

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA



ACLIMATACIÓN DE LA ASOCIACIÓN PLANTA-HONGO FILAMENTOSO A UN
SUELO CONTAMINADO ARTIFICIALMENTE CON HIDROCARBUROS

T E S I S

Presentada en la Universidad Autónoma Metropolitana para obtener el grado de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

Por:

I. B.I. CALIOPE MENDARTE ALQUISIRA

Director:

DR. MARIANO GUTIÉRREZ ROJAS

MÉXICO D. F.

ENERO 2013.

México D. F. a 07 de Enero de 2013.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad
Iztapalapa aprobó la tesis:

**Aclimatación de la asociación planta hongo filamentoso a un suelo contaminado
artificialmente con hidrocarburos**

Que presentó la estudiante

CALIOPE MENDARTE ALQUISIRA

Comité Tutorial

Director: Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

Asesora: Dra. Araceli Tomasini Campocosio

Asesor: Dr. David Manuel Díaz Pontones

Jurado

Presidenta: Dra. Araceli Tomasini Campocosio

Secretaria: Dra. Tania L. Volke Sepúlveda

Vocal: Dr. David Manuel Díaz Pontones

Vocal: Dr. Mario Rodríguez Monroy

Handwritten signatures of the jury members: a small signature above the Presidenta name, a signature for the Secretaria, a signature for the Vocal Dr. David Manuel Díaz Pontones, and a signature for the Vocal Dr. Mario Rodríguez Monroy.

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Posgrado de Calidad (PNPC) de CONACyT con la referencia 001465.

México D. F. a 07 de Enero de 2013.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad
Iztapalapa aprobó la tesis:

**Aclimatación de la asociación planta hongo filamentoso a un suelo contaminado
artificialmente con hidrocarburos**

Que presentó la estudiante

CALIOPE MENDARTE ALQUISIRA

Comité Tutorial

Director: Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

Asesora: Dra. Araceli Tomasini Campocosio

Asesor: Dr. David Manuel Díaz Pontones

Jurado

Presidenta: Dra. Araceli Tomasini Campocosio

Secretaria: Dra. Tania L. Volke Sepúlveda

Vocal: Dr. David Manuel Díaz Pontones

Vocal: Dr. Mario Rodríguez Monroy

DEDICATORIA

A Dios todopoderoso:

Quien me ciñe de conocimiento y quien hace ligero mi camino.

A mi madre:

Olga Lidia

Por su amor inmenso y cuidados.

A mis hermanas:

Dánae y Calipso

Por su apoyo incondicional.

A mis sobrinos:

Osmara y Yael

Por todas las alegrías que me dan.

A mis abuelitos:

Celsa y Everardo

Por su amor incondicional.

A mis tíos y primos:

Elvira, Mario, Fabiola, Alberto; Mario, Isaí, Miroslaba

Por ser parte muy importante en mi vida.

Al resto de mi familia:

Por ser parte importante en mi camino.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Araceli Tomasini, al Dr. David M. Díaz y especialmente al Dr. Mariano Gutiérrez por su gran apoyo.

A la Dra. Tania L. Volke por sus comentarios y observaciones, que siempre me ayudaron a mejorar.

Al laboratorio Divisional de Microscopía y al M. B. E.: Roberto Lazzarini, por su apoyo en el uso del Microscopio Confocal.

Por siempre apoyarme con el material extra: al sr. Juan Manuel García Olvera responsable de laboratorios de docencia CBS y al laboratorista Ángel Rivera

A todos los compañeros del Laboratorio: Areli, Asma, Víctor, Oli, Bety, Nemi, Blanca, Néstor David, César, José Luis, Pamela y Gloria.

Especialmente a César C. Rojas Loria por su apoyo durante la realización de la maestría.

A los amigos que siempre me escucharon y aconsejaron: Alejandra, Néstor David, Nohemí, Blanca, Nemi y Asma.

A Carlos Fco. Millán, por su gran apoyo y amistad.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	8
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
1.1 Contaminación de suelos por hidrocarburos	10
1.2 Fitorremediación de suelos	12
1.3 Plantas fitorremediadoras	14
1.4 Aclimatación.....	18
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
3. HIPÓTESIS	21
4. OBJETIVOS	22
4.1 General	22
4.2 Específicos.....	22
5. MATERIALES Y MÉTODOS	23
5.1 Material biológico	23
5.3 Preparación de los cultivos	24
5.5 Estimación del crecimiento de <i>F. arundinacea</i>	26
5.6 Identificación del tipo de asociación	26
5.7 Métodos analíticos	28
5.8 Análisis estadístico.....	30
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
6.1 Selección de condiciones de cultivo para <i>Festuca arundinacea</i>	31
6.2 Asociación planta-hongo	35
6.3 Identificación del tipo de asociación	39
6.4 Efecto de la aclimatación de la asociación <i>F. arundinacea-Lewia</i> sp. a una MHC sobre la remoción de HC en suelo contaminado artificialmente.	43
7. CONCLUSIONES.....	59
8. RECOMENDACIONES	60
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
APENDICE I.....	70
Protocolo de selección de semillas de <i>F. arundinacea</i>	70
PARTICIPACIONES	73

RESUMEN

La eficiencia de los mecanismos de fitorremediación se puede mejorar mediante la asociación de las plantas con hongos endófitos. Este tipo de asociaciones puede establecerse a través de un procedimiento de aclimatación bajo condiciones *in vitro*, que permite acondicionar a los organismos en los ambientes en los que serán utilizados. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la aclimatación de la asociación *Festuca arundinacea-Lewia* sp. a una mezcla definida de hidrocarburos en condiciones *in vitro* sobre la remoción de hidrocarburos en un suelo contaminado artificialmente. Para lo anterior, primero se establecieron las condiciones de cultivo de *F. arundinacea* y las condiciones de inducción de la asociación de las plantas con *Lewia* sp. Encontramos que la mejor temperatura para la germinación de semillas y el desarrollo de *F. arundinacea* fue 25°C, con la que se obtuvo hasta 80% de sobrevivencia. En plantas de 15 días de edad, se inocularon diferentes concentraciones de una suspensión de micelio de *Lewia* sp. y se incubaron durante diferentes tiempo. Se encontró que las mejores condiciones de cultivo de la asociación fueron 20 días de contacto con un inóculo de 20 mg (base seca) de biomasa por cada tubo con 4 plantas. Se determinó que el tipo de asociación entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp. es de carácter endófitico y que la asociación puede inducirse con éxito bajo condiciones *in vitro*. Se estableció que con 45 días de aclimatación de la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. a una mezcla de hidrocarburos en condiciones *in vitro* se logró incrementar la remoción y biodegradación de hexadecano (97.6%), fenantreno (97.7%) y pireno (97.5%) en un suelo contaminado, con respecto a la asociación sin aclimatar. Los resultados sugieren que los mecanismos de remoción de hidrocarburos por la asociación inducida entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp. en suelo fueron: fitodegradación y fitoextracción.

Palabras clave: fitorremediación, aclimatación a hidrocarburos, asociación *Festuca arundinacea-Lewia* sp.

ABSTRACT

The efficiency of phytoremediation mechanisms can be improved by combining plants with endophytes. These associations can be established through acclimatization process under *in vitro* conditions, which allows associated organisms to be conditioned to similar environments to which they will be used. The aim of this work was to evaluate the effect of acclimatization of *Festuca arundinacea*-*Lewia* sp. association to a defined hydrocarbons mixture under *in vitro* conditions on the removal of hydrocarbons in an artificially contaminated soil. In order to accomplish the task, first culture conditions for *F. arundinacea* and the induction of association with *Lewia* sp. were established. We found that best temperature for seeds germination and development of *F. arundinacea* was 25°C with 80% survival. In 15 days old plants, different concentrations of a mycelial suspension of *Lewia* sp. were inoculated and incubated for different time periods. The best culture conditions for the association was found to be 20 days of contact with an inoculum of 20 mg (dry basis) of biomass per tube with 4 plants. The type of association between *F. arundinacea* and *Lewia* sp. was endophytic and the association can be successfully induced under *in vitro* conditions. A 45 days period of acclimatization of the association *F. arundinacea*-*Lewia* sp. to a defined hydrocarbons mixture *in vitro* increased the removal and biodegradation of hexadecane (97.6%), phenanthrene (97.7%), and pyrene (97.5%) in a soil contaminated as compared to the unacclimated association. The results suggest that the hydrocarbon removal mechanisms by the induced association *F. arundinacea* and *Lewia* sp. in soil were: phytodegradation and phytoextraction.

Keywords: Phytoremediation, acclimatization hydrocarbons, association *Festuca arundinacea*-*Lewia* sp.

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos 50 años, se ha detectado una gran cantidad de sitios contaminados por hidrocarburos derivados de actividades petroleras, debido principalmente a la creciente industrialización. Esto ha generado un efecto negativo en la calidad del suelo en algunas partes del mundo. Tan sólo en México, un país que se dedica a la industria petrolera, se estiman alrededor de 25 967 km² de suelos contaminados. El petróleo consiste de una mezcla de hidrocarburos alifáticos, aromáticos policíclicos (HAP) y otros compuestos. Estos grupos de hidrocarburos son tóxicos para el ambiente, sobre todo los HAP, por sus propiedades mutagénicas y carcinogénicas. Hoy en día, una de las preocupaciones de las autoridades ambientales es el desarrollo de tecnologías eficientes y económicamente factibles que permitan la eliminación de este tipo de contaminantes. Diversos estudios han demostrado que la remoción de HAP y otros contaminantes orgánicos es más rápida en suelos donde se encuentra vegetación creciendo activamente.

El uso de tecnologías de fitorremediación para el tratamiento de sitios contaminados con hidrocarburos es una opción que presenta varias ventajas con respecto a los métodos físicos y químicos: (i) son sencillas de implementar; (ii) efectivas y ambientalmente seguras; (iii) los contaminantes se destruyen o transforman; (iv) generalmente no se requieren tratamientos adicionales, y (v) son económicas. No obstante, una desventaja de esta tecnología es el tiempo necesario para el tratamiento. Esta desventaja puede superarse mediante el establecimiento de asociaciones entre plantas y microorganismos que toleran y transforman contaminantes a sustancias menos tóxicas. Se sabe que diversos hongos filamentosos desempeñan diversas actividades en la rizósfera e influyen en el desarrollo de las plantas y de otros microorganismos. Existen estudios acerca de los efectos de la interacción planta-hongo filamentosos sobre la eficiencia de la fitorremediación, sin embargo, los estudios enfocados hacia el papel que juegan éstos en la mejora de los mecanismos de fitorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos, son muy escasos.

En los últimos 10 años el interés por los estudios de fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos ha ido en aumento, tan sólo desde el 2006 hasta la fecha se han publicado más de 400 artículos científicos a nivel mundial (ISI Web of

Knowledge). Sin embargo, sólo 8 artículos hacen referencia al aumento en la eficiencia de la fitorremediación a través del uso de asociaciones entre plantas y hongos endófitos. Esto último puede deberse a que no siempre se tiene éxito en la inducción de las asociaciones.

En el presente trabajo, se desarrolló un método para establecer las mejores condiciones de cultivo de una planta fitorremediadora y la inducción de su asociación con un hongo filamentoso. Se realizaron diferentes técnicas para determinar el tipo de asociación que se establece entre la planta y el hongo. Posteriormente se proponen las condiciones de cultivo de la asociación planta-hongo filamentoso que posteriormente de aclimatación a una mezcla definida de hidrocarburos en condiciones *in vitro*. La asociación se utilizó para remover una mezcla de hidrocarburos en un suelo contaminado artificialmente y finalmente, se analizó el destino de los hidrocarburos para proponer los posibles mecanismos de fitorremediación empleados por dicha asociación.

En el primer capítulo del documento se presenta una revisión bibliográfica que, de manera general, aborda el tema de la contaminación de suelos por hidrocarburos, la fitorremediación como una alternativa para su remediación, así como la aclimatación de los organismos a medios contaminados. En seguida se esboza el problema a partir del cual se plantea la hipótesis de trabajo y se derivan los objetivos. En el capítulo cinco se detallan los materiales y los métodos utilizados para el alcance de los objetivos. En el capítulo seis se presentan y discuten los resultados obtenidos. Finalmente, se exponen las conclusiones del trabajo y las recomendaciones de los estudios que faltan por realizar.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Contaminación de suelos por hidrocarburos

México tiene una industria petrolera muy importante conocida como Petróleos Mexicanos (PEMEX), que es el monopolio de propiedad estatal a cargo de las actividades de explotación, transformación, almacenamiento y distribución de petróleo crudo y sus fracciones. El transporte de petróleo y sus derivados es una operación crucial para el ciclo de producción-transformación-distribución. La mala disposición y manejo ha impactado de manera negativa sobre la calidad del ambiente (Iturbe y col., 2007).

El interés por atenuar el impacto negativo del petróleo y sus derivados es relativamente reciente. Las repercusiones son muy extensas dañando agua, aire y suelo. El suelo es el soporte donde habitan y crecen plantas, animales y microorganismos, que son fundamentales en el mantenimiento de la vida humana. Los contaminantes orgánicos se acumulan en los suelos, especialmente en el seno de la materia orgánica, donde pueden ser retenidos por muchos años (Torre-Roche y col., 2009).

El derrame accidental de hidrocarburos derivados del petróleo conduce a la contaminación constante de tierras de cultivo. Tan sólo en el estado de Veracruz, en 2002, se atendieron 41 emergencias ambientales asociadas con el derrame de sustancias incluyendo hidrocarburos, elementos alcalinotérreos, ácidos y alcoholes entre otros, lo que suma cerca de 25 967 km² de suelos contaminados en todo el país (Ferrera-Cerrato y col., 2007).

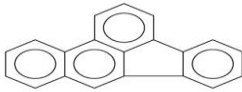


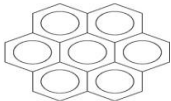
Los hidrocarburos del petróleo son un grupo de compuestos orgánicos constituidos en mayor proporción por átomos de carbono e hidrógeno. Se conoce una gran diversidad de hidrocarburos que varían tanto en sus propiedades físicas como químicas y que van desde moléculas pequeñas y sencillas hasta moléculas extremadamente complejas (Dandie y col., 2010). Estos representan una compleja mezcla de compuestos alifáticos y aromáticos policíclicos (Coulon y col., 2010). Los hidrocarburos alifáticos son cadenas sencillas de carbono e hidrógeno, también conocidos como hidrocarburos saturados, ya que sólo presentan un enlace entre carbono e hidrógeno.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son compuestos orgánicos de dos o más anillos de benceno fusionados que comparten dos átomos de carbono, se encuentran entre los grupos de contaminantes orgánicos más ampliamente distribuidos en el suelo. Estos pueden provenir de fuentes naturales, petrogénicas o pirogénicas y generalmente, se forman durante la combustión incompleta del petróleo y sus derivados. Los efectos de los HAP están relacionados con su tamaño y estructura, que condicionan sus propiedades físicas y químicas y, por lo tanto, su distribución en el ambiente como contaminantes. Los HAP de alto peso molecular son relativamente inmóviles y tienen una baja volatilidad y solubilidad en agua. Se ha reportado el potencial mutagénico y carcinogénico de HAP como fenantreno (PHE), pireno (PYR), antraceno (Ant) y benzo-(a)-pireno (BaP), sobre los seres humanos (Fishbein 1984; Villalobos-Pietrini y col., 2006; Betancur-Galvis y col., 2006; Chevron y Merlin, 2007). La estructura química de los HAP carcinogénicos y mutagénicos más comúnmente estudiados se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Estructura de los hidrocarburos aromáticos policíclicos carcinogénicos y mutagénicos más comúnmente estudiados.

Hidrocarburo	Estructura
Naftaleno	
Fluoreno	
Antraceno	
Fenantreno	
Fluoranteno	
Benzo[a]Antraceno	
Pireno	
Benzo[a]Pireno	

Estructura de los hidrocarburos aromáticos policíclicos carcinogénicos y mutagénicos más comúnmente estudiados. (Continuación de Tabla 1.)

Hidrocarburo	Estructura
Benzo[b]Fluoranteno	
Dibenz[a,c]Antraceno	
Benzo[g, h, i]Perileno	
Coroneno	

1.2 Fitorremediación de suelos

La fitorremediación es una alternativa tecnológica en la que se aprovecha la capacidad de las plantas para extraer, degradar, metabolizar, volatilizar y/o estabilizar contaminantes del aire, agua y suelo. Esta tecnología se ha aplicado para remediar suelos con contaminantes como metales pesados, residuos radiactivos y compuestos orgánicos como los hidrocarburos alifáticos y los HAP derivados del petróleo (Lee y col., 2008).

En la fitorremediación de suelos contaminados con compuestos orgánicos, se aprovechan diversos mecanismos que las plantas han desarrollado para reducir la concentración de los contaminantes a partir de procesos bioquímicos propios de las plantas como (i) el metabolismo de los contaminantes al interior y exterior de la planta (rizósfera); (ii) los procesos que conducen a la completa degradación de los contaminantes (mineralización) y (iii) la absorción de los contaminantes (extracción) (Reichenauer y Germida, 2008).

Dependiendo del tipo de contaminantes, las condiciones climatológicas del sitio y el nivel de limpieza requerido, la fitorremediación se puede utilizar ya sea como un medio de contención (rizofiltración, fitoestabilización) o de eliminación (fitoextracción, fitodegradación, fitovolatilización y fitoestimulación) de los contaminantes (Ghosh y Singh, 2005). A continuación se detalla cada uno de los mecanismos mencionados.

La *rizofiltración* es el uso de las plantas para absorber y adsorber los contaminantes, principalmente metales, del suelo o del agua a través de las raíces. Cuando el sistema radicular de las plantas está bien desarrollado se introduce en el sitio contaminado. A medida que las raíces se van saturando del contaminante, las plantas se cosechan y se disponen de forma segura (Dushenkov y col., 1995).

La *fitoestabilización* permite inmovilizar el contaminante en el suelo a través de su absorción y acumulación en las raíces o bien, por su precipitación en la zona de la rizósfera. Este mecanismo reduce la biodisponibilidad y movilidad de los contaminantes evitando su migración a las aguas subterráneas o al aire (Barton y col., 2005; Mendez y Maier, 2008).

La *fitoextracción* se basa en la absorción de los contaminantes a través de las raíces. Para ser translocados y acumulados en altas concentraciones en los tejidos cosechables (vástagos: conjunto de tallo y hojas) (Pilon-Smits y Pilon, 2000).

En la *fitovolatilización*, las plantas pueden convertir los contaminantes en formas volátiles que son generalmente menos tóxicas y transpirarlas hacia la atmósfera (Pilon-Smits y Pilon, 2000).

Durante la *fitodegradación* las plantas y los microorganismos asociados, degradan los contaminantes orgánicos en productos menos tóxicos o bien, los mineralizan hasta CO₂ y H₂O. En este mecanismo los contaminantes son metabolizados y transformados dentro de los tejidos vegetales. La fitodegradación se ha utilizado para la remoción de diversos hidrocarburos, incluidos los HAP (Singh y Jain, 2003).

La *fitoestimulación* se lleva a cabo porque las raíces de las plantas exudan sustancias (azúcares, ácidos carboxílicos y aminoácidos, entre otros) aprovechadas por los microorganismos degradadores de contaminantes que se encuentran cercanos a la rizósfera (Singh y Jain, 2003).

Para determinar el o los mecanismos de fitorremediación que actúan para cada caso concreto, se consideran varios factores (tales como el factor de fitoestabilización y el

factor de translocación). Uno de los factores cuantitativos más utilizados es la determinación del factor de translocación (FT). Con el FT se establece la capacidad de una planta para transportar los contaminantes a través del xilema desde la raíz hasta los vástagos y representa la concentración del compuesto en el vástago de la planta.

Para mejorar la eficiencia de los mecanismos de fitorremediación, se han propuesto diferentes estrategias: (i) la selección de plantas con mayor tolerancia frente a determinados contaminantes; (ii) la utilización de técnicas agronómicas como el ajuste de pH, adición de fertilizantes o quelantes; (iii) manipulación genética, como las técnicas de sobre-expresión de los genes responsables de la resistencia y/o tolerancia o degradación de compuestos contaminantes, y (iv) la asociación de plantas con microorganismos de la rizósfera que resisten, toleran o degradan contaminantes del suelo, al mismo tiempo que benefician a la planta (Ernst y col., 2003; Ferrera-Cerrato y col., 2007; Gao y col., 2011).

1.3 Plantas fitorremediadoras

Las plantas utilizadas para la fitorremediación se destacan por tener un sistema radicular lo suficientemente extenso para proporcionar una gran área superficial de contacto con los contaminantes, además de que deben presentar capacidades de adaptación a las condiciones particulares del suelo (Aprill y Sims., 1990; Anderson y col., 1993; Schwab y col., 1998). Desde el punto de vista económico, se seleccionan plantas que requieran poco mantenimiento (fertilizantes o frecuentes recortes) y que toleren altas concentraciones de contaminantes.

La mayoría de los estudios de fitorremediación se han realizado con plantas de la familia *Poaceae*. Estas plantas, comúnmente tienen sistemas de raíces muy fibrosas que se extienden por una gran superficie del suelo. Pero no es sólo la raíz la que se ha tomado en cuenta para esta selección, sino también por la capacidad de remoción de hidrocarburos (Parrish y col., 2005). Algunas plantas de esta familia estudiadas con fines de fitorremediación son: *Lolium multiflorum*, *Lolium perenne*, *Dactylis glomerata*, *Festuca rubra* y *Festuca arundinacea* (Rezek y col., 2008; Smith y col., 2006).

Festuca arundinacea (Schreb), es una planta nativa de Europa y Asia, que llegó a México alrededor de 1904 con fines forrajeros. Recientemente ha sido una de las plantas más

estudiadas por su uso potencial para la fitorremediación (Burns y col., 2002). Se ha probado que *F. arundinacea* tiene la capacidad de germinar y degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos en condiciones *in vitro* (Reynoso-Cuevas y col., 2008). Huang y col. (2004) demostraron que semillas de *F. arundinacea* germinaron en suelo contaminado con creosota y, además, observaron respuestas de las plantas que sugerían su aclimatación al contaminante. Por otro lado, Chen y col. (2003) demostraron que *F. arundinacea* mineralizó hasta 38% del PYR inicial en un suelo contaminado. Estudios más recientes demuestran que *F. arundinacea* estimula la actividad microbiana en suelos contaminados con hidrocarburos mejorando así la fitorremediación (Cheema y col., 2009).

1.3.1 Asociaciones planta-hongo en la fitorremediación

En la naturaleza, los organismos están involucrados en múltiples interacciones, tanto con otros organismos como con factores abióticos (Eichron, 1992). Es así como surgen las diversas asociaciones que se observan en la naturaleza. Ejemplo de ello son las asociaciones planta-microorganismo en el suelo. Diferentes especies de microorganismos están presentes en el suelo. La rizósfera es definida por Westover y col. (1997) como el volumen del suelo adyacente a las raíces y está influenciada por las mismas y representa una región de intensa actividad microbiana.

La rizósfera es un microambiente que la planta misma ayuda a crear y donde los microorganismos tanto patógenos como benéficos tienen influencia sobre el estado fisiológico y el crecimiento de las plantas (Johansson y col., 2004). En la rizósfera se desarrollan relaciones simbióticas mutualistas entre microorganismos y plantas, debido a que éstas últimas exudan nutrimentos orgánicos (ácidos carboxílicos, aminoácidos, azúcares, entre otros) útiles para el metabolismo microbiano. Los microorganismos, a la vez, proveen numerosos beneficios para la planta, ayudando en el crecimiento, regulando la actividad metabólica de la raíz e influenciando en las propiedades físicas y químicas del suelo y de los contaminantes en el mismo (González-Chávez, 2005).

Entre los microorganismos benéficos para las plantas destacan los hongos endófitos. Éstos se definen como aquellos microorganismos que habitan asintóticamente dentro de los tejidos de las plantas (Mahesh y col., 2005; Sánchez y col., 2012). Los hongos endófitos promueven el crecimiento de las plantas a través de diversos mecanismos, como es el caso de la fijación biológica de carbono, que se ve reflejado en la

concentración de las clorofilas de las plantas y la síntesis de fitohormonas, como las giberelinas, que promueven el crecimiento de las plantas (Khan y col., 2011). Diversos estudios sugieren que la interacción mutualista de plantas con hongos endófitos está relacionada con la genética de las plantas y de los mismos endófitos, además de presiones selectivas y condiciones abióticas (Müller y Krauss, 2005; Saikkonen y col., 2006).

Se ha reportado además que los hongos endófitos confieren un gran potencial adaptativo a las especies vegetales hospederas frente a condiciones adversas de tipo abiótico, por ejemplo, pueden mejorar la tolerancia a la sequía, al estrés oxidante, al estrés salino y a la presencia de contaminantes como hidrocarburos del petróleo (Rodríguez y col., 2004; Barrutia y col., 2011).

Los hongos endófitos han recibido mucha atención en procesos de biorremediación, en especial aquellos capaces de degradar contaminantes orgánicos en asociación con las plantas (Newman y Reynolds, 2004; Lorenzo, 2004). Recientemente, Soleimani y col. (2010) reportan hasta un 93% de remoción de PYR después de siete meses, utilizando *F. arundinacea* asociada al endófito *Neotyphodium coenophialum* en un suelo contaminado y 97% de remoción de PYR durante el mismo periodo utilizando *F. pratensis* asociada al hongo endófito *Neotyphodium uncinatum*.

En estudios más recientes, se reporta que a partir de la germinación de semillas de *F. arundinacea* se aisló un hongo identificado como *Lewia* sp. y que al asociarlos en condiciones de laboratorio aumenta la remoción tanto de hidrocarburos alifáticos como HAP (Cruz-Hernández y col., 2013). *Lewia* sp. es un hongo que se asocia a cultivos de cereales económicamente importantes y gramíneas silvestres, no reportado como patógeno para el ser humano (Constantione 1990), este hongo pertenece a la orden de *Pleosporales* y a la familia de los *Pleosporaceae* (Kwasna y Kosiak, 2003).

1.3.2 Identificación de hongos endófitos

En la actualidad se conocen diversas técnicas para la identificación de hongos endófitos, entre los cuales, destacan los microcultivos, el método inmunológico y los estudios histológicos, que se describen a continuación.

Microcultivos. La técnica se basa en la observación de hifas que emergen del interior de fragmentos de plantas (raíces o tallos) que pasaron por un proceso de desinfestación superficial (Lucero y col., 2006).

Método inmunológico. El uso de la inmunología se basa en el reconocimiento de epítopes (sitios específicos de algunas proteínas como la IgE y la IgG) por los anticuerpos y este método es específico para la detección del hongo endófito *N. coenophialum* tanto en semillas como en plantas de *F. arundinacea* (Hiatt y col., 1999).

Estudios histológicos. Son el primer paso en la observación de los cambios en el interior de las plantas, con éstos, se puede determinar la ubicación del hongo en relación con las células vegetales que conforman el órgano de interés (Eynck y col., 2007).

La preparación histológica del material biológico consta de cuatro pasos fundamentales, que son, la fijación, la inclusión, el corte y la tinción.

En la fijación, el tejido vegetal se conserva lo más natural posible, ya que las sustancias fijadoras actúan sobre los componentes celulares deteniendo cualquier proceso dentro de las células. Algunos fijadores de tejidos vegetales son el formaldehído, el glutaraldehído, el ácido acético glacial y el etanol al 70%, entre otros.

La inclusión del tejido, se realiza para que el material presente la suficiente firmeza al cortarse. El agua que contiene el tejido se sustituye por una sustancia que le proporciona rigidez y evita que se deforme.

Una vez incluido el material, se realiza el corte que interesa observar. Los cortes se montan en portaobjetos y se tiñen con diversos colorantes (tales como Hematoxilina y Eosina y Calcofluor White Stain, entre otros) que tienen la capacidad de reaccionar con los componentes de las estructuras celulares. Estas preparaciones quedan listas para ser observadas de manera más profunda con ayuda de un microscopio confocal u otros microscopios (Bacon y Yates, 2006; Abdellatif y col., 2009).

En la observación al microscopio se pueden diferenciar tanto las estructuras de la planta como las de los hongos endófitos. Los hongos endófitos colonizan el interior de las

plantas ya sea de manera natural (Saikkonen y col., 2006; Ralphs y col., 2011) o inducidos mediante la manipulación en condiciones de laboratorio (Huang y col., 2004; Cruz-Hernández y col., 2013).

1.3.3 Inducción de asociaciones planta-hongo endófito

Diversos estudios demuestran que los hongos endófitos pueden aislarse de las plantas y ser propagados bajo condiciones de laboratorio (Ernst y col., 2003; Huang y col., 2004; Cruz-Hernández y col., 2013). Una vez propagados, los hongos pueden ser inoculados en diversas plantas y de distintas maneras. Por ejemplo, Huang y col. (2004) incubaron durante 2 h semillas de *F. arundinacea* en una suspensión de bacterias endófitas, a las semillas se les quitó el excedente de la suspensión y se sembraron, de este modo, al germinar las semillas aseguraron que las bacterias quedaran en el interior de las raíces de la planta. Por su parte, Cruz-Hernández y col. (2013), propagaron micelio del hongo *Lewia* sp. en medio líquido, y con la biomasa obtenida elaboraron una suspensión que se inoculó sobre plantas de *F. arundinacea* de 15 días de edad, libres de microorganismos.

En los trabajos descritos, se utilizaron las asociaciones planta-endófito para mejorar la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Sin embargo, en ninguno de los casos mencionados utilizaron un pre-tratamiento de aclimatación de la asociación, a la presencia de los contaminantes, previa al trasplante al suelo contaminado. La aclimatación de estas asociaciones permite que el endófito afronte menor competencia durante el establecimiento y mantenimiento de la asociación en el suelo (Conn y Franco, 2004), asegurando así su permanencia dentro de la planta.

1.4 Aclimatación

La supervivencia de los organismos a condiciones adversas, depende de la naturaleza de los organismos y de las condiciones en que se desarrollan. Con base en lo anterior, la aclimatación es una técnica que permite aumentar la supervivencia de los organismos. La aclimatación es la respuesta de un organismo a los cambios en su entorno, ésta respuesta hace apto al organismo para resistir y/o tolerar las condiciones del medio.

Lo anterior se debe a que, las características del cultivo de una planta o microorganismo bajo condiciones *in vitro*, difiere en muchos aspectos a las características de ambientes

naturales (tanto en soporte, luz y sustrato). Así, una vez que un organismo crecido inicialmente en condiciones in vitro es transferido a condiciones nativas, éstos tienen que modificar o ajustar mecanismos fisiológicos para aclimatarse al nuevo ambiente, ya sea en invernadero o en campo (Luo y col., 2001). Debido a esto, se cree que la aclimatación de plantas y microorganismos, ocurre a través de la inducción de moléculas (como las enzimas) implicadas en el metabolismo constitutivo de los organismos, las cuales también participan en la degradación de los contaminantes, de manera que los organismos toleran con mayor eficiencia las condiciones adversas (Macleod y Semple, 2002; Torkian y col., 2003).

En contraste con los cambios que ocurren durante el crecimiento y el desarrollo de los organismos, la aclimatación se refiere a un cambio que es reversible cuando las condiciones vuelvan a su estado anterior. Si las condiciones adversas se mantiene a largo plazo, se convierten en presiones selectivas y sólo los organismos aclimatados sobreviven y entonces, se da una adaptación (tiempos muy largos). La adaptación de las poblaciones es un proceso más arraigado a la capacidad genética y diferente de la aclimatación de los organismos.

De hecho, hay varios estudios que demuestran que los organismos aclimatados responden de mejor manera ante las condiciones del sitio donde se utilizan posteriormente (Huang y col., 2004; Germaine y col., 2006).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La actividad humana y la creciente industrialización han aumentado la distribución de contaminantes orgánicos, como los HAP, en diferentes matrices ambientales como agua y suelos. Los HAP son compuestos derivados del petróleo y que son tóxicos para el ambiente y más aún para los seres humanos, puesto que ocasionan mutaciones y cáncer, entre otras enfermedades.

Para atenuar estos problemas, se ha recurrido al desarrollo de tecnologías eficientes y ambientalmente amigables que permitan la eliminación de estos contaminantes del ambiente. El uso de tecnologías de fitorremediación para el tratamiento de suelos contaminados con HAP es una opción que cumple con estos requisitos.

La eficiencia de la fitorremediación se puede mejorar mediante la asociación inducida entre microorganismos y plantas que toleren y transformen a los contaminantes. Una alternativa interesante que permite incrementar la probabilidad de éxito del uso de asociaciones planta-microorganismos, es la aclimatación en el laboratorio, en el cual, dicha asociación se somete a la presencia de hidrocarburos antes de su trasplante a un suelo contaminado.

3. HIPÓTESIS

La aclimatación *in vitro* de la asociación entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp. mejora la remoción de hidrocarburos en un suelo contaminado artificialmente bajo condiciones experimentales controladas.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Evaluar el efecto de la aclimatación *in vitro* de la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. sobre la remoción de hidrocarburos en un suelo contaminado.

4.2 Específicos

1. Establecer las condiciones particulares para la germinación y desarrollo de *F. arundinacea* bajo condiciones *in vitro*.
2. Definir las condiciones para la inducción de la asociación entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp.
3. Determinar el tipo de asociación que se establece entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp.
4. Evaluar el efecto de la aclimatación *in vitro* de la asociación entre *Festuca arundinacea* y *Lewia* sp. a una mezcla de hidrocarburos sobre la remoción de los mismos en un suelo contaminado artificialmente.
5. Proponer los posibles mecanismos de fitorremediación que ocurren durante la remoción de hidrocarburos en un suelo contaminado por la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material biológico

5.1.1 Planta: *Festuca arundinacea*

Las plantas de *F. arundinacea* (Schreb.) se obtuvieron a partir de semillas adquiridas en la Central de Abasto de la Cd. de México. Las semillas fueron conservadas a temperatura ambiente hasta su utilización.

Para la obtención de plantas de *F. arundinacea* bajo condiciones *in vitro*, las semillas se desinfectaron como se describe a continuación. Estas, se introdujeron en un sobre de papel filtro y se mantuvieron inmersas en agitación constante en una solución de detergente comercial (marca Roma) con una concentración de 0.02 g/mL, por 20 min, posteriormente se lavaron con abundante agua destilada. En una campana de flujo laminar, el sobre con las semillas se sumergió en etanol (70%, v/v) durante 30 s, seguido por una solución de hipoclorito de sodio (4%, v/v) adicionado con 0.1 mL de Tween-20 por 30 min, con agitación constante y, nuevamente, en etanol (70%, v/v) durante 1 min. El sobre se lavó con 150 mL de agua desionizada estéril. El sobre se abrió bajo condiciones asépticas y se colocó en una caja de Petri estéril para la siembra inmediata de las semillas.

Después de la siembra en tubos con medio MS, las semillas se incubaron en una cámara de crecimiento a 25°C o 30°C durante 24 días. El índice de germinación se reporta como positivo cuando se observó la producción de la raíz embrionaria de 2 mm de largo (Maila y Cloete, 2002) y como negativo cuando esto no se observó. La germinación se evaluó cada 24 h durante los 24 días del ensayo.

5.1.2 Hongo: *Lewia* sp.

El micelio de *Lewia* sp. se aisló a partir de semillas de *F. arundinacea* y se conservó en el laboratorio W-108, en las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. La conservación de la cepa se realizó en cajas Petri con medio agar papa dextrosa (PDA), incubadas a 28-30 °C, durante 7-10 días.

5.2 Suelo

El suelo para los ensayos fue colectado en el Municipio de Hueyapoxtla en el Estado de México (19°54'10.6" N, 99°05'16.0" O) de la superficie y hasta una profundidad de 20 cm. Se transportó al laboratorio, se secó a temperatura ambiente y se tamizó a un tamaño de partícula homogéneo de 2 mm.

5.3 Preparación de los cultivos

5.3.1 Tubos de cultivo para *F. arundinacea*

Para la obtención de las plantas de *F. arundinacea* se utilizaron las semillas desinfectadas, se sembraron 4 semillas por tubo de cultivo (3.8 x 20 cm) con medio MS (Murashige y Skoog, 1962), con 10 g/L de sacarosa. El pH del medio se ajustó a 5.8 con KOH 0.1 N y se agregaron 2 g/L de Phytigel (Sigma). Cada tubo se adicionó con 30 mL de medio MS y se esterilizó a 15 lb/in² durante 15 min. Las semillas se incubaron durante 24 días a 25°C y 30 °C con un fotoperiodo de 16 h, hasta la germinación de las plantas.

5.3.2 Propagación e inoculación de *Lewia* sp.

Para la propagación de la cepa de *Lewia* sp., se utilizaron cajas Petri de 8.5 cm de diámetro con 30 mL de medio MS incubadas a 28-30 °C durante 15 días. De éstas, se tomaron discos de 5 mm de biomasa y se colocaron en tubos con perlas de vidrio y solución isotónica para disgregar el micelio hasta obtener una suspensión homogénea. La suspensión se utilizó como inóculo en los tubos que contenían las plantas de *F. arundinacea*. Para la inoculación se adicionaron 2 mL de la suspensión a cada tubo que contenía 4 plantas de 15 días de edad. La biomasa inoculada en cada tubo se cuantificó previamente en miligramos (base seca, BS) por tubo (mg biomasa*tubo⁻¹). Para determinar el efecto de la concentración inicial de inóculo sobre el crecimiento de *F. arundinacea*, se adicionaron diferentes concentraciones de biomasa: 0, 6.82, 8.13, 10.13 y 67.90 (mg hongo BS*tubo⁻¹).

El tiempo de contacto entre el hongo y la planta en los tubos fue de 0, 7, 14 y 21 días, posteriormente se cuantificaron crecimiento y contenido de clorofilas.

5.3.3 Efectos del hongo sobre la planta

Con el fin de seleccionar las condiciones de cultivo (tiempo de contacto y concentración inicial de inóculo) para la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. previo a la aclimatación *in vitro* a los hidrocarburos, se evaluó la fitopatogenicidad de *Lewia* sp. sobre las plantas de *F. arundinacea*, con el siguiente criterio: se consideró como efecto negativo si la planta mostraba cambios negativos en la relación de clorofilas *a/b* y en la relación vástago/raíz (V/R), con respecto a plantas sin hongo, y como positivo en caso contrario.

5.3.4 Ensayos de aclimatación de *F. arundinacea-Lewia* sp.

La aclimatación de la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. se realizó en condiciones *in vitro* en tubos con medio MS (apartado 5.3.1). Los tiempos de aclimatación ensayados fueron 0, 15, 30 y 45 días, en tubos con diferentes concentraciones de una mezcla de hidrocarburos (MHC) hexadecano (HXD al 99%), y dos aromáticos policíclicos (HAP), fenantreno (PHE grado HPLC > 96%) y pireno (PYR al 98%) en proporciones 1 : 0.5 : 0.5, respectivamente. Todos los hidrocarburos fueron adquiridos en la Compañía Sigma-Aldrich. Para adicionarlos al medio, los hidrocarburos se disolvieron en diclorometano (DCM), se adicionaron a los tubos, se homogenizaron y después el DCM fue completamente evaporado. Las concentraciones iniciales de la MHC en el medio MS fueron 0, 500, 1000 y 1500 (mg*L⁻¹). En la Tabla 2 se muestra el diseño de los tratamientos.

Tabla 2. Diseño de los tratamientos de aclimatación de la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp.

MHC inicial en el medio MS (mg*L ⁻¹) en la aclimatación	Tiempo de aclimatación (días)		
	15	30	45
0	A	E	I
500	B	F	J
1000	C	G	K
1500	D	H	L

Después de que la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. pasó estos tiempos en contacto con las diferentes concentraciones de MHC en el medio MS (aclimatación), fue trasplantada a un suelo contaminado con 1500 (mg*kg⁻¹) de la misma MHC, donde se

mantuvo 60 días más. Posterior a este periodo, las plantas se retiraron del suelo. Tanto a la asociación como al suelo se les cuantificó el contenido de hidrocarburos. La metodología se describe en los siguientes apartados.

5.4 Preparación del suelo

Para contaminar el suelo, la MHC se disolvió en acetona (99.6%, J. T. Baker), se adicionó al suelo se homogenizó y después la acetona fue completamente evaporada. La concentración inicial de la MHC en el suelo fue de 1500 (mg*kg⁻¹). El suelo con la MHC se intemperizó durante 40 días y se conservó en oscuridad en recipientes cerrados hasta su utilización. Cada unidad experimental (maceta) contenía 400 g del suelo contaminado e intemperizado.

5.5 Estimación del crecimiento de *F. arundinacea*

La estimación del crecimiento se realizó en plantas *F. arundinacea* (apartados 5.1.1 y 5.3.3), las cuales fueron cosechadas del medio MS, posteriormente, se separaron vástagos y raíces, mismos que se midieron con un Vernier. Con los resultados se realizó la relación vástago/raíz (V/R) que se muestra en la ecuación 1.

$$\text{Relación } \left(\frac{V}{R}\right) = \frac{\text{elongación vástago (mm)}}{\text{elongación raíz (mm)}} \dots\dots\dots \text{Ec.(1)}$$

5.6 Identificación del tipo de asociación

5.6.1 Identificación microscópica del endófito

A partir de los cultivos de la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp., bajo campana de flujo laminar, las plantas se separaron tallos y raíces. En seguida, éstos fueron desinfestados superficialmente sumergiéndolos por separado en etanol 70% durante 1 min, seguido de una solución de hipoclorito de sodio al 10% por 10 min, etanol 70% 1 min, y para finalizar en agua desionizada estéril 1 min. Se cortaron segmentos de 1 cm de raíces y tallos desinfestados, se sembraron en cajas Petri con PDA para favorecer el crecimiento de

hongos y se incubaron a 30°C hasta observar el crecimiento del hongo desde el interior de las raíces o de los tallos.

5.6.2 Aclaramiento y tinción de raíces y tallo con aplicación de calor

Con el propósito de observar hifas de *Lewia* sp. en el interior de los tejidos de *F. arundinacea*, los cultivos de la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. se retiraron del medio, las raíces y tallos se separaron y lavaron con abundante agua para retirar los excesos de medio y de hongo superficial y se cortaron segmentos de 1 cm. Los segmentos se sumergieron en una solución de hidróxido de potasio (10%) y se colocaron en una autoclave a 10 lb/in² por 10 min. Posteriormente se eliminó el hidróxido de potasio y los tejidos se lavaron con abundante agua, se realizó un blanqueo con peróxido de hidrógeno (3%) durante 10 min, y se lavaron con abundante agua. Posteriormente, los tejidos se acidificaron por inmersión en una solución de ácido clorhídrico (1%) durante 10 min, se eliminó la solución ácida y, sin enjuagar, se tiñeron con azul tripano (0.05% en glicerol 50%). La tinción de los tejidos se llevó a cabo mediante calentamiento con el colorante durante 10 min usando autoclave a 10 lb/in² por 10 min. Los tejidos se destiñeron durante 15 h con glicerol (50%). Para su observación al microscopio se prepararon portaobjetos con los tejidos teñidos.

5.6.3 Cortes para microscopía confocal

Para verificar la presencia de micelio de *Lewia* sp. dentro de los tejidos de la planta, se utilizaron plantas de 15 días de edad inoculadas con 20 mg de hongo por tubo. Después de 20 días de contacto, el tratamiento a las muestras fue el siguiente:

Fijación e infiltración del tejido vegetal. El medio MS de las plantas fue sacado del tubo de cultivo y se cortaron cubos de 1cm³ en las zonas de las raíces. Los cubos con el segmento de raíz se colocaron en una solución de etanol (70%) por 48 h. Posteriormente, los cubos se lavaron con agua desionizada para eliminar el exceso de etanol y se sumergieron en una solución de sacarosa (320 mM) por 48 h a 5°C. Enseguida se cambiaron a una solución de sacarosa (420 mM) por 48 h a 5°C. A continuación se cambió la solución anterior por una nueva solución de sacarosa 420 mM donde los cubos se dejaron por 48 h más a 5°C. Se realizó un cambio más de la solución, pero ahora sólo se dejó 24 h a 5°C. Los cubos tratados se conservaron a -20°C y se descongelaron para

liberar la raíz. Se realizaron cortes a mano y éstos se colocaron en un portaobjetos excavado con Calcofluor White Stain (Sigma-Aldrich) y KOH 10% durante 7 min. Para analizar los segmentos de raíz, se utilizó el microscopio confocal multifotónico LSM780 NLO (Carl Zeiss) con las especificaciones mostradas en la Tabla 3.

Tabla 3. Especificaciones de uso del microscopio confocal multifotónico LSM780 NLO (Carl Zeiss).

Canal	Filtro (nm)	Laser (nm)	Color
Canal 1	410-579	405	Azul
Canal 2	490-586	488	Verde
Canal 3	585-734	561	Rojo

5.7 Métodos analíticos

5.7.1 Cuantificación de la relación de clorofilas *a/b*

Al final del experimento descrito en el apartado 5.3.1 y 5.3.3, las plantas fueron cosechadas.

Para la extracción y cuantificación de clorofilas, el vástago de las plantas se pesó en una balanza analítica, posteriormente se colocó en un mortero, se adicionó con 2 mL de metanol frío y se trituró con la ayuda de un pistilo. El contenido se pasó a un tubo de ensaye de plástico con tapón, el mortero y el pistilo se lavaron 3 veces con 1.5 mL de metanol que se añadió al tubo de ensaye anterior. Los tubos que contenían las clorofilas se centrifugaron a 804 g por 10 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante, se colocó en otro tubo de ensaye, la biomasa sedimentada resultante se lavó con 1 mL de metanol y se centrifugó nuevamente con las mismas condiciones anteriores. Se recuperó el sobrenadante y se colocó con el resto de las clorofilas extraídas, y se aforó con metanol a un volumen final de 8 mL.

Para cuantificar la concentración de clorofilas, se colocó 1 mL de la solución de clorofilas en una celda de 1 cm para espectrofotometría. Las lecturas de cada muestra se realizaron a 665 y 652 nm, para determinar la concentración de clorofilas a y b, respectivamente, mediante las ecuaciones propuestas por Porra y col., (1989):

$$Chl a = 16.29XA^{665.2} - 8.54XA^{652.0} \dots\dots\dots Ec. (2)$$

$$Chl b = 30.66XA^{652.0} - 13.58XA^{665.2} \dots\dots\dots Ec. (3)$$

5.7.2 Extracción de la MHC del suelo

Para extraer la MHC residual del suelo, se realizó una extracción con solventes asistida con microondas (MARS XPRESS, CEM). 5 g de suelo seco se adicionaron con 30 mL de una mezcla DCM:acetona (1:1 v/v) y se procesaron a 175-200 psig y 150°C por 30 min (Cruz-Hernández y col., 2013). Las eficiencias de extracción de la MHC obtenidas bajo estas condiciones fueron: 98.7 ± 0.8% HXD, 96.7 ± 1.4% PHE y 94.3 ± 3.5% PYR.

5.7.3 Extracción de MHC de la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp.

Para cuantificar la concentración de la MHC en tejido vegetal, las plantas cosechadas se separaron raíces y vástago, se lavaron con agua desionizada. Y se secaron en estufa a 60 °C durante 8 días. Una vez secas, se pulverizaron con nitrógeno líquido y se lavaron 3 veces con 10 mL de DCM para extraer los HC. Previo a la extracción de los hidrocarburos del vástago se realizó una saponificación (15 mL de KOH 1M disuelto en MeOH/H₂O (80:20; v/v), 30 min, 60°C), con la finalidad de eliminar los compuestos que interfirieran con la cuantificación de los hidrocarburos en estudio (Dugay y col., 2002). La extracción se realizó en un matraz de bola con ayuda de un rotavapor (BÜCHI R-205) al vacío.

5.7.4 Cuantificación de hidrocarburos

Los hidrocarburos se cuantificaron utilizando un cromatógrafo de gases (Varian 3900) con un detector de ionización de llama (FID), y una columna AT-1HT (15 m, 0,25 mm de diámetro interno x 0,10 µ de espesor de película, Alltech). Se utilizó helio como gas acarreador, alimentado a una tasa de 2.0 mL min⁻¹. La inyección de las alícuotas fue de 2µL en modo splitless con un auto-inyector (Varian CP-8410). Las condiciones de operación del cromatógrafo fueron las siguientes: temperatura inicial del horno de 100°C (mantenida durante 2 min); la temperatura se aumentó a 200°C a 20°C min⁻¹ con un tiempo de retención final de 1 min; la temperatura del inyector y líneas de transferencia fue de 300°C.

Con los datos obtenidos de la concentración de hidrocarburos en tallos y raíces, se determinó la capacidad de la asociación para translocarlos. Este factor se basa en la determinación cuantitativa del contenido de los contaminantes en los tejidos de las plantas, como se muestra en la Ecuación 4 (Marchiol y col., 2004):

$$Translocación (\%) = \frac{Contenido\ del\ contaminante\ en\ vástago\ (mgkg^{-1})}{Contenido\ del\ contaminante\ en\ toda\ la\ planta\ (mgkg^{-1})} X100 \dots\dots\dots Ec. (4)$$

Con los datos obtenidos de la concentración de hidrocarburos residual en suelo, se realizó un balance de cada HC para estimar la capacidad de la asociación para biodegradarlo. El balance se muestra en la Ecuación 5:

$$HC_{T(biodisponible)} = HC_{residual} + HC_{bioacumulado} + HC_{biodegradado} \dots\dots\dots Ec. (5)$$

Donde:

$HC_{T(biodisponible)}$ = HC biodisponible en el suelo.

$HC_{T(bioacumulado)}$ = HC bioacumulado en toda la planta.

$HC_{T(biodegradado)}$ = HC biodegradado por la asociación.

5.8 Análisis estadístico

Para probar las diferencias entre los tratamientos utilizados se realizó una prueba de ANOVA con Tukey-B con un $\alpha = 0.05$, utilizando el paquete estadístico SPSS (PAWS Statistics 18).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Selección de condiciones de cultivo para *Festuca arundinacea*

Las semillas dan lugar a un nuevo individuo, perpetuando y multiplicando a la especie que pertenecen. Para que las semillas puedan dar lugar a estos individuos, las condiciones deben ser adecuadas. Dichas condiciones tienen que ver con los factores ecológicos apropiados para su germinación: luz, humedad, sales minerales, temperatura, etcétera (Hardegree y Vactor, 1999).

6.1.1 Temperatura de germinación de semillas

Para la germinación de las semillas es importante considerar factores diversos como: la luz, la humedad del medio y la temperatura. En el presente trabajo, con el objetivo de conocer las diferentes expresiones fenológicas, se sembraron las semillas de *F. arundinacea* a dos temperaturas diferentes.

En la Figura 1 se muestra la variación del índice de germinación acumulado en semillas de *F. arundinacea* con respecto al tiempo a dos temperaturas: 25 y 30 °C. A 30 °C no se observó la producción de la raíz embrionaria en los primeros 2 días, mientras que a 25 °C se observó aproximadamente el 10% de germinación. El mayor número de semillas germinadas se obtuvo a 25 °C alcanzando el 80% después de 18 días, mientras que a 30 °C sólo se alcanzó el 70% en el mismo tiempo.

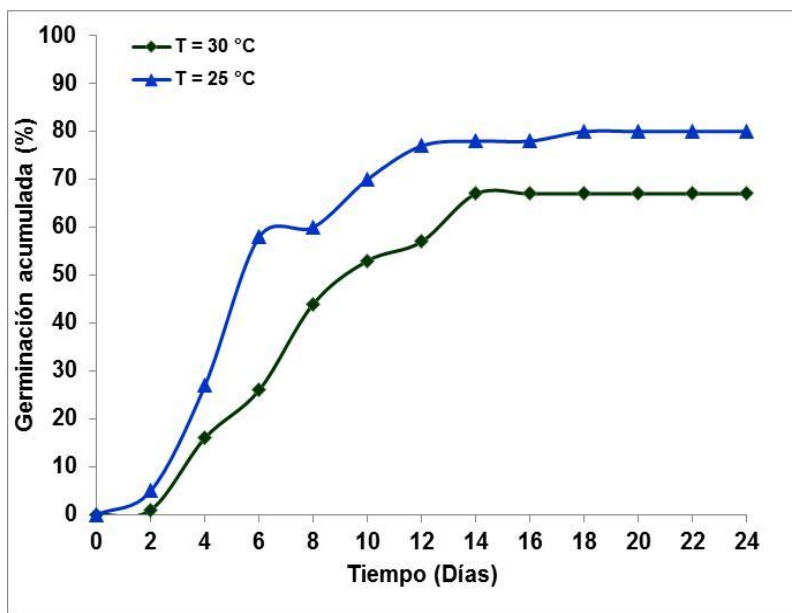


Figura 1. Índice de germinación acumulado de semillas de *F. arundinacea* durante 24 días a 25 y 30 °C.

Nuestros resultados son similares a los de Andersson y Milberg (1998) quienes reportan 20-25 °C como rango óptimo de germinación de semillas de gramíneas. La temperatura de germinación de las semillas puede variar de acuerdo al estado fisiológico de la planta madre, fenómeno conocido como latencia (Andersson y Milberg, 1998; Hardegee y Vactor, 1999). Con base en éste resultado, se establecieron 25 °C como la temperatura adecuada para la germinación de semillas de *F. arundinacea*.

6.1.2 Temperatura de crecimiento y establecimiento de plantas

Diversos estudios han demostrado que la estructura y fortaleza de la raíz se correlaciona con la degradación de los contaminantes, y que cambios en la temperatura de incubación pueden dañar el desarrollo de las raíces de las plantas (Kechavarzi y col., 2007). Con base en lo anterior, se realizó un ensayo para evaluar el efecto de la temperatura sobre el desarrollo de las raíces y plantas de *F. arundinacea* de 15 días de edad.

Se realizaron mediciones de la relación de elongación vástago/raíz (V/R) en plantas después de 15 días de incubación. Valores pequeños de esta relación indican una mayor elongación de la raíz, con respecto a los vástagos. En la Figura 2A se muestran los valores de la relación de elongación V/R a 25 y 30°C, obteniéndose promedios de $2.4 \pm$

0.6 y 5.1 ± 1.5 respectivamente. Lo anterior indica que las raíces de *F. arundinacea* se desarrollaron significativamente mejor a 25°C que a 30°C.

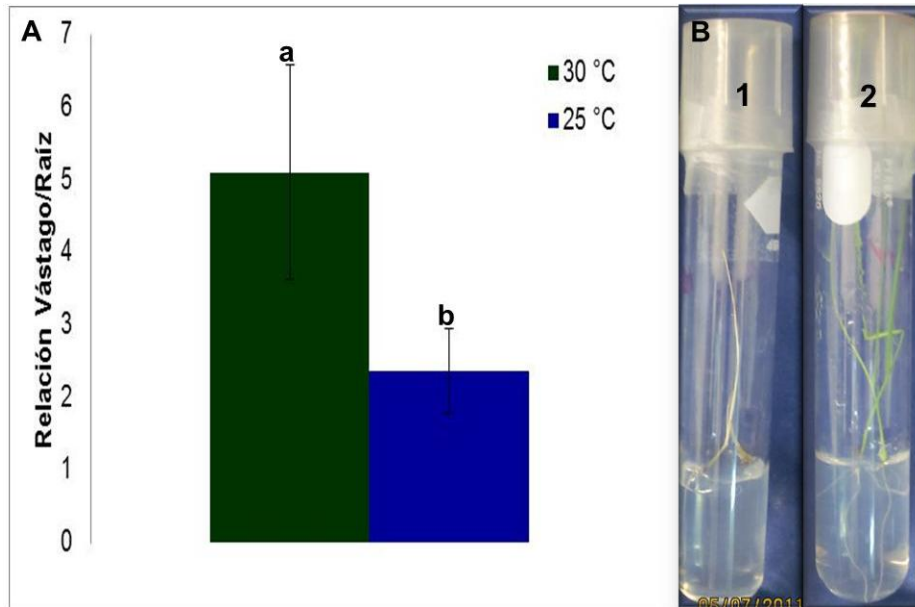


Figura 2. A) Relación vástago/raíz. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas. Las barras representan la desviación estándar de cada muestra. B) 1. Plántulas incubadas a 30 °C con clorosis 2. Plántulas incubadas a 25 °C sin clorosis.

Resultados similares son reportados por Qiu y col. (2010) quienes obtienen un mejor desarrollo en raíces de plántulas de *Festuca hallii*, una gramínea similar a *F. arundinacea*, a 25 °C.

Así mismo en las plantas incubadas a 30°C (Figura 2B) se observó la presencia de clorosis, no así en las incubadas a 25°C. Murage y col. (1997) observaron clorosis al aumentar 7°C en la temperatura de incubación de diversas plantas. De hecho se ha reportado que el aumento en la temperatura de incubación de ciertas plantas provoca poca producción de clorofilas induciendo una disminución en la asimilación de CO₂ y en la producción de almidón (Murage y col., 1997).

Con estos resultados se estableció 25 °C como la temperatura de crecimiento de plantas de *F. arundinacea*.

6.1.3 Relación de clorofilas *a/b*

Para la realización de los diferentes estudios de fitorremediación de suelos contaminados con compuestos orgánicos o inorgánicos no siempre se comienza con semillas. En ocasiones se utilizan plantas cultivadas en condiciones de laboratorio con el objetivo de que éstas desarrollen diversas características y se encuentren en determinado estado fisiológico relacionado con la edad de los cultivos (Küpper y col., 2000). Una manera de conocer el estado fisiológico de las plantas es a través de la relación de la concentración de las clorofilas *a/b* (Roca y col., 2004). La clorofila *a* es el pigmento activo principal que transforma la energía lumínica en energía química, mientras que la clorofila *b* absorbe luz en longitudes de onda diferentes a la clorofila *a* para luego transferirla a la clorofila *a*. La relación que guardan estos dos tipos de clorofila es muy importante para determinar que una planta se encuentra en buen estado fisiológico (Cambrón-Sandoval y col., 2011).

Así, con el objetivo de encontrar el estado fisiológico adecuado para asociar a *F. arundinacea* con *Lewia* sp. se cuantificó la relación entre clorofila *a/b* en diferentes días de incubación a 25°C, los resultados se muestran en la Figura 3. Como se puede apreciar, no se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la relación de clorofilas *a/b* debido a la edad de las plantas. La relación de clorofilas *a/b* de *F. arundinacea* resultó estable en el rango de edades ensayado: entre 15 y 36 días. Roca y col. (2004), encontraron estabilidad en la relación de clorofilas *a/b* de la gramínea *Lolium temulentum* después de 45 días de incubación a 25 °C, resultados similares a los reportados en este trabajo.

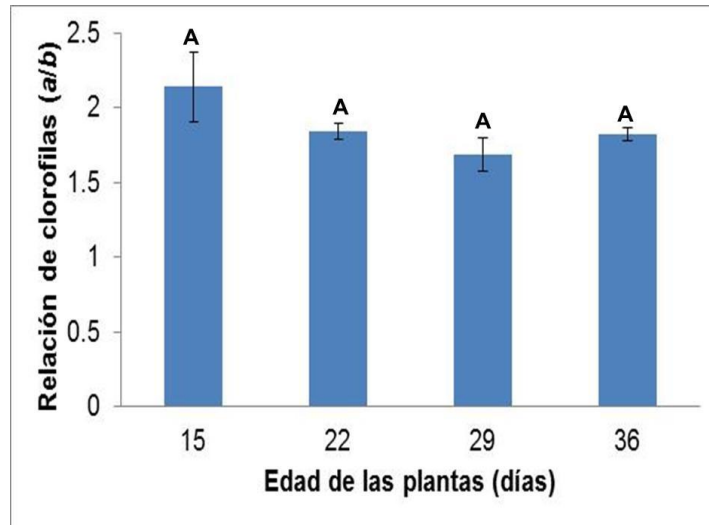


Figura 3. Relación de clorofilas (*a/b*) en *F. arundinacea* para diferentes días de incubación a 25°C. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas. Las barras representan la desviación estándar de cada muestra.

En la naturaleza se encuentra una relación de clorofila *a/b* entre 2:1 ó 3:1 (Cambrón-Sandoval y col., 2011), los cuales coinciden con los encontrados en nuestro trabajo. Con base en los resultados obtenidos, se seleccionaron 15 días de edad como la etapa fisiológica adecuada para comenzar los ensayos de asociación entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp.

6.2 Asociación planta-hongo

6.2.1 Efecto de *Lewia* sp sobre la relación de elongación vástago/raíz de *F. arundinacea*

Las gramíneas son seleccionadas para la fitorremediación por su intenso crecimiento y amplia extensión de sus raíces (Wang y col., 2011). Sin embargo, estas características pueden ser potenciadas por la presencia de microorganismos (Sheng y col., 2008). Así, para investigar el efecto de la inoculación con *Lewia* sp. en la elongación del vástago y la raíz de *F. arundinacea*, se realizó un ensayo para establecer las condiciones bajo las cuales era posible inducir la asociación entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp.

Para esto se comenzó por evaluó el efecto de diferentes concentraciones de inóculo inicial y tiempo de contacto entre la planta y el hongo sobre la relación de elongación vástago/raíces (V/R) de *F. arundinacea*.

En la Figura 4 se muestran las variaciones en la relación de elongación V/R por efecto de la concentración inicial de inóculo y del tiempo de contacto. Se puede observar que para concentraciones entre 20-30 mg de hongo*tubo⁻¹ con tiempos prolongados de contacto (18-21 días), se encontraron relaciones de elongación V/R entre 2 y 4, similares a los obtenidos cuando las plantas crecieron solas durante 15 días a 25°C (apartado 6.1.2).

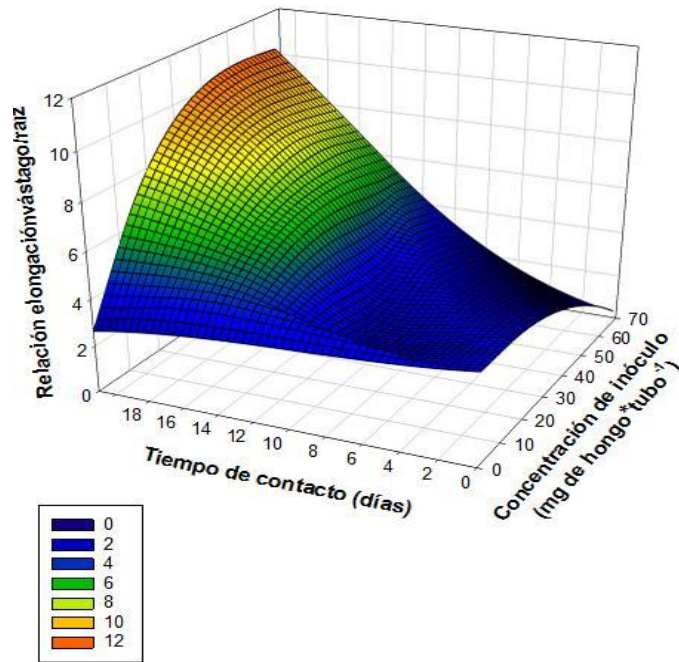


Figura 4. Variación de la relación de elongación (V/R) de *F. arundinacea* con respecto al tiempo de contacto y la concentración inicial de inóculo.

Estos resultados indican que cuando la concentración inicial de inóculo y el tiempo de contacto entre la planta y el hongo aumentan, la relación de elongación V/R también aumenta lo cual indica que hay mayor elongación del vástago, generando relaciones de elongación V/R entre 6 y 12. Es importante resaltar que el aumento en el valor de esta relación indica una menor elongación de la raíz con respecto a los vástagos, lo cual indica que el aumento en la concentración inicial de inóculo y del tiempo de contacto tuvieron un efecto negativo en la elongación de la raíz de *F. arundinacea*.

Zhang y Nan (2007) compararon la elongación de vástagos de *Elymus dahuricus* asociada al hongo *Neotyphodium* con plantas no asociadas y observaron un aumento en la elongación de los vástagos cuando la planta se encontraba asociada con el hongo endófito después de 8 semanas de contacto. De manera similar Malinowski y col. (1999)

no observaron diferencias significativas en la elongación de las raíces pero sí de los vástagos de *F. arundinacea* después de 15 días de contacto con el hongo endófito *Neotyphodium coenophyalum* comparadas con plantas sin el hongo.

Los resultados obtenidos sugieren que una concentración de inóculo entre 20 y 40 mg de hongo*tubo⁻¹ y tiempos de contacto entre 10 y 15 días pueden asegurar una relación de elongación V/R baja. Sin embargo, estos resultados fueron verificados mediante el efecto de ambas variables sobre la relación de clorofilas a/b.

6.2.2 Efecto de *Lewia* sp. sobre la relación de clorofilas a/b de *F. arundinacea*

El metabolismo de las clorofilas se produce a lo largo del ciclo de vida de las plantas, está estrechamente relacionado con la asimilación de CO₂ y es un indicador sensible al estrés abiótico y biótico. Uno de los tipos de estrés biótico más comunes, es el generado por la presencia de microorganismos (Roca y col., 2004; Yang y col., 2010). Para evaluar el efecto de la concentración inicial de inóculo inicial y del tiempo de contacto planta-hongo sobre la relación de clorofilas a/b en *F. arundinacea*, se realizaron los ensayos que se muestran y discuten a continuación.

En la Tabla 4 se observa la relación de concentraciones de clorofilas a/b de *F. arundinacea* en función de la concentración inicial de inóculo y del tiempo de contacto entre la planta y el hongo. La relación de clorofila a/b se deriva de los comportamientos de las concentraciones de la clorofila a y la clorofila b por separado. El análisis de los resultados de las variaciones para cada clorofila, indica que la concentración de clorofila a no mostró diferencias significativas (P<0.05) por efecto de la concentración inicial de inóculo de *Lewia* sp., en comparación con la concentración de clorofila a en plantas control (sin hongo). No así con respecto al tiempo de contacto, ya que, la clorofila a aumentó 1.2 veces a partir de los 14 días, manteniéndose constante hasta el día 21.

En lo que respecta a la clorofila b, se observó que la concentración incrementó hasta 1.7 veces por efecto de la todas las concentraciones de inóculo iniciales ensayadas. Mientras que, en lo referente a los días de contacto, la concentración de clorofila b aumentó 2.5 veces entre los 7 y los 21 días comparada con las plantas control (sin hongo). La relación

de concentración de clorofilas *a/b* resultó sensible a la concentración inicial de inóculo en tiempos de contacto menores a 10 días. Y para tiempos de contacto mayores, la concentración inicial de inóculo que proporciona los valores de la relación de clorofilas *a/b* similares a los mostrados en el apartado 6.1.3 (para *F. arundinacea* sin hongo), corresponden a un rango de concentración inicial de inóculo que va de 20 a 40 mg de hongo*tubo⁻¹.

Tabla 4. . Variación de la relación de concentración de clorofilas *a* y *b*, así como en su relación con respecto al tiempo de contacto y la concentración inicial de inóculo.

Concentración de inóculo inicial (mg de hongo*tubo ⁻¹)	Tiempo de contacto (días)	Concentración de clorofila <i>a</i> (µgmgPS ⁻¹)	Concentración de clorofila <i>b</i> (µgmgPS ⁻¹)	Relación de clorofilas <i>a/b</i> ± DS
0	0	1.38	0.70	2.14 ± 0.66 a
	7	1.23	0.67	1.85 ± 0.15 a
	14	1.25	0.77	1.69 ± 0.31 a
	21	1.58	0.86	1.82 ± 0.12 a
3.41	0	1.13	0.64	1.80 ± 0.27 a
	7	1.32	0.68	1.94 ± 0.18 a
	14	1.59	1.04	1.53 ± 0.14 a
	21	1.62	0.79	2.06 ± 0.16 a
4.07	0	0.97	0.67	1.48 ± 0.28 a
	7	2.20	1.38	2.08 ± 1.5 a
	14	1.83	2.27	0.86 ± 1.32 a
	21	2.17	2.11	1.02 ± 0.09 a
5.07	0	1.33	0.70	2.01 ± 0.38 a
	7	1.98	0.70	2.88 ± 0.40 a
	14	1.86	1.06	1.76 ± 0.14 a
	21	1.60	0.83	2.03 ± 0.59 a
33-95	0	1.67	0.69	2.60 ± 0.97 a
	7	2.09	1.68	1.53 ± 0.63 a
	14	1.65	0.78	2.13 ± 0.23 a
	21	2.11	0.90	2.38 ± 0.49 a

Los valores representan el promedio (tres unidades experimentales por cada tratamiento). Letras iguales por columna indican que no hay diferencias significativas entre cada grupo. DS, corresponde a la desviación estándar.

Nuestros resultados concuerdan con los reportados para plantas de *Elymus dahuricus* asociadas con el hongo endófito *Neotyphodium*, en donde se observó un aumento en la concentración de clorofilas *a* y *b* en 6 semanas de contacto (Zhang y Nan, 2007). Khan y col. (2011), encontraron un aumento en el contenido de clorofilas *a* y *b* en plantas de arroz asociadas con el hongo endófito *Aspergillus fumigatus*, debido a que el hongo sintetiza giberelinas (hormonas de crecimiento) que son aprovechadas por las plantas.

Tomando en cuenta que una manera de mejorar los procesos de fitorremediación es asegurando un área superficial máxima de raíces y que las plantas que se encuentran en un estado fisiológico sano presentan una relación de clorofilas *a:b* entre 2:1 ó 3:1 y, con base en los resultados obtenidos (apartados 6.2.1 y 6.2.2) se estableció como concentración de inóculo inicial 20 mg de hongo*tubo⁻¹ y 20 días de contacto entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp. antes de la aclimatación de la asociación a una MHC en condiciones *in vitro*.

Hasta aquí, los resultados previos en el laboratorio (Cruz-Hernández y col., 2013) y los que se muestran en este trabajo siempre sugirieron que entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp se establecía una asociación benéfica que era necesario demostrar. En el capítulo siguiente se muestran los resultados obtenidos acerca del análisis del tipo de relación entre la planta y el hongo en estudio.

6.3 Identificación del tipo de asociación

En la naturaleza, ningún organismo que viva en una comunidad existe de forma aislada. Cada organismo interviene en toda una serie de interacciones, tanto con los factores del ambiente abiótico como con otros organismos (Eichron, 1992). Con el objetivo de conocer el tipo de asociación que se establece entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp. se realizaron tres estudios microscópicos diferentes que permitieron determinar la naturaleza de la asociación entre ambos organismos.

6.3.1 Identificación microscópica del endófito

Como una primera aproximación, se cultivaron fragmentos de raíces de plantas de *F. arundinacea* con y son *Lewia* sp. desinfectados superficialmente (Figura 5A). Al realizar la observación microscópica de los fragmentos de raíces sembradas en medio PDA, a los 6

de incubación, se observó el crecimiento de hifas desde el interior de las raíces, como la que se muestra en la Figura 5B. En la Figura 5C, se muestra el mismo fragmento de raíz con un claro aumento en la longitud y en el número de hifas. Las mismas observaciones y comparaciones se realizaron con fragmentos de las raíces control que nunca estuvieron en contacto con *Lewia* sp. (Figura 5A).

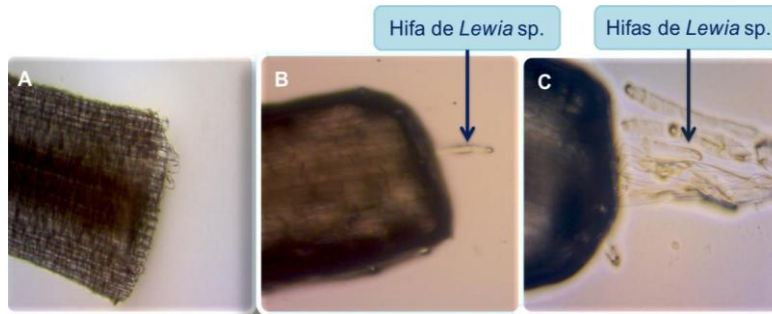


Figura 5. Micrografías ópticas de contraste de fases (60 veces) de raíces de *F. arundinacea* A) En agar papa dextrosa sin contacto con *Lewia* sp. B) En agar papa dextrosa con 20 días de contacto con *Lewia* sp. C) Seguimiento de raíz en B.

En cuanto al tallo al realizar las observaciones microscópicas en el día 6 de incubación se observó el crecimiento de una hifa (Figura 6B), en el mismo fragmento al día 7 de incubación, se observó el aumento en el número de hifas (Figura 6C) comparado siempre con un fragmento de tallo que no estuvo en contacto con *Lewia* sp. (Figura 7A).

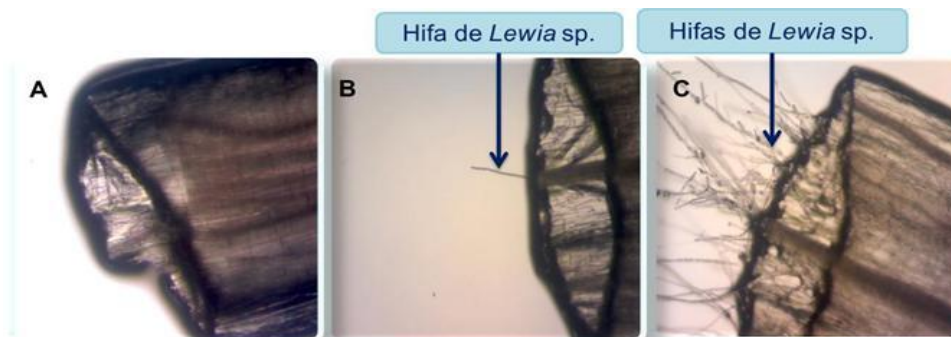


Figura 6. Micrografías ópticas de contraste de fases (60 veces) de tallo de *F. arundinacea* A) En agar papa dextrosa sin contacto con *Lewia* sp. B) En agar papa dextrosa con 20 días de contacto con *Lewia* sp. C) Seguimiento de tallo en B.

Aplicando la misma técnica que se describe anteriormente, Lucero y col. (2006) aislaron e identificaron hongos endófitos de los géneros *Moniliophthora*, y *Engyodontium* a partir de raíces de *Bouteloua eriopoda*, así como los hongos *Penicillium olsonii* y *Aspergillus ustus* a partir de las raíces de *Atriplex canescens*. Sin embargo, para demostrar el carácter

endófito de la asociación entre *Lewia* sp. y *F. arundinacea*, se recurrió a otros estudios de microscopía que se describen a continuación.

6.3.2 Aclaramiento y tinción de raíces y tallos

El análisis morfológico de raíces teñidas es comúnmente utilizado para observar hongos en el interior de la raíz o el tallo de las plantas. En nuestro trabajo, fue necesario eliminar el contenido de pigmentos y los compuestos fenólicos de las células corticales para así teñir diferencialmente el tejido de *Lewia* sp. (Phillips y Hayman, 1970).

En la Figura 7 se muestran las micrografías ópticas de la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. Se observan células de la epidermis de la raíz (Figura 7A) y del tallo (Figura 7B) de *F. arundinacea* e hifas de *Lewia* sp. teñidas con azul de tripano en el interior de los órganos. Utilizando la tinción con azul de tripano, Lucero y col. (2006) observaron hifas de un hongo del género *Moniliophthora* que se asocian a los principales tejidos epidérmicos de *Bouteloua eriopoda*.

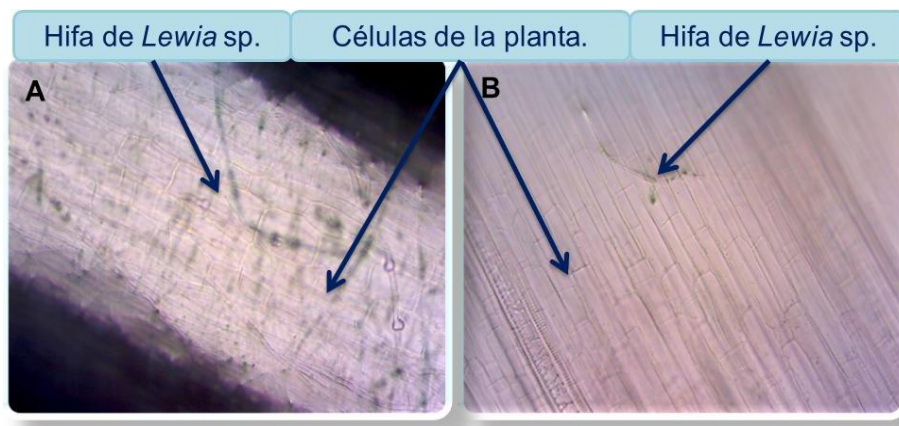


Figura 7. Micrografías ópticas (60 veces) de la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. A) Epidermis de la raíz aclarada, blanqueada e hifas teñidas con azul tripano- B) Epidermis del tallo aclarado, blanqueado e hifas teñidas con azul tripano.

Estos resultados nuevamente indican que el tipo de asociación que se establece entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp. es de carácter endófito. Sin embargo, no se puede observar qué tanto interacciona el hongo con la planta.

6.3.3 Estudios histológicos

La microscopía confocal constituye una nueva y poderosa herramienta que, mediante fluorocromos, permite examinar los cambios en las estructuras celulares (Abdellatif y col., 2009). En la Figura 8 se muestra el sistema microscópico confocal multifotónico de la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. obtenido con la técnica descrita en el apartado 5.6.3. En azul se observa la fluorescencia proveniente de la quitina de las hifas del hongo, así como la celulosa de las paredes celulares de la planta, como puede verse, las hifas de *Lewia* sp. aparecen septadas y rodean por completo a la raíz (Figura 8A). Algunas de estas hifas se encontraron dentro de las células epidérmicas, las cuales se observaron enrolladas y compartimentadas en uno de los extremos de las células de la planta (Figura 8B). También se observa una fluorescencia en la región del verde en áreas aglomeradas en las células vegetales, que por la longitud de onda donde se observan sugieren la presencia de compuestos fenólicos (Figura 8C), sin embargo, es necesario realizar otros análisis para corroborarlo. En la Figura 8D se observa que la fluorescencia proveniente de la celulosa de las paredes celulares de la planta se modifica cuando se encuentra en presencia del hongo. Estos estudios son importantes debido a que se ha reportado que para el éxito en la formación de una asociación endófito entre una planta y un hongo es necesario que se observe la compartimentación de las hifas del hongo, en la célula de la raíz de la planta (Abdellatif y col. 2009).

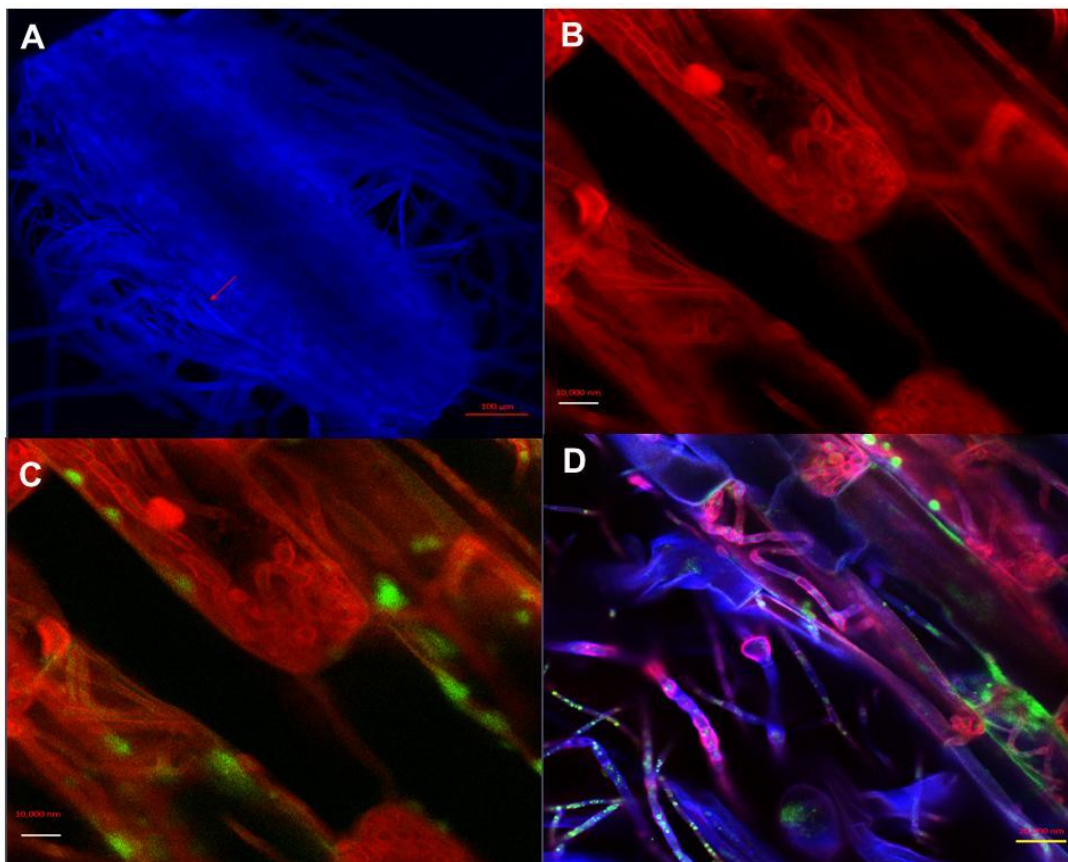


Figura 8. Imágenes de cortes longitudinales de raíces de *F. arundinacea* en asociación con *Lewia* sp. A) Panorámica, se observa quitina y celulosa. B) Hifas compartimentadas dentro de las células epidérmicas de la planta. C) Fluorescencia en la región del verde en áreas aglomeradas en las células vegetales, que sugieren la presencia de compuestos fenólicos. D) Fluorescencia de la celulosa de las paredes celulares de la planta modificada por la presencia del hongo. Microscopía Confocal Espectral Multifotónico.

Las micrografías obtenidas en el presente trabajo son similares a las de Abdellatif y col., (2009), que observan a dos ascomicetos endófitos dentro de las células de las raíces de *Triticum turgidum* L. Así, de acuerdo con los resultados presentados, es posible concluir que la asociación de *Lewia* sp. con *F. arundinacea* es de carácter endófito.

6.4 Efecto de la aclimatación de la asociación *F. arundinacea*-*Lewia* sp. a una MHC sobre la remoción de HC en suelo contaminado artificialmente.

Las características fisiológicas y anatómicas de las plantas propagadas en condiciones de laboratorio requieren de una aclimatación gradual al entorno en el que después serán utilizadas (Preece y Sutter, 1991). La capacidad de algunas plantas para aclimatarse a condiciones adversas puede mejorar debido a la presencia de hongos endófitos que ayudan a las plantas a resistir y/o tolerar cambios en el hábitat (Hahn y col., 2008).

Para demostrar el efecto de la aclimatación de la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. en el laboratorio, se utilizó la concentración individual de los hidrocarburos de la MHC removidos en las unidades experimentales, como la principal variable de respuesta.

Como se describe en el apartado 5.4, las unidades experimentales contenían suelo contaminado artificialmente con una concentración inicial de 1500 (mg*kg⁻¹) de la MHC, en las cuales se trasplantaron y cultivaron los ejemplares de la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. previamente aclimatados en condiciones *in vitro* en el laboratorio.

6.4.1 Remoción de hexadecano

En la Figura 9 se muestra la variación de la remoción de HXD en el suelo por la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. con respecto a las dos variables independientes que inducen la aclimatación: (i) el tiempo de contacto en tubos bajo las condiciones de laboratorio, y (ii) las concentraciones iniciales de la MHC.

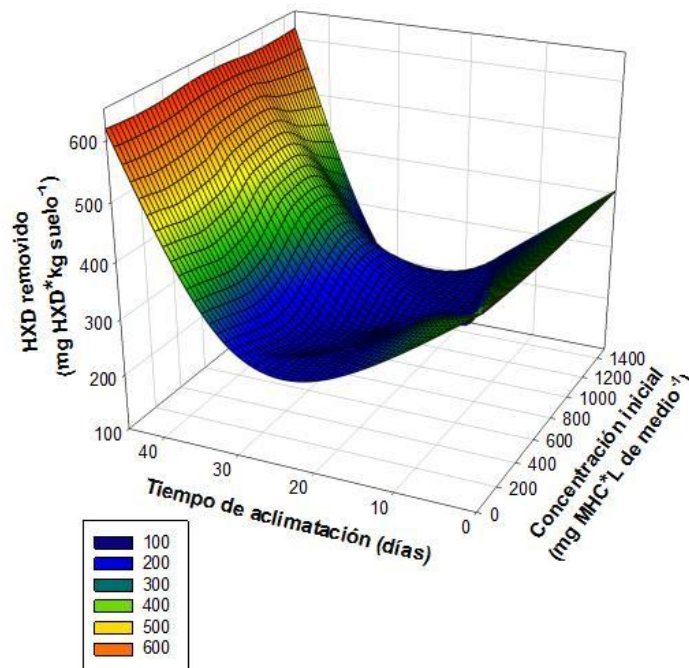


Figura 5. Variación en la remoción de HXD en suelo por la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. con respecto al tiempo y a la concentración inicial de MHC en la aclimatación.

Se puede observar que la concentración inicial de la MHC en el medio de aclimatación, no tuvo un efecto significativo sobre la remoción de HXD en las unidades experimentales con suelo contaminado. De manera similar, tampoco se encontraron diferencias significativas

en la remoción de HXD por efecto del tiempo de aclimatación, encontrándose valores de remoción de 97.5 ± 0.6 , 35.9 ± 19.4 y $39.3 \pm 6.6\%$ a los 0, 15 y 30 días, respectivamente, comparable con el suelo control ($60.9 \pm 10.1\%$). Mientras que con el tiempo mayor de aclimatación (45 días) se alcanzó el $97.6 \pm 0.1\%$ de remoción de HXD del suelo.

En un trabajo reciente en nuestro laboratorio, Cruz-Hernández y col. (2013) reportan que después de 45 días se encontró $95.1 \pm 0.8\%$ de remoción del HXD en un suelo plantado con la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp., sin aclimatación previa a la aplicación en suelo contaminado con la misma MHC. Nuestros resultados fueron significativamente mayores, probablemente debido a la aclimatación.

6.4.2 Remoción de fenantreno

En la Figura 10 se muestra la remoción de PHE en las unidades experimentales con suelo por la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. en función del tiempo de aclimatación y la concentración inicial de la MHC a la que se aclimataron los organismos. La menor remoción de PHE se observó con 0, 15 y 30 días de aclimatación (97.1 ± 0.1 , 96.7 ± 0.6 y $97.0 \pm 0\%$ respectivamente), similares a los valores obtenidos en el suelo control sin planta ($95.2 \pm 0\%$). Mientras que al aumentar el tiempo de la aclimatación a 45 días, la remoción de PHE en suelo aumentó significativamente ($P < 0.05$) hasta alcanzar el $97.7 \pm 0\%$. Es importante resaltar que la remoción de PHE obtenida en este trabajo puede considerarse muy elevada, ya que este hidrocarburo tiene una gran distribución en la naturaleza y causa diversas enfermedades en el ser humano (cáncer, linfoma, etc.).

Resultados menores fueron reportados por Gao y col. (2011) quienes obtuvieron un 98% en la remoción de PHE (inicial en suelo $103 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) utilizando plantas de *Medicago sativa* L. asociadas con dos hongos micorrícicos arbusculares (*Glomus mosseae* y *G. etunicatum*). Por su parte, Cheema y col. (2009), observaron hasta 97.8% de remoción de PHE inicial ensayado ($344.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) utilizando plantas de *F. arundinacea* asociada a microorganismos de la rizósfera.

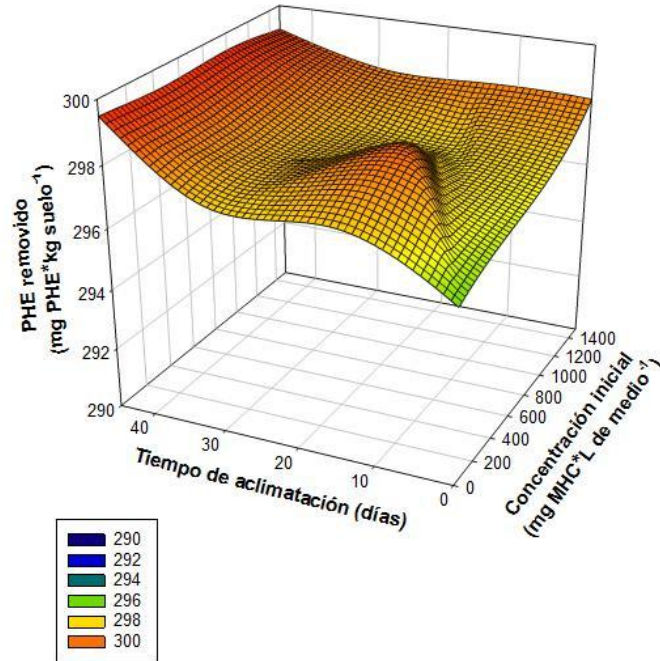


Figura 60. Variación en la remoción de PHE en suelo por la asociación *F. arundinacea-Lewia sp.* con respecto al tiempo de aclimatación y a la concentración inicial de la MHC en la aclimatación.

6.4.3 Remoción de pireno

La remoción de PYR por la asociación *F. arundinacea-Lewia sp.* en función del tiempo de aclimatación y de las concentraciones iniciales de la MHC se muestra en la Figura 11. No se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la remoción de este hidrocarburo para 0, 15 y 30 días de aclimatación (94.5 ± 1 , 94.8 ± 1.3 y $93.6 \pm 0.8\%$, respectivamente) por efecto de la concentración inicial de la MHC, pero la remoción de PYR se redujo significativamente con respecto al suelo control sin la asociación ($77.4 \pm 0.7\%$). Cuando el periodo de aclimatación se extendió a 45 días, el PYR removido aumentó significativamente con respecto al suelo control, sin la asociación, alcanzando el $97.5 \pm 0.1\%$.

Gao y col. (2011) encontraron 88.1% de remoción de PYR en un suelo (inicial $74 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) utilizando plantas de *Medicago sativa* L. asociadas a *G. mosseae* y *G. etunicatum* en un periodo de 70 días. Por otro lado, Cheema y col. (2009), obtuvieron el 90% de degradación de PYR utilizando por 65 días plantas de *F. arundinacea* asociada a microorganismos de la rizósfera en un suelo contaminado ($335.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$).

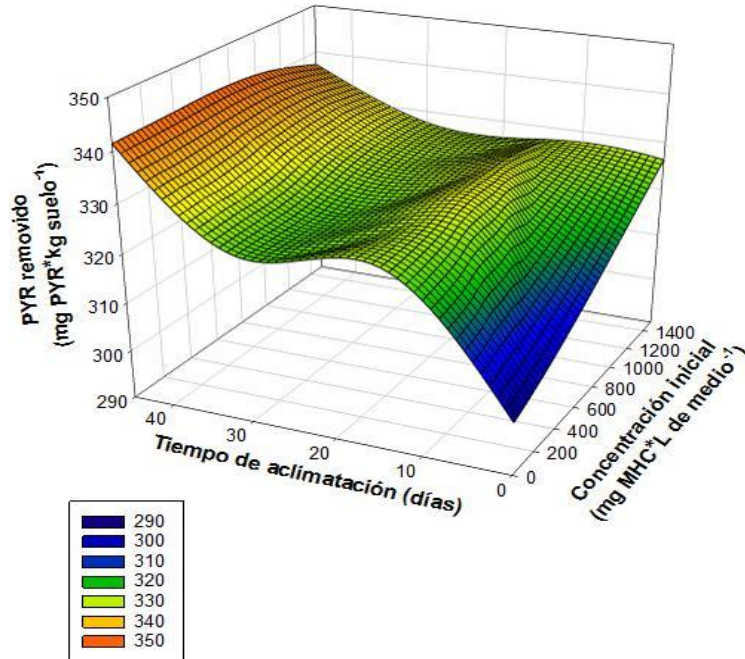


Figura 11. Variación en la remoción de PYR en suelo por la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. con respecto al tiempo de aclimatación y la concentración inicial de la MHC.

La relativamente baja remoción de PYR se debe a que éste es un hidrocarburo recalcitrante que queda adsorbido en el suelo y, por lo tanto, su biodisponibilidad es muy baja. Además, el PYR es un hidrocarburo con un alto peso molecular resistente al ataque por plantas y microorganismos (Cheema y col., 2009; Gao y col., 2011).

En el presente trabajo observamos que la remoción de PYR del suelo aumentó con el mayor periodo de aclimatación (45 días) de la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. al contaminante en condiciones *in vitro*. Este resultado puede atribuirse a un mayor tiempo de aclimatación, el cual puede inducir sustancias (enzimas: peroxidasas, glutatión S-transferasas, etcétera) implicadas en la degradación de los contaminantes (Macleod y Semple, 2002).

La asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. aclimatada a la MHC removió mayor cantidad (entre 1.5 y 2 veces más) de HXD que de PHE y PYR que la asociación sin aclimatar. Diversos estudios demuestran que los hidrocarburos alifáticos, como el HXD, son más fácilmente removidos del suelo por las plantas y microorganismos de la rizósfera (Wang y col., 2010; Barrutia y col., 2011) y que, cuando el tamaño de la molécula aumenta,

disminuye la biodisponibilidad del compuesto y con esto la remoción y degradación (Alexander, 1995).

Se observó que la respuesta de la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. sobre la remoción de HXD, PHE y PYR en suelo, en general, no varió por efecto de la concentración inicial de la MHC durante la aclimatación. Sin embargo, si hubo un efecto positivo en la remoción por la aclimatación en condiciones *in vitro* anteriores al trasplantado al suelo. Lo anterior podría atribuirse a la producción de moléculas de detoxificación (glutatión) como respuesta de la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. ante el tiempo prolongado de exposición a los hidrocarburos.

6.5 Distribución de hidrocarburos en los tejidos de *F. arundinacea-Lewia* sp. durante la aclimatación

Las plantas fitorremediadoras llevan a cabo diversos mecanismos a través de los cuales los contaminantes son transformados (fitoestimulación y fitodegradación), removidos (fitoextracción), estabilizados (fitoestabilización) o volatilizados (fitovolatilización) (Pilon-Smits y LeDuc, 2009). Sin embargo, hasta la fecha, la fitorremediación de suelos contaminados con compuestos orgánicos, asistida por microorganismos endófitos ha sido poco estudiada (Sheng y col., 2008), y aún menos conocida es la distribución de los contaminantes en los tejidos de este tipo de asociaciones. Esto último es muy importante, ya que conocer la distribución de los contaminantes en los tejidos de una planta, permite determinar el tipo de mecanismo de fitorremediación a través del cual ocurre el proceso.

La absorción y entrada de todo contaminante orgánico a plantas y microorganismos son los pasos esenciales para que la remoción y degradación de los compuestos se lleve a cabo (Gao y col. 2004). Se sabe que la raíz de las plantas son el primer contacto con los contaminantes, y a partir de aquí, éstos pueden ser translocados a otros tejidos de las plantas (Kechavarzi y col., 2007), aun cuando las raíces de las plantas se encuentren asociadas a microorganismos.

Con base en lo anterior, para evaluar la capacidad de la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. para acumular hidrocarburos en los tejidos, se extrajeron los hidrocarburos tanto de la raíz como del vástago de los individuos cosechados en los experimentos de aclimatación.

A continuación se detallan los resultados obtenidos para cada uno de los hidrocarburos que contenía la MHC.

6.5.1 Hexadecano

En la Figura 12 se muestra la acumulación de HXD en raíces de la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. con respecto a la concentración inicial de la MHC y el periodo de aclimatación. Se observaron dos puntos máximos de acumulación de HXD que no difieren entre sí ($2,554 \pm 246$ mg HXD*kg de raíz⁻¹), pero sí del resto de los resultados. Los puntos máximos se detectaron para tiempos de aclimatación cortos (15 días) y concentraciones de MHC iniciales intermedias (1000 mg*L⁻¹), así como para tiempos de aclimatación prolongados (45 días) y concentraciones iniciales de MHC altas (1500 mg*L⁻¹). Este resultado puede deberse a que durante tiempos cortos de aclimatación, aún no se han producido las enzimas (peroxidasas, super oxido dismutasas, etcétera) implicadas en la degradación del HXD, por lo que éste se mantiene almacenado en el tejido de *F. arundinacea* en asociación con *Lewia* sp.

Nuestros resultados contrastan de lo reportado por Cruz-Hernández y col. (2013), quienes encontraron sólo $1,404 \pm 56$ mg HXD*kg de raíz⁻¹ (cerca de la mitad) en las raíces de *F. arundinacea* asociada a *Lewia* sp. en periodos de incubación hasta de 45 días.

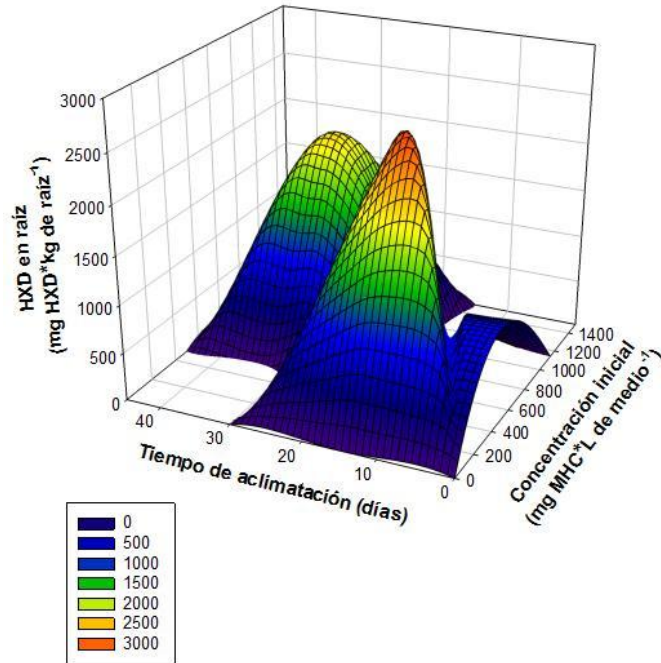


Figura 12. Variación en la acumulación de HXD en la raíz de la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. con respecto al tiempo de aclimatación y a diferentes concentraciones iniciales de la MHC.

En la Figura 13 se muestra la acumulación de HXD en los vástagos de la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. en función de la concentración inicial de MHC y el tiempo de aclimatación. Se puede observar un máximo significativo en la acumulación de HXD en vástagos ($3,468 \pm 115$ mg HXD*kg de vástago⁻¹) para un tiempo de aclimatación de 30 días y una concentración inicial de MHC de 1500 mg*L⁻¹.

Los resultados obtenidos en este trabajo no coinciden con los reportados por Cruz-Hernández y col. (2013), quienes encontraron una acumulación de HXD 25 veces menor (136 ± 79 mg HXD*kg de vástago⁻¹) después de 45 días. Sin embargo, estos autores no realizaron una aclimatación previa de la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp.

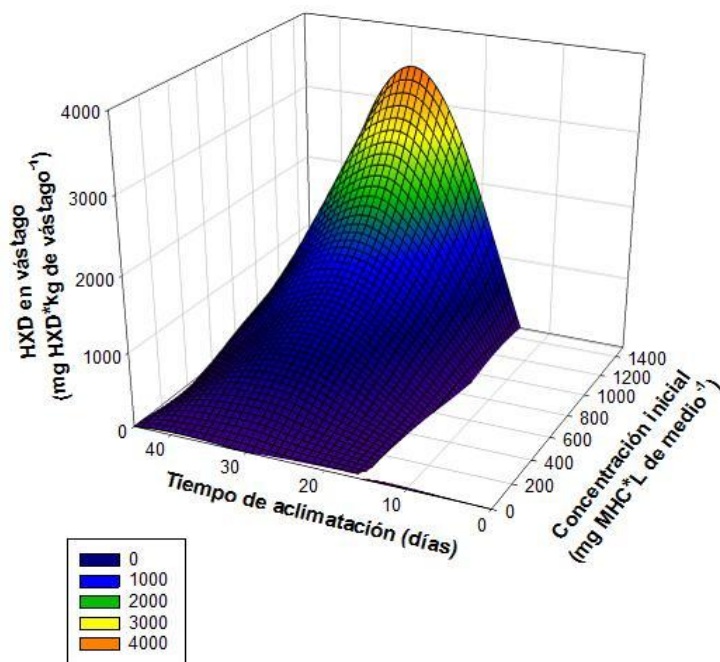


Figura 73. Variación en la acumulación de HXD en el vástago de la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. con respecto al tiempo de aclimatación y las diferentes concentraciones iniciales de MHC.

De acuerdo con nuestros resultados, del HXD absorbido por las raíces, el 84% fue translocado a los vástagos en la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. Se ha demostrado que mientras más bajo es el peso molecular de los compuestos orgánicos contaminantes, éstos son más fácilmente transportados desde la raíz a través del xilema hacia los vástagos de las plantas (Marchiol y col., 2004).

6.5.2 Fenantreno

En la Figura 14 se muestra la acumulación de PHE en las raíces de *F. arundinacea* en asociación con *Lewia* sp. con respecto a la concentración inicial de MHC y el tiempo de aclimatación. Se observó un punto máximo de acumulación de PHE, correspondiente a 31.6 ± 0.2 mg PHE*kg de raíz⁻¹, que es significativamente diferente al resto de los resultados. Este punto se encontró para tiempos de aclimatación cortos y concentraciones iniciales de MHC intermedios (15 días y 1000 mg*L⁻¹). Lo anterior puede atribuirse a que, en periodos cortos de aclimatación, aún no se han producido las enzimas (peroxidasa, superóxido dismutasas, etcétera) implicadas la biodegradación del PHE, por lo que éste es acumulado en la planta asociada al hongo endófito.

Estas concentraciones de PHE acumulado son 9 veces mayor a los reportados por Gao y col. (2011), quienes sólo encontraron 3.86 mg PHE*kg de raíz⁻¹ en plantas de *M. sativa* L asociadas con *G. mosseae* y *G. etunicatum*, incubadas por un periodo de 70 días. Por otro lado, Cruz-Hernández y col. (2013) no detectaron PHE en las raíces de *F. arundinacea* asociada a *Lewia* sp. en 45 días.

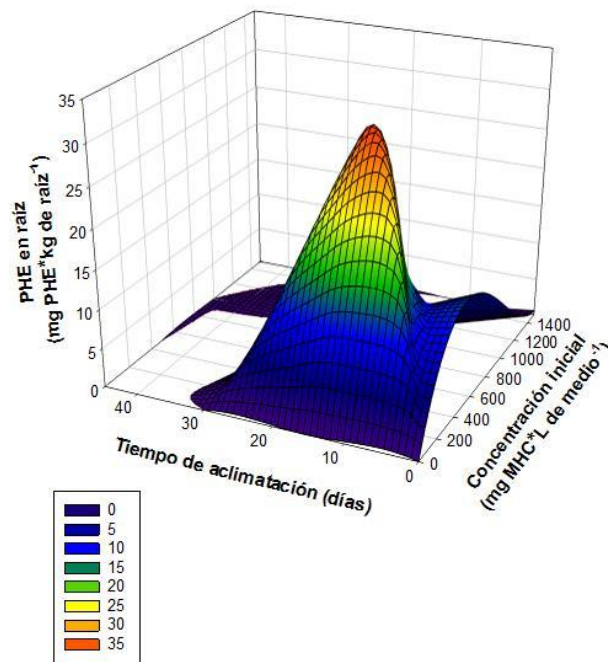


Figura 14. Variación en la acumulación de PHE en la raíz de la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. con respecto al tiempo de aclimatación y las diferentes concentraciones iniciales de MHC.

En la Figura 15 se muestra la acumulación de PHE en los vástagos de la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. en función de la concentración inicial de la MHC y el tiempo de aclimatación. En este caso, destaca un máximo de $1,054 \pm 111$ mg PHE*kg de vástago⁻¹ que corresponde a la zona de mayor tiempo de aclimatación (45 días) y mayor concentración inicial de MHC ($1500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). Este máximo indica que el 93% del total de PHE encontrado en los tejidos fue translocado a los vástagos. Este resultado contrasta con lo reportado por Gao y col. (2011), que registraron bajas cantidades de PHE ($1.29 \text{ mg PHE} \cdot \text{kg}^{-1}$) en vástagos de *M. sativa* L. asociada a *G. mosseae* y *G. etunicatum* durante 70 días. Mientras que Cruz-Hernández y col. (2013), no detectaron PHE en vástagos de *F. arundinacea* asociada a *Lewia* sp. después de 45 días en un suelo contaminado sin una previa aclimatación de la asociación.

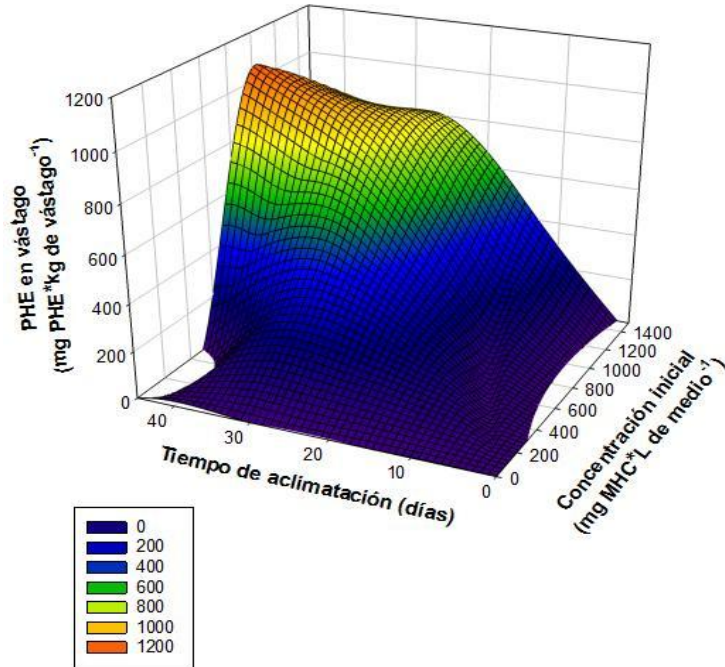


Figura 8. Variación en la acumulación de PHE en el vástago de la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. con respecto al tiempo de aclimatación y a la concentración inicial de la MHC.

Se sabe que los HAP de 2-3 anillos como el PHE son absorbidos por las raíces y transportados a los vástagos de las plantas (Zhan y col., 2010). Por ejemplo, Tao y col. (2004), encontraron altas concentraciones de HAP de 2-3 anillos sólo en raíces de arroz. En contraste, en nuestro trabajo se encontró 33 veces mayor concentración de PHE en vástagos que en raíces, lo cual sugiere que la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. podría usarse para la extracción de PHE.

6.5.3 Pireno

En la Figura 16 se muestra la acumulación de PYR en raíces de *F. arundinacea* en asociación con *Lewia* sp. con respecto a la concentración inicial de MHC y el tiempo de aclimatación. Se puede apreciar un valor máximo en la acumulación de $2,757.9 \pm 80.2$ mg PYR*kg de raíz⁻¹, el cual corresponde a los menores tiempos de aclimatación y las mayores concentraciones iniciales de MHC, lo cual podría explicarse debido a que, para periodos cortos de aclimatación no se han producido las enzimas (peroxidasa, superóxido dismutasas, etcétera) implicadas en la biodegradación del PYR.

Estos resultados difieren de los reportados por Gao y col. (2011), quienes encontraron una concentración de PYR 169 veces menor en raíces de *M. sativa* L. asociada a *G.*

mosseae y *G. etunicatum*, con respecto a los reportados en el presente trabajo. Por otro lado, Su y col. (2008), reportan en raíces de *Melilotus officinalis*, *F. arundinacea* Schreb., *M. sativa* L. y *Sorghum sudanense* asociadas a microorganismos de la rizósfera, concentraciones de PYR hasta 3 órdenes de magnitud menores que las encontradas en este trabajo. Mientras que Cruz-Hernández y col. (2013) encontraron hasta 1,603.4 mg PYR*kg de raíz⁻¹ en plantas de *F. arundinacea* asociada a *Lewia* sp. No obstante, estos resultados siguen siendo menores a los obtenidos en este trabajo. Lo cual indica que *F. arundinacea* en asociación con *Lewia* sp. aumenta la eficiencia de la extracción de PYR, con las condiciones propuestas en el presente trabajo.

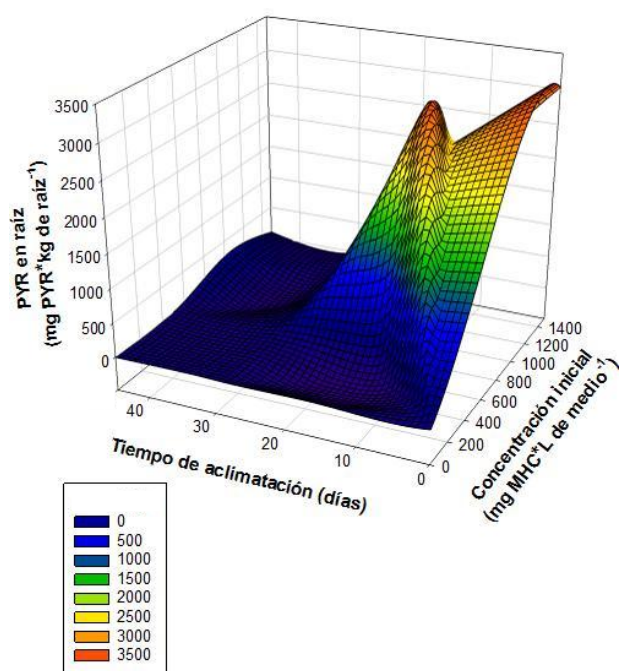


Figura 16. Variación en la acumulación de PYR en la raíz de la asociación *F. arundinacea*-*Lewia* sp. con respecto al tiempo de aclimatación y a la concentración inicial de la MHC.

En la Figura 17 se muestra la acumulación de PYR en los vástagos de *F. arundinacea* en asociación con *Lewia* sp. en función de la concentración inicial de MHC y el tiempo de aclimatación. Se encontró una mayor acumulación de PYR (745.3 ± 98.8 mg PYR*kg de vástago⁻¹) cuando la asociación fue aclimatada durante 45 días con la mayor concentración de MHC inicial. Los valores de acumulación encontrados en las raíces y en los vástagos conduce a valores del factor de translocación de PYR de 41-48%. En contraste, Su y col. (2008) no detectaron PYR en vástagos de diferentes plantas (*M.*

officinalis, *F. arundinacea*, *M. sativa* y *S. sudanense*) asociadas con microorganismos de la rizósfera.

Recientemente Gao y col. (2011) observaron concentraciones bajas de PYR en vástagos de *M. sativa* L. asociada a *G. mosseae* y *G. etunicatum*. Cruz-Hernández y col. (2013) no encontraron PYR en vástagos de *F. arundinacea* asociada a *Lewia* sp. Sin embargo, en el presente trabajo, el PYR encontrado en los vástagos de la asociación *F. arundinacea*-*Lewia* sp. alcanza hasta 745.3 ± 98.8 mg PYR*kg de vástago⁻¹. Lo cual indica que *F. arundinacea* asociada a *Lewia* sp. bajo las condiciones propuestas en el presente trabajo tiene un gran potencial para la extracción de PYR.

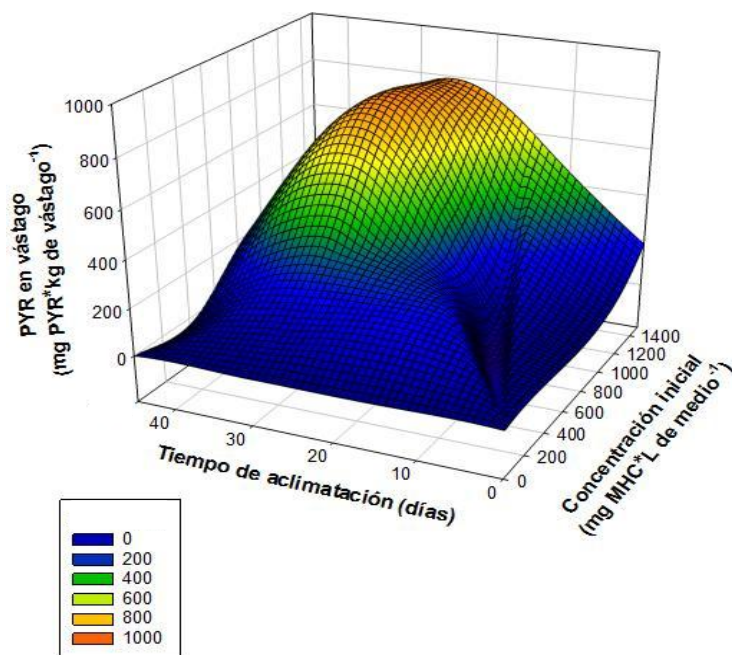


Figura 17. Variación en la acumulación de PYR en el vástago de la asociación *F. arundinacea*-*Lewia* sp. con respecto al tiempo de aclimatación y las diferentes concentraciones iniciales de MHC.

De acuerdo con los resultados presentados en las Figuras 16 y 17, se puede observar que el PYR se queda absorbido en mayor cantidad en las raíces que en los vástagos. La distribución de los contaminantes entre raíces y vástagos dentro de una asociación planta-hongo, depende de las características de los contaminantes y de la asociación (Gao y Zhu, 2004). Una vez absorbidos, los contaminantes pueden tener diferentes destinos dentro de las plantas, aun estando en asociación con microorganismos. Sin embargo, no es claro cómo es que la asociación entre plantas y hongos endófitos pueden modificar esta distribución de contaminantes (Gao y Zhu, 2004; Zhan y col. 2010).

6.6 Biodegradación de hidrocarburos

Diversos estudios demuestran que las plantas son capaces de activar un conjunto definido de procesos bioquímicos y fisiológicos para resistir los efectos tóxicos de los contaminantes. A éste conjunto de procesos se le conoce como biodegradación. Por la naturaleza física de los hidrocarburos utilizados, no es posible suponer su volatilización y pérdida en la atmósfera, lo que sugiere que fueron biodegradados por la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. a compuestos diferentes a los cuantificados por cromatografía de gases, mientras que el resto fue bioacumulado en los tejidos de *F. arundinacea* en asociación *Lewia* sp. Para estimar la fracción de hidrocarburos biodegradada, se realizó un balance de cada hidrocarburo con el objetivo de evaluar el efecto la concentración inicial de la MHC en la aclimatación. Cabe mencionar que los valores mostrados son sólo los encontrados con 45 días de aclimatación, puesto a que en este periodo se remueve mayor cantidad de los hidrocarburos.

En la Tabla 5 se muestra la distribución porcentual del HXD residual, bioacumulado y biodegradado en función de las diferentes concentraciones iniciales de la MHC.

Tabla 5. Distribución porcentual de HXD residual, bioacumulado y biodegradado, en función de las diferentes concentraciones iniciales de MHC para 45 días de aclimatación.

MHC inicial en el medio MS ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) en la aclimatación	Residual (%)	Bioacumulado (%)		Biodegradado (%)
		R	V	
Sin aclimatación	2.5 ± 0.6 a	ND	ND	97.6 ± 0.6 c
0	2.3 ± 2.2 ab	ND	ND	97.6 ± 1.7 bc
500	2.4 ± 1.3 a	ND	ND	97.5 ± 1.3 c
1000	2.2 ± 0.2 a	ND	ND	97.5 ± 0.2 c
1500	4.1 ± 0.9 b	0.01 ± 0.0	ND	95.5 ± 0.9 b
Control sin planta	39 ± 10.1 c	-----	-----	60.9 ± 10.1 a
Hidrocarburo inicial en suelo ($\text{mg}\cdot\text{kg suelo}^{-1}$)	633.7 ± 3.2			

Los valores representan el promedio (tres unidades experimentales por cada tratamiento) \pm la desviación estándar de la diferencia entre la concentración inicial de hidrocarburo y la concentración final cuantificada en el suelo o en la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. después de 60 días; ND: No detectado. Letras iguales por columna indican que no hay diferencias significativas entre cada grupo.

Como se puede observar (Tabla 5) no hay diferencias significativas ($P < 0.05$) en la distribución porcentual de la biodegradación del HXD en función de la concentración

inicial de la MHC durante la aclimatación. También se puede observar que el HXD absorbido se localiza en las raíces de *F. arundinacea* en asociación con *Lewia* sp. en cantidades muy pequeñas (0.01%) y, cuando la concentración de la MHC inicial en la aclimatación es de 1500 mg*L⁻¹. Por lo que la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. posee mayor capacidad de concentrar HXD en las raíces que en los vástagos, bajo estas condiciones. Esto último puede deberse a que la raíz de las plantas es el primer órgano de contacto con los contaminantes (Kechavarzi y col., 2007).

Tabla 5. Distribución porcentual de PHE residual, bioacumulado y biodegradado, en función de las diferentes concentraciones iniciales de MHC para 45 días de aclimatación.

Concentración inicial de la MHC (mg*L ⁻¹) en la aclimatación	Residual (%)	Bioacumulado (%)		Biodegradado (%)
		R	V	
Sin aclimatación	2.9 ± 0.1 b	ND	ND	96.9 ± 0.1 b
0	2.1 ± 0.4 a	ND	ND	97.3 ± 0.4 c
500	2.0 ± 0.0 a	ND	ND	97.3 ± 0.0 c
1000	2.6 ± 0.2 ab	ND	ND	97.3 ± 0.2 bc
1500	2.7 ± 0.5 ab	ND	ND	97.2 ± 0.5 bc
Control sin planta	4.8 ± 0.4 c	-----	-----	95.2 ± 0.4 a
Hidrocarburo inicial en suelo (mg*kg suelo⁻¹)	307.6 ± 1.1			

Los valores representan el promedio (tres unidades experimentales por cada tratamiento) de la diferencia entre la concentración inicial de hidrocarburo y la concentración final cuantificada en el suelo o en la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. después de 60 días; ND: No detectado. Letras iguales por columna indican que no hay diferencias significativas entre cada grupo.

En la Tabla 6, se muestra la distribución porcentual de la biodegradación y la bioacumulación del PHE en función de la concentración inicial de la MHC en la aclimatación, se puede observar que no hay diferencias significativas (P<0.05) en ésta distribución. En lo que respecta a la bioacumulación del PHE en los tejidos de *F. arundinacea* en asociación con *Lewia* sp. no se pudo detectar, bajo estas condiciones de trabajo, por lo que se estima que fue biodegradado.

En la Tabla 7, se muestra la distribución porcentual de la biodegradación del PYR en función de la concentración inicial de la MHC en la aclimatación, no se observan diferencias significativas (P<0.05) en ésta distribución. En lo que respecta a la bioacumulación de PYR en los tejidos de *F. arundinacea* en asociación con *Lewia* sp., no se observa una tendencia, en función de la concentración inicial de la MHC en la

aclimatación ya que, el PYR es translocado, en pequeñas cantidades ($0.004 \pm 0.0\%$ y $0.005 \pm 0.0\%$), a los vástagos de *F. arundinacea* pero sólo cuando las concentraciones iniciales de la MHC durante la aclimatación *in vitro* son 500 y 1500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Esto último puede deberse a la presencia del hongo.

Tabla 6. Distribución porcentual de PYR residual, bioacumulado y biodegradado, en función de las diferentes concentraciones iniciales de MHC para 45 días de aclimatación.

Concentración inicial de la MHC ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) en la aclimatación	Residual (%)	Bioacumulado (%)		Biodegradado (%)
		R	V	
Sin aclimatación	5.5 ± 2.0 ab	ND	ND	94.4 ± 2.0 bc
0	2.4 ± 0.3 a	ND	ND	97.5 ± 0.3 c
500	2.3 ± 0.1 a	ND	0.004 ± 0.0	97.7 ± 0.1 c
1000	2.5 ± 0.0 a	ND	ND	97.5 ± 0.0 c
1500	3.6 ± 0.2 b	ND	0.005 ± 0.0	96.4 ± 0.2 b
Control sin planta	22.6 ± 0.7 c	-----	-----	77.4 ± 0.7 a
Hidrocarburo inicial en suelo ($\text{mg}\cdot\text{kg suelo}^{-1}$)	348.9 ± 2.7			

Los valores representan el promedio (tres unidades experimentales por cada tratamiento) de la diferencia entre la concentración inicial de hidrocarburo y la concentración final cuantificada en el suelo o en la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. después de 60 días; ND: No detectado. Letras iguales por columna indican que no hay diferencias significativas entre cada grupo.

Con base en los resultados observados a partir de las Tablas 5, 6 y 7, el HXD es biodegradado en mayor concentración que el PHE y PYR. Se ha demostrado que mientras más sencillos son los contaminantes (caso del HXD), éstos son más fáciles de biodegradar por las plantas y los microorganismos del suelo, mientras que al aumentar la complejidad de las moléculas disminuye la biodisponibilidad del compuesto y su biodegradación (Alexander, 1995; Wang y col. 2010; Barrutia y col., 2011). No obstante lo anterior, para disminuir la cantidad del HXD, PHE y PYR en un suelo contaminado, es necesaria la presencia de la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp.

Con base en el balance de HC, puede decirse que la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. biodegrada a los tres hidrocarburos, además de bioacumular HXD en las raíces y PYR en los vástagos, y que esta biodegradación y bioacumulación depende de los parámetros de aclimatación que se impusieron en este trabajo.

7. CONCLUSIONES

- 1.- La mejor temperatura para la germinación y desarrollo de *F. arundinacea* en condiciones *in vitro* fue de 25°C. La edad de la planta para inducir su asociación con el *Lewia* sp. fue de 15 días.
- 2.- Las condiciones para el cultivo de la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. antes de la aclimatación fueron: un inóculo de 20 mg de hongo•tubo⁻¹ y 20 días de contacto *in vitro*.
- 3.- La asociación que se establece entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp. es de tipo endofítica y fue posible inducirla en el laboratorio.
- 4.- El tiempo de aclimatación de la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. a una MHC en condiciones *in vitro* aumentó significativamente la remoción de HXD, PHE y PYR en un suelo contaminado, mientras que la concentración inicial de los hidrocarburos durante la aclimatación no tuvo efecto significativo.
- 5.- Las raíces *F. arundinacea* en asociación con *Lewia* sp. son el tejido donde se acumula la mayor cantidad de HXD y los vástagos donde se acumula el PYR.
- 6.- Los posibles mecanismos de fitorremediación propuestos para suelo contaminado con hidrocarburos, son fitoextracción y fitodegradación.

8. RECOMENDACIONES

Con base en los resultados obtenidos, se proponen las siguientes recomendaciones:

Estudiar los mecanismos de tolerancia y acumulación de los hidrocarburos en la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. que permitan proponer un mecanismo de detoxificación de hidrocarburos.

Estudiar la actividad de la glutatión S-transferasas en la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. que catalizan reacciones de conjugación entre el glutatión y los hidrocarburos.

Estudiar la actividad de peroxidasas de la asociación *F: arundinacea-Lewia* sp. que participan en la degradación de los hidrocarburos.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdellatif L., Bouzid S. Kaminskyj S. y Vujanovic V. 2009 Endophytic hyphal compartmentalization is required for successful symbiotic Ascomycota association with root cells. *Mycological Research*. 113: 782-791.
- Alexander M. 1995. How toxic are toxic chemical in soil? *Environmental Science & Technology*. 29: 2713-2717.
- Anderson T. A., Guthier E. A. y Walton B. T. 1993. Bioremediation in the rhizosphere: Plant roots and associated microbes clean contaminated soil. *Environmental Science & Technology*. 27: 2630-2636.
- Andersson L., y Milberg P. 1998. Variation in seed dormancy among mother plants, populations and years of seed collection. *Seed Science Research*. 8: 29-38.
- Aprill W. y Sims R. C. 1990. Evaluation on the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil . *Chemosphere*. 20: 253-265.
- Barrutia O., Garbisu C., Epelde L., Sampedro M. C., Goicolea M. A. y Becerril J. M. 2011. Plant tolerance to diesel minimizes its impact on soil microbial characteristics during rhizoremediation of diesel-contaminated soils. *Science of the Total Environment*. 409: 4087-4093.
- Bacon C. W. y Yates I. E. 2006. Endophytic root colonization by *Fusarium* species: Histology, plant interactions, and toxicity. *Soil Biology*. 9: 133-150.
- Barton C., Marx D., Jun-Koo B., Newman L., Czapka S. y Blake J. 2005. Phytostabilization of a landfill containing coal combustion waste. *Environmental Geosciences*. 12: 251-265.
- Betancur-Galvis L. A., Alvarez-Bernal D., Ramos-Valdivia A. C. y Dendooven L. 2006. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated saline-alkaline soil of the former Lake Texcoco. *Chemosphere*. 62: 1749-1760.
- Bewley D. J. 1997. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*. 9: 1055-1066.

- Burns J., Fraser P. D. y Bramley P. M. 2003. Identification and quantification of acrotenoids, tocopherols and chlorophylls in commonly consumed fruits and vegetables. *Phytochemistry*. 62: 939-947.
- Cambrón-Sandoval V. H., España-Boquera M. L. Sánchez-Vargas N. M., Sáenz-Romero C., Vargas-Hernández J. J. y Herrerías-Diego Y. 2011. Chlorophyll production in *Pinus pseudotrobus* Juveniles under different development environments. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 17: 253-260.
- Cheema S. A., Khan M. I., Tang X., Zhang C., Shen C., Malik Z., Ali S., Yang J., Shen K., Chen X. y Chen Y. 2009. Enhancement of phenanthrene and pyren degradation in rhizosphere of tall feascue (*Festuca arundinacea*). *Journal of Hazardous Materials*. 166: 1226-1231.
- Conn V. M. y Franco C. M. M. 2004. Effect of microbial inoculants on the indigenous Actinobacterial endophyte population in the roots of wheat as determined by terminal restriction fragment length polymorphism. *Applied Environmental Microbiology*. 70: 6407-6413
- Constantione J. A. *Introductory Mycology*. New York: John Wiley, 1990.
- Coulon F., Whelan M. J., Paton G. I., Semple K. T., Villa R. y Pollard S. J. T. 2010. Multimedia fate of petroleum hydrocarbons in the soil: Oil matrix of constructed biopiles. *Chemosphere*. 81: 1454-1462.
- Chen H. y Cutright T. J. 2003. Preliminary evaluation of microbial mediated precipitation of cadmium, chromium, and nickel by rhizosphere consortium. *Journal Environmental Engineering Science*. 129:4-9.
- Chevron C. N. y Merlin G. 2007. Study of pyrene biodegradation capacity in two types of solid media. *Science of the Total Environment*. 380:116-123.
- Cruz-Hernández, A., A. Tomasini-Campocosio, L. J. Pérez-Flores, F. J. Fernández-Perrino, y M. Gutiérrez-Rojas. 2013. Inoculation of seed-borne fungus in the rhizosphere of *Festuca arundinacea* promotes hydrocarbon removal and pyrene acumulation in roots. *Plant Soil*. 362: 261-270.

- Dandie C. E., Weber J., Aler S., Adetutu E. M., Ball A. S. y Juhasz A. L. 2010. Assessment of five bioaccessibility assays for predicting the efficacy of petroleum hydrocarbon biodegradation in aged contaminated soil. *Chemosphere*. 81: 1061-1068.
- Dugay A., Herrenknecht C., Guyon F. y Pages N. 2002. New Procedure for selective extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in plants for gas chromatographic-mass spectrometric. *Journal of Chromatography*. 958: 1-7.
- Dushenkov V., Kumar P. B., Motto H. y Raskin I. 1995. Rhizofiltration: the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environmental Science & Technology*. 29: 1239-1245.
- Eichron, R. E. *Biology of Plants*. Barcelona: REVERTE S. A., 1992.
- Ernst M., Mendgen K. W. y Wlrsel S. G. R. 2003. Endophytic fungal mutualists: Seed-borne *Stagonospora* Spp. enhance reed biomass production in axenic microcosms. *The American Phytopathological Society*. 16: 580-587.
- Eynck C., Koopmann B., Grunewaldt-Stoecker G., Karlovsky P. y Tiedemann A. 2007. Differential interactions of *Verticillium longisporum* and *V. dahliae* with *Brassica napus* detected with molecular and histological techniques. *Journal Plant Pathology*. 118: 259-274.
- Ferrera-Cerrato R., Alarcón A., Mendoza-López M. R., Sangabriel W., Trejo-Aguilar D., Cruz-Sánchez J. S., López-Ortiz C. y Delgadillo-Martínez J. 2007. Phytoremediation of fuel oil-polluted soil with *Phaseolus coccineus* using organic or inorganic fertilization. *Agrociencia*. 41: 817-826.
- Fishbein L. 1984. An overview of environmental and toxicological aspects of aromatic hydrocarbons. I. Benzene. *The Science of the Total Environment*. 40: 189-218.
- Gao Y., Li Q., Ling W. y Zhu X. 2011 Arbuscular mycorrhizal phytoremediation of soil contaminated with phenanthrene and pyrene. *Journal of Hazardous Materials*. 185: 703-709.
- Gao Y. y Zhu L. 2004. Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soil. *Chemosphere*. 55: 1169-1178.

- Germaine K.J., Liu X., Garcia C. G., Hogan J.P., Ryan D. y Dowling D.N. 2006. Bacterial endophyte-enhanced phytoremediation of the organochlorine herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *FEMS Microbiology Ecology*. 57:302–310
- Ghosh M. y Singh S. P. 2005. A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its products. *Applied Ecology and Environmental Research*. 3: 1-18.
- González-Chávez M. 2005. Recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismos rizosféricos. *TERRA Latinoamericana*. 23: 29-37.
- Hahn H., McManus M. T., Warnstorff K., Monahan B. J., Young C. A., Davies E., Tapper B. A. y Scott B. 2008. *Neotyphodium* fungal endophytes confer physiological protection to perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) subjected to a water deficit. *Environmental and Experimental Botany*. 63: 183-199.
- Hardegree S. P. y Van Vactor S. S. 1999. Predicting germination response of four cool-season range grasses to field-variable temperature regimes. *Environmental and Experimental Botany*. 41: 209-217.
- Hiatt E. E. III., Hill N. S., Bouton J. H. y Stuedemann J. A. 1999. Tall fescue endophyte detection: Commercial immunoblot test kit compared with microscopic analysis. *Crop Science*. 39: 796-799.
- Huang X. D., El-Alawi Y., Penrose D. M., Glick B. R. y Greenberg B. M. 2004. *Environmental Pollution*. 130: 465-476.
- Iturbe R., Flores C., Castro A. y Torres L. G. 2007. Sub-soil contamination due to oil spills in six oil pipeline pumping stations in northern Mexico. *Chemosphere*. 68: 893-906.
- Johansson F., Paul L. R. y Finlay R. D. 2004. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiology Ecology* 48: 1-13.
- Kechavarzi C., Pettersson K., Leeds-Harrison P., Ritchie L. y Ledin S. 2007. Root establishment of perennial ryegrass (*L. perenne*) in diesel contaminated subsurface soil layers. *Environmental Pollution*. 145: 68-74.

- Khan A. L., Hamayun M., Kim Y. H., Kang S. M, Lee J. H. y Lee I. J. 2011 Gibberellins producing endophytic *Aspergillus fumigatus* sp. LH02 influenced endogenous phytohormonal levels, isoflavonoids production and plant growth in salinity stress. *Process Biochemistry*. 46: 440-447.
- Küpper H., Spiller M. y Küpper F. C. 2000. Photometric Method for the Quantification of Chlorophylls an Their Derivatives in Complex Mixures: Fitting with Gauss-Peak Spectra. *Analytical Biochemistry*. 286: 247-256.
- Kwasna H. y Kosiak B. 2003. *Lewia avenicola* sp. nov. and *Alternaria* anamorph from oat grain, with a key to the species of *Lewia*. *The British Mycological Society*. 107: 371-376.
- Lee S. H., Lee W. S., Lee C. H. y Kim J. G. 2008. Degradation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere of grasses and legumes. *Journal of Hazardous Materials*. 153: 892-898.
- Lorenzo V. 2008. Systems biology approaches to boiremediation. *Current Opinion in Biotechnology*. 19: 579-589.
- Lucero M. E., Barrow J. R., Osuna P. y Reyes I. 2006. Plant-fungal interactions in arid and semi-arid ecosystems: Large-scale impacts from microscale processes. *Journal of Arid Environments*: 65: 276-284.
- Luo Y., Wan S., Hui D. y Wallace L. L. 2001. Acclimatization of soil respiration to warming in a tall grass prairie. *Nature*. 413: 622-623.
- Macleod C. J. A. y Semple K. T. 2002. The adaptation of two similar soils to pyrene catabolism. *Environmental Pollution*. 119: 357-364.
- Mahesh B., Tejesvi M. V., Nalini M. S., Prakash H. S., Kini K. R., Subbiah V. y Shetty H. S. 2005. Endophytic mycoflora of inner bark of *Azadirachta indica* A. Juss. *Current Science*. 88: 218-219.
- Maila M. P. y Cloete T. E. 2002. Germination of *Lepidium sativum* as un method to evaluate polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal from contaminated soil. *International Biodeterioration y Biodegradation*. 50: 107-113.

- Malinowski D. P., Brauer D. K. y Belesky D. P. 1999. The Endophyte *Neotyphodium coenophialum* Affects Root Morphology of Tall Fescue Grown under Phosphorus Deficiency. *Journal Agronomy & Crop Science*. 183: 53-60.
- Marchiol L., Sacco P., Assolari S. y Zerbi G.. 2004. Reclamation of polluted soil: Phytoremediation potential of crop-related Brassica species. *Water Air Soil Pollution*. 158: 345-356.
- Mendez M. O. y Maier R. M. 2008. Phytostabilization of Mine Tailings in Arid and Semiarid Environments-An Emerging Remediation Technology. *Environ Health Perspect*. 116: 278-283.
- Müller C. B. y Krauss J. 2005. Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*. 8: 450-456.
- Murage E. N., Watashiro N. y Masuda M. 1997. Influence of light quality, PPFD and temperature on leaf chlorosis of eggplants grown under continuous illumination. *Scientia Horticulturae*. 68: 73-82.
- Murashige T. y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*. 15: 473-497.
- Newman L. A. y Reynolds C. M. 2004. Phytodegradation of organic compounds. *Current Opinion in Biotechnology*. 15: 225-230.
- Parrish D. Banks M. K. y Schwab A. P. 2005. Assessment of contaminant stability during phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon impacted soil. *Environmental Pollution*. 137: 187-197.
- Preece J. E. y Sutter E. J. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH. P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Ed.) *Micropropagation, technology and application*. London: Kluwer Academic. pp.71-93
- Phillips J. M. y Hayman D. S. 1970. Improved procedures for clearing and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*. 5: 158-161.
- Pilon-Smits E. A. H. y LeDuc D. L. 2009. Phytoremediation of selenium using transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology*. 20: 207-212.

- Pilon-Smits E. y Pilon M. 2000. Breeding mercury-breathing plants for environmental cleanup.» *Trends in plant science Research News*. 5: 235-236.
- Qiu J., Baí Y., Fu Y. B. y Wilmschurst J. F. 2010. Spatial variation in temperature thresholds during seed germination of remnant *Festuca hallii* populations across the Canadian prairie. *Environmental and Experimental Botany*. 67: 479-486.
- Ralphs M. H., Cook D., Gardner D. R. y Grum D. S. 2011. Transmission of the locoweed endophyte to the next generation of plants. *Fungal Ecology*. 4: 251-255.
- Reichenauer T. G. y Germida J. J. 2008. Phytoremediation of organic contaminants in soil and groundwater. *ChemSusChem*. 1: 708-717.
- Rezek J., Wiesche C., Mackova M., Zadrazil F. y Macek T. 2008. The effect of ryegrass (*Lolium perenne*) on decrease of PAH content in long term contaminated soil. *Chemosphere*. 70: 1603-1608.
- Reynoso-Cuevas L., Gallegos-Martínez M. E., Cruz-Sosa F. y Gutiérrez-Rojas M. 2008. *In vitro* evaluation of germination and growth of five plant species on medium supplemented with hydrocarbons associated with contaminated soil. *Bioresource Technology*. 99:6379-6385.
- Roca M., James C., Pruzinská A., Hörtensteiner S., Thomas H. y Ougham H. 2004. Analysis of the chlorophylls catabolism pathway in leaves of an introgression senescence mutant of *Lolium temulentum*. *Phytochemistry*. 65: 1231-1238.
- Rodríguez R. J., Redman R. S. y Henson J. M. 2004. The role of fungal symbioses in the adaptation of plants to high stress environments. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*. 9: 261-272.
- Saikkonen K., Lehtonen P., Helander M., Koricheva J. y Faeth S. H. 2006. Model systems in ecology: dissecting the endophyte-grass literature. *Trends in Plant Science*. 9: 428-433.
- Sánchez S. M., Bills G. F, Herrero N. y Zabalgogezcoa Í. 2012. Non-systemic fungal endophytes of grasses. *Fungal Ecology*. 5: 289-297.
- Schwab A. P., Al-Assi A. A. y Banks M. K. 1998. Adsorption of naphthalene onto plant roots. *Journal of Environmental Quality*. 27: 220-224.

- Sheng X., Chen X. y He L. 2008 Characteristics of an endophytic pyrene-degrading bacterium of *Enterobacter* sp. 12JI from *Allium macrostemon* Bunge. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 62: 88-95.
- Singh O. V. y Jain R. K. 2003 Phytoremediation of toxic aromatic pollutants from soil. *Applied and Microbiology Biotechnology*. 63: 128-135.
- Smith M. J., Flowers T. H., Duncan H. J. y Alder J. 2006. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on germination and subsequent growth of grasses and legumes in freshly contaminated soil and soil with aged PAHs residues. *Environmental Pollution*. 141: 519-525.
- Soleimani M., Afyuni M., Hajabbasi M. A., Nourbakhsh F., Sabzalian M. R. y Christensen J. H. 2010. Phytoremediation of an aged petroleum contaminated soil using endophyte infected and non-infected grasses. *Chemosphere*. 81: 1084-1090.
- Su Y., Yang X. y Chiou C. T. 2008. Effect of rhizosphere on soil microbial community and in-situ pyrene biodegradation. *Environmental Science Engineering*. 2: 468-474.
- Tao S., Cui Y. H., Xu. F. L., Li B. G., Cao J., Lui W. X., Schmitt G., Wang X. J., Shen W. R., Qing B. P. y Sun R. 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in agricultural soil and vegetables from Tianjin. *The Science of Total Environment*. 320: 11-24.
- Torkian A., Dehghanzadeh R. y Hakimjavadi M. 2003. Biodegradation of aromatic hydrocarbons in compost biofilter. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 78: 795-801.
- Torre-Roche R. J., Lee W. Y. y Campos-Díaz S. I. 2009. Soil-Borne polycyclic aromatic hydrocarbons in El Paso, Texas: Analysis of a potential problem in the United States/Mexico border region. *Journal of Hazardous Materials*. 163: 946-958.
- Villalobos-Pietrini R., Amador-Muñoz O. Waliszewski S., Hernández-Mena L., Munive-Colín Z., Gómez-Arroyo S., Bravo-Cabrera L. y Frías-Villegas A. 2006. *Atmospheric Environment*. 40: 5845-5857.

- Wang G., Zhou Y., Wang X., Huang L. y Deng N. 2010. Simultaneous removal of phenanthrene and lead from artificially contaminated soils with gloycine- β -cyclodextrin. *Journal of Hazardous Materials*. 184: 690-695.
- Westover K., Kennedy A. y Kellys S. 1997. Patterns of rizosphere microbial community structure associated with co-occurring plants species. *Journal of Ecology*. 85: 863-873.
- Yang F., Li J., Gan X., Qian Y., Wu Xi. y Yang Q. 2010. Assessing nutritional status of *Festuca arundinacea* by monitoring photosynthetic pigments from hyperspectral data. *Computers and Electronics in Agriculture*. 70: 52-59.
- Zhang Y. P. y Nan Z. B. 2007. Growth and anti-oxidative system change in *Elymus dahuricus* is affected by *Neotyphodium* endophyte under contrasting availability. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 193: 377-386.
- Zhan X. H., Ma H. L., Zhou L. X., Liang J. R., Jiang T. H. y Xu G. H. 2010. Accumulation of phenanthrene by roots of intact wheat (*Triticum acstivnm* L.) seedlings: passive or active uptake? *BMC Plant Biology*. 10: 1-8.

APENDICE I

Una parte importante de este trabajo fue conocer las características las semillas comerciales disponibles en la Central de Abastos. A continuación se detalla el protocolo, desarrollado en el laboratorio, para orientar la la selección de semillas. El protocolo incluye, pesado, ensayos de viabilidad y detección de microorganismos asociados a las semillas (seed-borne).

Protocolo de selección de semillas de *F. arundinacea*

Pesado de semillas de *F. arundinacea*

Para determinar el peso de un número aproximado de semillas se tomaron 25 muestras de 200 semillas cada una, se pesaron individualmente y se calculó el contenido de semillas por kilogramo con la siguiente ecuación:

$$\text{No de } \frac{\text{semillas}}{\text{kg}} = (\text{No. de semillas por muestra}) \left(\frac{1000\text{g}}{\text{kg}} \text{Peso promedio de la muestra} \right)$$

El resultado fue que el peso de 1000 semillas es de 2.369 ± 0.003 g, por lo que la especie tiene aproximadamente 421,998 semillas/kg.

Pre-selección de viabilidad de semillas de *F. arundinacea*

La pre-selección de viabilidad por flotación se realizó en un vaso de precipitados con 70 mL de agua destilada durante 10 minutos a temperatura ambiente, se analizaron cuatro réplicas de 1000 semillas cada una, donde se consideraron viables aquellas semillas que sedimentaron y posteriormente se contaron.

$$V = \left(\frac{SV}{T} \right) \times 100$$

Donde: V= semillas viables; SV= semillas que sedimentan; T= semillas totales

Se observó que de 1000 semillas, el 276 ± 37 sedimentaron, por lo que se consideran viables, el resto flotó considerándose como no viables. En teoría, las semillas flotan en agua porque no han desarrollado convenientemente el embrión y el endospermo, sin embargo, algunas semillas flotantes llegan a germinar, esto es porque se crea una cámara de aire entre el endocarpio y la semilla que provoca la flotación (Bewley, 1997).

En monocotiledóneas, por ejemplo, es debido a la gran cantidad de tricomas en las semillas.

Crecimiento de microorganismos durante la germinación de semillas de *F. arundinacea*

Se colocaron cuatro semillas, previamente desinfestadas, por cada tubo de cultivo que contenía 30 mL de medio MS estéril. Los tubos con las semillas se incubaron en una cámara de crecimiento a 25 °C con fotoperiodos de 16 h. La infestación por microorganismos en semillas de *F. arundinacea* fue definida como positiva al observar en el medio MS el crecimiento de microorganismos durante la germinación.

En la Figura A1 se muestra la distribución de plántulas en las que se observó el crecimiento de microorganismos durante la germinación de las semillas. La línea con rombos corresponde a la infestación por microorganismos como hongos y bacterias en general (infestación total) que, para el día 10, corresponde al 10% de las semillas germinadas. La línea con cuadros presenta el crecimiento de un hongo que tiene similitudes macroscópicas con el hongo *Lewia* sp. Este hongo crece entre los días 4 y 6 y corresponde al 2 % de las semillas germinadas.

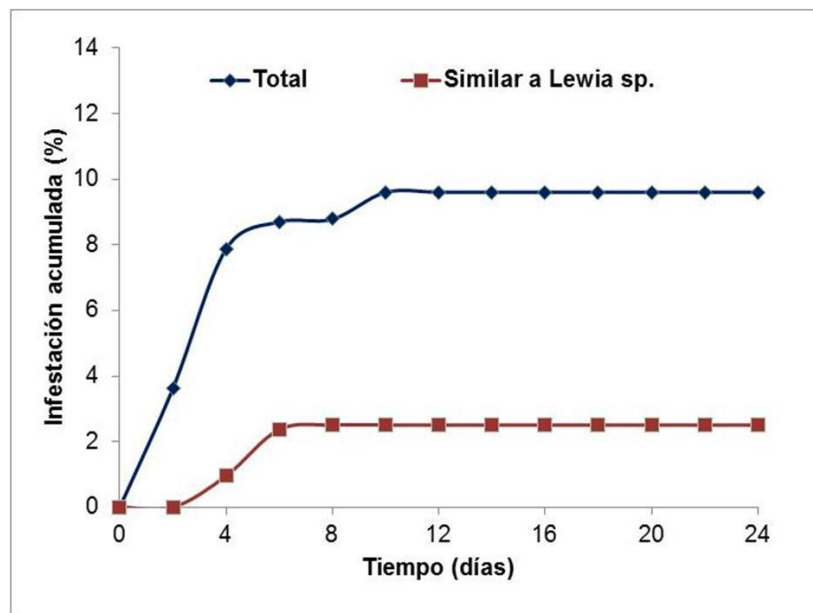


Figura A1. Variación de infestación en semillas de *F. arundinacea* germinadas.

PARTICIPACIONES



Colegio de Postgraduados
Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas
Campus Montecillo

otorga la presente

Constancia

Caliope Mendarte Alquisira

Por su participación
como **ASISTENTE**
al Curso sobre:
"Extracción de DNA"

Organizado por el Laboratorio de
Biotecnología de Semillas y la Línea
Prioritaria de Investigación 5:
Biotecnología Microbiana, Vegetal y
Animal, del 18 al 19 de abril, con una
duración de 14 horas

Montecillo, Estado de México a 19 de abril de 2011


Dr. J. Jesús Vargas Hernández
Director del Campus Montecillo
Colegio de Postgraduados



Colegio de Postgraduados
Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas
Campus Montecillo

otorga la presente

Constancia

Callope Mendarte Alquisira

Por su participación como
ASISTENTE al Curso sobre:
"Amplificación de genes mediante
la reacción en cadena de la
Polimerasa (PCR)"

Organizado por el Laboratorio de
Biotecnología de Semillas y la Línea
Prioritaria de Investigación 5:
Biotecnología Microbiana, Vegetal y
Animal, del 19 al 20 de abril, con una
duración de 14 horas.

Montecillo, Estado de México a 19 de abril de 2011.


Dr. J. Jesús Vargas Hernández
Decano del Campus Montecillo
Colegio de Postgraduados



Colegio de Postgraduados
Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas
Campus Montecillo

otorga la presente

Constancia

Caliope Mendarte Alquisira

Por su participación
como **ASISTENTE**
al Curso sobre:
"Clonación de productos
de PCR"

Organizado por el Laboratorio de
Biotecnología de Semillas y la Línea
Prioritaria de Investigación 5
Biotecnología Microbiana, Vegetal y
Animal, del 4 al 6 de mayo, con una
duración de 28 horas.

Montecillo, Estado de México a 6 de mayo de 2011.

Dr. J. Jesús Vargas Hernández
Director del Campus Montecillo
Colegio de Postgraduados



Colegio de Postgraduados

Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas

Campus Montecillo

otorga la presente

Constancia

• Calixpe Mendente Alquisivia

Por su participación como **ASISTENTE** al Curso sobre: "Secuenciación de productos de **PCR**", organizado por el Laboratorio de Biotecnología de Semillas y la Línea Prioritaria de Investigación 5: Biotecnología Microbiana, Vegetal y Animal del 8 al 9 de junio con una duración de 18 horas.

Montecillo, Estado de México a 8 de junio de 2011

Dr. J. Jesús Vargas Hernández

[Firma]
Director del Campus Montecillo
Colegio de Postgraduados

XVII
SIMPOSIO
DEPARTAMENTO
DE CIENCIAS
DE LA SALUD

LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Y
EL GOBIERNO DE CIENCIAS DE LA SALUD



Otorgan la Presente:

CONSTANCIA

a: Caliope Mendarte Alquisira, Mariano Gutiérrez Rojas, David M. Díaz
Pontones.

Por su participación con el trabajo:

RELACIÓN ENDOFÍTICA ENTRE *Festuca arundinacea*-*Lewia* sp. EN
CULTIVOS *in vitro*.

en el XVII Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud,

17-19 de septiembre, 2012


.....
Dr. Edmundo Borillo J.
Jefe del Departamento


.....
Dra. Lucina Rodríguez C.
Coordinadora del XVII simposio


.....
Dr. Fernando Díaz de León B.
Coordinador del XVII simposio

