cada tratamiento.

Tratamiento de suelo	pH	Clasificación de la muestra de suelo de acuerdo con la NOM 0021 RECNAT 2000
Suelo limpio	7.5	Medianamente alcalino
Suelo con Níquel	6.6	Neutro
Níquel + <i>P. putida</i> KT2440	6.4	Moderadamente ácido
Níquel + <i>M. sativa</i>	6.5	Moderadamente ácido
Níquel + <i>M. sativa</i> + <i>P. putida</i> KT2440	6.6	Neutro

Cuenta total de microorganismos mesófilos.

Se monitoreó el crecimiento de *P. putida* KT2440 en placas a las 24 horas sin observar crecimiento. A las 48 horas se observó ligero crecimiento en algunas de las placas. Finalmente, a las 72 horas, se observó fácilmente el crecimiento en las placas. En la figura 7, se muestran las diluciones inoculadas del ensayo que únicamente contenía suelo con níquel. Se observaron únicamente morfologías filamentosas, circulares, blanquecinas, lo que sugiere la presencia de hongos. Estos no fueron identificados, sin embargo, en ambas diluciones se muestran morfologías similares.



Figura 4. Germinados de *M. sativa* a 3 días posteriores al montaje.



Figura 5. (5a) El tratamiento de suelo con níquel + *Medicago sativa* + *P. putida* KT2440 el primer día del montaje. (5b) Una semana después. (5c) A las cuatro semanas del montaje, los germinados no lograron sobrevivir.

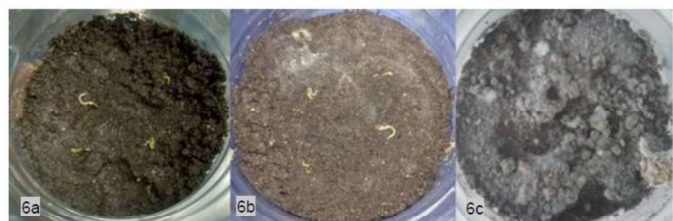


Figura 6. (6a) Se observa el tratamiento de suelo con níquel + *Medicago sativa* el primer día del montaje. (6b) Una semana después, se comienza a ver la formación de una película de hongo. (6c) Se muestra que después de cuatro semanas del montaje los germinados no sobrevivieron

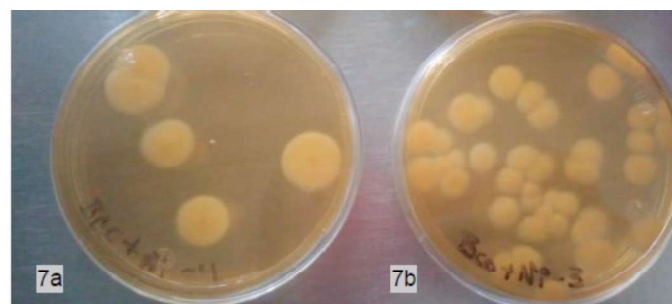


Figura 7. (7a) Se observa la dilución 10^{-4} de la muestra de suelo sin contaminar. Únicamente se observan 4 UFC con morfología de hongo. (7b) La dilución 10^{-3} , igualmente sólo se observa morfología de hongos, 39 UFC.

El ensayo de suelo contaminado con níquel e inoculado con la cepa *P. putida* KT2440 (Figura 8), mostró presencia de crecimiento filamentosos, aunque no se logra apreciar crecimiento de morfologías de origen bacteriano, lo que sugiere que la cepa inoculada no se logró recuperar a los 15 días posteriores del tratamiento.

En el ensayo tratado con la planta y la cepa *P. putida* KT2440, se obtuvo crecimiento en su mayoría de hongos filamentosos, observando la presencia de una colonia de aspecto bacteriano, sin embargo, la morfología de la colonia no coincide con la cepa inoculada, por tal motivo no se realizó una resiembra en medio selectivo.

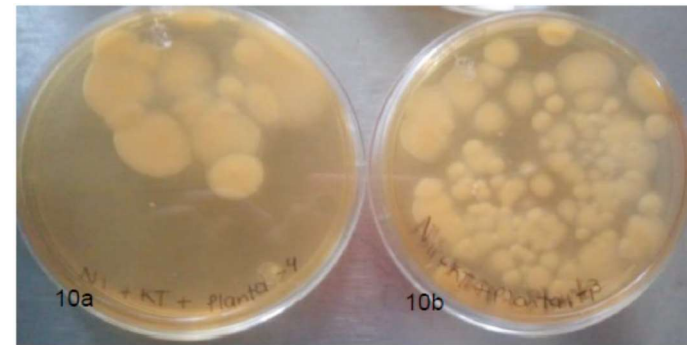


Figura 10. Tratamiento de suelo contaminado con níquel más el germinado de *M. sativa* e inoculado con la cepa *P. putida* KT2440. (10a) dilución 10^{-4} , y (10b) dilución 10^{-3} . No se logra observar presencia de colonias bacterianas de la cepa buscada, por lo que se asume que la cepa no fue capaz de sobrevivir tampoco en este tratamiento.

Tabla 5. Número de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) obtenidas por cuenta total.

Tratamiento	Dilución 10^{-3}	Dilución 10^{-4}
Suelo +Ni	7.8×10^4	8×10^4
Suelo + Ni+ <i>KT2440</i>	Incontables	Incontables
Suelo + Ni+ <i>M. sativa</i>	1.72×10^5	2.8×10^5
Suelo + Ni+ <i>M. sativa</i> + <i>KT2440</i>	2×10^5	3.4×10^5

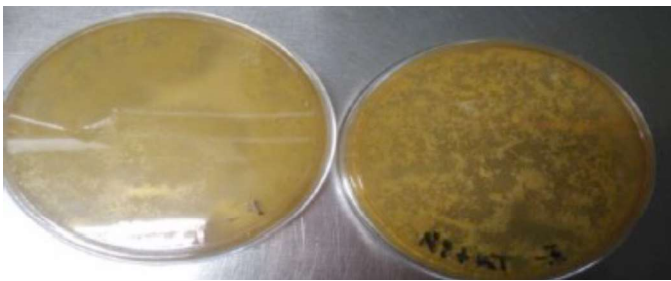


Figura 8. Muestra de suelo contaminado con níquel, inoculado con la cepa *Pseudomonas putida* KT2440. No se logró obtener un conteo viable, ya que no se observaron colonias bacterianas aisladamente, invadidas por micelios, indicando que la cepa no logró sobrevivir a los 15 días.

En el tratamiento donde se trasplantó *M. sativa*, se observó mayor diversidad de morfologías (Figura 9), entre las que se encuentran hongos en su mayoría filamentosos (colonias circulares, colores blancos y algunos con centro café), y en menor proporción colonias de aspecto levaduriforme (aspecto mucoide, de colores blanco y crema). También se pudieron observar colonias más pequeñas que aparentemente pueden ser de origen bacteriano.



Figura 9. Tratamiento de suelo contaminado con níquel más la planta *Medicago sativa*, se observan tanto colonias bacterianas como de hongos. (9a) Dilución 10^{-4} , con 11 UFC tanto bacterianas como de hongos. (9b) Dilución 10^{-3} , con una densidad mayor de UFC, tanto bacterianas como de hongos.

En la tabla 5, se muestran las UFC/mL de cada uno de los tratamientos.

Concentración de níquel por absorción atómica.

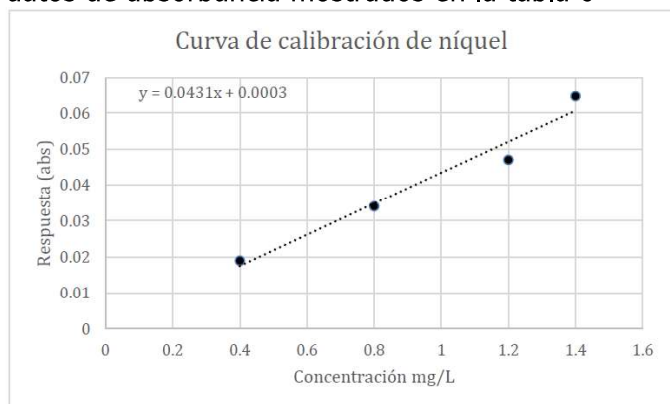
Una vez que las muestras de cada ensayo al día 60 de montaje, ya habían sido sometidas al proceso de digestión ácida se prosiguió al análisis por medio espectrofotómetro de absorción atómica.

Una curva estándar de concentraciones específicas de níquel fue realizada (Tabla 6, Gráfico 1).

Tabla 6. Valores de para la curva estándar de calibración.

Concentración de Níquel (mg/L)	Absorbancia
0.4	0.019
0.8	0.034
1.2	0.047
1.4	0.065

Gráfico 1. Curva de calibración realizada con los datos de absorbancia mostrados en la tabla 6



En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos en la cuantificación de níquel al inicio y final del experimento (día 2 y día 60).

Tabla 7. Concentración de níquel (ppm)

Ensayo	Concentración inicial de Ni	Concentración final de Ni
1. Níquel + <i>M. sativa</i>	115.599	66.916
2. Níquel + <i>P. putida</i> KT2440	5367.642	28.664
3. Níquel + <i>M. sativa</i> + <i>P. putida</i> KT2440	7228.055	53.006

Se llevaron a cabo los cálculos con cada uno de los ensayos para determinar la concentración de metal en las muestras.

Ejemplo de cálculo:

$$[Ni] = (2.312)(0.005)/0.001 = 115.599 \text{ mg/Kg}$$

DISCUSIÓN

Determinación de Materia Orgánica

El suelo analizado contiene un 10.123% de materia orgánica, lo cual, de acuerdo con los datos proporcionados por la NOM-021-RECNAT-2000, indican que es un suelo con muy alto contenido de materia orgánica. Lo cual lo hace un excelente sustrato para el desarrollo de las plantas *M. sativa* utilizada en este experimento. La alta presencia de materia orgánica puede deberse a que el lugar de muestreo fue una zona en la que se encontraban plantas ornamentales, además de encontrarse anexo a una obra en construcción, lo cual pudo haber contribuido a la presencia de materiales finos, principalmente arcillas silicatadas, como vermiculita y montmorillonita, que afecten el nivel de oxidación del carbono debido a la formación de

microagregados estables que protegen la materia orgánica.

Sin embargo, estos tipos de determinación de la materia orgánica están sujetos a interferencias provocadas por algunos constituyentes del suelo siempre y cuando se encuentren en cantidades elevadas. Se ha reportado que la presencia significativa de iones cloruros o iones ferrosos sobreestimarían el monóxido de carbono (CO) mientras que los nitratos provocarían el efecto inverso dando valores bajos de CO [16]. En cuanto al nitrato sólo interfieren cuando la concentración excede el 5 % del contenido de carbono. Por otro lado, la presencia de calcáreo en los suelos podría neutralizar la acidez del medio, pero algunos ensayos con contenidos de carbonatos de hasta el 50% p/p no afectan la determinación [16].

Cuenta total de microorganismos mesófilos

Los suelos son ecosistemas naturales con altas concentraciones de metales pesados como níquel, cromo y cobalto, además de una baja concentración de micronutrientes como fósforo, nitrógeno, potasio, calcio y altos niveles de erosión. Esto hace que dichos ambientes sean considerados extremos para muchas especies de microorganismos y plantas. En esto radica la importancia de identificar y caracterizar microorganismos capaces de resistir la presencia de níquel, podrían considerarse buenos candidatos para procesos de biorremediación de suelos contaminados por metales pesados [19, 20]. La resistencia de las bacterias a metales pesados está

dada por la intervención de múltiples sistemas genéticos con especificidad de sustrato diferentes, pero que comparten las mismas funciones. Estos sistemas están ampliamente distribuidos y contribuyen en la defensa elemental de la célula frente a metales potencialmente dañinos, así como frente a las especies que estos producen al interactuar con los componentes celulares [20]. Por otro lado, existen otros sistemas de resistencia muy especializados y se encuentran solo en algunas especies bacterianas, confiriéndoles la capacidad de resistencia a metales pesados [20]. Los géneros *Alcaligenes*, *Klebsiella*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Acidiphilum*, son los géneros con resistencia a níquel y cobalto más referidos [21,22].

La mayoría de los genes involucrados en los mecanismos de resistencia a metales se localizan en plásmidos por lo que la selección de nuevos géneros bacterianos con resistencia a níquel y cobalto puede estar dado por la característica de los plásmidos de transferirse de una cepa a otra, lo que posiblemente indica que faltó tiempo para de adaptación de la cepa ensayada [21, 22, 23].

La cepa *P. putida* KT2440, es una cepa ambiental ampliamente estudiada por su versatilidad metabólica y sus capacidades de resistencia y degradación de contaminantes, tanto orgánicos, como por su resistencia a metales pesados [18].

Está ampliamente reportado que varias cepas del *Pseudomona* son capaces de sintetizar fitohormonas que estimulan el crecimiento vegetal, como las auxinas, que estimulan el desarrollo

radicular [26]. Además, se ha demostrado que la respuesta a estrés de las plantas a metales pesados está mediada por fitohormonas como el ácido giberélico [25].

El conteo por método estándar de microorganismos mesófilos en cada uno de los ensayos arrojó que existen poblaciones fúngicas resistentes a la concentración de níquel, por otro lado, se detectaron en menor densidad cepas bacterianas, y únicamente en los ensayos de suelo contaminado con níquel tratado con la *M. sativa*, y en el ensayo tratado con *M. sativa* y *KT2440*. Esto puede deberse a que la interacción microorganismo-planta, en este caso, de la cepa *KT2440*, capaz de colonizar la rizósfera de plantas, pudo generar alguna relación simbiótica, sin embargo, hacen falta ensayos para poder concluir esto [24].

Por otro lado, la alta densidad poblacional de hongos detectada en los ensayos de suelo directamente evidenció que existen una gran cantidad de hongos con capacidad de resistir a altas concentraciones de níquel. La presencia de estos microorganismos posiblemente se debió a que los sistemas experimentales se tenían en zonas abiertas y estos hongos encontraron condiciones propicias para su desarrollo por lo que fácilmente se establecieron.

Supervivencia de *M. sativa* en el sistema de biorremediación

M. sativa ha sido catalogada como una planta capaz de establecer relaciones benéficas con rizobios y bacterias consideradas como promotoras

de crecimiento, además de que es considerada una planta hiperacumuladora. Es por esto por lo que fue propuesta como modelo para propuesta de biorremediación [32, 33, 34]. Por otro lado, la capacidad de resistencia de las plantas al estrés provocado por metales pesados se ve influenciado por el estadio de la planta, la edad, la presencia de fitohormonas, como el ácido giberélico, que inhibe efectos causados por metales pesados en germinados de plantas de arroz [25]. Por lo tanto, es posible que la presencia de dicha hormona no se encuentre en la concentración suficiente como para inhibir algunos efectos nocivos sobre la planta, pues en este estadio de desarrollo, son las auxinas las que llevan a cabo un rol muy importante en el desarrollo de la plántula, y debido a que la cepa *P. putida* *KT2440* es productora de auxinas como la hormona ácido-3-indolacético, se esperaría que la planta pudiera tener un mejor desarrollo, sin embargo, como la cepa bacteriana no se detectó posterior a la inoculación en ninguno de los ensayos inoculados con la cepa, se sugiere que no logró existir un establecimiento de la cepa bacteriana con *M. sativa* por lo que no sobrevivió a las condiciones de contaminación a esa concentración, por lo tanto, no hubo un desarrollo óptimo de la plántula [26, 35].

Concentración de níquel

La solubilidad de los metales depende de las características de suelo y están influenciadas directamente por el pH, este tiene un efecto en la movilidad de los metales pesados dentro del suelo,

bajo condiciones ácidas los metales son más móviles y por tanto más disponibles y al contrario, en condiciones básicas los cationes son adsorbidos a la superficie mineral o precipitados disminuyendo así la biodisponibilidad de los metales; aunado a esto los metales del suelo existen como iones metálicos libres y compuestos metálicos solubles; como iones intercambiables adsorbidos a las superficies de la fase sólida inorgánica o como iones no intercambiables y precipitados; o en compuestos metálicos intercambiables insolubles [1]. Se considera que por esta razón el suelo que se contaminó se encontró con concentraciones iniciales diferentes ya que además en el primer ensayo mostrado en la tabla 7 se tuvo un filtrado casi total de la solución contaminante, haciendo así la concentración de metal en suelo menor a los otros ensayos.

La fitoextracción resulta una técnica útil que utiliza variedades de plantas hiperacumuladoras para transferir elementos traza de suelos contaminados a la parte aérea de la planta. La especie *M. sativa* se considera una planta hiperacumuladora [17], se encontraron estudios que reportan la concentración máxima de níquel en valores similares a la norma que esta planta puede tolerar [6], se considera que es por esta razón que en los ensayos Níquel + *M. sativa* y Níquel + *M. sativa* + *P. putida* KT2440, sin embargo, no logró sobrevivir de estos germinados y en su lugar se observó el crecimiento de un hongo grisáceo no identificado en la atenuación del metal pesado, ya que se tuvo una disminución del 42.11% y 99.26% respectivamente respecto a la

concentración inicial de níquel cuantificada en el suelo.

Algunos microorganismos pueden ser capaces de alterar el estado químico, la forma o distribución de metales en el suelo, las bacterias tienen en general una amplia capacidad para acumular metales en su biomasa, en este estudio la cepa *P. putida* KT2440 no sobrevivió a los ensayos níquel + *M. sativa* + *P. putida* KT2440 y níquel + *P. putida* KT2440 sin embargo este último logró una disminución del 99.46% del metal.

CONCLUSIONES

M. sativa no puede desarrollarse en un sustrato contaminado con altas concentraciones de níquel, bajo las condiciones experimentales evaluadas, de la misma manera, la cepa de *P. putida* KT2440 no fue capaz de permanecer ni asimilar el níquel, a pesar de que no se utilizó la mayor concentración de Ni permitida por la norma (20 000ppm), esto nos indica que habría que evaluar los valores que la norma refiere ya que la cepa bacteriana? utilizada en estos ensayos se considera altamente resistente a factores similares a los que fue expuesta .

Sin embargo, se observó establecimiento, crecimiento y proliferación de hongos en todos los tratamientos, asimismo en los ensayos de monitoreo de níquel por absorción atómica, se observó una disminución de la concentración de éste, lo cual podría ser atribuible a la presencia de dichos hongos.

A diferencia de las variables evaluadas en un principio, se desarrollaron hongos que,

adaptándose a las condiciones expuestas en los ensayos, no solo sobrevivieron si no que lograron la mayor disminución del metal.

Los microorganismos cuentan con capacidades metabólicas diversas que les permiten utilizar diferentes tipos de sustratos, los metales pesados son sustratos que pueden ser transformados a compuestos más estables o menos tóxicos por estos organismos, gracias a esta capacidad se han podido implementar técnicas de biorremediación con el fin de reducir la carga contaminante de un ambiente o ecosistema.

Podemos observar que el sistema propuesto no se acoplo en el tiempo establecido, pero se da pauta a establecer un nuevo sistema biorremediador con presencia del hongo adaptado a estas concentraciones de níquel y que funcional con una eficiencia de remoción del metal hasta de un 99.4%.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

REFERENCIAS

- [1] González-Dávila O, Gómez-Bernal J, Ruíz-Huerta E. Plants and soil contamination with heavy metals in agricultural areas of Guadalupe, Zacatecas, Mexico [Internet]. Environmental contamination. 2012 [cited 30 March 2019].
- [2] Díaz Aguilar, I., Larqué Saavedra, M. U., Alcántar González, G., Vázquez Alarcón, A.,

González Cossio, F. V., & Carrillo González, R. Acumulaciones tóxicas de níquel en el crecimiento y la nutrición de trigo [Internet]. Redalyc.org. 2001 [cited 30 March 2019]. Available from: <https://www.redalyc.org/html/573/57319301/>

[3] Brown, P.H., R.M. Welch y E.E. Cary. Nickel: A micronutrient essential for higher plants. [Internet]. Plant physiology. 1987 [cited 30 March 2019]. Available from: <http://www.plantphysiol.org/content/85/3/801.short>

[4] Sheoran, I.S. y R. Singh. Effect of heavy metals on photosynthesis in higher plants. [Internet]. Photosynthesis: Photoreactions to plant productivity. 1993 [cited 30 March 2019]. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-011-2708-0_18

[5] Rubio, M.I., I. Escrig, C. Martínez-Cortina, F.J. López-Benet y A. Sanz. Cadmium and nickel accumulation in rice plants. Effects on mineral nutrition and possible interactions of abscisic and gibberellic acids. [Internet]. Plant Growth Regulation, 14:151-157. 1994. [cited 30 March 2019]. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00025217>

[6] Çuni E, Dodona E, Harasani P, Sallaku F, Shallari S. Assessment of Habitats Area Sand Nickel Hyperaccumulator Plant *Alyssum genus* in Albania. Albanian Journal of Agricultural Sciences [Internet]. 2015 Oct [cited 2019 Jun 25];14(4):374–80. Available from:

<https://www.proxydgb.buap.mx:2057/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=112843072&lang=es&site=ehost-live>.

[7] Kabata-Pendias, A. Trace elements in soils and plants. Third Edition. CRC Press, Inc. Boca Raton. USA. 2000.

[8] Vig, K., Megharaj, M., Sethunathan, N., Naidu, R. Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil: a review. [Internet] 2003 Advances in Environmental Research, 8: 121-135. 2003. [Cited on 30 March 2019]<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1093019102001351>

[9] Bolan N, Kunhikrishnan A, Thangara-jan R, Kumpiene J, Park J, Makino T, Kirkham M and Scheckel K. Remediation of heavy metal (loid)s contaminated soils- to mobilize or to immobilize? [Internet] Journal of Hazardous Material, 266: 141-166. 2014 [cited 30 March 2019] Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389413009485>

[10] Rajendran P, Muthukrishnan J, Gunasekaran P. Microbes in heavy metal remediation. [Internet] Indian Journal of Experimental Biology, 41: 935-944. 2003 [cited 30 March 2019]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28116999>

[11] Marrero J, Díaz A, Coto O. 2010. Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la Biorremediación.[Internet] Revista CENIC Ciencias Biológicas, 41 (1): 67-78. 2010 [cited 31 March 2019] Available from:

<https://www.redalyc.org/html/1812/181221644010/>

[12] Morales García, Y. E., Pazos Rojas, L. A., Bustillos Cristales, M. D. R., Krell, T., & Muñoz Rojas, J. Método rápido para la obtención de maíz axénico a partir de semillas. [Internet] Elementos Revista de Ciencia y Cultura, 17(20):35 2010 [cited on 31 March]. Available from: <https://elementos.buap.mx/num80/htm/35.htm>

[13] Sánchez-Yáñez, J. M., Alonso-Bravo, J. N., Dasgupta-Schuber, N., Márquez-Benavides, L. Biorremediación de suelo contaminado con 55000 y 65000 de aceite residual automotriz y fitorremediación con *Sorghum bicolor* inoculado con *Burkholderia cepacia* y *Penicillium chrysogenum*. [Internet]. Journal of the Selva Andina Biosphere, 3(2), 86-94. 2015. [Cited 1 April 2019]. Available from:

http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2308-38592015000200004

[14] Alonso-Bravo, J. N., Montaña-Arias, N. M., Santoyo-Pizano, G., Márquez-Benavides, L., Saucedo-Martínez, B. C., Sánchez-Yañez, J. M. Biorrecuperación y fitorremediación de suelo impactado por aceite residual automotriz [Internet]. Journal of the Selva Andina Research Society, 2018, vol. 9, no 1, p. 45-51. 2018. [Cited 1 April 2019] Available from: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S2072-92942018000100004&script=sci_abstract

[15] Camacho, A., Giles, M., Ortegón, A., Palao, M., Serrano, B., Velázquez, O. Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos. [Internet] 2a (Ed.)

Facultad de Química, UNAM. 2019. [Cited 1 April 2019] Available from:

http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Tecnica-Basic-Diluciones_6526.pdf

[16] Albán Molina, E. I., Granda Garzón, J. A. Determinación del contenido de carbono en la biomasa aérea del páramo de la Reserva Ecológica Yanacocha. [Internet] 2013 [Cited 2 April 2019]. Available from:

<http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/6171>

[17] Wenzel, W.W., Adriano, D. C. Salt y R. Smith. Phytoremediation: A plant-microbe-based remediation system. [Internet] Bioremediation of contaminated soils. Agronomy 37. American Society of Agronomy. Madison, WI. 1999 [Cited 2 April 2019]. Available from:

<https://dl.sciencesocieties.org/publications/books/abstracts/agronomymonograph/bioremediation/457?access=0&view=pdf>

[18] Nelson, K. E., Weinel, C., Paulsen, I. T., Dodson, R. J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V. A. P., & Brinkac, L. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. [Internet] Environmental microbiology, 4(12),799-808. 2002 [Cited on 2 April 2019] Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1462-2920.2002.00366.x>

[19] Chiarucci, A. Baker, G. Advances in the ecology of serpentine soil. [Internet] Plant soil 293: 1-2. Chojnacka, K. (2010) Biosorption and bioaccumulation-the prospects for practical applications. Env. Int. 36: 299-307. 2007 [Cited 4

April 2019] Available from: https://www.researchgate.net/publication/215566930_Advances_in_the_ecology_of_serpentine_soils

[20] Mengoni A., S. Henk, J. Vangronsveld Plants as extreme environments? Ni-resistant bacteria and Ni-hyperaccumulators of serpentine flora. [Internet] Plant and Soil, 331: 5-16. 2010 [Cited on 2 April 2019]. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-009-0242-4>

[21] Marrero-Coto, J., Díaz-Valdivia, A., & Coto-Pérez, O. Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. [Internet]. Revista CENIC. Ciencias Biológicas, 41(1). 2010 [Cited 4 April 2019]. Available from: <https://www.redalyc.org/html/1812/181221644010/>

[22] Angelo, Y. T. G., Pérez, O. C., Vazquez, L. A., María, C., Fernández, H. Método efectivo para el aislamiento de bacterias resistentes a níquel y cobalto. [Internet] Revista CENIC Ciencias Biológicas, 33(1). 2002 [Cited 4 April 2019]. Available from: <https://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/articulos/m%C3%A9todo-efectivo-para-el-aislamiento-de-bacterias-resistentes-n%C3%ADquel-y-cobalto>

[23] Del Solar G., Moscoso M. y Espinosa M. A family of highly related promiscuous plasmid. Trends in microbial ecology, 697-700. 1993.

[24] Matilla Vázquez, M. Á. Análisis genómico y funcional de la interacción Planta-*Pseudomonas putida* KT2440 en la rizosfera: colonización y

resistencia sistémica. [Internet]. 2009 [Cited 10 April 2019]. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=64170>

[25] Moya, J. L., Ros, R., & Picazo, I. Heavy metal-hormone interactions in rice plants: Effects on growth, net photosynthesis, and carbohydrate distribution. [Internet] Journal of plant growth regulation, 14(2), 61. 1995 [Cited 10 April 2019] Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00203115>

[26] Jaramillo, M. P., Navarrete, E. T., Álvarez, A. E. B., Encalada, H. G. P., Morante-Carriel, J., & Martínez, H. F. C. Producción de ácido indol-3-acético por *Pseudomonas veronii* R4 y formación de raíces en hojas de vid "Thompson seedless" in vitro. [Internet] Revista Ciencia y Tecnología, 9(1), 31-36. 2016 [Cited on 11 April 2019] Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5609377>

[27] Beltrán-Pineda, M. E., & Gómez-Rodríguez, A. M. Biorremediación de Metales Pesados Cadmio (Cd), Cromo (Cr) y Mercurio (Hg), Mecanismos Bioquímicos e Ingeniería Genética: Una Revisión. [Internet] Revista Facultad de Ciencias Básicas, 12(2), 172-197. 2016 [Cited 11 April 2019]. Available from: <https://revistas.unimilitar.edu.co/index.php/rfcb/article/view/2027>

[28] Valdivia, J. E. G., del Pilar Aponte, M., Bustamante, E., & Chomba, J. 2018.

Fitorremediación de un suelo contaminado con dos niveles de cobre, mediante el uso del cultivo de la alfalfa "Medicago sativa". [Internet] SEARCHING-SCIENCE, 1(1), 10-10. 2018 [Cited on 11 April 2019] Available from: https://scholar.google.com.mx/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=Valdivia%2C+J.+E.+G.%2C+del+Pilar+Aponte%2C+M.%2C+Bustamante%2C+E.%2C+%26+Chomba%2C+J.+2018.+Fitorremediaci%C3%B3n+de+un+suelo+contaminado+con+dos+niveles+de+cobre%2C+mediante+el+uso+del+cultivo+de+la+alfalfa+%E2%80%9CMedicago+sativa%E2%80%9D.+SEARCHING-SCIENCE%2C+1%281%29%2C+10-10&btnG=

[29] Molina-Romero, D., Morales-García, Y. E., Hernández-Tenorio, A. L., Castañeda-Lucio, M., Netzahuatl-Muñoz, A. R., & Muñoz-Rojas, J. *Pseudomonas putida* estimula el crecimiento de maíz en función de la temperatura. [Internet] Revista Iberoamericana de Ciencias, 4(1):88 2017. [Cited on 12 April 2019]. Available from: <http://www.reibci.org/publicados/2017/feb/2100115.pdf>

[30] Ruiz-Olivares, A., González-Chávez, M. C. A., Carrillo-González, R. *Ricinus communis* L., Y *Pseudomonas* sp. para la recuperación de suelos contaminados con residuos de mina. [Internet] Agroproductividad, 10(4). 2017 [Cited 15 April 2019]. Available from: <http://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/1002>

[31] Mayz-Figueroa, J., & Manzi, L. Bacterias hidrocarburoclásticas del género *Pseudomonas* en

la rizosfera de *Samanea saman* (Jacq.) [Internet]. Merr. Revista Colombiana de Biotecnología, 19(1), 29-37. 2017. [Cited 20 April 2019]. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0123-34752017000100029

[32] Fuentes-Ramírez, L.E., Juárez-Hernández, D., Munive, J. A. Morales-García, Y. E., Muñoz-Rojas, J. Formulación de un inoculante multiespecies para potenciar el crecimiento de plantas. [Internet] IMPI 2019. [Cited on 30 April 2019] Available from: https://www.researchgate.net/publication/309550250_Formulacion_de_un_inoculante_multiespecies_para_potenciar_el_crecimiento_de plantas.

[33] Peña-Salamanca E. J., Madera-Parra C., Sánchez, J., Medina-Vásquez J. Bioprospección de plantas nativas para su uso en procesos de biorremediación: caso *Heliconia psittacorum* (Heliconiaceae). [Internet] Rev. Acad. Colomb. Cienc, 37(145). 2013 [Cited 30 April 2019] Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/racefn/v37n145/v37n145a04.pdf>

[34] Pommeresche, R., & Hansen, S. Examen de la actividad de los nódulos en raíces de leguminosas [Internet] Ficha Técnica. 2017 [Cited on 30 april 2019] Available from: <http://orgprints.org/32468/1/pommeresche-hansen-2017-root-nodules-spanish.pdf>

[35] Möller, B. K., Colette, A., Xiang, D., Williams, N., López, L. G., Yoshida, S., .. & Weijers, D. (2017). Auxin response cell-autonomously controls ground tissue initiation in the early Arabidopsis embryo. [Internet] Proceedings of the National

Academy of Sciences, 114(12), E2533-E2539. 2017 [Cited on 30 April]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28265057>