

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Biotecnología

TOLERANCIA AL CROMO EN ALTRAMUZ BLANCO (*Lupinus albus*) Y SUS SIMBIONTES

Autor: Nerea Pérez Simón

Villaviciosa de Odón, *Junio 2026*

ANEXO IX

Título del Trabajo: TOLERANCIA AL CROMO EN ALTRAMUZ BLANCO (*Lupinus albus*) Y SUS SIMBIONTES.

Este trabajo se ha llevado a cabo en el Instituto de Ciencias Agrarias (ICA), perteneciente al CSIC. El ICA es un centro de referencia en investigación agroambiental, fundado en 2004 con el objetivo de dar respuesta a los desafíos de la agricultura española moderna y especializada. El trabajo se ha realizado en el grupo de investigación: Interacciones Beneficiosas Planta-Microorganismo (IBPM), dirigido por el Prof. José J. Pueyo Dabad, perteneciente al Departamento de Suelo, Planta y Calidad Ambiental.



Tutor/es: Miguel A. Quiñones Gómez, José J. Pueyo Dabad y Gara Romero Hernández

Índice

Título.....	3
Resumen.....	3
Palabras clave.....	3
Abreviaturas.....	4
1. Introducción	5
2. Objetivos	9
3. Materiales y métodos.....	9
3.1. Material vegetal	9
3.2. Cepas bacterianas	10
3.3. Protocolo de esterilización de semillas	10
3.4. Siembra	10
3.5. Soluciones y riego	11
3.6. Recogida de muestras y análisis fisiológicos	12
3.7. Actividad nitrogenasa	13
3.8. Protocolo ACC desaminasa	13
3.9. Extracción de ADN	13
3.10. PCR	13
3.11. Purificación de ADN	14
3.12. Tratamiento estadístico	14
3.13. Uso de inteligencia artificial	14
4. Resultados y discusión	15
4.1. Estudio de la simbiosis leguminosa-rizobio en presencia de cromo (VI).....	15
4.1.1 Secuenciación de las bacterias aisladas de los nódulos.....	15
4.1.2. Respuesta fisiológica vegetal en presencia de cromo (VI).....	16
4.1.3. Análisis de la actividad nitrogenasa en presencia de cromo (VI).....	24
4.2. Análisis de la actividad ACC desaminasa en bacterias inoculadas	26
4.3. Formación de raíces proteoides y respuesta fisiológica frente al cromo (VI)	26
4.4. Futuro trabajo	28
5. Conclusiones	29
6. Bibliografía	30

Título: Tolerancia al cromo en altramuz blanco (*Lupinus albus*) y sus simbioses.

Resumen

La contaminación por cromo representa un importante problema ambiental debido a sus efectos negativos sobre los ecosistemas, la agricultura y la salud humana. Los métodos que se han empleado tradicionalmente para eliminar este compuesto son eficaces, pero presentan importantes limitaciones debido a su elevado coste, al uso de productos químicos y al riesgo de generar contaminación secundaria. Por ello, en los últimos años ha aumentado el interés por estrategias más sostenibles como la biorremediación, basada en el uso de plantas y microorganismos capaces de transformar, inmovilizar o reducir la toxicidad de los contaminantes presentes en el medio. El presente trabajo tiene como objetivo estudiar la tolerancia al cromo en *Lupinus albus* y el papel de distintos microorganismos simbioses en la respuesta al estrés por este metal. Para ello, se han llevado a cabo dos experimentos en condiciones controladas: un experimento de nodulación, utilizando distintas cepas bacterianas, y un experimento de raíces proteoides, con diferentes ecotipos de *L. albus*. Se evaluaron diversos parámetros fisiológicos como el área foliar, el contenido de clorofila, el peso fresco aéreo y radicular, la formación de nódulos y raíces proteoides, así como la actividad nitrogenasa de las plantas y la actividad ACC desaminasa de las cepas bacterianas. Los resultados mostraron, en términos generales, una disminución del crecimiento vegetal en presencia de cromo, reflejada en la reducción del área foliar, el contenido de clorofila y la biomasa vegetal. Sin embargo, algunas cepas bacterianas, concretamente las cepas 8, 9, 19, 24, 36 y 60, mostraron un posible efecto protector frente al estrés por cromo, favoreciendo determinados parámetros fisiológicos. Asimismo, algunos ecotipos de *L. albus* incrementaron la producción de raíces proteoides bajo condiciones de estrés, lo que podría representar una respuesta adaptativa relacionada con la tolerancia al metal. En conjunto, los resultados obtenidos ponen de manifiesto la importancia de las interacciones planta-microorganismo en la respuesta frente al estrés por cromo y destacan el potencial de determinadas cepas bacterianas y ecotipos de *L. albus* en estrategias de biorremediación y agricultura sostenible.

Palabras clave: *Lupinus albus*, cromo, nódulos, raíces proteoides, nitrogenasa, ACC desaminasa.

Abreviaturas

ACC: 1-aminociclopropano-1-carboxilato

AFR: área foliar relativa

ANOVA: análisis de la varianza

BYM: Besag–York–Mollié

MIC: concentración mínima inhibitoria

ROS: especies reactivas de oxígeno

SE: error estándar

ODS: objetivos de desarrollo sostenible

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PGPB: bacterias promotoras del crecimiento vegetal

1. Introducción

La contaminación por metales pesados constituye uno de los principales problemas ambientales derivados de la actividad humana con implicaciones directas sobre la salud de ecosistemas y poblaciones humanas. Actividades como la minería, la industria metalúrgica y determinadas prácticas agrícolas como el uso de fertilizantes o agroquímicos, han contribuido a la liberación y acumulación de estos elementos en suelos y aguas, alterando los ciclos biogeoquímicos naturales (Lado et al., 2008). Estos metales representan una amenaza significativa tanto para los ecosistemas como para la salud humana, habiéndose relacionado su exposición con diversas patologías, entre las que se incluyen ciertos tipos de cáncer (**Figura 1B**), trastornos respiratorios y daño hepático y renal (El Montassir et al., 2025; Núñez et al., 2016).

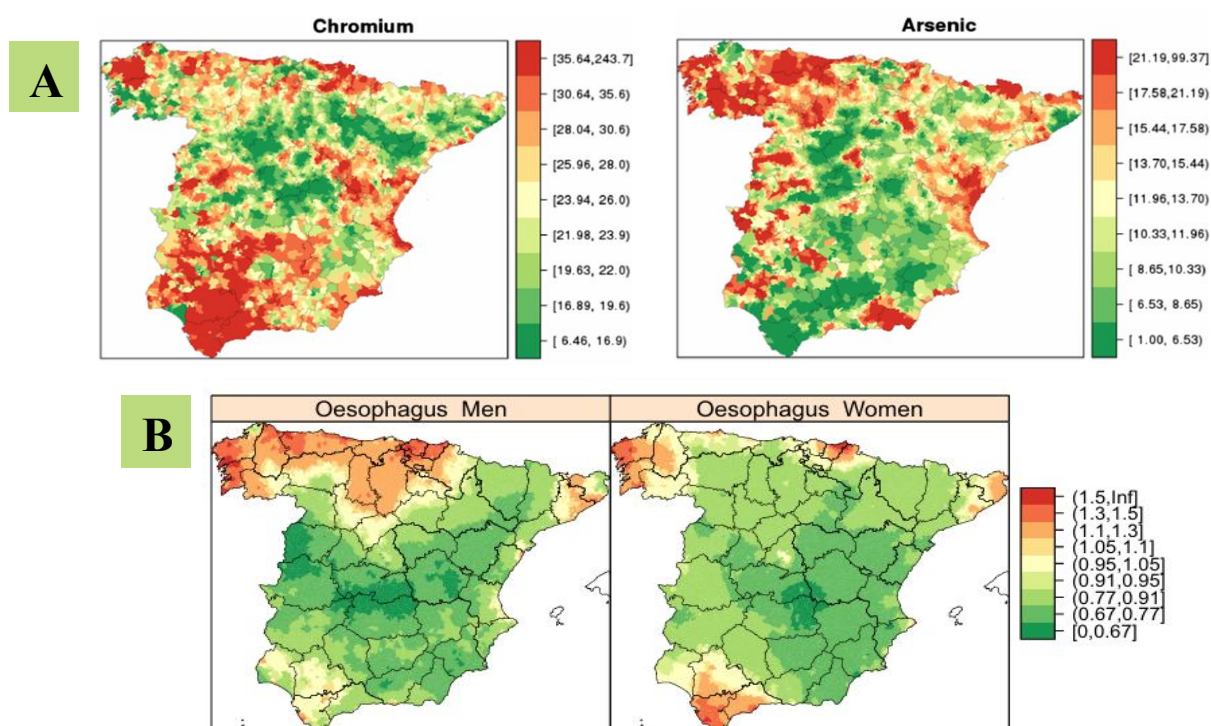


Figura 1. Distribución del cromo y arsénico en España y riesgo relativo de cáncer de esófago por sexo. **A:** distribución municipal de las concentraciones de cromo y arsénico en el suelo superficial de la España peninsular, donde se muestran a la izquierda los niveles de cromo (mg kg^{-1}) y a la derecha los niveles de arsénico (mg kg^{-1}). **B:** modelización BYM (Besag–York–Mollié) de la mortalidad por cáncer de esófago en hombres (izquierda) y mujeres (derecha) durante un periodo de 10 años. Representa la media posterior del riesgo relativo para cada municipio (Núñez et al., 2016).

Entre los metales pesados, el cromo presenta un especial interés debido a su elevado uso en la industria y a su persistencia en el medio ambiente (**Figura 1A**). Se utiliza en diversos procesos industriales tales como la producción de acero inoxidable, el curtido de cuero, la fabricación de pinturas y pigmentos textiles o fungicidas y fertilizantes, siendo eliminado principalmente a

través de los efluentes de estas industrias y a través de las aguas residuales urbanas (Ertani et al., 2017; Kamila et al., 2025). Es el séptimo elemento más abundante de la Tierra y el vigésimo primero en la corteza terrestre ($0,1-0,3 \text{ mg kg}^{-1}$) (Ertani et al., 2017). En el entorno natural, el cromo se presenta fundamentalmente en dos estados de oxidación estables: el trivalente Cr (III) y el hexavalente Cr (VI) (Kamila et al., 2025). La toxicidad que puede representar el cromo va a depender de su forma química y va a dar lugar a un amplio espectro de reacciones. Mientras que el Cr (III) es menos móvil y presenta menor biodisponibilidad, el Cr (VI) forma compuestos solubles como cromatos y dicromatos, caracterizados por su alta movilidad, biodisponibilidad y toxicidad (Ertani et al., 2017). A nivel celular, el Cr (VI) puede atravesar fácilmente las membranas celulares y, una vez en el interior, reducirse a Cr (III), generando especies reactivas y formando complejos intracelulares con macromoléculas como el ADN. Este proceso está asociado a efectos mutagénicos, estrés oxidativo y daño celular, lo que explica su carácter altamente tóxico y cancerígeno (**Figura 1B**) (Siddiqi & Faisal, 2019; Xing et al., 2025).

El tratamiento más habitual de residuos y aguas contaminadas con cromo consiste en reducir el Cr (VI), más tóxico y móvil, a Cr (III), menos peligroso. Las principales estrategias de eliminación del cromo hexavalente incluyen métodos fisicoquímicos tales como excavación, extracción, fijación química o lavado de suelos (El Montassir et al., 2025). Estas estrategias son muy eficientes para un alto contenido de Cr (VI), pero conllevan limitaciones para su aplicación, ya sea por los productos químicos que hay que utilizar o por las propiedades de la zona contaminada. Además, tienen el riesgo de generar contaminaciones secundarias en el proceso de eliminación (Tumolo et al., 2020). Una alternativa a estas limitaciones es la biorremediación. Se trata de una técnica que consiste en utilizar las capacidades fisiológicas y metabólicas de los organismos para eliminar, transformar o inmovilizar contaminantes. La biorremediación se utiliza para la eliminación de metales pesados, por lo que es una opción para descontaminar zonas con diversos niveles de contaminación por Cr (VI). Dentro de las técnicas de biorremediación destaca la fitorremediación, que utiliza ciertas plantas que pueden acumular metales en sus tejidos. Cuando la acumulación ocurre en la parte aérea (fitoextracción), las plantas pueden cosecharse para retirar el contaminante del medio. Si, por el contrario, el metal se retiene en raíces o en la rizosfera sin trasladarse a la parte aérea (fitoinmovilización), se reduce el riesgo de entrada en la cadena trófica (Shahid et al., 2017).

En situaciones de estrés por metales pesados, las plantas pueden mostrar respuestas adaptativas como la hormesis, un fenómeno caracterizado por la estimulación del crecimiento a bajas

concentraciones del agente estresante y su inhibición a concentraciones elevadas (Erofeeva, 2022). En el caso del cromo, altas concentraciones pueden provocar efectos fitotóxicos como inhibición del crecimiento, clorosis, necrosis, alteraciones fotosintéticas y daño celular (Jun et al., 2009). Sin embargo, se ha visto que la interacción entre plantas y microorganismos desempeña un papel clave en la fitorremediación de metales tóxicos, especialmente de Cr (VI). Estos microorganismos pueden mejorar este proceso mediante la metilación, la modificación del pH del suelo, la facilitación de reacciones redox y la secreción de compuestos quelantes (como sideróforos y ácidos orgánicos), así como de biosurfactantes (Qureshi et al., 2024a). Estas interacciones, especialmente aquellas que implican rizobios y bacterias promotoras del crecimiento vegetal (*Plant Growth-Promoting Bacteria*, PGPB), son fundamentales para que las plantas puedan adaptarse a suelos contaminados con metales pesados y favorecer procesos de fitorremediación (Lee & Cho, 2026). Las PGPB estimulan el crecimiento vegetal mediante mecanismos directos como: solubilización de fósforo, fijación de nitrógeno (actividad nitrogenasa), captación de hierro mediante sideróforos, síntesis de fitohormonas (auxinas, citoquininas, giberelinas), así como la reducción de los niveles de etileno en las plantas, mediante la actividad de la ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilato) desaminasa (Gómez-Godínez et al., 2023). También actúan mediante mecanismos indirectos como la producción de antibióticos o antifúngicos frente a fitopatógenos, la competencia por el hierro en la rizosfera y la síntesis de enzimas de defensa (Gómez-Godínez et al., 2023; Voccianti et al., 2022). En el caso concreto de los rizobios, pertenecientes a Alpha y Betaproteobacteria, pueden infectar tejidos vegetales y formar nódulos en raíces de leguminosas, donde fijan el nitrógeno atmosférico gracias a la actividad nitrogenasa (Fagorzi et al., 2018). Además, dentro del nódulo, la presencia de leghemoglobina contribuye a mantener un ambiente microaeróbico, necesario para la actividad nitrogenasa (Ott et al., 2005).

Las leguminosas, pertenecientes a la familia Fabaceae, se caracterizan por presentar frutos en forma de vaina y constituyen la tercera familia más grande de plantas con flores, con más de 20.000 especies, que incluyen plantas herbáceas, arbustivas y arbóreas, algunas de las cuales se utilizan como alimento para humanos o forraje (Hughes et al., 2025; Jach et al., 2022). Diversos géneros de rizobios como *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium* y *Ensifer*, pueden fijar nitrógeno de manera eficiente en estas plantas y contribuir a su crecimiento (Nakei et al., 2022). Una planta modelo y con interés creciente es el altramuza blanco (*Lupinus albus*), cuyo cultivo ha aumentado debido a, no solo a su capacidad para crecer en suelos pobres y en condiciones adversas, sino también por su utilización en la alimentación animal y en la dieta humana,

consecuencia del elevado contenido proteico de las semillas. Además, su cultivo contribuye a mejorar la fertilidad del suelo al enriquecerlo con compuestos nitrogenados (Pereira et al., 2022). Esta especie, aparte de formar nódulos (**Figura 2A**) en sus raíces mediante simbiosis con rizobios, principalmente del género *Bradyrhizobium*, también es capaz de generar raíces proteoides (pequeños conglomerados de raíces laterales y cortas) que se observan en las raíces secundarias (**Figura 2B**) (Quiñones et al., 2021). Las raíces proteoides aumentan significativamente el volumen de la rizosfera, y son capaces de movilizar nutrientes como fósforo (P), hierro (Fe), zinc (Zn) y manganeso (Mn) mediante la inducción de cambios químicos en la rizosfera. Normalmente, las raíces proteoides, aparecen en bajas concentraciones de P, no obstante, en algunas especies aparecen en suelos deficientes en Fe (Quiñones et al., 2021). Ambos órganos (nódulos y raíces proteoides) están estrechamente relacionados con los metabolismos del N y el P (Pueyo et al., 2021).

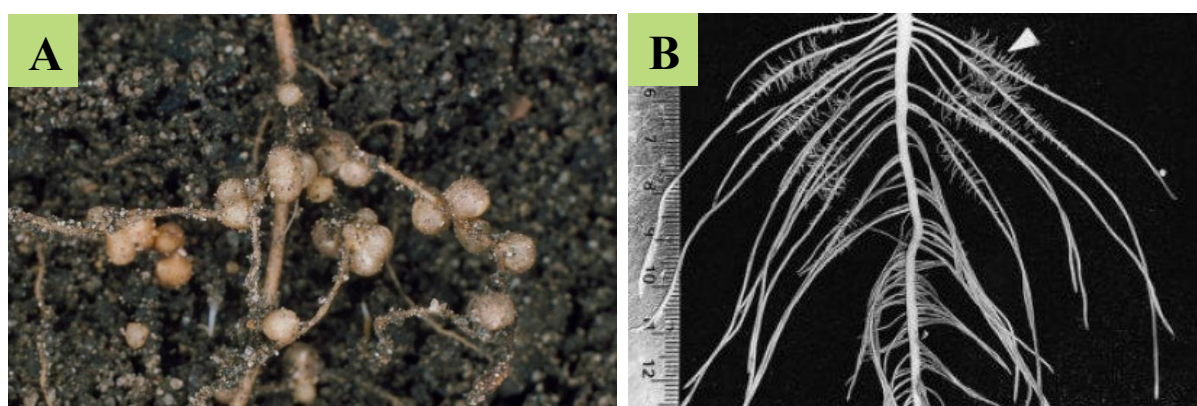


Figura 2. Fotografía del sistema radical de *Lupinus* spp y nódulos. **A:** sistema radical de *Lupinus* spp compuesto por una raíz principal de la que emergen las raíces secundarias. El triángulo blanco muestra las raíces proteoides (*cluster roots*) situadas en ciertas zonas de las raíces secundarias. **B:** nódulos radiculares visibles como pequeñas estructuras redondeadas y engrosamientos en la raíz, generalmente de color blanquecino o rosado, formados tras la infección por bacterias simbióticas.

Dentro de este contexto, la elección de este tema surge de la creciente preocupación por la contaminación por metales pesados, especialmente por cromo, debido a su impacto negativo sobre el medio ambiente, la agricultura y la salud humana. La acumulación del cromo en suelos agrícolas supone un problema relevante no solo desde el punto de vista ambiental, sino también económico y sanitario, ya que puede afectar a la productividad de los cultivos y favorecer la entrada de compuestos tóxicos en la cadena alimentaria. En un ámbito educativo y de contribución a la ciencia, este trabajo permite profundizar en áreas de gran interés actual como la microbiología ambiental, la fisiología vegetal y la biotecnología aplicada a la biorremediación, destacando la importancia de las interacciones planta-microorganismo en el desarrollo de estrategias más sostenibles y respetuosas con el medio ambiente.

2. Objetivos

- Analizar y comparar el papel de microorganismos simbioses con *L. albus* en condiciones de estrés por cromo, con el fin de comprender mejor los mecanismos implicados y su potencial aplicación en estrategias de fitorremediación, así como estudiar su capacidad de nodulación, la actividad nitrogenasa de las raíces y otros parámetros fisiológicos.
- Estudiar la actividad de la ACC desaminasa de las bacterias asociadas a las raíces para determinar su contribución al crecimiento y desarrollo de la planta bajo condiciones de estrés por cromo.
- Estudiar distintos ecotipos de *L. albus* en presencia y ausencia de cromo para profundizar en cómo afecta el cromo a la producción de raíces proteoides junto con otros parámetros fisiológicos.

3. Materiales y métodos

3.1. Material vegetal

El material vegetal de este estudio fue el altramuz blanco (*L. albus*). Para el experimento de raíces proteoides se utilizaron los ecotipos 3896, 4773, 4776, 5174 y 6256 y para el experimento de nodulación se utilizó la variedad Orden Dorado. Las condiciones de la cámara de crecimiento fueron: fotoperiodo de 14 h de luz y 10 h de oscuridad, temperatura entre 25°C (luz) y 20°C (oscuridad), y humedad relativa entre 50-80% (**Figura 3**). Las plantas se cultivaron con distintos tratamientos durante cinco semanas. Las semillas de los distintos ecotipos o variedades de *L. albus* utilizados fueron proporcionadas por el equipo de Leguminosas Grano del CICYTEX (Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura, Badajoz).



Figura 3. Distribución de los distintos tratamientos en la cámara de crecimiento.

3.2. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo están indicadas en la **Tabla 1**. Todas las cepas fueron cultivadas en el medio de cultivo Vincent (Vincent, 1970).

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en el experimento de nodulación donde se presenta el número asignado a cada muestra bacteriana, la cepa correspondiente, la familia a la que pertenece, el porcentaje de identidad y la concentración mínima inhibitoria (MIC) de cromo (VI) para cada una de ellas.

Muestra	Cepa	Familia	% de identidad	MIC (CrO ₃)
1	<i>Burkholderia</i> sp.	Burkholderiaceae	99.45%	> 750
8	<i>Priestia aryabhatai</i>	Bacillaceae	-	-
9	<i>Bradyrhizobium lupini</i> LLZ14	Nitrobacteraceae	99.00%	> 350
19	<i>Bacillus</i> sp. EP23	Bacillaceae	94.63%	> 500
24	<i>Bradyrhizobium lupini</i> LLZ14	Nitrobacteraceae	99.86%	> 200
26	<i>Burkholderia</i> sp. WSM4182	Burkholderiaceae	99.74%	> 350
29	<i>Bradyrhizobium lupini</i> LLZ14	Nitrobacteraceae	99.86%	> 350
30	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Nitrobacteraceae	-	-
32	<i>Bradyrhizobium lupini</i> LLZ14	Nitrobacteraceae	97.36%	> 200
34	<i>Bradyrhizobium</i> sp. SSUT18	Nitrobacteraceae	98.90%	>200
35	<i>Bradyrhizobium lupini</i> LLZ14	Nitrobacteraceae	97.53%	> 200
36	<i>Bradyrhizobium lupini</i> LLZ14	Nitrobacteraceae	97.67%	> 200
37	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Nitrobacteraceae	-	-
38	<i>Bacillus</i> sp. P12-9	Bacillaceae	98.53%	> 750
40	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i> M-31	Micrococcaceae	98.17%	> 350
52	<i>Burkholderia</i> sp. WSM4181	Burkholderiaceae	99.80%	> 350
55	<i>Peribacillus muralis</i> LMG 20238	Staphylococcaceae	97.95%	> 750
60	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Nitrobacteraceae	99.61%	> 350
61	<i>Burkholderia</i> sp. URHA0054	Burkholderiaceae	99.14%	> 350
63	<i>Arthrobacter</i> sp. NCCP-773	Micrococcaceae	96.48%	> 350
64	<i>Bradyrhizobium lupini</i> LLZ14	Nitrobacteraceae	99.26%	> 200

3.3. Protocolo de esterilización de semillas

Las semillas de altramuz se esterilizaron superficialmente mediante la inmersión en cloruro de mercurio (HgCl₂) al 1% (p/v) durante cinco minutos. Posteriormente, se hicieron cuatro lavados con agua destilada de dos minutos cada uno. Finalmente, se dejaron las semillas en agua destilada durante una hora con el objetivo de realizar la siembra transcurrido dicho tiempo.

3.4. Siembra

En total se hicieron 22 tratamientos para el experimento de nodulación, siendo uno de ellos un control (sin inoculación), y cinco tratamientos para el experimento de raíces proteoides.

Además, por cada tratamiento se pusieron 10 plantas. Se rellenaron botes de farmacia de 1 L de volumen con aproximadamente 400 g de vermiculita, se taparon con papel de autoclave y se esterilizaron a 121°C durante 20 min. Se quitaron las tapas por primera vez a la hora de la siembra de las semillas. Las semillas de altramuces blancos se esterilizaron mediante el protocolo anteriormente mencionado. En cada bote se pusieron dos semillas y, para el experimento de nodulación, se hicieron dos inoculaciones con la cepa correspondiente (**Tabla 1**), una en el momento de la siembra y otra una vez transcurridos siete días. Las plantas se regaron con la solución nutritiva correspondiente diferenciando si contenía o no cromo (**Figura 4**). Una vez la planta había crecido lo suficiente (aproximadamente 10 días) se cortaron los cotiledones para estimular la nodulación.

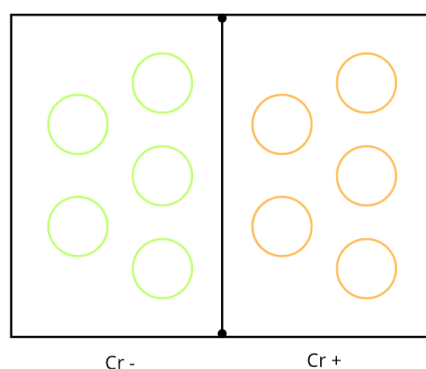


Figura 4. Esquema de la disposición de cada tratamiento. A la derecha se ponen las plantas que se riegan con la solución nutritiva añadiendo cromo (CrO_3) 250 μM y a la izquierda las plantas que se riegan solo con la solución nutritiva, sin cromo.

3.5. Soluciones y riego

La solución nutritiva empleada para ambos experimentos (nodulación y raíces proteoides) fue la solución de Hoagland (Hoagland, 1920). En el experimento de nodulación salvo en el control, se eliminó la fuente de nitrógeno para favorecer la nodulación. Se regó tres veces por semana. La primera semana se regó con 25 mL de agua destilada. La segunda semana con 25 mL de la solución nutritiva diluida $\frac{1}{4}$. La tercera semana con 50 mL de la misma solución diluida $\frac{1}{2}$, y desde la cuarta semana hasta la retirada de los experimentos (5 semanas) con 50 mL de la misma solución sin diluir. En todos los casos se diferenció entre solución nutritiva con y sin cromo (**Figura 4**).

3.6. Recogida de muestras y análisis fisiológicos

Área foliar

Para medir el área foliar se seleccionó la hoja más joven y completamente expandida de cada planta (es decir, 10 hojas por tratamiento) y se escaneó utilizando un escáner Epson Perfection V350 Photo (Suwa, Japón) para, posteriormente, cuantificar el área foliar con la herramienta informática ImageJ v.1.53 (NIH, Bethesda, MD, EE. UU.) en mm².

Contenido de clorofila

El contenido de clorofila se midió el día anterior a la recolección de las plantas, empleando una técnica no invasiva. Se realizaron dos mediciones por planta. El contenido total de clorofilas se determinó mediante un medidor portátil de clorofila de Opti-Sciences Inc. (modelo CCM-200 plus) (Hudson, NH, EE. UU.).

Peso húmedo y peso seco

Para pesar tanto la parte aérea como la raíz, ambas partes se separaron de la planta y se pesaron en una balanza de precisión. Para el peso seco, se secaron las muestras durante 48-72 h en una estufa a 60°C.

Nódulos

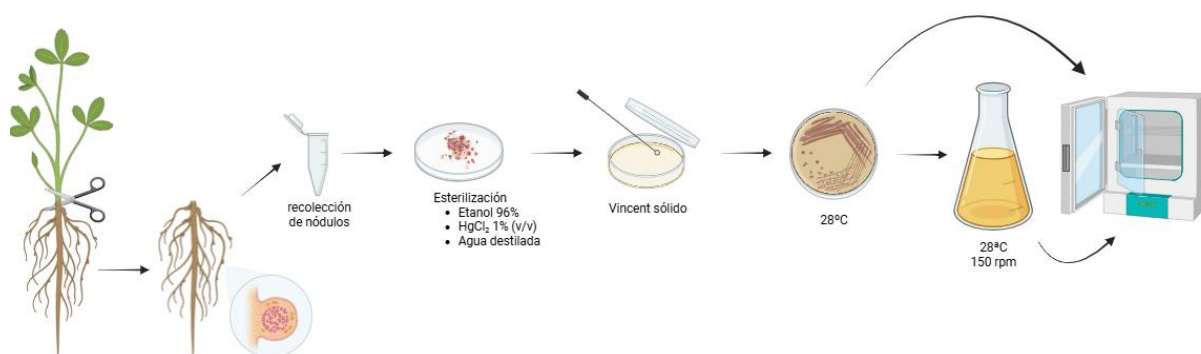


Figura 5. Esquema del protocolo de extracción y aislamiento de las bacterias de los nódulos creado con Biorender. Primero se separa la raíz de la parte aérea, posteriormente se extraen los nódulos de la raíz y se almacenan y pesan en tubos Eppendorf. A continuación, se esterilizan utilizando alcohol al 96%, HgCl₂ al 1% (v/v) y agua destilada estéril. Tras homogeneizarse en un mortero, se siembra en placas con medio de cultivo Vincent solidificado (Vincent, 1970). Las placas se pasan a crecer a 28°C en el incubador orbital INC 125 FS digital (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Alemania). Una vez hay colonias, se coge una aislada que crecerá en medio de cultivo Vincent líquido (Vincent, 1970) a 28°C y 250 rpm en el mismo incubador.

El protocolo de extracción y aislamiento de las bacterias de los nódulos se resume en la **Figura 5**. Sólo se esterilizaron los nódulos más grandes o que presentaban mejor estado de cada bandeja (más rojizos).

Raíces proteoides

Tanto para el experimento de raíces proteoides como para el de nodulación, se localizaron las raíces proteoides (**Figura 2B**). Para ello, se lavaron cuidadosamente las raíces con agua y posteriormente se aislaron las raíces proteoides mediante corte, procesándolas por separado. Cabe señalar que, en el cálculo del peso total de la raíz, se incluyó también el peso correspondiente a las raíces proteoides.

3.7. Actividad nitrogenasa

Para medir la actividad nitrogenasa se introdujeron 10 mL de acetileno en tubos de 110 mL de volumen donde se habían introducido previamente las raíces, siguiendo el protocolo de reducción de acetileno (Ruiz-Díez et al., 2008). Se dejó actuar durante una hora con el objetivo de que las bacterias presentes en los nódulos redujesen el acetileno a etileno. Se empleó un cromatógrafo de gases Agilent 8860 (Santa Clara, CA, EE. UU.), con dos columnas HP-PLOT/Q de 15 y 30 m, situadas en serie. El gas portador fue nitrógeno a una presión de cinco atmósferas, con una pureza del 100% y a un flujo de 15 mL min⁻¹.

3.8. Protocolo ACC desaminasa

Para los estudios de ACC desaminasa se crecieron las bacterias (**Tabla 1**) en medio de cultivo Vincent (Vincent, 1970) y se siguió el protocolo descrito por Msaddak et al., (2023). Se empleó un espectrofotómetro Beckman DU 640 (Fullerton, CA, EE. UU.) a una longitud de onda de 540 nm. Los resultados se expresan como $\mu\text{moles de } \alpha\text{-cetobutirato mg proteína}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Con objeto de expresar la actividad ACC desaminasa por concentración de proteína en los extractos, se estimó ésta siguiendo el protocolo de Bradford (Bradford, 1976).

3.9. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el kit comercial DNeasy Ultraclean Microbial Kit de Qiagen (Hilden, Alemania) y se siguieron las indicaciones del fabricante.

3.10. PCR

El ADN que codifica el ARN ribosómico 16S se amplificó de acuerdo a Ruiz-Díez et al. (2008) con algunas modificaciones. Los cebadores utilizados fueron fD1 y rP2 (**Tabla 2**). La PCR se llevó a cabo en un volumen de 50 μL , conteniendo 2 mM MgCl₂ (4 μL , Applied Biosystems), tampón Gold 10X (5 μL , Applied Biosystems), 10 mM de dNTP (1 μL), 10 μM de cada cebador

(2 μ L cada uno), 2.50 U de DNA polimerasa AmpliTaq Gold (0.5 μ L, Applied Biosystems) y entre 50 y 100 ng de ADN genómico (1 μ L).

Tabla 2. Secuencia de los cebadores empleados en la PCR en sentido 5' $\rightarrow$ 3'.

Cebadores	Secuencia
fD1	ccgaattcgtcgacaacAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
rP2	cccgggatccaagcttACGGCTACCTTGTTACGACTT

3.11. Purificación de ADN

Una vez confirmada, mediante electroforesis, la amplificación por PCR de la secuencia de interés, utilizando como fuente de alimentación el sistema PowerPac 300 y la cubeta horizontal Wide Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.), se procedió a la purificación del ADN empleando el kit NZYGelpure de NZYtech (Lisboa, Portugal), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

3.12. Tratamiento estadístico

Para el tratamiento estadístico de los datos se han utilizado las herramientas informáticas Microsoft Excel versión 2604 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EE. UU.) y Graphpad Prism versión 11.0.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.), donde se ha usado el análisis ANOVA de dos vías seguido de una prueba post hoc de Tukey. Se ha establecido como significativo a partir de $p < 0.05$. Los resultados obtenidos se han representado utilizando el programa GraphPad. Los experimentos de nodulación y raíces proteoides se hicieron por quintuplicado, y los relacionados con ACC desaminasa y nitrogenasa por duplicado.

3.13. Uso de inteligencia artificial

Para la elaboración del presente trabajo se han empleado herramientas de inteligencia artificial, concretamente ChatGPT, ChatPDF y Copilot, como apoyo complementario al estudio y análisis de los contenidos, así como para mejorar la comprensión y corrección del texto, la búsqueda bibliográfica y el apoyo en la discusión e interpretación de los resultados. En ningún caso han sido utilizadas como sustituto de fuentes académicas ni para la generación directa de contenidos sin revisión crítica. La información proporcionada por dichas herramientas ha sido contrastada con bibliografía científica y fuentes académicas fiables, garantizando así el rigor y la validez del contenido presentado.

4. Resultados y discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo pueden contextualizarse dentro del marco de la sostenibilidad ambiental y la búsqueda de estrategias agrícolas más sostenibles frente a la contaminación por metales pesados. En este sentido, el estudio de la tolerancia al cromo en *L. albus* y de la interacción con microorganismos beneficiosos resulta de interés por su posible aplicación en procesos de biorremediación y recuperación de suelos contaminados (Quiñones et al., 2021). Además, este trabajo se relaciona con diversos Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), especialmente el 2 (Hambre cero) ya que busca mejorar la sostenibilidad agrícola y la tolerancia de cultivos frente a contaminantes, 3 (Salud y bienestar) por promover estrategias que reducen el impacto de metales tóxicos sobre la salud humana, 13 (Acción por el clima) por el desarrollo de técnicas sostenibles como la biorremediación frente a la contaminación ambiental, y 15 (Vida de ecosistemas terrestres) porque contribuye a la recuperación y protección de suelos contaminados y ecosistemas terrestres. Asimismo, se engloba dentro del enfoque *One Health*, que destaca la conexión existente entre la salud ambiental, animal y humana, poniendo de manifiesto la importancia de desarrollar estrategias que reduzcan el impacto de contaminantes tóxicos en los ecosistemas y en la cadena alimentaria.

4.1. Estudio de la simbiosis leguminosa-rizobio en presencia de cromo (VI)

Se llevó a cabo un experimento de nodulación en condiciones controladas entre *L. albus* y distintas cepas bacterianas (**Tabla 1**) para estudiar el efecto del cromo sobre esta interacción. Para ello, se inocularon diferentes microorganismos potencialmente promotores del crecimiento vegetal y se evaluó su influencia sobre diversos parámetros fisiológicos y simbióticos en presencia y ausencia de cromo, así como la actividad nitrogenasa desarrollada en la raíz de la planta. Además, se realizó la secuenciación de las bacterias aisladas de los nódulos con el fin de verificar la identidad taxonómica de las cepas recuperadas tras el experimento.

4.1.1 Secuenciación de las bacterias aisladas de los nódulos

Con el fin de confirmar la identidad taxonómica de las bacterias aisladas de los nódulos, las muestras obtenidas se aislaron, amplificaron mediante PCR y purificaron con objeto de ser enviadas a secuenciar, obteniéndose los resultados que se muestran en la **Tabla 3**. En general se observó una posible contaminación por *Bradyrhizobium* sp., probablemente favorecida por la proximidad entre tratamientos durante el experimento. Asimismo, se identificaron algunas

cepas que no correspondían con las inicialmente inoculadas, lo que sugiere que parte de la contaminación podría haberse producido durante el almacenamiento o manipulación de las muestras. No obstante, pese a estas limitaciones metodológicas, los resultados obtenidos continúan siendo de utilidad para identificar tendencias fisiológicas y posibles cepas bacterianas de interés frente al estrés por cromo.

Tabla 3. Resultados obtenidos tras la secuenciación de las cepas bacterianas extraídas de los nódulos. Se puede observar cada muestra junto con la cepa inoculada inicialmente y la que se obtuvo tras la secuenciación.

Muestra	Cepa de inoculación	Cepa tras secuenciación
1	<i>Burkholderia</i> sp.	No se secuenció: no se obtuvieron nódulos
8	<i>Priestia aryabhattai</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
9	<i>Bradyrhizobium lupini</i> LLZ14	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
19	<i>Bacillus</i> sp. EP23	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
24	<i>Bradyrhizobium lupini</i> LLZ14	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
26	<i>Burkholderia</i> sp. WSM4182	No se secuenció: no se obtuvieron nódulos
29	<i>Bradyrhizobium lupini</i> LLZ14	<i>Staphylococcus hominis</i>
30	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
32	<i>Bradyrhizobium lupini</i> LLZ14	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
34	<i>Bradyrhizobium</i> sp. SSUT18	<i>Ralstonia insidiosa</i>
35	<i>Bradyrhizobium lupini</i> LLZ14	<i>Bradyrhizobium canariense</i>
36	<i>Bradyrhizobium lupini</i> LLZ14	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
37	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Ralstonia insidiosa</i>
38	<i>Bacillus</i> sp. P12-9	No se secuenció
40	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i> M-31	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
52	<i>Burkholderia</i> sp. WSM4181	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
55	<i>Peribacillus muralis</i> LMG 20238	<i>Bradyrhizobium lupini</i>
60	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
61	<i>Burkholderia</i> sp. URHA0054	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
63	<i>Arthrobacter</i> sp. NCCP-773	<i>Bradyrhizobium canariense</i>
64	<i>Bradyrhizobium lupini</i> LLZ14	<i>Bradyrhizobium</i> sp.

4.1.2. Respuesta fisiológica vegetal en presencia de cromo (VI)

Área foliar

El área foliar constituye un parámetro fisiológico clave, ya que refleja directamente la capacidad fotosintética y el crecimiento vegetal. Diversos estudios realizados en leguminosas han descrito una disminución de este parámetro bajo condiciones de estrés por metales pesados (Pandey et al., 2022). En el caso concreto de *L. albus*, se ha observado que este tipo de estrés afecta al desarrollo foliar, provocando una reducción del tamaño de las hojas y, en consecuencia, del área foliar (Quiñones et al., 2021).

Los resultados obtenidos se pueden observar en la **Figura 6**. En conjunto, se observa una disminución del área foliar en las plantas tratadas con cromo en comparación con las condiciones sin tratamiento, lo que indica un efecto fitotóxico del metal sobre el crecimiento vegetal. Esta reducción del área foliar puede estar relacionada con la inhibición de procesos fisiológicos clave. Según la bibliografía, el cromo afecta a la fotosíntesis en términos de fijación de CO₂, transporte de electrones y actividad enzimática. También afecta a otros procesos clave como la conductancia estomática y la tasa de transpiración, donde a altas concentraciones la reducción es mayor (Subrahmanyam, 2008). Además, el cromo es conocido por inducir estrés oxidativo al aumentar la producción de ROS (*reactive oxygen species*, por sus siglas en inglés), lo que puede afectar a la integridad celular y limitar el desarrollo de los tejidos foliares (Sharma et al., 2020). Aun así, hay cepas en las que no hubo diferencias significativas entre condiciones, llegando incluso a ser superior en el tratamiento con cromo como es el caso de la cepa 19. Esto podría indicar una mayor tolerancia en presencia de este metal. También cabe destacar que la presencia de diferencias significativas en el tratamiento control sugiere que, en ausencia de microorganismos, el efecto del cromo es muy notable, lo que refuerza la hipótesis de que ciertas bacterias pueden ejercer un papel protector frente al estrés por metales pesados (Qureshi et al., 2024).

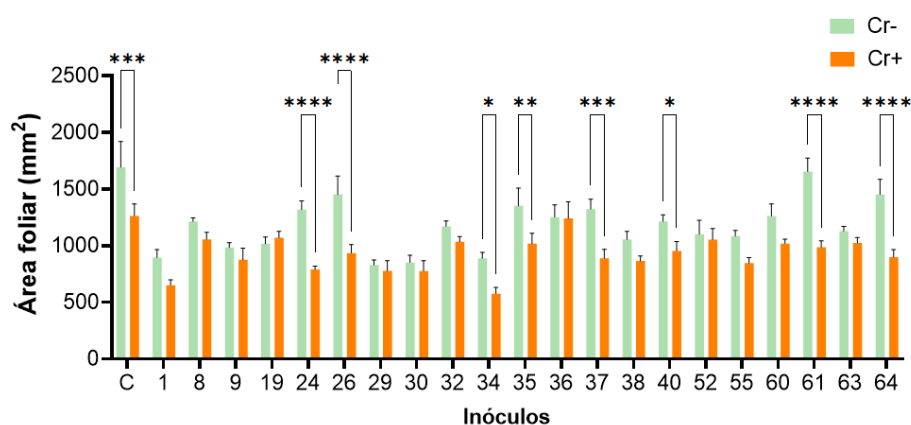


Figura 6. Efecto del Cr (VI) sobre el área foliar en plantas de *L. albus* frente a cada inóculo, siendo “C” el control. En verde se observan las plantas regadas sin cromo y en naranja las plantas regadas con cromo. Se representa con la media ($n=5$) $\pm$ SE. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (-Cr vs +Cr) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,02$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

No obstante, dado que existían diferencias basales de crecimiento entre tratamientos, se calculó el área foliar relativa (AFR) (**Ecuación 1**) con el objetivo de comparar de forma más precisa el efecto del cromo entre las distintas cepas bacterianas. Este parámetro permitió expresar la respuesta al estrés en términos relativos respecto a sus correspondientes controles sin cromo.

$$\text{Área foliar relativa (AFR)} = \frac{\text{Área foliar tratada con cromo}}{\text{Área foliar sin cromo}} \times 100$$

Ecuación 1. Cálculo del área foliar relativa en %.

Tabla 4. Cada inóculo (Inoc) frente a su área foliar relativa (AFR) en %. “C” es el control. Se han clasificado los resultados en tres grupos: **rojo** aquellos que tienen mayor sensibilidad al cromo, **amarillo** aquellos que tienen una sensibilidad moderada, y en **verde** aquellos que presentan mayor tolerancia.

Inoc	C	1	8	9	19	24	26	29	30	32	34	35	36	37	38	40	52	55	60	61	63	64
AFR (%)	75	73	87	89	105	60	64	94	91	88	65	75	99	67	82	79	96	62	77	60	91	62

Los resultados obtenidos del cálculo del AFR se pueden observar en la **Tabla 4**. La mayoría de los tratamientos presentaron valores inferiores al 100%, lo que indica una reducción del área foliar en presencia de cromo y, por tanto, un efecto fitotóxico del metal. No obstante, se observaron diferencias notables entre cepas. Las cepas clasificadas como menos tolerantes (24, 26, 34, 37, 55, 61 y 64) mostraron los valores más bajos de AFR (≈ 60 – 67%), evidenciando una alta sensibilidad al cromo y una menor capacidad de mitigación del estrés. Entre estas cepas cuatro pertenecen al género *Bradyrhizobium*, dos son *Ralstonia insidiosa* y una es una posible *Burkholderia* (**Tabla 3**). Las cepas clasificadas con sensibilidad moderada (control, 1, 35, 40, 60) presentaron un AFR entre 70-80%. Estas cepas pertenecen todas al género *Bradyrhizobium* (**Tabla 3**). Por último, las cepas clasificadas como tolerantes (8, 9, 19, 29, 30, 32, 36, 38, 52 y 63) representaron el grupo más numeroso, con valores cercanos o incluso superiores al 100 %, lo que sugiere una mayor tolerancia al metal. Entre estas cepas se encontraban cuatro que pertenecen al género *Bradyrhizobium*, un *Staphylococcus hominis*, y un posible *Bacillus* (**Tabla 3**).

Según la bibliografía, *Bradyrhizobium* es, con diferencia, el género de rizobios que se encuentra con mayor frecuencia asociado a *L. albus*. Asimismo, algunas cepas de *Bradyrhizobium* son capaces de absorber y acumular metales, lo que podría contribuir a mejorar el crecimiento vegetal y la respuesta fisiológica de las plantas bajo condiciones de estrés (Salmi & Boulila, 2021; Sprent et al., 2017). Esto es coherente ya que mayoritariamente encontramos este género entre las cepas moderadamente tolerantes y tolerantes. Concretamente, la cepa 19 mostró un valor superior al control (105%), lo que podría indicar un posible efecto beneficioso o protector frente al estrés por cromo.

En relación con el resto de los géneros, se ha visto que la inoculación con *Burkholderia* puede mejorar el crecimiento de leguminosas y reducir la absorción de metales pesados en suelos contaminados (Shanmugasundaram & Somasundaram, 2024). En cuanto al género *Ralstonia*,

ha sido ampliamente estudiado como un género patógeno que infecta penetrando en la planta a través de heridas radiculares o aberturas naturales, y una vez establecida, se propaga rápidamente por el tejido vascular, provocando síntomas como oscurecimiento del xilema, marchitez y, finalmente, la muerte de la planta (Benezech et al., 2020; Kurabachew & Wydra, 2013). Esto concuerda con el hecho de que se encuentre en el grupo donde el área foliar se ve más perjudicada. Por otro lado, el género *Bacillus* presenta una elevada capacidad para producir compuestos que promueven el crecimiento vegetal, así como mecanismos para mitigar los efectos tóxicos del Cr (VI), como es su reducción a Cr (III), la activación de enzimas implicadas en la detoxificación de ROS y la reparación del daño en el ADN, lo que guarda coherencia al encontrarlo entre las cepas más tolerantes. Por último, sobre la cepa *Staphylococcus hominis* no hay muchos estudios en plantas, no obstante, se ha descrito que esta cepa forma parte de la microbiota de la piel (Kloos & Schleifer, 1975). Aun así, es considerada una bacteria endofítica no rizobiana procedente de los nódulos radiculares de algunas plantas, y se ha visto que puede presentar ciertas propiedades promotoras del crecimiento vegetal (Bakhtiyarifar et al., 2021). Sin embargo, no se ha encontrado bibliografía donde se haya estudiado la interacción entre esta especie y *L. albus*.

Peso fresco de las partes aérea y radicular

Los pesos frescos aéreo y radicular son parámetros fisiológicos muy utilizados porque permiten evaluar de forma directa el crecimiento vegetal y el estado general de la planta frente a condiciones de estrés. El peso fresco de la parte aérea refleja el desarrollo de hojas y tallos, y está estrechamente relacionado con la capacidad fotosintética y la acumulación de biomasa. Por otro lado, el peso fresco radicular permite analizar el desarrollo del sistema de raíces, fundamental para la absorción de agua y nutrientes y para la adaptación frente a condiciones adversas como la toxicidad por metales pesados. En la bibliografía se ha visto en *L. albus* una disminución general de la biomasa causada por la presencia de metales pesados (Quiñones et al., 2021).

Los resultados relacionados con el peso fresco de la parte aérea y radicular se pueden observar en la **Figura 7**. En primer lugar, destaca la clara diferencia observada en el control sin inoculación, donde las plantas tratadas con cromo (+Cr) presentan una notable reducción del peso fresco tanto de la parte aérea como radicular, en comparación con las condiciones sin tratamiento (-Cr). Este resultado evidencia, nuevamente, el impacto negativo del cromo sobre el crecimiento vegetal en ausencia de microorganismos.

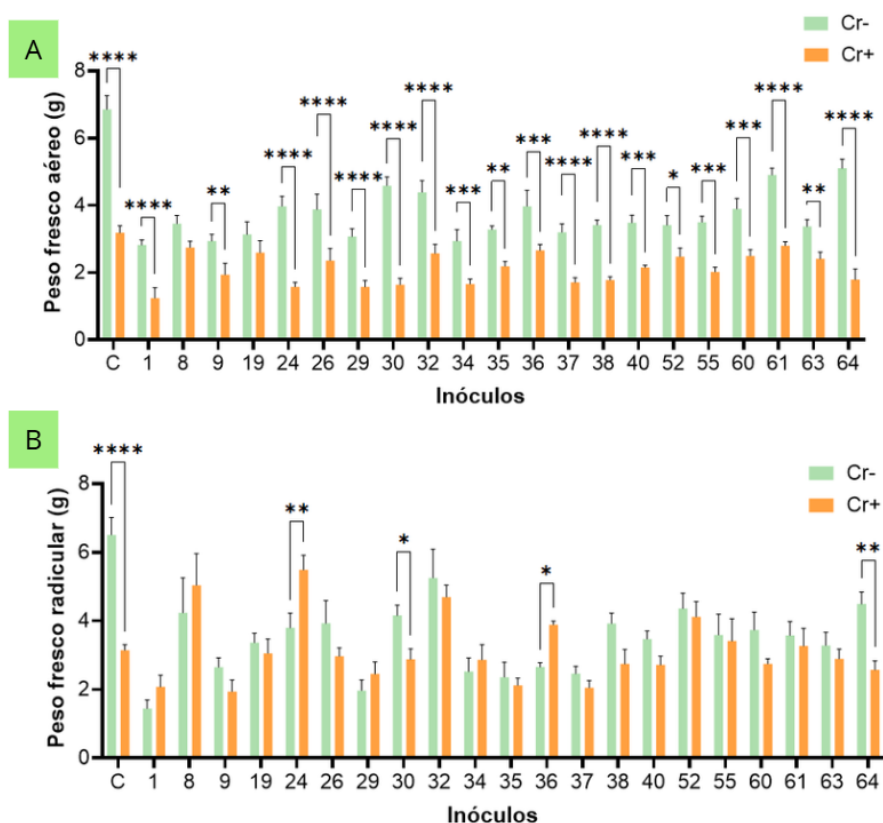


Figura 7. Efecto del Cr (VI) sobre los pesos frescos de las partes aérea y radicular de plantas de *L. albus* frente a cada inóculo, siendo “C” el control. En verde se observan las plantas regadas sin cromo y en naranja las plantas regadas con cromo. **A:** peso fresco aéreo en g frente a cada inóculo. **B:** peso fresco de la raíz total en g frente a cada inóculo. Se representa con la media (n=5) $\pm$ SE. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (-Cr vs +Cr) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,02$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

En la parte aérea (**Figura 7A**), la mayoría de los inóculos muestran diferencias significativas entre condiciones, evidenciando una disminución del crecimiento bajo estrés por cromo. Sin embargo, en las cepas 8 y 19 no se observaron diferencias significativas entre -Cr y +Cr, lo que podría indicar una mayor tolerancia al metal o un posible efecto protector de estas bacterias frente al estrés por cromo. Ambas son *Bradyrhizobium*, lo que nuevamente explica su capacidad para tolerar mejor la contaminación por metales pesados (Salmi & Boulila, 2021).

En el peso fresco radicular (**Figura 7B**) se observa una tendencia general de disminución bajo estrés por cromo, aunque en algunas cepas las plantas regadas con cromo presentan valores superiores al de las plantas sin tratamiento con cromo (1, 8, 24, 29, 34 y 36). Esto sugiere una posible estimulación del crecimiento radicular, asociada a una respuesta adaptativa de la planta y al efecto de ciertas bacterias que pueden favorecer el desarrollo y reducir la toxicidad del metal. Concretamente las cepas 24 y 36 mostraron diferencias significativas, viendo un incremento radicular en el tratamiento con cromo (ambas *Bradyrhizobium*). Este

comportamiento podría estar relacionado con el fenómeno de hormesis, ya que, según la bibliografía, dependiendo de la dosis aplicada (concentración y tiempo de exposición), el Cr (VI) puede ejercer tanto un efecto estimulador como inhibidor sobre el crecimiento radicular (Patnaik et al., 2013).

Clorofila

Antes de entrar en detalle sobre los resultados obtenidos respecto a la producción de clorofila, cabe destacar que, a simple vista, en algunos tratamientos se pudo observar una clara diferencia de color entre las plantas regadas con y sin cromo (**Figura 8**).

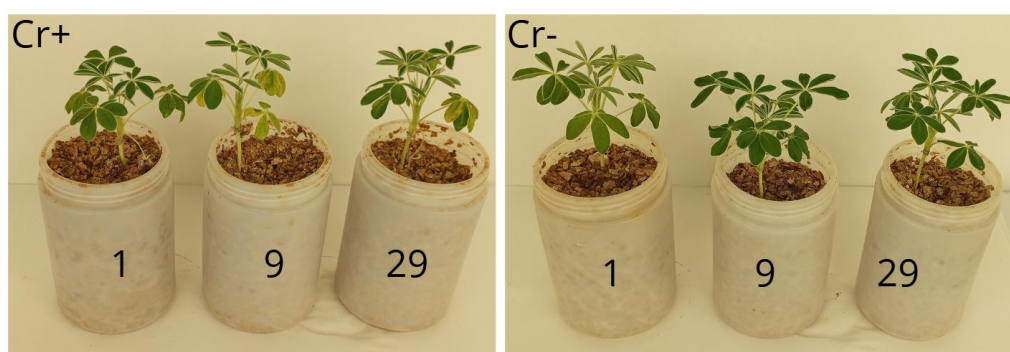


Figura 8. Fotografía de 6 macetas de *L. albus* junto con los inóculos 1, 9 y 29, diferenciando entre tratamientos con cromo (Cr+) y sin cromo (Cr-). Se observa principalmente en los tratamientos 9 y 29 una clara disminución del color y la turgencia de las hojas en el caso de las plantas regadas con cromo, en comparación de las que fueron regadas sin cromo. Por el contrario, en el inóculo 1 no se observan grandes diferencias.

Al estudiar los resultados obtenidos (**Figura 9**), en general se observa una disminución en el contenido de clorofila en las plantas regadas con cromo respecto a las que no fueron regadas con cromo, lo que refleja el efecto negativo del metal sobre la capacidad fotosintética de *L. albus*. Esta reducción fue especialmente evidente en el control sin inoculación, donde las diferencias entre -Cr y +Cr fueron altamente significativas. La disminución del contenido de clorofila bajo estrés por cromo ha sido ampliamente descrita en la bibliografía donde se afirma que las plantas expuestas a dicho metal mostraron una disminución en los niveles de clorofila, lo que podría deberse a una alteración en la biosíntesis de la clorofila (Sharma et al., 2020). Además, la toxicidad por cromo suele reducir el crecimiento vegetal al causar alteraciones en la estructura celular y en los cloroplastos, provocando clorosis foliar y disminución del contenido de pigmentos (Sharma et al., 2020).

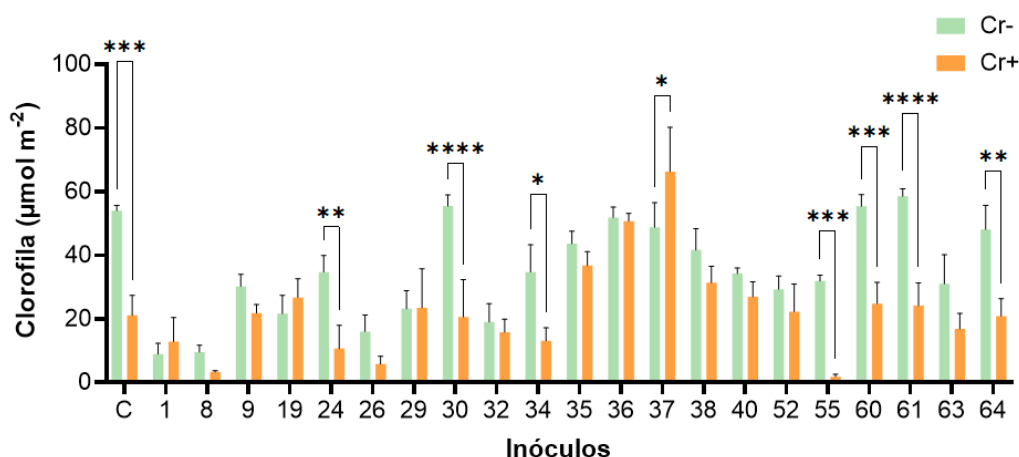


Figura 9. Efecto del Cr (VI) sobre la producción de clorofila ($\mu\text{mol m}^{-2}$) en plantas de *L. albus*, siendo “C” es el control. En verde las plantas regadas sin cromo y en naranja las plantas regadas con cromo. Se representa con la media ($n=5$) $\pm$ SE. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (Cr^- vs Cr^+) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,02$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

Sin embargo, algunas cepas mostraron una menor reducción del contenido de clorofila, e incluso valores similares o superiores a los tratamientos donde no se regó con cromo, como ocurrió en las cepas 1, 19, 29 y 37. Este comportamiento podría indicar una mayor tolerancia al cromo y un posible efecto protector de determinados microorganismos sobre el aparato fotosintético de la planta.

No obstante, este parámetro presentó una elevada variabilidad experimental. En algunos casos, dos mediciones realizadas sobre una misma hoja mostraron valores muy diferentes, lo que limita la fiabilidad de los datos obtenidos y dificulta la interpretación biológica de ciertas diferencias observadas. Además, la observación visual de las plantas no siempre fue completamente coherente con los valores registrados. Por tanto, los resultados relacionados con la producción de clorofila deben interpretarse con cautela y considerarse principalmente como una aproximación al estado fisiológico y fotosintético de las plantas, ya que serían necesarios métodos más precisos para confirmar estas diferencias.

Nódulos y raíces proteoides

Es interesante estudiar los nódulos para determinar qué cepas bacterianas establecen esta interacción con *L. albus* y en qué medida lo hacen. Además, estudiar la aparición de raíces proteoides también es un punto importante ya que se ha visto que podrían participar indirectamente en la tolerancia a metales pesados al ayudar a modular la disponibilidad de metales en la rizosfera (Quiñones et al., 2021).

En cuanto al número de nódulos (**Figura 10**), en términos generales se observa una reducción muy marcada de la nodulación en las plantas tratadas con cromo respecto a las condiciones sin tratamiento. En numerosas cepas, el número de nódulos disminuyó drásticamente o incluso fue prácticamente inexistente en presencia de Cr (VI), lo que indica un fuerte efecto negativo del metal sobre el establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa. En la bibliografía se ha reportado que varios metales pesados inhiben el crecimiento y modifican la morfología, la estructura y las actividades de varios grupos de microorganismos del suelo, incluyendo fijadores simbióticos de nitrógeno (Stambulska et al., 2018). Esto podría explicar la marcada reducción de la nodulación observada en los tratamientos regados con cromo. Sin embargo, se pueden destacar varias cepas. Por un lado, la cepa 60 (perteneciente al género *Bradyrhizobium*), mantuvo una capacidad de nodulación relativamente elevada en comparación con el resto de las cepas en presencia de cromo, lo que podría indicar una mayor tolerancia al metal o una mejor adaptación de la interacción simbiótica bajo estas condiciones. Por otro lado, la cepa 29 (*Staphylococcus hominis*) mostró una elevada capacidad de nodulación, un resultado especialmente interesante debido a que, de nuevo, no se ha encontrado bibliografía previa que relacione esta especie con *L. albus*, lo que podría abrir nuevas líneas de investigación. Además, las cepas 34 y 37 (ambas *Ralstonia insidiosa*) obtuvieron un número elevado de nódulos a pesar de no estar descritas como unas de las bacterias con mayor capacidad de nodulación en *L. albus*. Aun así, se ha visto que algunas especies de este género bacteriano tienen capacidad de nodular y fijar nitrógeno al entrar en simbiosis con algunas leguminosas (Chen et al., 2003). El resto de cepas que obtuvieron un elevado número de nódulos en condiciones sin cromo pertenecen al género *Bradyrhizobium*, resultado coherente con la bibliografía, ya que este género constituye el principal microsimbionte asociado a la nodulación de *L. albus* (Fernández-Pascual et al., 2007).

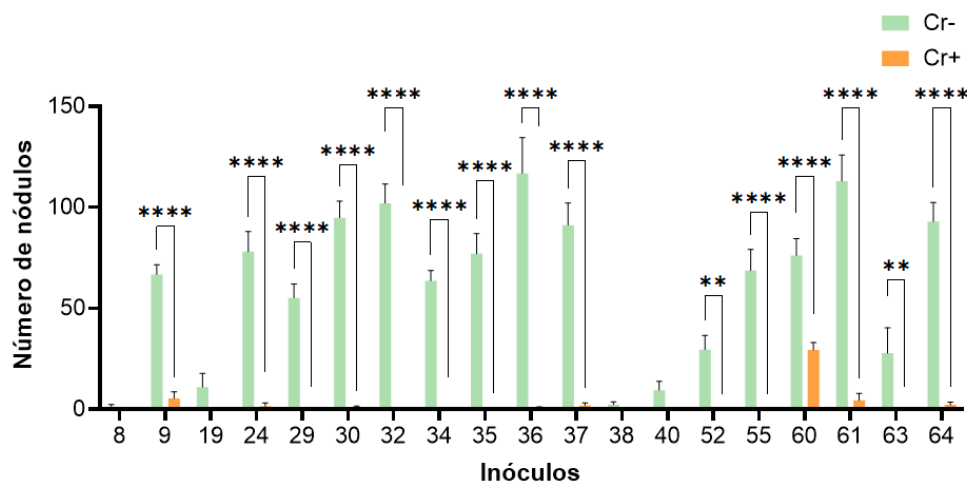


Figura 10. Efecto del Cr (VI) sobre el número de nódulos en plantas de *L. albus* frente a cada inóculo. En verde las plantas regadas sin cromo y en naranja las plantas regadas con cromo. Se representa con la media ($n=5$) $\pm$ SE. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (-Cr vs +Cr) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,02$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Los inóculos que no nodularon no se representan.

Respecto al número de raíces proteoides, únicamente algunos tratamientos presentaron este tipo de estructuras y en cantidades muy bajas (datos no mostrados). Aunque en ciertos casos aparecieron bajo condiciones de estrés por cromo, la elevada variabilidad y el reducido número observado dificultan establecer conclusiones claras sobre su relación con el tratamiento.

4.1.3. Análisis de la actividad nitrogenasa en presencia de cromo (VI)

Se midió la actividad nitrogenasa en las raíces de *L. albus* inoculado con las cepas de la **Tabla 1**. Esta actividad es un parámetro clave porque permite evaluar la capacidad funcional de la simbiosis entre la planta y las bacterias fijadoras de nitrógeno. Asimismo, es responsable de la fijación biológica de nitrógeno atmosférico, un proceso esencial para el desarrollo de las leguminosas, especialmente en suelos pobres en nutrientes (Li et al., 2024). El estudio de su actividad permite determinar hasta qué punto el cromo afecta al funcionamiento de los nódulos y a la eficiencia de la simbiosis. Los resultados obtenidos se pueden observar en la **Figura 11**.

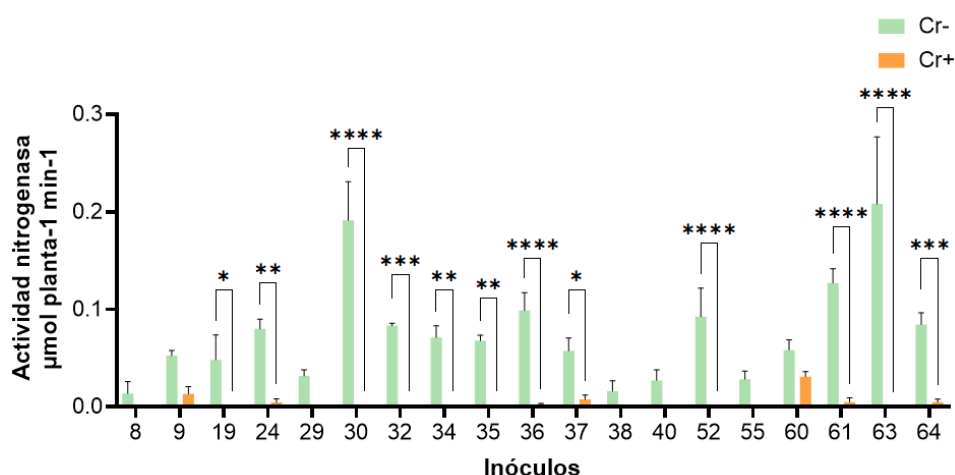


Figura 11. Efecto del Cr (VI) sobre la actividad nitrogenasa de raíces de *L. albus* en $\mu\text{mol etileno planta}^{-1} \text{ min}^{-1}$ frente a cada inóculo. En verde las plantas regadas sin cromo y en naranja las plantas regadas con cromo. Se representa con la media ($n=5$) $\pm$ SE. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (-Cr vs +Cr) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,02$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Los inóculos que no presentaron actividad no se representan.

Se observa una disminución de la actividad nitrogenasa en las plantas tratadas con cromo respecto a las tratadas sin cromo, lo que sugiere que el Cr (VI) afecta negativamente al funcionamiento de los nódulos y a la eficiencia de la fijación biológica de nitrógeno. Las cepas 1 y 26 que no habían nodulado, tampoco presentaron actividad nitrogenasa. Algunas cepas como 30 y 63 (ambas pertenecientes al género *Bradyrhizobium*), presentaron los valores más altos de actividad nitrogenasa en condiciones sin cromo, aunque dicha actividad se redujo significativamente bajo estrés por cromo. Por otro lado, algunas cepas como 9 y 60 (ambas pertenecientes al género *Bradyrhizobium*) mostraron niveles bajos, pero sin llegar a mostrar diferencias significativas de actividad en presencia de cromo, lo que podría sugerir una mayor tolerancia al estrés y una cierta capacidad para conservar parcialmente la actividad de fijación de nitrógeno bajo condiciones adversas. Se ha reportado en la bibliografía que cepas de este género son más resistentes a la presencia de metales pesados que otros géneros (Zahran, 1999).

En conjunto, los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la respuesta de *L. albus* frente al estrés por cromo depende en gran medida de la cepa bacteriana inoculada. Entre las cepas estudiadas, algunas destacaron por mostrar un posible efecto protector en distintos parámetros fisiológicos. La cepa 19 presentó los resultados más favorables en el área foliar relativa y en el mantenimiento del peso fresco aéreo bajo condiciones de estrés por cromo. Por su parte, las cepas 8, 24 y 36 también mostraron una respuesta positiva en el peso fresco, mientras que la cepa 60 destacó por su capacidad de nodulación en presencia de cromo y por obtener una elevada actividad nitrogenasa en presencia de cromo junto con la cepa 9. Estos resultados

sugieren que determinadas bacterias podrían contribuir a mejorar la tolerancia vegetal al cromo y presentan potencial interés en estrategias de fitorremediación y agricultura sostenible.

4.2. Análisis de la actividad ACC desaminasa en bacterias inoculadas

Como parte de la caracterización de las cepas bacterianas descritas en la **Tabla 1**, se llevó a cabo el protocolo ACC desaminasa. Durante el desarrollo del protocolo se plantearon varios problemas. Aunque sólo se detectó actividad en dos cepas (**Tabla 5**), los valores obtenidos no resultaron suficientemente consistentes ni comparables con los descritos en la bibliografía, lo que dificulta su interpretación biológica (Msaddak et al., 2023).

Tabla 5. Actividad ACC desaminasa expresada como μmol de α -cetobutirato mg^{-1} de proteína h^{-1} de las cepas 52 y 61.

Cepa	Actividad ACC desaminasa (μmol α -cetobutirato mg^{-1} proteína h^{-1})
52	2.78
61	2.36

4.3. Formación de raíces proteoides y respuesta fisiológica frente al cromo (VI)

Se llevó a cabo un experimento centrado en la formación de raíces proteoides en respuesta de distintos ecotipos de *L. albus* frente al estrés por cromo. Para ello, se analizaron diferentes parámetros fisiológicos y se evaluó la capacidad de cada ecotipo para desarrollar este tipo de estructuras en presencia y ausencia de cromo.

Al analizar el peso fresco aéreo (**Figura 12A**), todos los ecotipos presentaron una disminución del crecimiento muy significativa al comparar las plantas tratadas con cromo con las tratadas sin cromo. Inclusive, al comparar los distintos ecotipos entre sí (datos no mostrados), se observó que algunos presentaban diferencias significativas en su capacidad de crecimiento, lo que sugiere una respuesta diferencial frente al estrés por cromo dependiendo del genotipo vegetal. El ecotipo que obtuvo mayor biomasa aérea fue el 5174 tanto en presencia como en ausencia de cromo, aunque también mostró una reducción muy marcada bajo condiciones de estrés.

Respecto al peso fresco de la raíz (**Figura 12B**), también se observó una tendencia general de disminución en presencia de cromo, aunque las diferencias fueron menos evidentes que en la parte aérea. Nuevamente, el ecotipo 5174 destacó por presentar el mayor peso radicular en condiciones de tratamiento sin cromo, mostrando diferencias significativas respecto a otros ecotipos. Esto podría indicar una mayor capacidad de desarrollo del sistema radicular, característica que podría estar relacionada con una mejor adaptación a condiciones de baja disponibilidad de nutrientes o estrés ambiental.

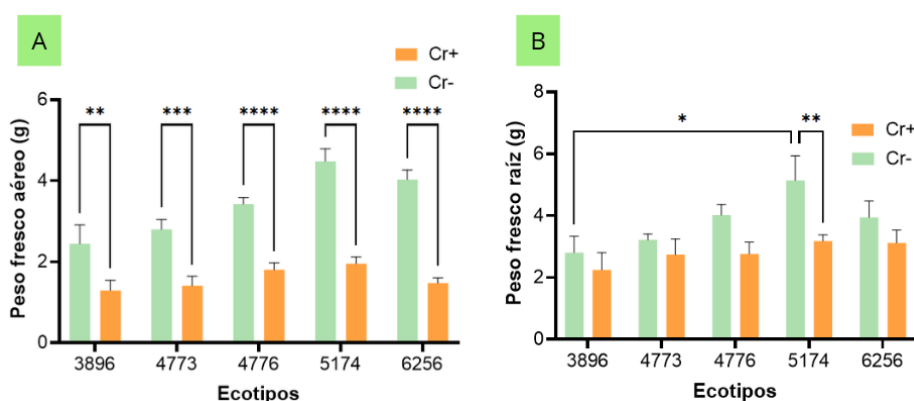


Figura 12. Efecto del Cr (VI) sobre el peso fresco de las partes aérea y radicular de cada ecotipo de *L. albus*. En verde las plantas regadas sin cromo y en naranja las plantas regadas con cromo. **A:** peso fresco aéreo (g) frente los cinco ecotipos de *L. albus*. **B:** peso fresco de la raíz (g) frente a los cinco ecotipos. Se representa con la media ($n=5$) $\pm$ SE. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (-Cr vs +Cr) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,02$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

Respecto al área foliar (**Figura 13A**), en líneas generales, se observa una disminución en las plantas tratadas con cromo respecto a las plantas control. Salvo el ecotipo 4776, todos los demás ecotipos mostraron diferencias significativas entre condiciones. Esto podría sugerir una mayor tolerancia relativa al estrés por cromo.

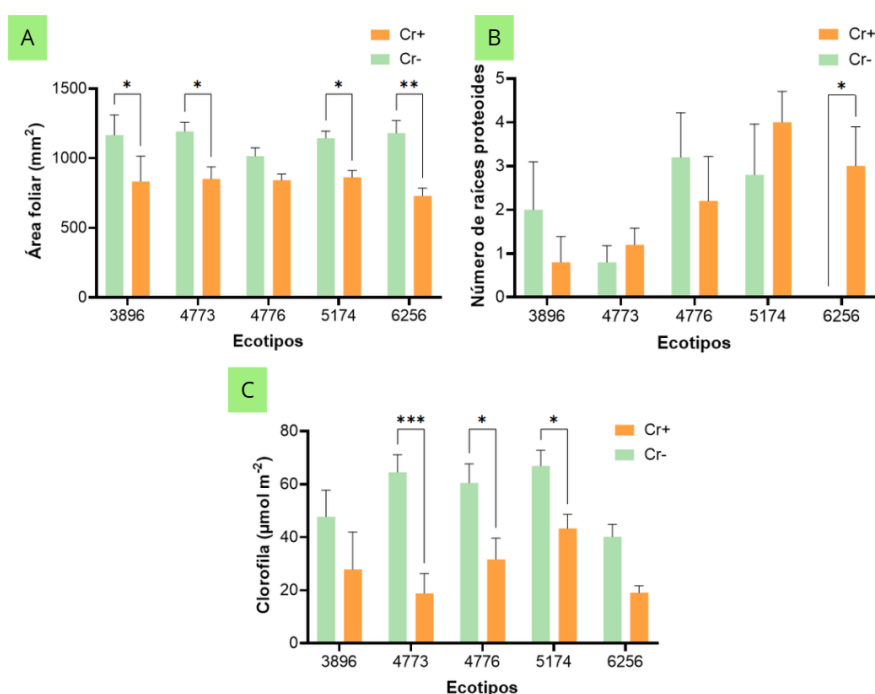


Figura 13. Efecto del Cr (VI) sobre el área foliar en mm^2 , número de raíces proteoides y clorofila en $\mu\text{mol m}^{-2}$ de cada ecotipo de *L. albus*. En verde las plantas regadas sin cromo y en naranja las plantas regadas con cromo. **A:** área foliar (mm^2) frente los cinco ecotipos de *L. albus*. **B:** número de raíces proteoides frente los cinco ecotipos de *L. albus*. **C:** clorofila ($\mu\text{mol m}^{-2}$) frente a los cinco ecotipos de *L. albus*. Se representa con la media ($n=5$) $\pm$ SE. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (-Cr vs +Cr) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,02$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

En cuanto al número de raíces proteoides (**Figura 13B**), los resultados muestran una elevada variabilidad entre ecotipos. Los ecotipos 4773, 5174 y 6256 superaron el número de raíces proteoides en las condiciones tratadas con cromo. De hecho, en el ecotipo 6256 se observó incluso un aumento significativo. Este comportamiento podría estar relacionado con una respuesta adaptativa de la planta frente a condiciones adversas, ya que las raíces proteoides permiten aumentar la superficie de absorción y mejorar la captación de nutrientes (Quiñones et al., 2021).

Por último, en relación con el contenido de clorofila (**Figura 13C**), los ecotipos 3896 y 6256 destacaron por no mostrar diferencias significativas entre tratamientos. Nuevamente, estos resultados deben interpretarse con cautela debido a la elevada variabilidad observada durante las mediciones.

En conjunto, estos resultados indican que los distintos ecotipos de *L. albus* presentan respuestas fisiológicas diferentes frente al estrés por cromo. Mientras algunos parecen mostrar una mayor sensibilidad al metal, otros podrían desarrollar mecanismos adaptativos, como el incremento de raíces proteoides, que favorecerían su tolerancia bajo condiciones adversas. De hecho, en la bibliografía se describe la capacidad de este órgano de restringir la absorción de metales tóxicos mediante la formación de complejos metal-ligando no tóxicos (Dessureault-Rompré et al., 2008).

4.4. Futuro trabajo

Los resultados obtenidos en este estudio abren nuevas líneas de investigación relacionadas con la tolerancia al cromo en *L. albus* y el papel de sus microorganismos simbioses en procesos de adaptación y fitorremediación. Aunque se observaron diferencias fisiológicas relevantes entre tratamientos y entre cepas bacterianas, aún quedan numerosos aspectos por profundizar para comprender mejor los mecanismos implicados. Por ello, algunos temas que podrían abordarse a continuación del presente trabajo son:

- Cuantificación del cromo acumulado tanto en la parte aérea como en las raíces de las plantas. Esto permitiría calcular parámetros como el factor de bioacumulación y el factor de translocación y estudiar cómo se mueve el cromo en esta especie.
- Sería de gran interés continuar trabajando con aquellas cepas bacterianas que mostraron un posible efecto protector frente al estrés por cromo. En este sentido, sería interesante repetir los experimentos utilizando concentraciones menores de cromo para estudiar si

la nodulación y el crecimiento vegetal mejoran bajo condiciones menos extremas y si pueden observarse fenómenos de hormesis de forma más clara. A su vez, en aquellas cepas que no se han hecho estudios de simbiosis con *L. albus* también sería de gran interés profundizar en cómo se produce esta interacción.

- En relación con la ACC desaminasa, los resultados obtenidos fueron limitados y presentaron problemas metodológicos, por lo que sería necesario optimizar y estandarizar los protocolos experimentales.

5. Conclusiones

En conjunto, los resultados obtenidos en el experimento de nodulación muestran que la respuesta de *L. albus* al estrés por cromo depende en gran medida de la cepa bacteriana inoculada. Mientras que algunas bacterias no parecen mitigar de forma significativa los efectos del metal, otras podrían contribuir a mantener el crecimiento vegetal e incluso favorecer determinadas respuestas adaptativas bajo condiciones de estrés, especialmente las cepas 8, 9, 19, 24, 36 y 60 (todas pertenecientes al género *Bradyrhizobium*). Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de la interacción planta-microorganismo en la respuesta al estrés por cromo, destacando la existencia de cepas con mayor potencial para su uso en estrategias de biorremediación.

Respecto a la caracterización bacteriana mediante la actividad ACC desaminasa, los resultados obtenidos no fueron lo suficientemente concluyentes como para realizar una caracterización fiable de las cepas analizadas.

Finalmente, los resultados obtenidos en el experimento de raíces proteoides ponen de manifiesto la elevada variabilidad existente entre los distintos ecotipos analizados. El ecotipo 5174 destacó por presentar la mayor producción de biomasa, mientras que el 4776 fue el único capaz de no mostrar diferencias significativas en el área foliar entre tratamientos con y sin cromo. Por su parte, el ecotipo 6256 destacó por desarrollar un mayor número de raíces proteoides bajo condiciones de estrés por cromo, lo que lo hace un potencial candidato para futuros estudios relacionados con tolerancia y adaptación a metales pesados.

6. Bibliografía

- Bakhtiyarifar, M., Enayatizamir, N., & Mehdi Khanlou, K. (2021). Biochemical and molecular investigation of non-rhizobial endophytic bacteria as potential biofertilisers. *Archives of Microbiology*, 203(2), 513–521. <https://doi.org/10.1007/S00203-020-02038-Z>
- Benezech, C., Berrabah, F., Jardinaud, M. F., Le Scornet, A., Milhes, M., Jiang, G., George, J., Ratet, P., Vailleau, F., & Gourion, B. (2020). Medicago-Sinorhizobium-Ralstonia Co-infection Reveals Legume Nodules as Pathogen Confined Infection Sites Developing Weak Defenses. *Current Biology*, 30(2), 351-358.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.11.066>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Chen, W. M., James, E. K., Prescott, A. R., Kierans, M., & Sprent, J. I. (2003). Nodulation of Mimosa spp. by the β -Proteobacterium Ralstonia taiwanensis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(12), 1051–1061. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.12.1051>
- Dessureault-Rompré, J., Nowack, B., Schulin, R., Tercier-Waeber, M. L., & Luster, J. (2008). Metal Solubility and Speciation in the Rhizosphere of Lupinus albus Cluster Roots. *Environmental Science and Technology*, 42(19), 7146–7151. <https://doi.org/10.1021/ES800167G>
- El Montassir, Z., Abdoul-Latif, F. M., Ainane, A., Lachtioui, Y., Bajjou, O., Liba, A., Ainane, T., & Maria Giuffrè, A. (2025). Phytoremediation of hexavalent chromium by absinthe: experimental approach and computational modeling of the transfer and production of some secondary metabolites. *Plant Physiology and Biochemistry*, 226, 110034. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2025.110034>
- Erofeeva, E. A. (2022). Hormesis in plants: Its common occurrence across stresses. *Current Opinion in Toxicology*, 30, 100333. <https://doi.org/10.1016/J.COTOX.2022.02.006>

- Ertani, A., Mietto, A., Borin, M., & Nardi, S. (2017). Chromium in Agricultural Soils and Crops: A Review. *Water, Air, & Soil Pollution* 2017 228:5, 228(5), 190-. <https://doi.org/10.1007/S11270-017-3356-Y>
- Fagorzi, C., Checcucci, A., Dicenso, G. C., Debiec-Andrzejewska, K., Dziewit, L., Pini, F., & Mengoni, A. (2018). Harnessing Rhizobia to Improve Heavy-Metal Phytoremediation by Legumes. *Genes*, 9(11), 542. <https://doi.org/10.3390/GENES9110542>
- Fernández-Pascual, M., Pueyo, J. J., De Felipe, M. R., Golvano, • M Pilar, & Lucas, • M Mercedes. (n.d.). *Dynamic Soil, Dynamic Plant Singular Features of the Bradyrhizobium-Lupinus Symbiosis*.
- Gómez-Godínez, L. J., Aguirre-Noyola, J. L., Martínez-Romero, E., Arteaga-Garibay, R. I., Ireta-Moreno, J., & Ruvalcaba-Gómez, J. M. (2023). A Look at Plant-Growth-Promoting Bacteria. *Plants*, 12(8), 1668. <https://doi.org/10.3390/PLANTS12081668>
- Hoagland, D. R. (1920). Optimum nutrient solutions for plants. *Science*, 52(1354), 562–564. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.52.1354.562>;WEBSITE:WEBSITE:AAAS-SITE;JOURNAL:JOURNAL:SCIENCE;WGROU:STRING:PUBLICATION
- Hughes, C., Ringelberg, J. J., & Bruneau, A. (2025). Legumes. *Current Biology*, 35(9), R323–R328. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2025.03.049>
- Jach, M. E., Sajnaga, E., & Ziaja, M. (2022). Utilization of Legume-Nodule Bacterial Symbiosis in Phytoremediation of Heavy Metal-Contaminated Soils. *Biology* 2022, Vol. 11, Page 676, 11(5), 676. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY11050676>
- Jun, R., Ling, T., & Guanghua, Z. (2009). Effects of chromium on seed germination, root elongation and coleoptile growth in six pulses. *International Journal of Environmental Science & Technology* 2009 6:4, 6(4), 571–578. <https://doi.org/10.1007/BF03326097>
- Kamila, S., Dey, K. K., Islam, S., & Chattopadhyay, A. (2025). Mixture of arsenic and chromium alters antioxidant, DNA repair and tumor suppressor gene expressions in zebrafish brain at environmental concentrations. *Journal of Environmental Sciences*, 155, 60–72. <https://doi.org/10.1016/J.JES.2024.07.014>

- Kloos, W. E., & Schleifer, K. H. (1975). Isolation and characterization of Staphylococci from human skin. II. Descriptions of four new species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus simulans*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 25(1), 62–79. <https://doi.org/10.1099/00207713-25-1-62/CITE/REFWORKS>
- Kurabachew, H., & Wydra, K. (2013). Characterization of plant growth promoting rhizobacteria and their potential as bioprotectant against tomato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Biological Control*, 67(1), 75–83. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2013.07.004>
- Lado, L. R., Hengl, T., & Reuter, H. I. (2008). Heavy metals in European soils: A geostatistical analysis of the FOREGS Geochemical database. *Geoderma*, 148(2), 189–199. <https://doi.org/10.1016/J.GEODERMA.2008.09.020>
- Lee, S. Y., & Cho, K. S. (2026). Microbial-assisted Phytoremediation: A Sustainable Strategy for Heavy Metal Pollution in Agriculture. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 2026, 1–35. <https://doi.org/10.1007/S42729-026-03236-2>
- Li, Y., Liu, Q., Zhang, D. X., Zhang, Z. Y., Xu, A., Jiang, Y. L., & Chen, Z. C. (2024). Metal nutrition and transport in the process of symbiotic nitrogen fixation. *Plant Communications*, 5(4), 100829. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2024.100829>
- Msaddak, A., Quiñones, M. A., Mars, M., & Pueyo, J. J. (2023). The Beneficial Effects of Inoculation with Selected Nodule-Associated PGPR on White Lupin Are Comparable to Those of Inoculation with Symbiotic Rhizobia. *Plants* 2023, Vol. 12, Page 4109, 12(24), 4109. <https://doi.org/10.3390/PLANTS12244109>
- Nakei, M. D., Venkataramana, P. B., & Ndakidemi, P. A. (2022). Soybean-Nodulating Rhizobia: Ecology, Characterization, Diversity, and Growth Promoting Functions. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6, 824444. <https://doi.org/10.3389/FSUFS.2022.824444/FULL>
- Núñez, O., Fernández-Navarro, P., Martín-Méndez, I., Bel-Lan, A., Locutura, J. F., & López-Abente, G. (2016). Arsenic and chromium topsoil levels and cancer mortality in Spain. *Environmental Science and Pollution Research* 2016 23:17, 23(17), 17664–17675. <https://doi.org/10.1007/S11356-016-6806-Y>

- Ott, T., Van Dongen, J. T., Günther, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., Bock, V., Czechowski, T., Geigenberger, P., & Udvardi, M. K. (2005). Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Current Biology*, 15(6), 531–535. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.042>
- Pandey, A. K., Zorić, L., Sun, T., Karanović, D., Fang, P., Borišev, M., Wu, X., Luković, J., & Xu, P. (2022). The Anatomical Basis of Heavy Metal Responses in Legumes and Their Impact on Plant–Rhizosphere Interactions. *Plants* 2022, Vol. 11, Page 2554, 11(19), 2554. <https://doi.org/10.3390/PLANTS11192554>
- Patnaik, A. R., Achary, V. M. M., & Panda, B. B. (2013). Chromium (VI)-induced hormesis and genotoxicity are mediated through oxidative stress in root cells of *Allium cepa* L. *Plant Growth Regulation* 2013 71:2, 71(2), 157–170. <https://doi.org/10.1007/S10725-013-9816-5>
- Pereira, A., Ramos, F., & Sanches Silva, A. (2022). Lupin (*Lupinus albus* L.) Seeds: Balancing the Good and the Bad and Addressing Future Challenges. *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 8557, 27(23), 8557. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27238557>
- Pueyo, J. J., Quiñones, M. A., Coba de la Peña, T., Fedorova, E. E., & Lucas, M. M. (2021). Nitrogen and Phosphorus Interplay in Lupin Root Nodules and Cluster Roots. *Frontiers in Plant Science*, 12, 644218. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2021.644218/FULL>
- Quiñones, M. A., Fajardo, S., Fernández-pascual, M., Lucas, M. M., & Pueyo, J. J. (2021). Nodulated white lupin plants growing in contaminated soils accumulate unusually high mercury concentrations in their nodules, roots and especially cluster roots. *Horticulturae*, 7(9), 302. <https://doi.org/10.3390/HORTICULTURAE7090302/S1>
- Qureshi, F. F., Ashraf, M. A., Rasheed, R., Hussain, I., Rizwan, M., Iqbal, M., & Yong, J. W. H. (2024). Microbial-assisted alleviation of chromium toxicity in plants: A critical review. *Plant Stress*, 11, 100394. <https://doi.org/10.1016/J.STRESS.2024.100394>
- Ruiz-Díez, B., Fajardo, S., Puertas-Mejía, M. A., De Felipe, M. D. R., & Fernández-Pascual, M. (2008). Stress tolerance, genetic analysis and symbiotic properties of root-nodulating bacteria isolated from Mediterranean leguminous shrubs in Central

- Spain. *Archives of Microbiology* 2008 191:1, 191(1), 35–46.
<https://doi.org/10.1007/S00203-008-0426-Y>
- Salmi, A., & Boulila, F. (2021). Heavy metals multi-tolerant Bradyrhizobium isolated from mercury mining region in Algeria. *Journal of Environmental Management*, 289, 112547. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2021.112547>
- Shahid, M., Shamshad, S., Rafiq, M., Khalid, S., Bibi, I., Niazi, N. K., Dumat, C., & Rashid, M. I. (2017). Chromium speciation, bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system: A review. *Chemosphere*, 178, 513–533. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2017.03.074>
- Shanmugasundaram, R., & Somasundaram, S. T. (2024). Effect of Burkholderia sp. on Root Nodulation in Black Gram Grown in Cadmium-Contaminated Soil Supplemented with Lignite Humic Acid and Seaweed Biochar. *Journal of Environmental Nanotechnology*, 13(4), 130–148. <https://doi.org/10.13074/JENT.2024.12.2441046>
- Sharma, A., Kapoor, D., Wang, J., Shahzad, B., Kumar, V., Bali, A. S., Jasrotia, S., Zheng, B., Yuan, H., & Yan, D. (2020). Chromium Bioaccumulation and Its Impacts on Plants: An Overview. *Plants*, 9(1), 100. <https://doi.org/10.3390/PLANTS9010100>
- Siddiqua, A., & Faisal, M. (2019). Phytoremediation of chromium-polluted soil using plants in conjunction with microbes. *Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants*, 6, 215–231. https://doi.org/10.1007/978-3-319-99651-6_10/TABLES/2
- Sprent, J. I., Ardley, J., & James, E. K. (2017). Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. *New Phytologist*, 215(1), 40–56. <https://doi.org/10.1111/NPH.14474;SUBPAGE:STRING:FRAMEDPDF;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER>
- Stambulska, U. Y., Bayliak, M. M., & Lushchak, V. I. (2018). Chromium(VI) Toxicity in Legume Plants: Modulation Effects of Rhizobial Symbiosis. *BioMed Research International*, 2018(1), 8031213. <https://doi.org/10.1155/2018/8031213>
- Subrahmanyam, D. (2008). Effects of chromium toxicity on leaf photosynthetic characteristics and oxidative changes in wheat (*Triticum aestivum* L.).

Photosynthetica 2008 46:3, 46(3), 339–345. <https://doi.org/10.1007/S11099-008-0062-4>

Tumolo, M., Ancona, V., De Paola, D., Losacco, D., Campanale, C., Massarelli, C., & Uricchio, V. F. (2020). Chromium Pollution in European Water, Sources, Health Risk, and Remediation Strategies: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2020, Vol. 17, Page 5438, 17(15), 5438. <https://doi.org/10.3390/IJERPH17155438>

Vocciante, M., Grifoni, M., Fusini, D., Petruzzelli, G., & Franchi, E. (2022). The Role of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) in Mitigating Plant's Environmental Stresses. *Applied Sciences* 2022, Vol. 12, Page 1231, 12(3), 1231. <https://doi.org/10.3390/APP12031231>

Zahran, H. H. (1999). Rhizobium -Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate . *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(4), 968–989. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.4.968-989.1999>;ISSUE:ISSUE:DOI