



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Efecto de la interacción hongo- *Dodonaea viscosa* L. Jacq en la fitorremediación de plomo en un sistema *in vitro*

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Biól. César Cuahutémoc Rojas Loria

DIRECTORA:

Dra. Tania Volke Sepúlveda

MÉXICO, D.F.

ENERO 2010

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Posgrado (PNPC) del CONACYT y además cuenta con el apoyo del mismo consejo, con el No. De Registro 001465”

México D.F. a 25 de Enero del 2010.

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

**Efecto de la interacción hongo- *Dodonaea viscosa* L. Jacq. en la
fitorremediación de plomo en un sistema *in vitro***

Que presentó
Biól. César Cuahutémoc Rojas Loria

Comité Tutorial:

Directora: Dra. Tania Lorena Volke Sepúlveda

Asesora: Dra. Leticia Buendía González

Asesora: Dra. María del Rosario Peralta Pérez

Jurado:

Presidenta: Dra. Araceli Tomasini Campocosio

Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

Secretaria: Dra. Mayola García Rivero

Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec

Vocal: Dra. Leticia Buendía González

Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

Vocal: Dra. María del Rosario Peralta Pérez

Universidad Autónoma de Chihuahua

DEDICATORIA

A mis padres:

Miriam y Elpidio, por ser el mejor ejemplo de esfuerzo para mí
y por su infinito apoyo y cariño en todo momento.

A mis hermanos:

Paola, Lorena e Israel por todo su cariño, apoyo y consejos que los hace
más que mis hermanos, mis compañeros de vida.

A la familia Cruz Rojas:

Lorena y Julio por su invaluable cariño, en especial a mi sobrino preferido: Emiliano, por
ser esa personita tan especial que siempre le brinda alegría a la familia.

A toda mi Familia:

A mis tíos y tías, en especial a la Familia Cuellar Loria por su gran apoyo,
consejos y ánimos.

A mis amigos:

Gonzalo, Víctor, Mariel, Marianela, Carlos, Marco, Roberto y Daniel por su paciencia y
apoyo en todo momento y brindarme una sonrisa aún en momentos difíciles.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero durante la realización de este trabajo, a través de la beca otorgada.

A la Dra. Tania Volke Sepúlveda por su infinita paciencia, esfuerzo y apoyo incondicional que hizo posible la culminación de este trabajo.

A la Dra. María del Rosario Peralta Pérez y la Dra. Leticia Buendía González por su invaluable dedicación y apoyo durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Araceli Tomasini Campocosio y la Dra. Mayola García Rivero por sus valiosos comentarios en la revisión de esta Tesis.

Al Dr. Mariano Gutiérrez Rojas, por su apoyo y sus sabios consejos.

A la Dra. María Flores Cruz por ser una excelente profesora y un maravilloso ser humano que me apoyó en todo momento.

Al Dr. Ernesto Favela Torres y la M. en C. Gloria Trejo Aguilar por su apoyo y orientación en la utilización de los equipos de laboratorio.

A la Lic. Violeta Luna Caballero por las facilidades otorgadas en la realización de los trámites de la maestría.

Finalmente a la que se ha convertido ya en mi segunda familia. A mis amigos y compañeros del Laboratorio Residuos Sólidos: Olivia, Marianela, Asmaveth, Areli, Daniel, Cinthya, Miriam, Nancy, Amalia, Liliana, Pedro, Manuel, Bety, Guille, Ady y Víctor.

“No amo menos al hombre pero si más a la naturaleza”

Lord Byron

ÍNDICE

RESUMEN.....	i
ABSTRACT	ii
INTRODUCCIÓN.....	1
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
1.1. Los metales pesados como contaminantes ambientales	5
1.2. Contaminación de suelos por metales pesados	5
1.3. Remediación de suelos por métodos biológicos.....	11
1.4. Fitorremediación de suelos contaminados con metales	12
1.5. Interacciones planta-microorganismos en la rizósfera	16
1.6. Uso de microorganismos en la fitorremediación	23
1.6.1. Efecto de bacterias y hongos micorrícicos sobre el crecimiento vegetal	23
1.6.2. Efecto de hongos no micorrícicos en la acumulación de metales	25
2. JUSTIFICACIÓN	27
3. HIPÓTESIS	28
4. OBJETIVOS	29
4.1. Objetivo general	29
4.2. Objetivos particulares.....	29
5. MÉTODOS Y MATERIALES.....	30
5.1. Estrategia experimental.....	30
5.2. Material biológico.....	30
5.3. Tratamiento y germinación de semillas de <i>D. viscosa</i>	32
5.4. Selección de cepas fúngicas	33
5.5. Efecto de la fuente y concentración de plomo sobre la acumulación y el crecimiento de la cepa seleccionada	36
5.6. Fitorremediación de un suelo modelo contaminado con plomo	37
5.7. Métodos analíticos	38
5.8. Análisis estadístico.....	40
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
6.1. Selección de cepas	41
6.2. Crecimiento y biosorción de plomo por <i>Lewia sp.</i> en medio líquido.....	49
6.3. Estudios de fitorremediación de plomo en un suelo modelo	55
7. CONCLUSIONES.....	64
8. RECOMENDACIONES	65
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
10. CONSTANCIAS Y CURSOS.....	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del medio Murashige & Skoog (MS) utilizado para la germinación de <i>D. viscosa</i> y para los experimentos con plomo	33
Tabla 2. Concentración de inóculo inicial empleado en los medios de cultivo líquido.	35
Tabla 3. Composición del medio MS Murashige & Skoog modificado	36
Tabla 4. Tratamientos aplicados durante las pruebas de fitorremediación de plomo en un suelo modelo con <i>D. viscosa</i>	38
Tabla 5. Capacidad de acumulación de plomo por las cepas en estudio	45
Tabla 6. Efecto de la inoculación de <i>B. theobromae</i> , <i>T. harzianum</i> , <i>Fusarium 1</i> y <i>Lewia sp.</i> sobre la producción de biomasa (peso seco [PS]) y la elongación de tallos y raíces de <i>D. viscosa</i> después de 30 días de contacto en medio MS sólido	47
Tabla 7. Fracción soluble de plomo en la agrolita antes y después del crecimiento de <i>Lewia sp.</i> durante 35 días	57
Tabla 8. Efecto de la asociación de <i>D. viscosa</i> y <i>Lewia sp.</i> sobre el crecimiento de la planta en un suelo modelo (agrolita) con 250 mg Pb/l en forma soluble ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) e insoluble (PbS) después de 35 días de incubación	58
Tabla 9. Índice de Tolerancia y densidad aparente (r) de raíces de <i>D. viscosa</i> en presencia o ausencia de <i>Lewia sp.</i> con y sin 250 mg/l de plomo soluble e insoluble.	59
Tabla 10. Factor de translocación (FT) y factor de bioconcentración (FBC) de plomo para plantas de <i>D. viscosa</i> y <i>D. viscosa</i> en asociación con <i>Lewia sp.</i> crecidas durante 35 días en agrolita con 250 mg Pb/l de forma soluble ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) e insoluble (PbS).	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efecto del pH del suelo en la disolución del plomo	9
Figura 2. Mecanismo de fijación de plomo en la fase sólida del suelo (arcilla)	10
Figura 3. Fijación de cationes en partículas de materia orgánica en el suelo	11
Figura 4. Mecanismos de fitorremediación aplicables a metales pesados	13
Figura 5. Vista microscópica de la raíz de una planta y la zona que conforma la rizósfera	17
Figura 6. Estructura hipotética del complejo formado entre la quitina y el cadmio. La molécula de oxígeno del grupo hidroxilo y N-acetil-glucosamina participan en la formación del complejo	21
Figura 7. Estrategia experimental por etapas	30
Figura 8. Semillas y tallos con flores y frutos de <i>Dodonaea viscosa</i>	32
Figura 9. Diferencias en la producción de biomasa (mg/ml medio) de las cepas fúngicas estudiadas, por efecto del plomo en medio MS sólido. MS: medio MS; MS + Pb: medio con 100 mg Pb/l.	41
Figura 10. Diferencias en la producción de biomasa (mg/ml medio) de las cepas estudiadas, por efecto del plomo en medio MS líquido. MS: medio MS; MS + Pb: medio con 100 mg Pb/l	42
Figura 11. Acumulación de Pb por cepas de hongos filamentosos crecidas durante 7 (<i>B. theo</i> y <i>T. harz</i>) y 14 días (F1, F2, F3 y <i>Lewia</i> sp.) en medio MS sólido y líquido con 100 mg Pb/l	45
Figura 12. Crecimiento de plantas de <i>D. viscosa</i> inoculadas con <i>B. theobromae</i> , <i>T. harzianum</i> , <i>Fusarium</i> 1 y <i>Lewia</i> sp. después de 30 días de incubación	46
Figura 13. Corte transversal (izquierda) y longitudinal (derecha) de raíz de <i>D. viscosa</i> inoculada con la cepa <i>Lewia</i> sp. después de 30 días de contacto	48
Figura 14. Efecto de la fuente y la concentración de Pb sobre la biomasa (peso seco) de <i>Lewia</i> sp. Medio MS líquido con y sin plomo (100, 250 y 500 mg Pb/l) en forma soluble ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) e insoluble (PbS)	49
Figura 15. Efecto de la fuente y la concentración de Pb sobre el pH del medio MS líquido, después de 10 días de incubación con <i>Lewia</i> sp	51
Figura 16. Acumulación de plomo en biomasa de <i>Lewia</i> sp. en función de la concentración inicial y de la fuente de Pb: soluble ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) e insoluble (PbS)	53
Figura 17. Adsorción de plomo insoluble (PbS) en biomasa de <i>Lewia</i> sp	54
Figura 18. Biosorción de plomo en biomasa muerta de <i>Lewia</i> sp. en función del tiempo de contacto del hongo con el metal y de la fuente de Pb: soluble ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) e insoluble (PbS)	55
Figura 19. Producción de biomasa de <i>Lewia</i> sp. creciendo en un suelo modelo con medio MS en ausencia (control) y presencia de 250 mg Pb/l en forma soluble ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) e insoluble (PbS)	56
Figura 20. Acumulación de plomo en tallos (a) y raíces (b) de <i>D. viscosa</i> crecida sola (P) o en asociación con <i>Lewia</i> sp. (P+H) en un suelo modelo con medio MS con 250 mg Pb/l soluble ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) o insoluble (PbS)	59
Figura 21. Balance del plomo total inicial (250 mg/kg) en el suelo modelo después de 35 días de crecimiento de <i>D. viscosa</i> (P) o <i>D. viscosa-Lewia</i> sp. (P+H)	61

RESUMEN

El crecimiento inmoderado de la industria y de la población en general ha traído consigo graves problemas de contaminación. Sin duda, uno de los problemas que afecta en mayor grado al planeta en el presente es la contaminación de los suelos por metales pesados. Este problema ha captado el interés de muchos grupos de investigación que se han enfocado hacia el desarrollo de nuevas tecnologías de remediación, dentro de las cuales destaca la fitorremediación por ser una de las pocas alternativas para el tratamiento de contaminantes inorgánicos como los metales pesados, además de ser económica y ambientalmente amigable. Sin embargo, en general, la fitorremediación se ha enfocado hacia el estudio de la capacidad de las plantas, de manera aislada, para eliminar metales del suelo, sin considerar el papel que desempeñan los microorganismos de la rizósfera de estas plantas. Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la interacción entre *D. viscosa* y un hongo filamentoso sobre la capacidad de la planta para acumular plomo. Para cumplir con este objetivo, se procedió a seleccionar una cepa fúngica con base en su capacidad para tolerar y acumular plomo, así como para interactuar con *D. viscosa*, una planta fitorremediadora de plomo. Se probaron seis cepas fúngicas, encontrando que al cabo de 30 días de cultivo, una cepa del género *Lewia*, favoreció de manera cualitativa y cuantitativa el crecimiento de *D. viscosa*, por lo que se seleccionó para los ensayos de fitorremediación. Durante una segunda etapa, se probó la capacidad de esta cepa para tolerar y acumular Pb a partir de diferentes concentraciones iniciales de una sal soluble ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) y una insoluble (PbS), encontrando una disminución (hasta 39%) y un aumento (hasta 16%) en el peso de la biomasa del hongo, respectivamente, al aumentar la concentración inicial del metal. La capacidad para acumular plomo por esta cepa es sobresaliente, ya que se alcanzaron valores mayores a 100 mg Pb/g (peso seco, PS) para concentraciones de 500 mg Pb/l, independientemente de la solubilidad de la fuente de Pb. En general, *D. viscosa* acumuló más plomo a nivel de raíz, encontrando ~5 veces más metal que en los brotes, lo que indica que la planta es una especie con potencial para fitoestabilizar plomo. Este estudio resalta la importancia que tienen este tipo de interacciones en la fitorremediación ya que la planta acumuló ~3 veces más plomo que sin el hongo, alcanzando concentraciones mayores a 5000 μg Pb/g raíz (PS) en presencia de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$.

Palabras clave: fitorremediación, hongos filamentosos, metales pesados, plomo.

ABSTRACT

The immoderate growth of the industry and population in general has brought with it serious problems of pollution. Undoubtedly, one of the problems that affects in major degree to the planet in the present is the pollution of the soils by heavy metals. This problem has caught the interest of many groups of researchers that has been focused towards the development of new technologies of remediation, inside which the phytoremediation stands out for being one of few alternatives for the treatment of inorganic pollutants as the heavy metals, beside being economic and environmentally friendship. Nevertheless, most of phytoremediation research has focused towards the study of the capacity of the plants, of an isolated way, to eliminate metals of soil, without considering the role that plays the microorganisms of the rhizosphere of these plants. With base in the previous thing, the aim of this work was to study the effect of the interaction between *D. viscosa* and a filamentous fungi on the capacity of the plant to accumulate lead. To achieve this, proceeded to select a fungic strain with base in his aptitude to tolerate and accumulate lead, as well as to interact with *D. viscosa*, a plant with the ability to acumulate lead. Six fungic strains were proved, finding that after 30 days of culture, the fungic strain of the genus *Lewia*, favored the growth of *D. viscosa* in a qualitative and quantitative way, by what it was selected for later essays of phytoremediaton. During a second stage, there was proved the capacity of this fungi to tolerate and accumulate lead from different initial concentrations of a soluble ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) and insoluble (PbS) salt, finding a decrease (up to 39 %) and an increase (up to 16 %) in the weight of the biomass of the fungi, respectively, on having increased the initial concentration of the metal. It was outstanding the ability of this fungi to accumulate lead, since there reached bigger values of lead than 100 mg Pb/g (dry weight, PS) for concentrations of 500 mg Pb/l, independently of the solubility of Pb's source. In general, *D. viscosa* accumulate more lead into roots, finding ~5 times more metal that in the stems, which indicates that *D. viscosa* is a plant with potential for phytostabilize lead. Does this study highlight the importance of this type of interactions in phytoremediation since the plant accumulated ~3 times more lead when it was inoculated with the fungi, reaching bigger concentrations than 5000 μg Pb/g of root (PS) in lead ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) presence.

Key words: phytoremediation, filamentous fungi, heavy metals, lead.

INTRODUCCIÓN

Desde hace algunos años, la contaminación por metales pesados se ha convertido en un problema ambiental importante en nuestro país. Si bien esta ocurre de forma natural (producto de la actividad volcánica), la mayor parte de la contaminación por metales pesados que afecta a la población general ha sido generada por el hombre (a través del empleo de prácticas agrícolas inadecuadas, los procesos industriales, y la explotación minera, etc.). En México una de las principales actividades que genera este tipo de contaminación es la minería, la cual es una actividad económica presente en el proceso histórico de México.

Los datos existentes sobre esta actividad en el país se remontan a la época prehispánica, y es hasta el periodo colonial cuando adquiere gran relevancia tanto económica como social (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005). Actualmente nuestro país ocupa el tercer lugar a nivel mundial en la producción de plata (Ag), el quinto en plomo (Pb) y el sexto en molibdeno (Mo) y zinc (Zn) (INEGI, 2005). La extracción de minerales a partir del suelo requiere de procesos que permitan la separación del mineral de interés de los elementos sin valor (mejor conocidos como jales mineros). Dicha separación se puede llevar a cabo a través de procesos pirometalúrgicos que permiten la obtención de los metales a partir de minerales o de sus concentrados por medio de la aplicación de calor, como la calcinación, tostación, fusión, volatilización y metalotermia; ó bien, por procesos hidrometalúrgicos por el uso de soluciones acuosas y orgánicas como la lixiviación, concentración y precipitación (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005).

Una consecuencia del empleo de estos procesos durante varios siglos de actividad minera en nuestro país, ha sido la producción una gran cantidad de residuos mineros. De acuerdo con Cortinas de Nava (1998), un mineral típico puede contener alrededor de 6% de zinc y 3% de plomo, que al ser concentrados generan alrededor de 850 kg de residuos sólidos y una cantidad equivalente de agua conteniendo cerca de un kilogramo de sustancias químicas residuales por cada tonelada de mineral procesado. Durante el 2006, se produjeron en el mundo 3.3 millones de toneladas de concentrados de plomo producto de las operaciones mineras, de los cuales el 4.2 % fueron producidas en nuestro país, ubicándolo así el 5º lugar entre los países que mayor contaminación genera por este concepto (USGS, 2006). Cabe mencionar que en ninguno de los procesos citados se logra una recuperación total del mineral de interés por lo quedan residuos de éste que podrían ser recuperados posteriormente; sin embargo una práctica común empleada por

muchas empresas mineras durante muchos años fue descartar estos residuos a través de su disposición en ríos o en grandes pilas depositadas en los suelos a cielo abierto, generando así problemas de contaminación de cuerpos de agua y grandes extensiones de suelos que ahora deben remediarse (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005). Entre los elementos más frecuentes que conforman los residuos mineros se encuentran el Pb, Cd, Hg, As y Se y otros, los cuales son potencialmente tóxicos para los organismos, además de que pueden producir graves daños a los ecosistemas (González-Chávez, 2005).

Una alternativa biológica ambientalmente amigable para la remediación y tratamiento de suelos contaminados con metales es la fitorremediación (EPA, 2000), una tecnología que implica el uso de plantas y los microorganismos de su rizósfera para remover, contener y/o estabilizar contaminantes presentes en suelos, agua y aire (Chaney *et al.*, 1997). Esta tecnología es una de las pocas que puede aplicarse para la remediación de sitios contaminados con metales. Al respecto existen diversos estudios que reportan especies de plantas capaces de tolerar la presencia de metales tóxicos y que pueden remediar un suelo a través de la acumulación de estos contaminantes en sus tejidos aéreos (fitoextracción) o bien, en sus raíces (fitoestabilización), favoreciendo así la eliminación o estabilización de metales del suelo (Adriano, 1986; Kramer, 2005).

Durante mucho tiempo, la mayoría de los estudios sobre fitorremediación de suelos se enfocó hacia la capacidad de las plantas para acumular estos metales pesados de forma individual; sin embargo, durante los últimos años ha habido un interés creciente por estudiar el papel que desempeñan los organismos asociados a las raíces estas plantas. En este sentido, se sabe que en la rizósfera existen grupos de microorganismos, como bacterias y hongos micorrícicos, que se asocian con las raíces de las plantas y que esta asociación produce beneficios para ambos organismos, además de favorecer la tolerancia y acumulación de elementos tóxicos que se encuentran en el suelo. No obstante, poco se ha estudiado sobre el papel que desempeñan los hongos no micorrícicos al respecto, los cuales son componentes importantes de la rizósfera y podrían desempeñar una función importante durante la fitorremediación de suelos (Frachia *et al.*, 2000; Zafar *et al.*, 2007). El estudio de este tipo de asociaciones y, particularmente, del efecto de la asociación hongo-planta sobre la fitorremediación de suelos contaminados por metales pesados resulta importante ya que representa una herramienta que puede aplicarse para mejorar los mecanismos que permiten la acumulación de estos elementos en los tallos y/o raíces de las plantas (Sudová *et al.*, 2007).

Con base en lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la interacción entre un hongo no micorrízico y una planta potencialmente fitorremediadora (*Dodonaea viscosa*) sobre la tolerancia, acumulación y estabilización de plomo en un sistema *in vitro*.

El primer capítulo de este trabajo comprende una revisión bibliográfica que incluye una breve descripción del problema de la contaminación de los suelos por metales pesados y el uso de la fitorremediación como alternativa para recuperar este tipo de suelos. Se revisan los principales mecanismos de fitorremediación aplicables a suelos con metales tóxicos, así como el papel que desempeñan los microorganismos en la fitorremediación y los principales procesos involucrados en la tolerancia y acumulación de metales pesados por dichos organismos. En los capítulos dos, tres y cuatro se plantea el problema que justifica este trabajo, la hipótesis a demostrar y los objetivos a cumplir. En el capítulo cinco se presenta la estrategia general de trabajo y se explican con detalle los métodos y materiales utilizados, los cuales abarcan: (i) pruebas de tolerancia a Pb por diferentes cepas fúngicas; (ii) pruebas de interacción entre las cepas y *D. viscosa*; (iii) determinación del efecto de diferentes fuentes y concentraciones de plomo sobre la tolerancia y acumulación por una cepa fúngica seleccionada; y (iv) efecto de la interacción entre esta cepa y *D. viscosa* en la fitorremediación de plomo en un suelo modelo. También se describen los principales métodos analíticos empleados para la medición de las variables de respuesta evaluadas.

Los resultados y discusión del trabajo se presentan en el capítulo seis. Se presentan y discuten los resultados obtenidos en la primera etapa de este trabajo, en la cual, se probó el efecto de una fuente de plomo soluble ($\text{PbNO}_3)_2$ sobre el crecimiento y acumulación del metal por diferentes cepas fúngicas, así como el efecto de estos hongos sobre el crecimiento de *D. viscosa* en ausencia de plomo. Los resultados de ambas pruebas se utilizaron como criterio para la selección de una cepa fúngica para los estudios de fitorremediación. Posteriormente se presentan los resultados de la segunda etapa, en la que se probó el efecto de diferentes concentraciones de plomo soluble ($\text{PbNO}_3)_2$ e insoluble (PbS) sobre el crecimiento y acumulación de plomo por la cepa seleccionada. Finalmente se muestran los resultados de las pruebas de fitorremediación de plomo, en donde se evaluó la tolerancia y capacidad de acumulación de plomo (en forma soluble e insoluble) por la planta, el hongo y la asociación planta-hongo en un suelo modelo. En los

últimos dos capítulos del presente documento, se presentan las conclusiones y algunas recomendaciones que surgen de este trabajo para la realización de estudios posteriores.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Los metales pesados como contaminantes ambientales

Los metales pesados constituyen el principal grupo de contaminantes inorgánicos de importancia a nivel mundial debido a la alta toxicidad potencial que estos representan y su larga persistencia en el medio. Debido a que algunos cationes metálicos presentan semejanza estructural con aquellos que cumplen funciones fisiológicas importantes en las células, la presencia de metales pesados, implica un peligro para el funcionamiento correcto de los sistemas biológicos. Elementos como el Hg, As, Sn, Tl y Pb pueden formar iones órgano-metálicos liposolubles capaces de penetrar membranas y acumularse en las células y, aunque no tienen importancia biológica significativa como elementos traza, si se consideran tóxicos para organismos superiores (Nies, 1999).

Los metales pesados pueden provocar diferentes efectos y síntomas sobre la salud humana. La exposición a metales como el zinc (Zn) aún en bajas concentraciones puede provocar problemas de rigidez muscular, pérdida de apetito y náuseas. El cromo (Cr) puede provocar cáncer en el tracto digestivo y pulmones, mientras que el manganeso (Mn) conduce a problemas de neurotoxicidad, disminuye los niveles de hemoglobina y se acumula en el tracto gastrointestinal. El cobre (Cu), que es un elemento con funciones fisiológicas, en niveles altos puede ocasionar graves problemas toxicológicos debido a su acumulación en el cerebro, piel, hígado, páncreas y en el miocardio, además de dolor intestinal, daños en los riñones y anemia. Un caso particular es el plomo (Pb), citado como uno de los metales pesados con mayor toxicidad, ya que tiene impactos a la salud a largo plazo, éste puede causar anemia, encefalopatía, hepatitis y síndrome nefrítico. Otro metal importante por su toxicidad es el cadmio (Cd), debido a que puede provocar cáncer, daños en el hígado, destrucción de la membrana mucosa, vómitos, diarrea, degeneración ósea, además de afectar la producción de progesterona y testosterona. La presencia de níquel (Ni) puede provocar problemas serios de riñón y pulmón, dolor gastrointestinal, fibrosis pulmonar y dermatitis de piel. Asimismo, el mercurio (Hg), uno de los metales más tóxicos para los humanos, provoca la degeneración del sistema nervioso (Lesmana *et al.*, 2009).

1.2. Contaminación de suelos por metales pesados

La globalización de la industria, así como el crecimiento poblacional ha traído consigo graves repercusiones sobre el ambiente; un ejemplo de ello, es la contaminación por metales pesados generada por diversas industrias. Metales como el Pb, Zn, Cu, Cr, Cd, Hg, Mn y As, entre otros, pueden ser ingeridos directa o indirectamente tanto por animales como por seres humanos, generando un problema grave de salud a nivel mundial (Raskin

et al., 1997). La presencia de dichos elementos, puede también generar daños ambientales, como problemas de erosión en suelos y contaminación de cuerpos de agua y, en casos extremos, destruir el ecosistema (Khan *et al.*, 2000).

De manera particular la contaminación de los suelos por metales pesados, se ha convertido en un problema ambiental importante en México y a nivel mundial. Existen diferentes fuentes potenciales de contaminación por estos elementos, entre las que se encuentran aquellas cuyo origen puede ser natural (producto de la actividad volcánica) o antropogénico.

La gran mayoría de la contaminación generada por los metales pesados ha sido provocada por el hombre, a través de diversas actividades como son ciertas prácticas agrícolas (el abuso en el uso de fertilizantes y pesticidas inorgánicos), la explotación minera, el transporte, procesos industriales, etc. Las fuentes de contaminación por plomo en México son variadas entre las que se encuentran las fundidoras, las fábricas de baterías, algunas pinturas, la loza de barro vidriado cocida a baja temperatura y las gasolinas con tetraetilo de plomo (que se dejaron de usar en México en 1997) (Valdés y Cabrera, 1999).

Una de las actividades que ha generado serios problemas de contaminación por metales, es el crecimiento inmoderado de la industria minera durante los últimos dos siglos. La contaminación por metales ha sido provocada por los procesos empleados para la separación de éstos, ya que se encuentran entremezclados dentro del suelo en su estado natural (ej. oro con cobre o el plomo y el zinc) (INEGI, 2005). Otro factor que ha contribuido a la contaminación de los suelos por estos elementos es la disposición inadecuada por muchos siglos de enormes cantidades de residuos generados por esta industria. En lo que se refiere a nuestro país, México se encuentra localizado sobre una región con alta actividad volcánica rica en minerales. Actualmente 15 de las 32 entidades que conforman el territorio nacional (Baja California, Coahuila, Chihuahua, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora y Zacatecas) presentan una actividad minera importante en el país (Volke *et al.*, 2005), destacando a nivel nacional la producción de 10 minerales (oro, plata, plomo, cobre, zinc, fierro, azufre, barita y fluorita), seleccionados por su importancia económica y su contribución a la producción nacional (INEGI, 2005). La separación del mineral de los materiales sin valor, se lleva a cabo a través de dos métodos: la flotación y la

hidrometalurgia, siendo el As y el Pb, dos de los contaminantes más frecuentes en las zonas mineras del país, además del Cd en algunas de ellas (Volke *et al.*, 2005).

1.2.1. Efecto de los metales pesados en los suelos

Los metales pesados son elementos cuya abundancia puede variar dentro de los suelos. De forma general, esta abundancia suele reportarse en términos de porcentaje o en concentración (partes por millón o partes por billón) y, dependiendo de su efecto sobre los organismos, éstos pueden clasificarse en elementos esenciales y no esenciales. De esta forma, al interior de los suelos pueden encontrarse algunos metales que se consideran esenciales (Ca, Fe, Cu, Na, K, Mg, Zn, Mn y Cr), los cuales se encuentran en forma de cationes y juegan un papel importante en reacciones bioquímicas y en el metabolismo de los organismos. Sin embargo, también existen elementos como los metales pesados (Hg^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} y Ag^+), cuya función biológica se desconoce y que actúan como “venenos” metabólicos, ya que pueden intervenir en diversos procesos fisiológicos e inhibir diversos sistemas enzimáticos. En el suelo, estos metales pueden estar presentes en forma de iones libres o en compuestos metálicos solubles o insolubles. Entre los solubles, se encuentran hidróxidos de metales alcalinos y alcalinotérreos, con excepción de Ca y Ba, así como sulfatos, con excepción de los de Pb, Ba, Hg, Ca y Ag; entre los insolubles pueden existir carbonatos, óxidos e hidróxidos de diversos metales, con excepción de los de metales alcalinos y alcalinotérreos y algunos metales de transición. Estos iones metálicos tóxicos pueden formar complejos en la células, acumulándose y produciendo efectos tóxicos para cualquier función biológica (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005).

En los suelos, a corto y largo plazo, la presencia de altas concentraciones de metales pesados puede tener efectos adversos sobre los organismos, como la inhibición del crecimiento normal y desarrollo de las plantas, y la disminución de las poblaciones microbianas (Martín, 2000; Kabata-Pendias, 1995). Asimismo, estos elementos pueden modificar las propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos a través de la reducción del contenido de materia orgánica y de nutrientes; pueden además provocar variaciones en el pH, generando la acidificación de suelos. Todo esto dificulta el crecimiento y desarrollo de la cobertura vegetal que protege a los suelos de problemas como aridez, erosión y evita la dispersión de contaminantes hacia las zonas acuíferas adyacentes (Zhang *et al.*, 2000; Cabrera *et al.*, 1999).

1.2.2. Biodisponibilidad de los metales pesados

De acuerdo con Adriano (1986), sólo el 10 % de los metales tienen su origen dentro de los suelos; con base en lo anterior, se estima que más del 90 % de dichos elementos llegan a los suelos a través de deposiciones atmosféricas y como resultado de la disposición inadecuada de residuos tóxicos y algunas prácticas agronómicas. Al interior de un suelo, los metales pueden encontrarse en solución, en forma de iones del metal libre o como complejos metálicos solubles, o bien, asociados a distintas fracciones del suelo: i) adsorbidos en los sitios de intercambio de los constituyentes inorgánicos del suelo; ii) fijados en ciertos cationes de intercambio presentes la materia orgánica; iii) precipitados como óxidos, hidróxidos y carbonatos; y iv) como parte de las estructuras de minerales ricos en sílice (Lassat, 2001, Reichaman, 2002; Basta, 2004).

Los metales pesados son tóxicos sólo si se encuentran biodisponibles para ser captados por los organismos, es decir, los que se encuentran solubles y los adsorbidos en los sitios de intercambio. Se entiende por biodisponibilidad a la cantidad de un elemento que puede ser absorbido por un organismo, y ésta se relaciona con las condiciones fisicoquímicas del ambiente en que se encuentra, las cuales a su vez, pueden determinar la especiación y, por lo tanto, la concentración disponible para un organismo (Greger, 2004). Es por ello que para predecir el efecto de un metal sobre un ecosistema terrestre, además de determinar el grado de contaminación, es fundamental conocer su biodisponibilidad (Lloyd y Lovley, 2000).

Algunos factores que influyen en la biodisponibilidad y, por consiguiente, en la toxicidad de los metales pesados en un suelo, son el pH, la temperatura, potencial redox, capacidad de intercambio catiónico de la fase sólida (retención en arcillas y materia orgánica) y la competencia entre iones (Acosta, 2007; Leyval *et al.*, 1994; Schmit y Sticher, 1991). A continuación se describen algunos de los principales factores que afectan la biodisponibilidad de los metales pesados en los suelos.

pH. De acuerdo con McBride *et al.* (1997), el pH del suelo es el principal factor que afecta la biodisponibilidad de gran parte de los metales pesados, pues modifica el equilibrio entre la especiación metálica, solubilidad, adsorción e intercambio de iones en el suelo (McBride *et al.*, 1997; Kabata-Pendias, 2000; Reichman, 2002). De acuerdo con Templeton *et al.*, (2000) el término de especiación aplicado a los metales pesados es ambiguo pues por una parte se refiere a la forma específica de un elemento según su composición isotópica, estado de oxidación, y/o estructura compleja o molecular; también está íntimamente

relacionado con la distribución de un elemento a través de sus distintas fracciones que componen una muestra o una matriz. Por lo tanto, cada especie formada en un organismo vivo puede presentar características de biodisponibilidad, movilidad y toxicidad completamente diferentes a la especie original. En suelos ácidos se produce una competencia entre los iones de hidrógeno (H^+) y los cationes metálicos por los sitios de intercambio. Un bajo valor de pH produce la desorción (disolución) de los metales pesados, aumentando su concentración y biodisponibilidad en los suelos (Alloway, 1995b; Lassat, 2001). Por otra parte, un elevado valor de pH provoca que estos iones sean eliminados de la solución del suelo y queden adsorbidos en las partículas del suelo, disminuyendo así su biodisponibilidad (Basta y Tabatabai, 1992; Alloway, 1995b; Lassatt, 2001). Con excepción del Mo, Se y As, la biodisponibilidad de los metales pesados disminuye con el aumento del pH del suelo debido a su precipitación como hidróxidos insolubles, carbonatos y complejos orgánicos (Alloway, 1993; Silveira *et al.*, 2003).

Un ejemplo de lo anterior ocurre con metales como el Cu y el Pb, que tienden a estar más biodisponibles en suelos ácidos debido a que éstos presentan una menor capacidad de intercambio catiónico. En este tipo de suelos, los iones de hidrógeno (H^+) desplazan a los cationes que normalmente se encuentran unidos a partículas como las arcillas y la materia orgánica, dejando libres a los metales en la solución del suelo (Figura 1).

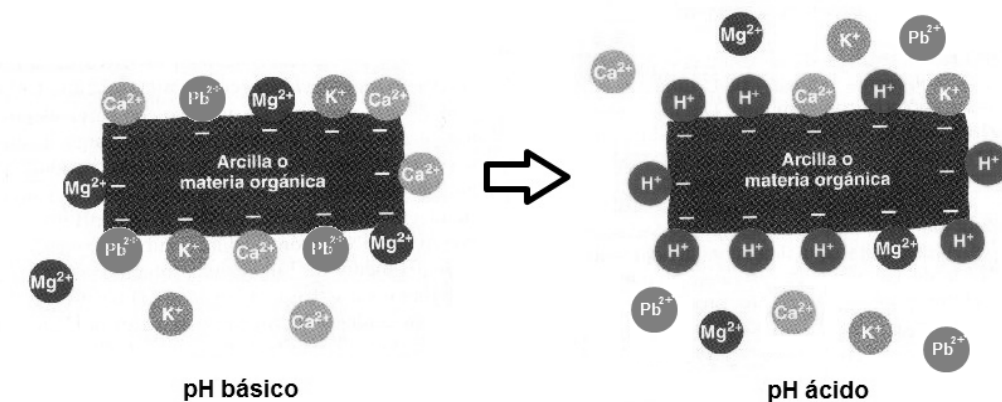


Figura 1. Efecto del pH del suelo en la disolución del plomo. Al disminuir el pH en el suelo los iones de hidrógeno desplazan a los cationes metálicos y minerales que se encuentran unidos a los sitios de intercambio de algunas partículas del suelo. (Modificado de Lomelí y Tamayo, 2004)

Textura. La textura de los suelos es otro factor que puede favorecer la infiltración de los metales pesados. Los suelos ricos en arcillas tienen mayor capacidad para acumular metales debido a que éstos son retenidos en ciertas posiciones de intercambio presentes

en estas partículas. Los suelos arenosos carecen de esta capacidad de fijación, por lo que los metales lixivian rápidamente al subsuelo, llegando a contaminar aguas subterráneas. La mayor parte de las arcillas se caracteriza por tener cargas eléctricas principalmente negativas en su superficie. Estas cargas son responsables de la capacidad de intercambio catiónico (CIC) de un suelo y constituyen un freno al movimiento de los cationes metálicos en solución, provocando que permanezcan por más tiempo en el suelo y disminuyendo su solubilidad y biodisponibilidad (Figura 2) (Kabata-Pendias, 2000).

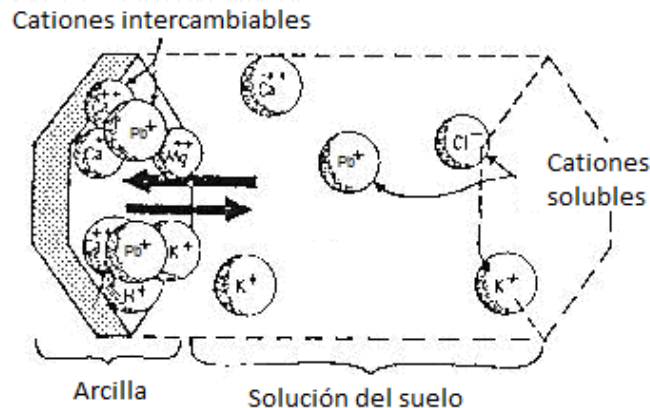


Figura 2. Mecanismo de fijación de plomo en la fase sólida del suelo (arcilla). (Modificado de Ibañez, 2007)

Contenido de materia orgánica. Junto con las arcillas, la materia orgánica presente en un suelo, puede reaccionar con ciertos metales formando complejos de intercambio (a través de agentes quelantes presentes en estas partículas), facilitando su migración a lo largo del perfil del suelo. La materia orgánica se compone de sustancias húmicas y no húmicas, siendo las primeras los compuestos más estables del suelo (ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y huminas), además de que presentan un número relativamente grande de grupos funcionales (CO_2 , OH , $C=C$, $COOH$, SH , CHO_2) que tienen una alta afinidad por los iones (Figura 3). En particular, los grupos carboxilo (COO^-) de la materia orgánica forman complejos estables con los metales, especialmente en ambientes alcalinos, donde la afinidad es mayor (González, 1993, 1995; Baker y Senft, 1995; Yin *et al.*, 1996).

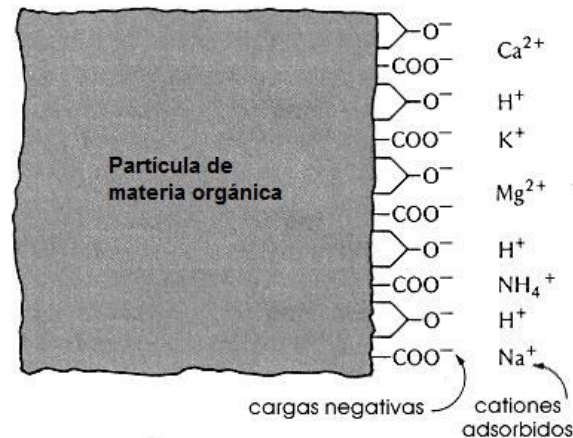


Figura 3. Fijación de cationes en partículas de materia orgánica en el suelo.
(Modificado de Ibañez, 2007)

Un ejemplo de lo anterior, es la fijación del cobre (Cu), el cual queda firmemente adherido a la materia orgánica. Por tal motivo, diversos grupos de investigación sugieren que ésta es la causa principal de la deficiencia de este elemento en plantas que crecen en suelos con un alto contenido de materia orgánica (Navarro-Blaya y Navarro-García, 2003).

1.3. Remediación de suelos por métodos biológicos

Durante muchos años la recuperación de suelos contaminados por metales pesados se realizó mediante el uso de métodos físicos o químicos tradicionales; sin embargo, la aplicación de éstos ha caído en desuso durante los últimos años debido a los altos costos que implica su aplicación en las grandes extensiones de terreno que son afectados por estos contaminantes. Por otra parte y más importante aún resulta el daño ecológico que representa el uso de estos métodos, los cuales pueden alterar las propiedades físicas químicas y biológicas de los suelos.

Actualmente el surgimiento de técnicas biológicas ha resultado una interesante alternativa a estos métodos. Los métodos biológicos, conocidos en su conjunto como biorremediación, tienen como objetivo principal el empleo de los procesos naturales para la recuperación de estos sitios con el fin de disminuir los impactos que tienen los contaminantes en el ambiente (Chaney *et al.*, 1999; Garbisu y Alkorta, 1997; Rao *et al.*, 1996). La biorremediación implica el aprovechamiento de la capacidad metabólica de organismos como plantas, hongos y bacterias, para degradar y/o transformar contaminantes orgánicos e inorgánicos.

En el caso de sitios contaminados con contaminantes inorgánicos como los metales, dichos organismos pueden modificar su movilidad en el ambiente a través de la

modificación de sus características físicas o químicas (ej. cambios en el estado redox de los metales pesados que favorecen mecanismos que modifican la solubilidad, movilidad y/o toxicidad de los contaminantes) (Lovley y Coates, 1997).

Dentro de este conjunto de métodos biológicos que componen a la biorremediación destaca el uso de la fitorremediación como una alternativa interesante que permite la remoción de los metales pesados del suelo, la cual es una técnica basada en el aprovechamiento de la capacidad de ciertas plantas y los microorganismos asociados a sus raíces para acumular y/o estabilizar este tipo de contaminantes (Chaney *et al.*, 1997).

1.4. Fitorremediación de suelos contaminados con metales

De manera general, los sitios contaminados con metales sólo pueden ser remediados a través de métodos que modifiquen la movilidad, solubilidad y/o toxicidad de dichos elementos (Adriano, 1986, 1992; Alloway, 1990; Meussen *et al.*, 1994; Kroopnick, 1994). Una alternativa que permite alcanzar tales objetivos es la fitorremediación. Se conoce como fitorremediación al conjunto de tecnologías que hacen uso de las plantas y los organismos rizosféricos asociados, para la limpieza de suelos, sedimentos y aguas contaminadas por moléculas y/o elementos, entre los cuales pueden encontrarse los metales pesados (Chaney *et al.*, 1997; Singh *et al.*, 2003). Para la fitorremediación de suelos contaminados con metales, pueden distinguirse básicamente tres mecanismos que actúan sobre los contaminantes: la fitoextracción, la fitoestabilización y la fitovolatilización (Figura 4).

La aplicación de uno u otro mecanismo de fitorremediación depende, en gran medida, del tipo de suelo y contaminante, así como del grado de afectación que éste genera, aunque cabe mencionar que estas categorías no son excluyentes y que pueden ocurrir de forma combinada (Chaney *et al.*, 1997; Pilon-Smits, 2005). A continuación se describen, de manera resumida, los principales mecanismos de fitorremediación, aplicables a la remediación de sitios contaminados con metales.

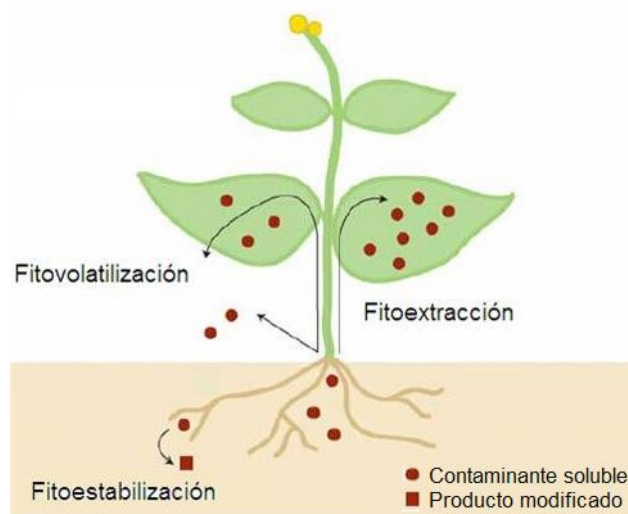


Figura 4. Mecanismos de fitorremediación aplicables a metales pesados (Modificado de Pilon-Smits, 2005).

1.4.1. Fitoextracción

La fitoextracción es el mecanismo por el cual las plantas son capaces de acumular y concentrar metales potencialmente tóxicos en sus partes aéreas, con el fin de eliminarlos del sitio contaminado por medio de prácticas agrícolas tradicionales.

En los últimos años se ha encontrado que ciertas plantas, conocidas como hiperacumuladoras, crecen y se desarrollan en suelos contaminados con iones metálicos. Estas plantas son capaces de acumular, concentrar y tolerar altas concentraciones de metales pesados presentes en los suelos (Clemens *et al.*, 2002); sin embargo, su capacidad de acumulación puede verse limitada debido a que muchas de ellas tienden a ser específicas para el contaminante sobre el que actúan (Khan *et al.*, 2000). De forma general, las plantas hiperacumuladoras deben tener ciertas características para cumplir con su función de acumular metales pesados en sus partes aéreas. En general, una planta fitorremediadora debe presentar crecimiento rápido, una alta producción de biomasa, raíces profundas, así como capacidad para acumular y tolerar varios tipos de metales pesados (Clemens *et al.*, 2002). Entre las características más importantes que una planta hiperacumuladora debe reunir se encuentran: 1) capacidad para tolerar altas concentraciones de metales en sus células; 2) alta capacidad de translocación de contaminantes desde las raíces a la parte aérea; 3) rápida tasa de captación de los elementos contaminantes (Chaney *et al.*, 1997). Es importante señalar que la transferencia de un metal tóxico del suelo al tallo de las plantas terrestres superiores es típicamente baja si se compara con la translocación de macronutrientes (Adriano, 1986).

Algunos de los factores que influyen en la captación de metales por las plantas son: 1) las interacciones entre planta y organismos rizosféricos que incrementan la solubilidad y movilidad de los metales en el suelo, para facilitar su captación por las plantas; 2) el metabolismo de los iones metálicos en las plantas, como son los mecanismos de compartimentalización en la planta (por ejemplo, el secuestro de metales tóxicos en la vacuola, como mecanismo de defensa) y la formación de complejos con péptidos y proteínas fijadores de metales, como glutatión, metalotioneinas y fitoquelatinas, que ayudan a disminuir la toxicidad de los metales pesados en las plantas (Singh *et al.*, 2003).

1.4.2. Fitoestabilización

Se conoce como fitoestabilización al mecanismo por el cual las plantas pueden convertir formas tóxicas de metales pesados a formas menos tóxicas o dañinas. La fitoestabilización de un sitio con contaminación moderada puede lograrse a través del establecimiento de una cubierta vegetal. El objetivo principal de este mecanismo es concentrar ciertos metales pesados y contaminantes orgánicos en la raíz de las plantas, reduciendo así la movilidad de los contaminantes y previniendo su migración hacia zonas más profundas del suelo y cuerpos de agua subterráneos (Morikawa y Erkin, 2003). Un componente importante en este mecanismo es el efecto de la rizósfera, ya que en ella pueden suceder mecanismos bióticos y abióticos que aumentan la precipitación y conversión de los metales pesados a formas insolubles.

Entre las características que debe presentar una planta para que pueda emplearse con fines de fitoestabilización, se encuentran: (i) el desarrollo de un sistema radicular extenso, (ii) proveer una buena cobertura en el suelo, (iii) tolerancia a los metales tóxicos presentes e, idealmente, (iv) inmovilizar los contaminantes en la rizósfera (por medio de una baja translocación de éstos hacia los tallos) (Kramer, 2005).

1.4.3. Fitovolatilización

La fitovolatilización implica la extracción de metales volátiles del suelo (como el Hg, TI) para su posterior volatilización hacia la atmósfera mediante la evapotranspiración a través del follaje de las plantas. En este mecanismo, una vez que el contaminante entra en la plantase libera hacia la atmósfera a través de los estomas (Kramer, 2005). No obstante, la fitovolatilización es un mecanismo que implica una serie de limitaciones, ya que existe la posibilidad de que, en muchos casos, los compuestos volatilizados en su forma original o

como complejos organo-metálicos, puedan permanecer intactos en el aire y después de un periodo regresar al suelo sin solucionarse el problema inicial.

1.4.4. Ventajas y limitantes de la fitorremediación

Aunque no es una tecnología totalmente nueva, ya que fue inicialmente propuesta en los años 80, la fitorremediación ha ganado gran aceptación en los últimos años como una alternativa ecológica de bajo costo y muy interesante para la remediación de suelos (Chaney *et al.*, 1997; Khan *et al.*, 2000). En comparación con los métodos fisicoquímicos tradicionales para la remediación de suelos contaminados con metales, como el lavado, la remoción, transporte y entierro, la fitorremediación representa una tecnología de aplicación mucho más barata, que podría ser utilizada para solventar, de alguna forma, las necesidades de remediación actuales (EPA, 2000).

Además de ser una tecnología de bajo costo, otra ventaja del uso de la fitorremediación, es su impacto regenerativo en aquellos lugares donde se aplica (a través de la restauración del paisaje), ya que la capacidad de extracción de las plantas puede mantenerse activa durante muchos años debido a que depende, en gran parte, del crecimiento vegetal en el sitio. Por sus características es una tecnología que ha ido evolucionando en los últimos años y, actualmente, existen muchos estudios que buscan mejorar los mecanismos de fitorremediación por plantas hiperacumuladoras a través de modificaciones genéticas que aumentan la capacidad de acumulación de los metales en el tejido vegetal aéreo (Pawlowska *et al.*, 2000; De Olivera, 1999; Salt *et al.*, 1998; Kumar *et al.*, 1995; Baker *et al.*, 1994). Asimismo, la validez del uso de esta tecnología ha quedado demostrada a través de diversos estudios, lo que ha generado que muchos países estén emprendiendo acciones que promueven el financiamiento de proyectos que impliquen la remediación de los suelos a través del uso de esta tecnología (Chaney, 1997).

No obstante, la fitorremediación debe de ser aplicada con cierto criterio, debido a que no puede implementarse en todos los suelos contaminados por metales pesados. Antes de que esta tecnología pueda considerarse totalmente eficiente existen ciertas limitaciones que deben superarse. Entre las principales limitantes de la fitorremediación se encuentran las siguientes: 1) las plantas deben estar presentes donde se encuentra el contaminante y deben ser capaces de actuar sobre él; 2) las propiedades del suelo, niveles de toxicidad y el clima deben permitir el crecimiento de las plantas; 3) puede estar limitada por la profundidad de las raíces de las plantas, pues éstas deben ser capaces de alcanzar el contaminante para poder actuar sobre él; 4) la fitorremediación, además de ser lenta en

comparación con tecnologías tradicionales de remediación de suelos, se encuentra afectada por la biodisponibilidad del contaminante (Chaney, 1997).

Quizás éste último sea el factor limitante más importante que representa el uso de la fitorremediación. La velocidad de extracción, estabilización y/o fitovolatilización de los metales es proporcional al crecimiento de la planta, además de que aun no se ha descubierto una planta que cumpla con los criterios ideales de una planta hiperacumuladora eficaz. Para superar tal problemática y que la aplicación de la fitorremediación resulte eficiente, es necesario comprender los procesos biológicos que intervienen (Khan *et al.*, 2000). Entre estos procesos se encuentran las interacciones planta-microorganismos que ocurren en la rizósfera, así como mecanismos de captación, translocación y tolerancia. Asimismo, es importante un mayor conocimiento acerca de agentes quelantes involucrados en el almacenamiento y transporte de los contaminantes, además de procesos que influyen en el movimiento de los contaminantes a través de los sistemas suelo-agua-planta hacia niveles tróficos superiores (Pilon-Smits, 2005). Otro factor importante a considerar es la escasez de investigaciones relacionadas con los mecanismos moleculares, bioquímicos y fisiológicos involucrados en estas plantas (Zhu y Rosen, 2009; Yang *et al.*, 2005; Freitas *et al.*, 2004; Prasad y Freitas, 2003; Raskin *et al.*, 1994). Comparado con la gran diversidad de plantas que existen en los suelos, se ha estudiado el posible potencial fitorremediador de muy pocas especies.

Es importante destacar que hasta hace algunos años la mayoría de los estudios sobre fitorremediación se llevaban a cabo a través del uso de modelos simples, en donde se evalúa el efecto de un solo metal y se determina el efecto del contaminante sobre las plantas o sobre los microorganismos, de manera independiente, pero no se consideran las interacciones planta-microorganismo-suelo (Arriagada *et al.*, 2007). Por ello es necesario introducir en este tipo de estudios sistemas biológicos como las asociaciones formadas entre hongos y plantas como una herramienta auxiliar que mejore los procesos de recuperación de suelos contaminados (Clemens *et al.*, 2002; Maagher *et al.*, 2000; Lovley y Coates, 1997).

1.5. Interacciones planta-microorganismos en la rizósfera

El suelo desempeña funciones importantes en la superficie terrestre, ya que actúa como reactor natural, hábitat de organismos, soporte de infraestructura y fuente de recursos no renovables (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005). Es un sistema complejo que se encuentra

determinado por las interacciones entre factores físicos, químicos y biológicos, así como por las condiciones ambientales prevalecientes (Barea *et al.*, 2005). Dentro de estas funciones, destacar la importancia que tienen los suelos como hábitat para una gran variedad de organismos, desde pequeños protozoarios hasta especies de plantas superiores. Al respecto existen autores (Karthikeyan *et al.*, 2003) que señalan que tan sólo en un gramo (peso seco) de suelo rizosférico existe una gran cantidad de microorganismos, con un conteo aproximado de 10^8 bacterias, 10^6 actinomicetos y 10^5 hongos. No obstante, la densidad de las poblaciones microbianas en el suelo puede variar significativamente de manera vertical y horizontal. Dicha distribución puede verse afectada por factores como la profundidad, que produce modificaciones en la difusión del oxígeno y la localización y disponibilidad de los nutrientes que actúan como fuentes potenciales de energía, además de la propia competencia que existe entre grupos microbianos (Lovley, 2000).

En el año de 1904, el investigador Lorenz Hiltner definió por primera vez el término rizosfera, para referirse a la zona de suelo alrededor de las raíces de algunas leguminosas que mostraba algún tipo de interacción con bacterias fijadoras de nitrógeno. Desde entonces se han hecho una gran variedad de estudios dentro de esta zona y el término ha sido redefinido para referirse a la región del suelo que se encuentra bajo la influencia física y fisiológica de la raíz de las plantas (Figura 5) (Glick, 1995; Kennedy, 1998; Linderman, 1992; Barea *et al.*, 2002).

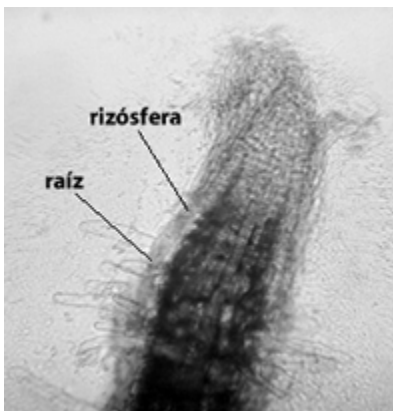


Figura 5. Vista microscópica de la raíz de una planta y la zona que conforma la rizósfera (Esquivel, 2008).

A diferencia de otras regiones del suelo, la rizósfera presenta propiedades físicas, químicas y biológicas únicas que se traducen en beneficios para la salud de las plantas y que influyen directamente sobre las poblaciones de microorganismos que habitan esta

zona (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2001). Una de las características que distingue a la rizósfera de zonas subyacentes del suelo es la gran variedad de sustancias orgánicas presentes. Debido a que la rizósfera está determinada por una interacción tripartita suelo-microorganismo-planta, cada uno de estos componentes repercute directamente en la integración de este sistema (Fuentes-Dávila y Ferrera-Cerrato, 2007).

Entre los compuestos presentes con mayor frecuencia en esta zona se encuentran carbohidratos como glucosa, fructosa, xilosa y maltosa, los cuales son producidos por las plantas y tienen influencia directa sobre las poblaciones microbianas del suelo. Asimismo, pueden encontrarse factores de crecimiento como biotina, tiamina e inositol que también intervienen en el desarrollo de microorganismos (Fuentes-Dávila y Ferrera-Cerrato, 2007). Otros compuestos excretados en la rizósfera por plantas y microorganismos son ácidos orgánicos como citrato, oxalato, malato, lactato y fumarato, que son compuestos de bajo peso molecular importantes debido a su potencial para estimular el crecimiento de otros organismos, detoxificar metales pesados, movilizar nutrientes poco solubles y acelerar procesos de meteorización mineral (López, *et.al.* 2000; Oburger *et al.*, 2009).

1.5.1. Microorganismos tolerantes a metales pesados

Dentro de la amplia diversidad de microorganismos presentes en los suelos, existen microorganismos resistentes y tolerantes a metales pesados. Comúnmente, tolerancia y resistencia son términos utilizados como sinónimos; sin embargo, es más adecuado definir como “resistentes” a aquellos grupos de microorganismos que poseen mecanismos de detoxificación, que son inducidos por la presencia de metales tóxicos. En cambio, la capacidad de “tolerancia” que se le adjudica a muchos organismos está relacionada más bien con ciertas propiedades bioquímicas y estructurales propias de los organismos, es decir, propiedades no inducibles como la permeabilidad de su pared celular, producción de polisacáridos extracelulares y excreción de metabolitos.

Tanto los microorganismos resistentes como los tolerantes a metales pesados son de particular interés en la recuperación de sitios contaminados, debido a su capacidad para acumular estos contaminantes a partir del medio. Esta capacidad propia de los organismos ha permitido la recuperación de sitios contaminados a través de procesos como la biosorción, bioacumulación, biomineralización, biotransformación y quimiosorción (Lovley, 2000). A pesar de esto, aún se conoce muy poco acerca de la enorme diversidad de microorganismos que existen en el suelo y, particularmente, de los que existen en la rizósfera, así como de sus propiedades y comportamiento dentro de este entorno. Resulta de particular

interés el estudio de la diversidad y comportamiento de los microorganismos que habitan en la rizósfera y que son capaces de interactuar con las raíces de las plantas, formando asociaciones que hacen posible la supervivencia de ambos organismos bajo condiciones de estrés como la deficiencia de nutrientes, la sequía, la presencia de microorganismos patógenos y la exposición a altas concentraciones de metales pesados (Khan, 1997).

De forma natural, microorganismos como hongos y bacterias consumen sustancias orgánicas presentes en el suelo (propias del ambiente o liberadas por otros organismos como las plantas) para la obtención de energía. Sin embargo, algunos de ellos, como parte de su metabolismo normal son capaces también de degradar algunos componentes orgánicos tóxicos (muchos de los cuales son peligrosos para el ser humano), los cuales pueden ser descompuestos en productos menos tóxicos, a través de un proceso llamado biodegradación. Como se mencionó anteriormente, a diferencia de los compuestos orgánicos, los metales no pueden ser biodegradados por estos organismos, pero si pueden sufrir modificaciones en su movilidad ó ser transformados a formas menos tóxicas. Este tipo de organismos, son capaces de alterar el estado de oxidación de ciertos metales pesados, convirtiéndolos ya sea en formas más solubles, los cuales pueden ser removidos posteriormente por lixiviación, o en formas menos tóxicas precipitándolos en el suelo y disminuyendo su biodisponibilidad dentro de éstos. Así los microorganismos presentes en los suelos pueden alterar el comportamiento y toxicidad de los metales pesados a través de cambios en su valencia, precipitación extracelular o volatilización (Lovley, 1993).

1.5.2. Mecanismos de tolerancia a metales en plantas y hongos

La presencia de metales pesados en el ambiente puede implicar toxicidad para los organismos que habitan tales zonas contaminadas. El grado de toxicidad de un metal depende del elemento en particular (ej. Pb, Cd, Cr), de su biodisponibilidad en el suelo y de su especiación. La biodisponibilidad de un metal en el suelo depende principalmente de factores abióticos como el pH, humedad y concentración del metal, además de factores bióticos como la presencia de plantas, bacterias, hongos y otros microorganismos que pueden encontrarse interactuando con estos metales afectando su disponibilidad a través de diversos mecanismos (Ezhourri *et al.*, 2009; Bellion *et al.*, 2006). De hecho, los organismos que entran en contacto con cualquier tipo de contaminante desarrollan estrategias para tolerar su presencia. A continuación se describen algunos de los principales mecanismos de tolerancia que se han encontrado en hongos y en plantas.

1.5.2.1. Mecanismos en hongos

Cuando un hongo filamentoso (micorrícicos y no micorrícicos) entra en contacto con un contaminante como los metales, se activan algunos mecanismos que le permiten tolerar su presencia. Estos mecanismos, que inciden directamente sobre la detoxificación de los metales, se clasifican en extracelulares e intracelulares. Los mecanismos extracelulares participan evitando la entrada de los metales al interior de la célula, mientras que la función de los mecanismos intracelulares es reducir la toxicidad de estos iones en el interior de las células (Bellion *et al.*, 2006; Gadd, 1993).

Mecanismos intracelulares. Se conocen algunos mecanismos intracelulares que le infieren a algunos hongos la capacidad para tolerar la presencia de metales pesados. Al interior de la célula se han encontrado metalotioneinas (MT), una familia de proteínas de bajo peso molecular con un alto contenido de grupos sulfhidrilo, que pueden unirse a iones metálicos formando complejos metalotioneína-metal (MT-M). Las MT actúan como transportadores de metales, los cuales son enviados a compartimentos en el interior de la célula, como la vacuola, o hacia el exterior, como la pared celular. Las MT desempeñan funciones importantes en el mantenimiento de las condiciones de homeostasis tanto de elementos traza como de metales tóxicos (Brambila y Lozano, 1999; Bellion *et. al*, 2006).

Otro componente en el interior de las células fúngicas es el glutatión (GSH), un tiol no proteico con muy bajo potencial redox involucrado en procesos celulares, que juega un papel importante en respuesta a diversas situaciones de estrés por el hongo (Pócsi *et al.*, 2004). El GSH actúa quelando y secuestrando los iones metálicos que penetran en el citoplasma, con lo cual se logra reducir los efectos dañinos producidos por metales tóxicos. También se han observado mecanismos antioxidantes de tolerancia a metales pesados en los hongos, a través de la acción de enzimas oxido-reductasas como las tiorredoxinas, (una familia particular caracterizada por la conservación de la secuencia aminoacídica - Trp-Cys-Gly-Pro-Cys- en su estructura primaria; en donde la alternancia de los átomos de azufre de las cisteínas entre el estado oxidado (disulfuro) y el reducido (tiol) le confiere la capacidad de alterar el estado redox de otras proteínas vía un intercambio tiol/disulfuro) cuyas funciones principales son la reducción de dehidroascorbato y la reparación de proteínas oxidadas. Recientemente se ha observado que las tiorredoxinas contribuyen a mantener las condiciones redox de homeostasis en respuesta a condiciones de estrés oxidativo y reductivo (Bellion *et. al.*, 2006).

Mecanismos extracelulares. Uno de los principales mecanismos extracelulares que se conoce en los hongos es su capacidad para producir ácidos orgánicos en respuesta al contacto de sus hifas con metales pesados. Ácidos como el cítrico y láctico, son excretados por las células fúngicas y actúan como quelantes de iones metálicos. Esto resulta importante debido a que estos ácidos actúan como una fuente de protones, lo cual interviene en la disolución de minerales metálicos que son posteriormente acumulados en compartimentos específicos de las células, como la vacuola. Por otra parte se ha reportado que la producción de ácido oxálico en *Paxillus involutus* reduce hasta en un 85 % la capacidad de acumulación de Cd por esta cepa (Bellion *et. al.*, 2006) debido a que este ácido en particular puede formar conjugados con los metales formando precipitados insolubles, logrando de esta manera reducir la entrada de estos elementos tóxicos al interior de la célula. Además de lo anterior, se ha encontrado que los hongos presentan algunos mecanismos pasivos que no dependen directamente de su actividad metabólica (Ezzouhri *et al.*, 2009). Un ejemplo de ello es que la biomasa viva o muerta de muchos hongos puede usarse de manera exitosa como biosorbente (intercambiador iónico natural que contiene principalmente grupos débilmente ácidos o básicos en su superficie). Esto se debe a que la pared celular de las hifas, en donde ocurre el contacto inicial con los metales, está compuesta principalmente por quitina, glucanos y polímeros de galactosamina, además de proteínas que actúan como sitios potenciales de unión para los iones metálicos. La presencia de pigmentos como la melanina puede también aumentar la capacidad de biosorción (Bellion *et al.*, 2005, Tobin *et al.*, 1994). Estos compuestos, presentes en la pared celular de los hongos, contienen un gran número de sitios potenciales de unión como los grupos fosfato, mercapto, hidroxilo, amino y carboxilos libres, generalmente con cargas negativas que atraen a los cationes metálicos (Figura 6). Un estudio realizado por Blaudez *et al.*, (2000) demostró que una fracción sustancial del cadmio acumulado (48%) por *Paxillus involutus* fue retenido en la pared celular del hongo.

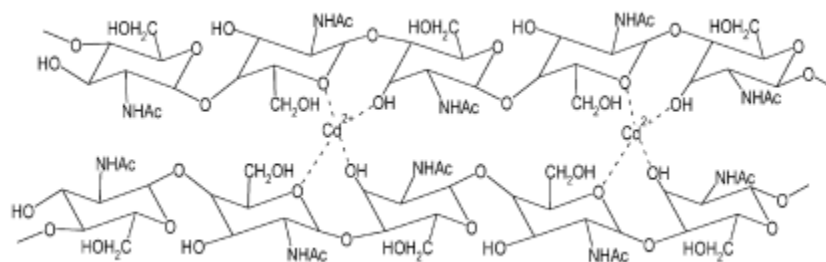


Figura 6. Estructura hipotética del complejo formado entre la quitina y el cadmio. La molécula de oxígeno del grupo hidroxilo y la N-acetil-glucosamina participan en la formación del complejo (Bhanoori y Venkateswerlu, 2000).

1.5.2.2. Mecanismos en plantas

De la misma forma en que sucede en los hongos, las plantas también tienen la capacidad de activar ciertos mecanismos extra e intracelulares que les permite tolerar la presencia de metales en el suelo. Esta tolerancia resulta principalmente de la capacidad de las plantas para excluir los elementos tóxicos a través de sus actividades metabólicas.

Mecanismos extracelulares. De manera similar a los hongos, uno de los primeros mecanismos que se activa en las plantas cuando éstas entran contacto con los metales pesados ocurre a través de la excreción de ácidos orgánicos por las raíces, los cuales actúan quelando iones metálicos (generalmente poco solubles), modificando su movilidad en el suelo. Una vez que los metales son movilizados en la rizósfera, éstos pueden ser capturados por las células de la raíz mediante su unión a la pared celular (un intercambiador iónico de baja afinidad y selectividad), para posteriormente ser transportados a la membrana plasmática (Singh, *et al.*, 2003).

Mecanismos intracelulares. Una vez que un metal tóxico alcanza la membrana plasmática, éste puede ser transportado al interior de la célula a través de diversos mecanismos. Algunas de las proteínas de transporte en el citosol son las proteínas de la familia de las CPx-ATPasas, proteínas macrófagas naturales asociadas a la resistencia (Nramp) y proteínas ZIP (proteínas ZRT tipo IRT). Las proteínas Nramp y ZIP intervienen en el transporte de los metales dentro del citosol hacia compartimentos internos como la vacuola, o externos como la pared celular.

Al parecer, uno de los principales mecanismos de tolerancia en las plantas se relaciona con el secuestro de los iones metálicos en compartimentos del interior de las células (ej. la vacuola), evitando así que los metales tóxicos afecten procesos vitales como la respiración y división celular. Se sabe que algunas de estas proteínas transportadoras participan también en actividades relacionadas con la acumulación de metales en el tallo y raíz de las plantas (Clemens *et al.*, 2002).

Por otra parte, la quelación de metales pesados implica la unión de los iones metálicos a proteínas como las metalotioneinas y fitoquelatinas. De esta manera, la acumulación de metales en la parte aérea se reduce debido a la captura en la raíz (Clemens *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2003). Otra estrategia involucrada en la detoxificación de metales por las plantas es la fitovolatilización y/o la biotransformación de iones metálicos, que implica su modificación a formas orgánicas (dimetil-selenio) o inorgánicas (mercurio elemental (Hg^0))

menos tóxicas, por medio de esta estrategia las plantas pueden remover elementos dañinos del interior de sus tejidos (Singh *et al.*, 2003).

1.6. Uso de microorganismos en la fitorremediación

De forma general, el estudio de las interacciones planta-microorganismo en el campo de la fitorremediación se ha enfocado principalmente hacia la remoción de compuestos orgánicos en suelos contaminados (Flathman *et al.*, 1994; Khan *et al.*, 2000). En contraste, los estudios realizados acerca del papel que juegan los microorganismos rizosféricos en la transformación de contaminantes inorgánicos, así como en su disolución y transporte hacia la planta, son escasos (Khan *et al.*, 2000).

Diversos estudios reportan que, con el fin de optimizar los resultados obtenidos durante la fitorremediación de suelos contaminados con metales, resulta importante considerar las interacciones de las plantas con los microorganismos del suelo, ya que estos juegan un papel importante en la salud de las plantas. Estos microorganismos participan también en el mejoramiento de procesos como la captura de nutrientes, la protección contra estrés hídrico y patógenos y aumentan la resistencia contra estrés por contaminación, además de producir modificaciones en actividades relacionadas con la acumulación de metales pesados, como son la disolución de minerales en el suelo y alteración de la estructura del suelo (Fomina *et al.*, 2005; Kabata-Pendias, 2004).

El descubrimiento de éstas estrategias, las cuales se presentan de forma natural en los microorganismos asociados a las raíces de las plantas, ha despertado el interés de muchos grupos de investigación, los cuales durante los últimos años, se han enfocado en estudiar el papel que desempeñan estas asociaciones en la transformación y especiación de los contaminantes (generalmente compuestos orgánicos) presentes en el ambiente (Debarati *et al.*, 2005; Lors *et al.*, 2004). A continuación se describen algunas investigaciones en las que se ha considerado este tipo de interacciones y, en particular, el uso de hongos no micorrícicos como herramienta para el mejoramiento de los mecanismos de fitorremediación de metales pesados.

1.6.1. Efecto de bacterias y hongos micorrícicos sobre el crecimiento vegetal

La función que desempeñan algunos grupos microbianos, como las bacterias y hongos micorrícicos, en la fitorremediación de suelos ha quedado demostrada a través de diversas investigaciones (Vivas *et al.*, 2003, Arriaga *et al.*, 2006, Sudová *et al.*, 2007,

Lixiang *et al.*, 2008). Como resultado de estas investigaciones se ha descubierto que las interacciones que existen entre ambos grupos de organismos (por ejemplo las asociaciones formadas entre algunas bacterias y hongos micorrícicos) desempeñan un papel importante en el establecimiento de las asociaciones planta-microorganismo en suelos contaminados por metales pesados.

Dentro de estas investigaciones destaca el estudio realizado por Vivas *et al.*, (2003), quienes evaluaron el efecto de la inoculación de algunas plantas con rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas (RPCP) y hongos micorrícicos arbusculares (HMA). Encontraron que ciertas interacciones específicas entre dichos microorganismos podían modular el efecto de los HMA sobre la fisiología de la planta. Se observó que, tanto los HMA como las RPCP se complementan en funciones como disolución de fósforo, fijación de nitrógeno y producción de fitohormonas, además de favorecer un incremento en la superficie de absorción de nutrientes.

Otros grupos (Garbaye, 1994; Dupponois y Garbaye, 1990; Requena *et al.*, 1997) han descrito la presencia de bacterias rizosféricas, conocidas como bacterias auxiliaadoras de la micorrización, que participan en la micorrización de las plantas bajo condiciones de estrés como la presencia de metales pesados; sin embargo, estas bacterias son selectivas hacia la especie de hongo con la que interactúan. En este aspecto, Mosse (1962), ya había demostrado que ciertas enzimas de la pared celular de *Pseudomonas* sp. podían mejorar la germinación de esporas de *Glomus mosseae*, además de promover el establecimiento de hongos micorrícicos en las raíces de las plantas.

Albretch *et al.*, (1999) realizaron estudios sobre la interacción entre especies de *Rhizobium* y HMA, observando que la formación de asociaciones sinérgicas entre ambos tipos de microorganismos mejoraba la nodulación en las plantas debido a un aumento en la captura de fósforo. Suresh y Bagyaraj (2002) también observaron este tipo de asociaciones sinérgicas entre HMA y bacterias no simbióticas fijadoras de N como *Azotobacter chroococum*, *Azospirillum* spp. y *Acetobacter diazotrophicus*. Asimismo, se ha encontrado que existe especificidad en las interacciones entre HMA, *Rhizobium* y RPCP, lo que indica la gran importancia de considerar este tipo de relaciones en estudios de fitorremediación de suelos. Esto señala que los organismos que constituyen relaciones simbióticas deben ser compatibles entre sí, con el objetivo de obtener una mayor eficiencia en la optimización de las estrategias de fitorremediación (Khan, 2006). Al respecto se sabe que los hongos ectomicorrícicos pueden brindarle cierta protección

indirecta a sus plantas hospederas asociadas, promoviendo su crecimiento mediante mejoras en la nutrición o producción de hormonas por parte de estos hongos (Clegg y Gobran, 1995; Jentschke *et al.*, 1999 y Meharg y Cairney, 2000)

1.6.2. Efecto de hongos no micorrícicos en la acumulación de metales

Aunque existen estudios acerca de los efectos de la interacción planta-microorganismos sobre la eficiencia de la fitorremediación, los estudios enfocados hacia el papel que juegan ciertos hongos filamentosos no micorrícicos en el mejoramiento de los procesos de fitorremediación de metales son escasos. En la actualidad se sabe que este grupo de hongos es muy importante debido a las diversas actividades que desempeñan en la rizósfera y a su influencia en el desarrollo de las plantas y de otros microorganismos (Fuentes-Dávila y Ferrera-Cerrato, 2007). Entre los mecanismos que pueden influir en la acumulación de metales por hongos, se encuentran la retención y precipitación extracelular, la unión de los metales a la pared celular, el secuestro intracelular y la compartimentalización o la volatilización (Gadd, 1993).

Uno de los primeros trabajos en los que se estudió la capacidad de la acumulación de metales por este grupo de hongos es el realizado por Tobin *et al.*, en 1984. Este grupo probó la capacidad de *Rhizopus arrhizus* para biosorber diferentes metales presentes en medios de cultivo líquidos, encontrando que esta cepa llegó a acumular hasta 165 mg/l de Pb y 140 mg/l de Cr en su biomasa.

Actualmente, el estudio de las interacciones hongo-planta con fines de fitorremediación está recibiendo mayor atención en el campo científico. Por ejemplo, Lixiang *et al.*, (2008) probaron el efecto de la asociación entre *Trichoderma atroviridae* y *Brassica juncea*, encontrando que la asociación aumentó en un 22% la capacidad de la planta para acumular Ni en su parte aérea. Arriagada *et al.*, (2006) probaron el efecto de la inoculación de *Glomus deserticola* y *Fusarium concolor* sobre el potencial de *Eucalyptus globulus* para acumular Pb. Este grupo encontró que cuando la planta se inoculó con ambos hongos, su capacidad para acumular el metal presente en un suelo contaminado por desechos mineros fue del doble con respecto a la planta no inoculada.

Por otra parte, existen estudios que han demostrado la capacidad de asociaciones de plantas con hongos no micorrícicos para remediar suelos contaminados por contaminantes orgánicos. Al respecto, los estudios realizados por Cruz-Hernández (2008) demostraron que la asociación entre *Lewia* sp. y *Festuca arundinacea* promovió un aumento

significativo (61.8 %) en la capacidad de esta planta para remover pireno a partir de una mezcla compuesta por fenantreno, pireno y hexadecano.

2. JUSTIFICACIÓN

El conocimiento de las respuestas biológicas y los mecanismos de tolerancia de algunas plantas y microorganismos a la exposición a metales tóxicos son herramientas básicas para la mejora de sistemas estratégicos para la remediación de suelos, que permitan obtener mejores rendimientos durante la aplicación de los diferentes mecanismos de fitorremediación. En este sentido, desde hace algunos años, diversos estudios reconocen la importancia del papel que desempeñan los hongos dentro de la rizósfera y la forma en que influyen en la acumulación y tolerancia a metales pesados en las plantas.

Se sabe que muchos microorganismos del suelo desempeñan funciones importantes relacionadas con la salud de las plantas con las que establecen contacto. La importancia de los hongos ecto- y, sobre todo, endomicorrícicos ha sido ampliamente reconocida tanto para fines agrícolas como en estudios de fito- y biorremediación de suelos. Sin embargo, su difícil propagación y, en particular, la imposibilidad de cultivar las micorrizas arbusculares en ausencia de raíces de una planta hospedera, hace que su aplicación con fines de fitorremediación sea limitada. Los hongos filamentosos no micorrícicos son también componentes comunes e importantes de la rizósfera de muchas plantas y representan una parte sustancial de la biomasa presente en el suelo. Al respecto existen algunos estudios que reportan la capacidad de este tipo de hongos para modificar el nivel de micorrización de hongos del género *Gigaspora* y *Glomus* con diferentes especies de plantas; sin embargo, a la fecha, los estudios destinados a probar el efecto de hongos no micorrícicos sobre el crecimiento de plantas fitorremediadoras y la fitoacumulación de metales pesados, son escasos.

Con base en los antecedentes previos, así como en la capacidad demostrada de muchos hongos filamentosos no micorrícicos para alterar la composición de la rizósfera, así como la especiación de los metales pesados (modificando su movilidad) y la fisiología de las plantas, es de gran importancia para el campo de la fitorremediación de suelos, realizar estudios que incluyan a este grupo de hongos en el proceso, con la finalidad de determinar el efecto de este tipo de interacciones (hongo-planta) en la fitorremediación de suelos contaminados con metales.

3. HIPÓTESIS

Al menos una cepa de un hongo no micorrícico puede asociarse con *D. viscosa* y modificar su capacidad de acumulación y/o estabilización de plomo

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar, en un sistema *in vitro*, el efecto de la interacción de *D. viscosa* con un hongo saprófito sobre la tolerancia, acumulación y estabilización de plomo.

4.2. Objetivos particulares

1. Evaluar la tolerancia y acumulación de plomo por diferentes cepas de hongos saprofitos
2. Evaluar la capacidad de diferentes cepas de hongos saprófitos para interactuar con *D. viscosa*.
3. Seleccionar una cepa fúngica para realizar estudios de fitorremediación de plomo, con base en su capacidad para interactuar con *D. viscosa* y su tolerancia al metal.
4. Determinar el efecto de la fuente de plomo sobre el crecimiento, acumulación y estabilización del metal por la cepa seleccionada.
5. Evaluar el efecto de la interacción de *D. viscosa* con el hongo seleccionado sobre la capacidad de la planta para acumular y/o estabilizar plomo.

5. MÉTODOS Y MATERIALES

5.1. Estrategia experimental

Para la realización de este proyecto, la fase experimental se dividió en tres etapas: 1) selección de una cepa fúngica tolerante a plomo y capaz de interactuar con *Dodonaea viscosa*; 2) efecto de la fuente y concentración de plomo en el crecimiento de la cepa seleccionada, y 3) pruebas de fitorremediación de plomo por *D. viscosa* en asociación con la cepa seleccionada (Figura 7).

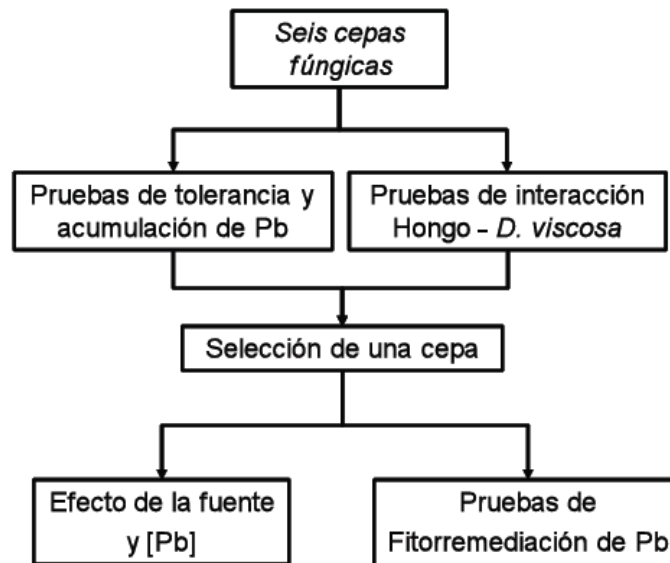


Figura 7. Estrategia experimental por etapas

5.2. Material biológico

5.2.1. Hongos filamentosos

Se emplearon seis cepas de hongos filamentosos: *Botryodiplodia theobromae* (cepa 1368), *Trichoderma harzianum* (NICTMA 206040), 3 cepas del género *Fusarium* y una cepa del género *Lewia*. Las últimas cuatro cepas fueron aisladas de semillas de cuatro especies de gramíneas: *Bouteloua curtipendula* (Michx) Torr., *Cenchrus ciliaris* L., *Lolium perenne* L. y *Festuca arundinacea* (Schreber), respectivamente. Las cepas utilizadas se seleccionaron con base en los siguientes criterios:

- a) *B. theobromae* es un hongo capaz de producir fitohormonas de crecimiento (ácido jasmónico) que benefician el desarrollo de las plantas (Eng *et al.*, 2003).
- b) *T. harzianum* es una especie reportada como tolerante a la presencia de metales,

además de que puede producir ciertos metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas (6-pentil-a-pirona, ácido heptelídico y ácido koningico), involucrados en la protección de plantas contra organismos patógenos (Vinale *et al.*, 2008).

- c) Las tres cepas del género *Fusarium*, así como la de *Lewia* se aislaron a partir de semillas de cuatro especies de gramíneas: *Bouteloua curtipendula* (Michx) Torr, *Cenchrus ciliaris* L., *Lolium perenne* L. y *Festuca arundinacea* (Schreber), respectivamente. Estas plantas se colectaron en sitios contaminados en el Estado de Querétaro. Por otra parte, existen estudios donde se ha demostrado la capacidad de este grupo de hongos para tolerar diversos iones metálicos como Cd, Cr y Pb (Ezzouhri, *et al.*, 2009).

Todas las cepas se conservaron a 4°C en cajas Petri con medio papa-dextrosa-agar (PDA, *Baker*), después de su crecimiento a 28-30 ° C durante 7-14 días.

5.2.2. *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq.

Dodonaea viscosa L. (Jacq.), mejor conocida como chapulixtle, es un arbusto perennifolio de la familia *Sapindaceae* que presenta una distribución cosmopolita en regiones tropicales, subtropicales y templadas de África, América y el sur de Asia (Von-Carlowitz *et al.*, 1991). Esta planta tiene una amplia distribución en nuestro país, en donde se encuentra generalmente asociada con diferentes tipos de vegetación como bosques de coníferas y bosque tropical caducifolio. Su presencia se ha registrado en los estados de Chihuahua, Baja California Norte, Aguascalientes, Baja California Sur, Chiapas, Coahuila, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luís Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán (Villaseñor y Espinosa, 1998).

D. viscosa es una especie que puede crecer en suelos muy erosionados y con fuertes pendientes, sobre tepetate y toba removida (Camacho *et al.*, 1992). Es tolerante a sequías, inundaciones, viento y heladas y se recomienda para el control de la erosión, como cortina rompevientos y como restaurador de suelos (Carlowitz, *et al.*, 1991). Esta especie se seleccionó debido a que se ha demostrado (Camacho *et al.*, 1992; Gutiérrez-Rojas *et al.*, 2008) su potencial para fitorremediar matrices contaminadas con metales, además de encontrarse frecuentemente creciendo cerca de sitios contaminados.

Este arbusto puede alcanzar una altitud de 2 a 3 m, tiene hojas simples con una gran variedad de formas que va desde espatuladas a elípticas u obovadas de 6 a 13 cm de

longitud y 2 a 4 cm de ancho (Figura 8). Las hojas segregan una sustancia resinosa que les proporciona una cubierta protectora que evita la pérdida de agua, lo cual hace de esta planta una especie con una tolerancia excepcional a sequías, vientos y heladas (Gilman, 1999). Sus flores van del color amarillo al naranja rojizo y se localizan en racimos cortos. El fruto es una cápsula de ~2 cm de ancho que cuando emerge es verde y, posteriormente, se torna a un color verde amarillo y luego en rosa y rojo (Figura 8).



Figura 8. Semillas y tallos con flores y frutos de *Dodonaea viscosa*

Las plantas de *D. viscosa* utilizadas para las pruebas de tolerancia y fitorremediación fueron obtenidas, en condiciones *in vitro*, a partir de semillas recolectadas en los alrededores de un sitio contaminado con residuos mineros en el estado de Guanajuato. Estas semillas se secaron a temperatura ambiente y se almacenaron en bolsas de papel hasta su utilización para la obtención de plántulas.

5.3. Tratamiento y germinación de semillas de *D. viscosa*

Las semillas de *D. viscosa* usadas para los ensayos se seleccionaron mediante el método de flotación en agua, debido a que las semillas vivas tienden a hundirse (Camacho *et al.*, 1992). Una vez seleccionadas, éstas se escarificaron térmicamente, con el fin de inducir una germinación más rápida, para lo cual se sumergieron en agua destilada y se mantuvieron a 75° C durante 3 min.

Una vez escarificadas, las semillas se desinfectaron a través de su lavado con detergente comercial (2%) durante 30 min., después se enjuagaron hasta eliminar el detergente y se colocaron en una solución de etanol (70%) por 30 segundos, finalmente, en una solución

de hipoclorito de sodio comercial (12%) por 25 min. Las semillas se enjuagaron con agua destilada estéril entre cada procedimiento.

Una vez tratadas, las semillas se sembraron en tubos de cultivo con medio Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962) y sacarosa (10 g/l), y se le adicionó Phytigel (*Sigma*, 2 g/l) como agente solidificante. En la Tabla 1 se muestra la composición del medio MS. El pH del medio se ajustó a 5.7 con una solución de NaOH 1N y se esterilizó (15 lb/plg², 15 min). Estas condiciones se utilizaron para las pruebas de interacción (sección 6.5.2) y de tolerancia a Pb (sección 6.4).

Tabla 1. Composición del medio Murashige & Skoog (MS) utilizado para la germinación de *D. viscosa* y para los experimentos con plomo.

Compuesto ^a	mg/l
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
EDTA-Na ₂	37.3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ ·4H ₂ O	8.6
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
KI	0.83

^a Los reactivos utilizados fueron provistos por *Sigma* y *J.T. Baker*

El medio MS es un medio rico en nutrientes, comúnmente utilizado para la propagación de plántulas y el cultivo de tejidos vegetales en condiciones *in vitro*.

5.4. Selección de cepas fúngicas

Para la selección de una cepa fúngica, se consideró la capacidad para tolerar y acumular la presencia de plomo en el medio, así como para interaccionar con *D. viscosa*. La cepa seleccionada en esta etapa se utilizó en pruebas posteriores de fitorremediación/ fitoestabilización de plomo.

5.4.1. Pruebas de tolerancia y acumulación de plomo

Se evaluó la capacidad de las diferentes cepas fúngicas para tolerar y acumular el plomo presente en el medio. De acuerdo con Gadd (1990), la tolerancia a metales pesados es una característica importante que presentan muchos organismos y en particular los hongos, la cual se define como la capacidad de un organismo para sobrevivir a la toxicidad de los metales mediante mecanismos activados en respuesta directa a la presencia de tales contaminantes.

5.4.1.1. Medio superficial

Con el fin de determinar el efecto del Pb sobre el crecimiento de las cepas fúngicas, éstas se inocularon por piquete por triplicado en cajas Petri conteniendo medio MS con sacarosa (30 g/l) y plomo (0 y 100 mg Pb/l), adicionado en forma soluble como $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Sigma). Al medio control (sin plomo) se le adicionó además 0.08 g/l de NaNO_3 para compensar la concentración de nitrato aportado por el $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ en los medios con Pb. A ambos medios se les agregó 2 g/l de Phytigel. Las cajas se incubaron en un cuarto de temperatura controlada a 30°C, durante un periodo de 7 (*Botryodiplodia theobromae* y *Trichoderma harzianum*) y 14 días (cepas 1, 2 y 3 de *Fusarium* y *Lewia sp.*).

El efecto del Pb sobre el crecimiento se cuantificó a través de la producción de biomasa (peso seco), así como la acumulación de plomo en biomasa, el cual fue cuantificado por espectrofotometría de absorción atómica (EAA).

5.4.1.2. Medio líquido

También se determinó el crecimiento de las cepas en medio MS líquido, adicionado con sacarosa (10 g/l) y plomo (adicionado en forma soluble $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) sin Phytigel. Para lo anterior, el micelio en suspensión de cada cepa se inoculó (por triplicado) en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio basal MS, en ausencia y presencia de plomo (0 y 100 mg Pb/l). Los matraces se dejaron en agitación a 150 rpm durante un periodo de 7 (*Botryodiplodia theobromae* y *Trichoderma harzianum*) y 14 días (cepas 1, 2 y 3 de *Fusarium* y *Lewia sp.*) a una temperatura de 30° C.

Las variables de respuesta consideradas en este caso fueron: la producción de biomasa y la acumulación de plomo en biomasa.

5.4.1.2.1. Preparación del inóculo

La preparación del inóculo para los cultivos líquidos, así como para las pruebas de fitorremediación se realizó como se describe a continuación. Se prepararon cultivos de cada cepa en medio PDA, para lo cual, las cepas se inocularon por piquete en cajas Petri con el medio y se incubaron durante 4 (*B. theobromae* y *T. harzianum*) y 10 (*Fusarium 1*, *2*, *3* y *Lewia* sp.) días a una temperatura de 30° C.

Después del tiempo de incubación, se realizaron cortes en forma de cuadros de 5 x 5 mm aproximadamente de la periferia de las colonias, tratando de recuperar sólo el micelio. Estos cuadros (6 por cepa) se colocaron en tubos de cultivo con 2 ml de agua estéril y 15 perlas de ebullición y se agitaron en un vórtex hasta la disgregación del micelio. Se adicionaron 10 ml más de agua estéril a cada tubo y se agitaron nuevamente hasta obtener una suspensión homogénea de cada cepa.

En la Tabla 2 se muestra la concentración de inóculo inicial empleado en los medios de cultivo líquidos.

Tabla 2. Concentración de inóculo inicial empleado en los medios de cultivo líquido.

Cepa	mg/ml
<i>B. theo</i>	0.28 ± 0.01
<i>T. harz</i>	0.21 ± 0.01
<i>F1</i>	0.55 ± 0.01
<i>F2</i>	1.47 ± 0.09
<i>F3</i>	0.76 ± 0.09
<i>Lewia</i> sp.	1.21 ± 0.18

5.4.2. Pruebas de interacción con *D. viscosa*

Una prueba fundamental para la selección de la cepa con la que se realizaron las pruebas de fitorremediación consistió en evaluar su capacidad para interaccionar, de manera positiva, con *D. viscosa*. Para lo anterior, semillas tratadas de *D. viscosa* se germinaron (por quintuplicado) en tubos de cultivo con medio MS con sacarosa (10 g/l) y Phytigel (2 g/l) y se mantuvieron en oscuridad a una temperatura de 25°C; después de 15 días de la germinación, las plántulas se inocularon por piquete con cada cepa por separado. Como controles se utilizaron tubos de cultivo con la planta sin inocular. Finalmente los tubos se

colocaron en una cámara de crecimiento a una temperatura de 25°C, con un fotoperiodo de 16h durante un periodo de 30 días.

El efecto de cada cepa sobre el crecimiento de *D. viscosa* se determinó (por quintuplicado) a través de una inspección visual (análisis cuantitativo) y de las siguientes variables cuantitativas: elongación, peso seco y peso fresco de tallos y raíces.

5.5. Efecto de la fuente y concentración de plomo sobre la acumulación y el crecimiento de la cepa seleccionada

Una vez que se seleccionó una cepa fúngica, se determinó el efecto de la solubilidad de la fuente de plomo, y su concentración sobre el crecimiento y capacidad de acumulación del metal por el hongo. Para lo anterior, la cepa se inoculó mediante una suspensión de micelio (1.21 mg/ml), en matraces Erlenmeyer de 250 ml. de capacidad que contenían 50 ml de medio MS líquido modificado (Tabla 3) y 10 g/l de sacarosa (pH 5.7), con y sin plomo (0,100, 250, 500 mg Pb/l) adicionado en forma soluble ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) e insoluble (PbS). Los cultivos se incubaron en agitación (150 rpm) por 10 días a 30° C; cada condición fue evaluada a través de 3 repeticiones.

Tabla 3. Composición del medio MS Murashige & Skoog modificado

Compuesto ^a	mg/l
NH_4NO_3	850
KNO_3	2020
$\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	170
KH_2PO_4	170
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
H_3BO_3	6.2
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16.9
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
KI	0.83

Cabe mencionar que la composición del medio MS inicialmente empleado fue modificada a partir de esta prueba. Estudios realizados previamente en el laboratorio demostraron que al agregar concentraciones iniciales superiores a 120 mg/l de plomo en este medio en particular, el metal tiende a formar complejos insolubles con algunas moléculas presentes en el medio como los sulfatos, formando precipitados; por tanto, se eliminaron dichos

compuestos (particularmente compuestos como el $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) del medio con el fin de mantener una mayor biodisponibilidad del Pb en el medio. Otro compuesto que forma estos precipitados de plomo son los fosfatos (como el KH_2PO_4), no obstante dicho compuesto se mantuvo debido a la importancia que representa su presencia para el crecimiento fúngico. Para la preparación de este medio se tomó como base las modificaciones propuestas por Buendía-González *et. al.* (2010).

Una vez finalizada la prueba, se evaluó el efecto de la fuente y la concentración de Pb sobre el crecimiento de la cepa, para lo cual se consideraron como variables de respuesta: (i) crecimiento, a través de la cuantificación de la biomasa (peso seco); (ii) cambio de pH en el medio, y (iii) concentración de plomo en biomasa y plomo soluble residual en el medio.

5.6. Fitorremediación de un suelo modelo contaminado con plomo

La última etapa de este trabajo consistió en evaluar el efecto de la cepa seleccionada sobre el potencial fitorremediador de plomo de *D. viscosa*. Estas pruebas se realizaron con un suelo modelo (agrolita) previamente lavado, secado y tamizado (3 – 5 mm). En tubos de cultivo (*Pyrex*) (25 x 150 mm) se colocaron 2.2 g de agrolita, la cual se humectó con 7 ml de medio MS modificado (pH 5.7) con sacarosa (10 g/l) hasta 75-80% de humedad. Antes de adicionarlo a los tubos, el medio se adicionó con 250 mg/kg de plomo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ó PbS), además de un control sin metal.

Para esta serie de experimentos, en condiciones asépticas, se sembraron semillas de *D. viscosa* escarificadas y desinfectadas sobre la agrolita húmeda y se colocaron en oscuridad a 30°C para su germinación. 15 días después de la germinación, las plántulas de *D. viscosa* se inocularon mediante una suspensión de micelio (1.21 mg/ml) con la cepa seleccionada.

Por otra parte se realizaron experimentos con el hongo y la planta sola, bajo las mismas condiciones señaladas anteriormente y se prepararon controles sin plomo por cada tratamiento. Todos los tubos con las plántulas de *D. viscosa* ó inóculo del hongo se incubaron 35 días en una cámara de crecimiento a 25 °C con un fotoperiodo de 16 h. Las variables evaluadas fueron las siguientes: (i) crecimiento de *D. viscosa*, medido a través de la elongación y peso seco de la parte aérea y raíces; (ii) crecimiento del hongo, a través de la estimación de la biomasa (peso seco), y (iii) acumulación de Pb en raíces y tallos de *D. viscosa* (en presencia y ausencia del hongo). Se utilizó un diseño factorial 3 x 3 con los tratamientos descritos en la Tabla 4.

Tabla 4. Tratamientos aplicados durante las pruebas de fitorremediación de plomo en un suelo modelo con *D. viscosa*^a.

TRATAMIENTOS								
Control			Pb(NO ₃) ₂			PbS		
P	H	P +	P	H	P +	P	H	P +
		H			H			H

^a P, indica el tratamiento con *D. viscosa*; H, son los tubos con la cepa seleccionada; P+H, indica el tratamiento con la interacción hongo-*D. viscosa*. Todas las pruebas, excepto la del hongo solo (x 3), se evaluaron a través de 7 réplicas.

5.7. Métodos analíticos

5.7.1. Cuantificación de biomasa

La determinación de biomasa fúngica y de *D. viscosa* se estimó por peso seco, para lo cual se utilizó papel filtro (Whatman 42), para los ensayos en medio MS sólido o líquido, ó charolas de aluminio, para las pruebas con agrolita, a peso constante (48 h, 60°C).

Para los ensayos realizados en medio MS sólido (gel) o líquido con el hongo, la biomasa se retiró del medio y se filtro a vacío en el papel filtro. Los papeles con biomasa fúngica se dejaron secar a 60°C durante 48 h. La biomasa se cuantificó por la diferencia de peso entre el papel filtro con y sin biomasa.

La biomasa vegetal se estimó, en raíces y tallos por separado, después de extraer las plantas del medio MS sólido o de la agrolita y lavar las raíces con una solución de EDTA (10 mM) para retirar el metal extracelular o las partículas de agrolita adheridas. El tejido vegetal se colocó en los papeles filtro y se dejó secar en una estufa (*Binder*) a 60°C durante 48 h. La biomasa se calculó a través de la diferencia entre el peso final e inicial.

Para cuantificar el peso de la biomasa fúngica en los tratamientos con agrolita, se colocó todo el material de un tubo en charolas de aluminio a peso constante. Posteriormente las charolas con biomasa se dejaron secar a 60°C durante 48 h y se registró el peso. La biomasa se estimó a través de la diferencia entre el peso de la agrolita inoculada con el hongo y la agrolita de un control abiótico.

5.7.2. Determinación del pH

El pH de los medios líquidos con diferentes concentraciones de una fuente soluble (Pb(NO₃)₂) y una insoluble (PbS) de plomo, se registró directamente en el medio al final

de cada experimento, con un potenciómetro (*Conductronic pH 130*), después de retirar la biomasa del hongo. El líquido de cada muestra se guardó en frascos de vidrio para su posterior análisis por EAA.

5.7.3. Análisis de plomo

5.7.3.1. Digestión ácida de biomasa

Para determinar el plomo acumulado en la biomasa fúngica o de *D. viscosa*, es necesario extraer el metal a través de una digestión ácida. Para lo anterior, las muestras de tejido se lavaron con EDTA (10 mM) para eliminar el Pb extracelular, se enjuagaron con agua desionizada y se secaron a 60°C hasta peso constante. Aproximadamente a 0.1 g de tejido se le adicionó 5 ml de HNO₃ concentrado y 4 mL de H₂O desionizada (*PURELAB Option-Q Elga*) y se digirió (~10 min) bajo presión en un digestor de microondas (*CEM, MARSXpress*). Una vez que la muestra se enfrió, se filtró con membranas de 0.45 µm (*GN-6 Metricell*) y se aforó a un volumen de 10 ml. con agua desionizada (18 MΩ cm⁻¹) para finalmente ser analizado por EAA.

5.7.3.2. Extracción de plomo soluble con agua meteórica

La extracción del plomo soluble en la agrolita se realizó empleando agua meteórica, de acuerdo con el procedimiento descrito en la NOM-147 SEMARNAT/SSA1-2004. Este procedimiento permite lixiviar la fracción soluble de metales pesados contenidos en un suelo mediante el uso de una solución extractante (agua meteórica). El agua meteórica (H₂O-CO₂) se preparó burbujeando aire en agua destilada durante 12 h, tiempo estimado para alcanzar un pH de 5.5 ± 0.2. Para la extracción, a la agrolita se le adicionó 10 ml de H₂O-CO₂ y se agitó a 120 rpm durante 24 h. La fase acuosa se separó de la agrolita por filtración (*Whatman 42*) y se utilizó para medir el pH y la fracción de plomo soluble por EAA.

5.7.3.3. Análisis de plomo por espectrometría de absorción atómica (EAA)

La cuantificación de Pb por EAA se realizó con las muestras líquidas obtenidas de la digestión ácida o directamente en los medios de cultivo filtrados. El análisis se llevó a cabo mediante el método de flama (FA), utilizando una longitud de onda de 283 nm, con una mezcla de gas de aire-acetileno (1.5-2 L/min) y una abertura del quemador de 0.5 nm. El equipo utilizado para el análisis de plomo fue un espectrofotómetro de absorción

atómica *Shimadzu* (modelo AA-6300). Las curvas patrón para la cuantificación de Pb se prepararon con agua desionizada, en un rango de 0 a 20 mg/l, con una solución estándar de 1000 µg Pb/ml (estándar grado absorción atómica, *J.T. Baker*).

5.7.4. Estimación de parámetros indicadores del potencial fitorremediador

Como parámetros indicadores del potencial fitorremediador de *D. viscosa* se estimó el índice de tolerancia (IT), el factor de translocación (FT) y el factor de bioconcentración (FBC). El IT Deng *et al.* (2004) se estimó con la siguiente relación:

$$IT (\%) = \frac{\text{Elongación de raíces en medio + metal} \times 100}{\text{Elongación de raíces en medio - metal}}$$

Para evaluar la capacidad de *D. viscosa* para translocar el plomo de las raíces a los tallos se calculó el factor de translocación (FT) de la siguiente manera:

$$\text{Factor de translocación (FT)} = \frac{[\text{Metal}] \text{ en parte aérea}}{[\text{Metal}] \text{ en raíces}}$$

El FT es una medida del transporte interno de un metal e indica la relación entre la concentración acumulada en la parte aérea y la raíz de una planta (Mattina *et al.*, 2003).

El factor de bioconcentración (FBC) (Audet y Charest, 2007) se utiliza para medir la capacidad de captación de un metal por una planta con relación a su concentración en el suelo, y está definido por:

$$FBC = \frac{[\text{Metal}] \text{ en planta}}{[\text{Metal}] \text{ en suelo}}$$

5.8. Análisis estadístico

Para probar las diferencias entre los tratamientos utilizados se realizaron pruebas de Tukey o t-student con una $p = 0.05$, utilizando el paquete estadístico NCSS.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Selección de cepas

6.1.1. Efecto del plomo en la producción de biomasa

La tolerancia a los metales pesados es una propiedad indispensable que deben presentar los microorganismos para que éstos puedan ser aplicados con fines de fitorremediación. En el presente estudio, dicha capacidad se evaluó midiendo el efecto del plomo sobre el crecimiento de seis cepas fúngicas, para lo cual se comparó la biomasa producida por cada cepa en medio sólido y líquido, en presencia y ausencia de una fuente soluble de plomo (Figuras 9 y 10).

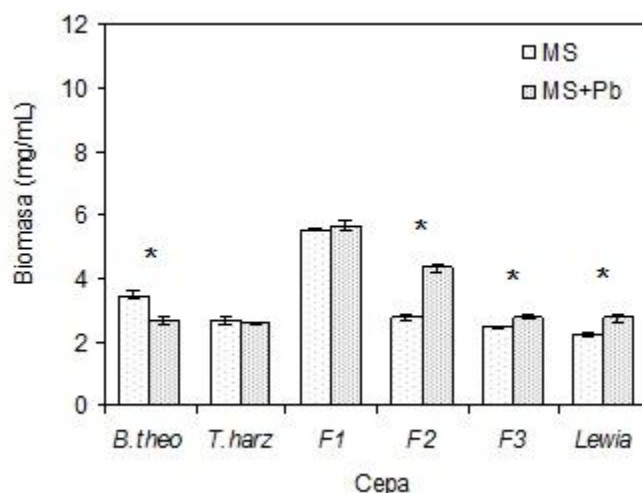


Figura 9. Diferencias en la producción de biomasa (mg/ml medio) de las cepas fúngicas estudiadas, por efecto del plomo en medio MS sólido. MS: medio MS; MS + Pb: medio con 100 mg Pb/l. *B. theo*: *B. theobromae*; *T. harz*: *T. harzianum*; F1, F2 y F3: cepas de *Fusarium* y *Lewia*: *Lewia* sp. Medias con * son significativamente diferentes (t-student, $\alpha = 0.05$).

De forma general, se observó que todas las cepas toleraron una concentración inicial de plomo soluble de 100 mg/l, tanto en medio sólido como en líquido. En el caso del medio sólido (Figura 9) sólo la cepa de *B. theobromae* presentó una disminución en la biomasa en presencia del metal; contrario a lo observado para las cepas 2 y 3 de *Fusarium* y para *Lewia* sp., en las cuales, la presencia del metal produjo un incremento en la biomasa con respecto al control. En las cepas de *T. harzianum* y *Fusarium 1* no se observaron cambios significativos en la biomasa por efecto del Pb. En estudios realizados por Al-kadeeb (2007) se demostró una limitada capacidad de diferentes cepas de los géneros *Fusarium* y *Alternaria* para tolerar altas concentraciones de plomo (mayores a 3000 ppm). Se encontró que en un medio sólido con 4000 ppm de $Pb(NO_3)_2$, el metal provocó una

disminución significativa (15 - 35%) de la producción de biomasa en *F. equiseti* (de 101 a 70.7 mg MS), *F. poae* (de 131 a 84.7 mg MS), *F. solanii* (de 143 a 90 mg MS) y *A. chlamydospora* (de 120 a 86 mg MS), con respecto a los respectivos controles sin metal.

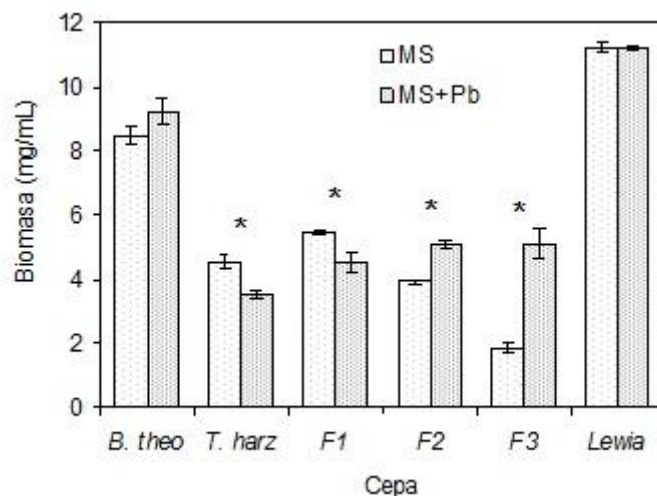


Figura 10. Diferencias en la producción de biomasa (mg/ml medio) de las cepas estudiadas, por efecto del plomo en medio MS líquido. MS: medio MS; MS + Pb: medio con 100 mg Pb/l. *B. theo*: *B. theobromae*; *T. harz*: *T. harzianum*; F1, F2 y F3: cepas de *Fusarium* y *Lewia*: *Lewia* sp. Medias con * son significativamente diferentes (t-student, $\alpha = 0.05$)

Por otra parte, en el medio líquido (Figura 10) se observó que el plomo tuvo un efecto negativo sobre la producción de biomasa para las cepas de *T. harzianum* y *Fusarium* 1, mientras que para las cepas 2 y 3 de *Fusarium*, el metal promovió una mayor producción de biomasa. De la misma manera que en el medio superficial (medio sólido), los cambios en el crecimiento de las diferentes cepas en presencia del metal podrían deberse a diferencias en los mecanismos de tolerancia, cuando éstas entran en contacto con el metal (Bellion *et al.* 2006). Sin embargo, en este caso, es muy importante considerar las diferencias en los tiempos de contacto con el Pb, que fueron de 7 días para *B. theobromae* y *T. harzianum*, y de 14 días para *Fusarium* 1, 2, 3 y *Lewia* sp., debido a las diferencias en la velocidad de crecimiento de cada cepa. Al respecto, existen estudios en donde se ha observado que diferentes tiempos de exposición a metales pesados pueden provocar diferencias en la producción de biomasa en hongos (Taboski *et al.* 2005). Sin embargo, a pesar de la diferencia en el tiempo de contacto, en *B. theobromae* y *Lewia* sp. no se observaron efectos sobre el crecimiento por la presencia de Pb en el medio.

Estos resultados sugieren la especificidad que existe en la respuesta de las diferentes cepas hacia la exposición al metal. Este mismo fenómeno fue observado en los estudios realizados por Taboski *et al.* (2005), quienes observaron diferencias en el crecimiento de dos cepas (*Corolospora lacera* y *Monodyctis pelágica*) por efecto de la presencia de 100 mg/l de cloruro de plomo en un medio líquido. Encontraron que después de 30 días de incubación, se produjo un aumento en la producción de biomasa en *C. lacera*, mientras que *M. pelágica* presentó una disminución en la biomasa con respecto a los controles sin metal. Este grupo también demostró que el tiempo de contacto entre el hongo y el metal fue determinante para el crecimiento de *C. lacera*, ya que cuando el hongo creció durante 15 días en presencia del metal, la biomasa disminuyó, mientras que con 30 días de exposición se observó un aumento en la variable.

Como puede apreciarse en las Figuras 9 y 10, de forma general, la cantidad de biomasa producida en medio líquido fue mayor que la obtenida en el medio superficial (sólido). Estas diferencias podrían estar relacionadas principalmente con las condiciones de cultivo en cada medio; ya que por ejemplo la velocidad de agitación usada en el medio líquido proporciona una mejor aireación y, por tanto, recambio de oxígeno que influye en el crecimiento de los hongos; además de que los nutrientes presentes en el medio líquido están más disponibles para el hongo que en el medio sólido.

En la literatura, hay autores (Celestino *et al.* 2005; Albany *et al.* 2006; Reyes, *et al.* 2008, Taboski *et al.* 2005) que relacionan las diferencias en el crecimiento y acumulación de plomo de los organismos con las propiedades del medio. De acuerdo con varios de estos estudios, la obtención de una mayor cantidad de biomasa en cultivos líquidos es consecuencia de una mayor disponibilidad de los nutrientes en el medio, a diferencia del medio sólido, donde los cationes de algunos minerales permanecen en posiciones fijas y por lo tanto se encuentran menos disponibles.

Por otra parte es importante considerar algunos factores externos como es el empleo del calor durante la separación de la biomasa fúngica del medio superficial; ya que de acuerdo con Reeslev y Kjoller (1995) quienes realizaron experimentos para determinar la efectividad de diferentes métodos para la recuperación y cuantificación de biomasa (peso seco) a partir de un medio de cultivo sólido, empleando diferentes cepas fúngicas como *Penicillium commune*, *Aureobasidium pullulans* y *Paecilomyces farinosus*; encontraron que el calentamiento que normalmente se aplica para separar la biomasa fúngica del agar

provocó una degradación térmica de la biomasa con respecto a otros métodos, registrándose un peso alrededor de 22% menor.

En la actualidad hace falta investigación que permita tener un mejor conocimiento sobre los mecanismos empleados por los hongos para tolerar y acumular plomo. Dentro de los estudios que han abordado este tema podemos citar el trabajo realizado por Valix y Loon (2002), quienes estudiaron el crecimiento de diferentes cepas fúngicas (*Aspergillus niger*, *Penicillium simplicissimum*, *A. foetidus* y *A. carbonarius*) en presencia de metales pesados como Ni, Co, Fe, Mg y Mn en concentraciones mayores a 2000 ppm. Estos investigadores señalan que el patrón de crecimiento de muchos hongos al entrar en contacto con metales pesados comprende 5 etapas (en orden cronológico): a) fase lag de crecimiento cuando éstos son inoculados; b) una primera etapa de crecimiento rápido inferior a la cepa no expuesta al metal; c) una etapa de inhibición y decaimiento del crecimiento; d) una etapa adaptativa, en donde la tasa de crecimiento del hongo expuesto al metal y la cepa control se nivela; y e) una segunda fase de crecimiento rápido. De acuerdo con estos autores, la tolerancia a la presencia de metales pesados en muchos hongos se desarrolla durante las etapas c y d de crecimiento. En dicho estudio se encontró que especies tolerantes a metales, como *A. niger*, *P. simplicissimum* y *A. foetidus*, presentaron una corta etapa de inhibición del crecimiento (etapa c), seguida de una tasa de crecimiento superior al control en las etapas d y e. Es posible que este comportamiento adaptativo desarrollado por hongos tolerantes tenga relación con los resultados obtenidos en este trabajo, donde se observó que algunas cepas presentaron una mayor producción de biomasa cuando fueron expuestas a plomo que en ausencia del metal.

6.1.2. Acumulación de plomo en biomasa

La capacidad de acumulación de plomo por las diferentes cepas fúngicas en medio MS sólido y líquido se evaluó a los 7 (*B. theobromae* y *T. harzianum*) y 14 días (*Fusarium* 1, 2, 3 y *Lewia* sp.) de incubación (Figura 11).

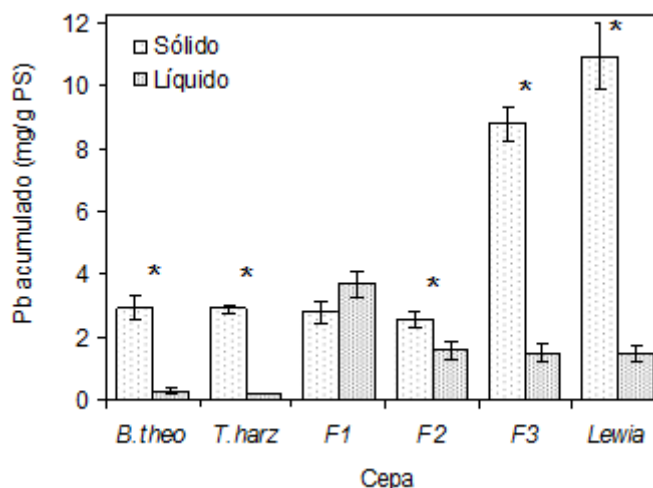


Figura 11. Acumulación de Pb por cepas de hongos filamentosos crecidas durante 7 (*B. theo* y *T. harz*) y 14 días (F1, F2, F3 y *Lewia* sp.) en medio MS sólido y líquido con 100 mg Pb/l. Medias con * son significativamente diferentes (t-student, $\alpha=0.05$)

En general, se observó mayor acumulación de Pb en el medio sólido que en el medio líquido (Figura 11 y Tabla 5). Este es un fenómeno que se presenta comúnmente en este tipo de estudios; sin embargo, los mecanismos que pueden explicarlo aún no son bien claros. Es posible que las diferencias en la acumulación entre los diferentes medios se deban a que el crecimiento en medio líquido ocurrió en forma de pellets, lo que impide que toda la biomasa producida entre en contacto con el metal disuelto en el medio; mientras que en el medio sólido, al haber crecimiento sobre toda la superficie del medio, existe una mayor área de contacto entre la biomasa del hongo y el metal (Ritz, 1995). Este mismo fenómeno fue observado por Taboski *et al.* (2005), quienes encontraron una correlación negativa (-0.97) entre la producción de biomasa y la acumulación de plomo por *Corolospira lacera* y *Monodyctis pelagica* en un medio líquido.

Tabla 5. Capacidad de acumulación de plomo por las cepas en estudio

Cepa	Acumulación de plomo (%) ^a	
	Líquido	Sólido
<i>B. theobromae</i>	2.76 ± 0.90	9.13 ± 1.03
<i>T. harzianum</i>	0.65 ± 0.05	8.69 ± 0.43
<i>Fusarium</i> sp. (F1)	16.67 ± 2.05	18.45 ± 2.21
<i>Fusarium</i> sp. (F2)	7.95 ± 1.50	12.85 ± 1.45
<i>Fusarium</i> sp. (F3)	7.43 ± 0.99	28.42 ± 1.18
<i>Lewia</i> sp.	16.41 ± 2.70	35.07 ± 3.19

^aSe refiere al porcentaje de plomo acumulado con respecto al inicial en el medio (100 mg Pb/l).

La cepa F3 del género *Fusarium* y la cepa del género *Lewia* presentaron una mayor acumulación de plomo en biomasa en el medio sólido (> 28% del Pb inicial), con respecto al resto de las cepas evaluadas, cuando se incubaron en presencia de una fuente soluble de plomo ($Pb(NO_3)_2$). Cabe resaltar la alta capacidad de biosorción de Pb por *Lewia* sp. tanto en medio sólido como en medio líquido (Tabla 5). En contraste, *T. harzianum* fue la cepa que presentó la menor capacidad de acumulación del metal.

6.1.3. Interacción con *D. viscosa*

La capacidad de interacción entre cada cepa fúngica y *D. viscosa* se evaluó después de 30 días de incubación, de ambos organismos juntos, en medio MS sólido sin plomo. Dicha capacidad, se determinó a través de una prueba cualitativa (visual) y una cuantitativa. En la Figura 12 se muestra el efecto cualitativo de las cepas sobre el crecimiento de *D. viscosa*.



Figura 12. Crecimiento de plantas de *D. viscosa* inoculadas con *B. theobromae*, *T. harzianum*, *Fusarium* 1 y *Lewia* sp. después de 30 días de incubación. La planta control corresponde a una planta sin inóculo. La prueba se realizó en medio MS sólido; las plántulas se inocularon con cada cepa 15 días después de la germinación.

A través de una inspección visual (Figura 12) se observó que, de las 6 cepas iniciales, las de *Fusarium* 2 y 3 dañaron a la planta hasta matarla antes de finalizar el experimento (30 días), por lo que se descartaron para pruebas posteriores. No obstante, de las cuatro cepas restantes, sólo la de *Lewia* sp. promovió un mayor crecimiento de *D. viscosa*, en comparación con plantas sin inóculo (control). Los resultados anteriores se corroboraron

de manera cuantitativa, a través de la cuantificación de la producción de biomasa y la elongación de brotes y raíces de *D. viscosa* (Tabla 6).

Cuando *D. viscosa* creció en presencia de las cepas de *Fusarium* (F1) y *Lewia* sp. se registró un aumento significativo en su crecimiento, con respecto a las plantas crecidas en ausencia de microorganismos. Sin embargo, a pesar del efecto positivo en la producción de biomasa y elongación de raíces en *D. viscosa* por efecto de *Fusarium* sp., la planta presentó también signos de clorosis. La cepa de *Lewia* sp. destacó por su efecto positivo en el crecimiento de la planta, registrando hasta 39 y 12 unidades más en la biomasa de brotes y raíces, respectivamente y hasta 18 unidades más en la elongación de raíces, con respecto a las plantas control. En contraste, *B. theobromae* y *T. harzianum*, además de clorosis (Figura 12), provocaron una disminución significativa en el crecimiento de *D. viscosa* (Tabla 6).

Los resultados contrastan con los reportados por Sell *et al.* (2005), quienes no encontraron diferencias significativas en el crecimiento de *Salix viminalis* por efecto de la inoculación con diferentes cepas de hongos ectomicorrícicos (*Pisolithus tinctorius*, *Paxillus involutus*, *Hebeloma crustuliniforme*).

Tabla 6. Efecto de la inoculación de *B. theobromae*, *T. harzianum*, *Fusarium* 1 y *Lewia* sp. sobre la producción de biomasa (peso seco [PS]) y la elongación de tallos y raíces de *D. viscosa* después de 30 días de contacto en medio MS sólido.

Cepa	Biomasa (mg PS)		Elongación (cm)	
	Brotes	Raíces	Brotes	Raíces
Control	28.6 ± 6.1 ^a	3.1 ± 0.5 ^a	59.4 ± 4.6 ^c	58.4 ± 7.8 ^a
<i>B. theobromae</i>	27.0 ± 8.7 ^a	3.1 ± 0.4 ^a	42.6 ± 2.6 ^a	57.0 ± 3.7 ^a
<i>T. harzianum</i>	19.0 ± 6.2 ^a	3.5 ± 0.8 ^a	49.6 ± 3.7 ^{ab}	60.0 ± 6.9 ^a
<i>Fusarium</i> sp. (F1)	60.5 ± 7.5 ^b	7.4 ± 1.9 ^b	54.2 ± 5.0 ^{bc}	55.8 ± 10.2 ^a
<i>Lewia</i> sp.	67.2 ± 11.4 ^b	14.6 ± 2.7 ^b	60.2 ± 5.3 ^c	76.2 ± 6.0 ^b

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey $\alpha = 0.05$)

Los efectos benéficos de diversos microorganismos, como los hongos micorrícicos y ciertas bacterias, en la salud de las plantas son bien conocidos; sin embargo, el efecto que producen muchos hongos endófitos de la división *Ascomycota* (como son los géneros *Fusarium* y *Lewia*) sobre el crecimiento vegetal, es aún incierto. Lo anterior se atribuye a que estos hongos presentan un ciclo de vida asexual en el cual, generalmente, se establece una simbiosis mutualista con la planta que funciona como hospedera. No

obstante, también pueden presentar un ciclo sexual que puede llegar a ser parasítico para algunas especies de plantas con las que interactúan (Morales y Rodríguez, 2006). Por ejemplo, Muller y Krauss (2005) encontraron que una cepa del género *Ephicloe*, que tiene una forma sexual parasítica en pastos, se asoció de manera benéfica con *Lolium perenne* en su forma asexual (*Neotyphodium*). Estas diferencias en el comportamiento de muchos hongos endófitos pertenecientes a esta división revela que al parecer son más específicos al elegir a una planta hospedera para asociarse de forma benéfica. Esto podría explicar el hecho de que sólo una de las cepas evaluadas produjo efectos positivos en el crecimiento de *D. viscosa* con respecto al control, en donde además, se observaron diferencias en la forma de interacción aún en especies pertenecientes al mismo género (*Fusarium*).

Con base en los resultados anteriores, se seleccionó la cepa de *Lewia* sp. para el resto de los estudios en interacción con *D. viscosa*. Con el fin de determinar el tipo de asociación entre *D. viscosa* y *Lewia* sp. se realizó una inspección microscópica de las raíces de la planta creciendo durante 30 días con el hongo (Figura 13).

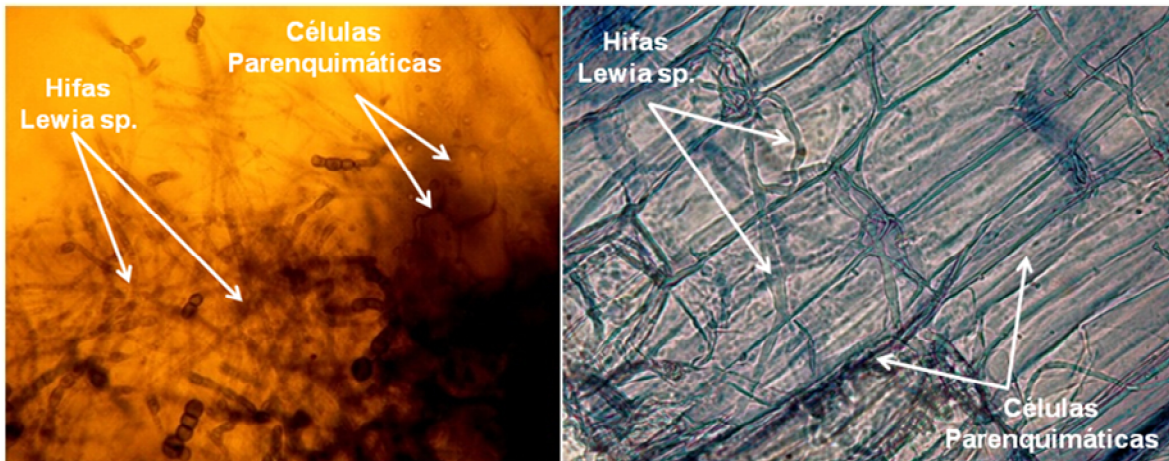


Figura 13. Corte transversal (izquierda) y longitudinal (derecha) de raíz de *D. viscosa* inoculada con la cepa *Lewia* sp. después de 30 días de contacto.

Como puede observarse en la Figura 13, los cortes realizados en la raíz de *D. viscosa* demostraron el contacto entre las hifas de *Lewia* sp. y las células parenquimáticas de la raíz de *D. viscosa*. Este hecho demuestra que existe una asociación entre ambas especies, lo que sugiere que las hifas del hongo pueden favorecer el transporte de agua y nutrientes a partir del medio hacia la raíz de las plantas. Una de las funciones que desempeña el parénquima de reserva en las raíces de una planta se relaciona con el almacén de nutrientes (Salisbury, 1968; Fawcett, 1995; Espíndola, 2004).

6.2. Crecimiento y biosorción de plomo por *Lewia sp.* en medio líquido

La exposición a metales pesados puede resultar tóxica para muchos organismos del suelo. A este respecto, se sabe que el grado de toxicidad de ciertos metales depende de la forma iónica del elemento y de su biodisponibilidad en el suelo (Bellion *et al.* 2006; Schwab *et al.* 2008). Con base en lo anterior, durante este trabajo se evaluó el efecto de dos sales de plomo con solubilidades distintas y, por lo tanto, con diferencias en cuanto a su toxicidad, sobre el crecimiento y acumulación (biosorción) por *Lewia sp.* Para lo anterior, se utilizaron diferentes concentraciones de dos sales de plomo, una soluble ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, con una solubilidad de 38.8 g en 100 g de agua (0°C)) y una insoluble (PbS , con solubilidad de 0.00009 g en 100 g de agua (18°C)) (Liley *et al.* 1997). El hongo se incubó durante 10 días en medio MS líquido en presencia de cada fuente de plomo.

6.2.1. Efecto de la fuente y concentración de plomo en el crecimiento

Se encontró que concentraciones crecientes de plomo soluble ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) tuvieron un efecto negativo sobre la producción de biomasa, registrándose entre 13 y 46 unidades menos (para concentraciones iniciales de 250 y 500 mg Pb/l respectivamente) con respecto a la biomasa en el control sin plomo (Figura 14). Sin embargo, cuando el metal se agregó en forma insoluble, como PbS , se observó un aumento (más de 10 unidades) en el peso seco de la biomasa del hongo (Figura 14).

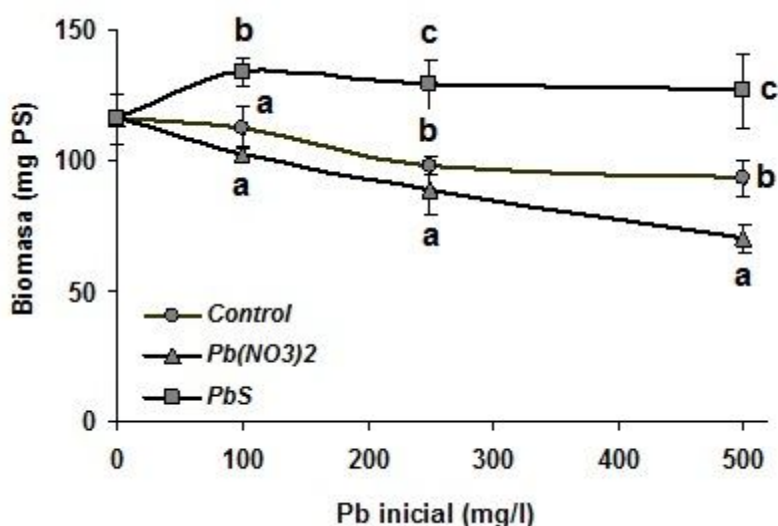


Figura 14. Efecto de la fuente y la concentración de Pb sobre la biomasa (peso seco) de *Lewia sp.* Medio MS líquido con y sin plomo (100, 250 y 500 mg Pb/l) en forma soluble ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) e insoluble (PbS). Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey $\alpha = 0.05$)

El resultado encontrado puede relacionarse con la especiación del plomo en el medio, es decir, la forma química en que éste se encuentra, ya que una forma más soluble de plomo (como lo es el $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) incrementa la toxicidad de un metal. Así, la toxicidad de un metal se encuentra controlada por la concentración de la(s) forma(s) disponible(s) y no por la concentración total del metal. En otras palabras, la biodisponibilidad y la toxicidad dependen de la concentración de las diferentes formas fisicoquímicas (especiación) (Greger, 2004).

Con base en lo anterior, y considerando el efecto negativo del nitrato de plomo sobre la producción de biomasa por *Lewia sp.*, la cepa creció aún en el medio con la mayor concentración de plomo; este resultado sugiere que el hongo tolera altas concentraciones solubles del metal. De forma similar, Ott *et al.* (2002), encontraron que *Paxillus involutus* sobrevivió a diferentes concentraciones (superiores a 150 mg/l) de Cd. Este grupo atribuyó tal respuesta a la activación de un mecanismo de detoxificación en el cual, el metal pudo haber sido transportado rápidamente hacia la vacuola, lo cual fue también asociado con un aumento en la síntesis de glutatión. Así mismo, Martin *et al.* (1994), reportaron la inmovilización de Al por *Laccaria bicolor* a través de la formación de complejos entre el metal con polifosfatos o péptidos como las metalotioneinas en la vacuola.

6.2.2. Modificación del pH en el medio por *Lewia sp.*

La biodisponibilidad de los metales pesados depende de factores abióticos, como el pH, su concentración y la forma en que se encuentra el elemento en el suelo (Bellion *et al.* 2006; Schwab *et al.* 2008). En el ambiente planta-suelo, la biodisponibilidad del plomo generalmente se interpreta como la fracción de la concentración total del metal que interactúa con las raíces de las plantas. En la rizósfera, existe una serie de compuestos, como los ácidos orgánicos, entre muchos otros, que pueden modificar sustancialmente la especiación de un metal y, en consecuencia, su biodisponibilidad (Geebelen *et al.* 2003). Los factores más importantes que controlan la especiación de un metal son: (i) el pH; (ii) materia orgánica; (iii) tipo y contenido de arcillas; (iv) presencia y naturaleza de óxidos e hidróxidos de Fe, Mn y Al; (v) potencial redox; (vi) concentración de sales y agentes acomplejantes; y (vii) contenido de aniones y cationes. Un patrón general en un medio líquido, es que a valores bajos de pH, los iones metálicos se encuentran normalmente libres, mientras que a valores altos, éstos precipitan en forma de carbonatos, óxidos, hidróxidos e, incluso silicatos (Hursthouse, 2001; Greger, 2004). En el caso particular del

Pb, la fracción del metal extraíble en EDTA (Pb soluble) aumenta conforme el pH de la solución disminuye. En un suelo, valores de pH arriba de 7.5 disminuyen la solubilidad del Pb mientras que valores debajo de 5.5 la aumentan (Blaylock *et al.*, 1997).

Con base en lo anterior, en el presente estudio se evaluó la capacidad de *Lewia* sp. para modificar el pH del medio al final del periodo de incubación (10 días). En la Figura 15 se muestra el efecto del crecimiento de *Lewia* sp. sobre el valor final de pH en función de la concentración y la fuente de plomo. Se encontró que en el medio con plomo insoluble (PbS), *Lewia* sp. provocó una disminución en el pH (casi 2 unidades) del medio con respecto al control sin plomo. Este resultado en el pH, podría atribuirse al hecho de que entre los hongos existen mecanismos extra e intracelulares que se relacionan con su capacidad para tolerar y acumular metales pesados. Entre estos mecanismos, se encuentra la producción de ácidos orgánicos (como el ácido cítrico y málico) que reducen el pH en el medio y, como consecuencia, incrementan la movilidad de los metales por la formación de complejos solubles (Bellion *et al.* 2006; Schwab *et al.* 2008).

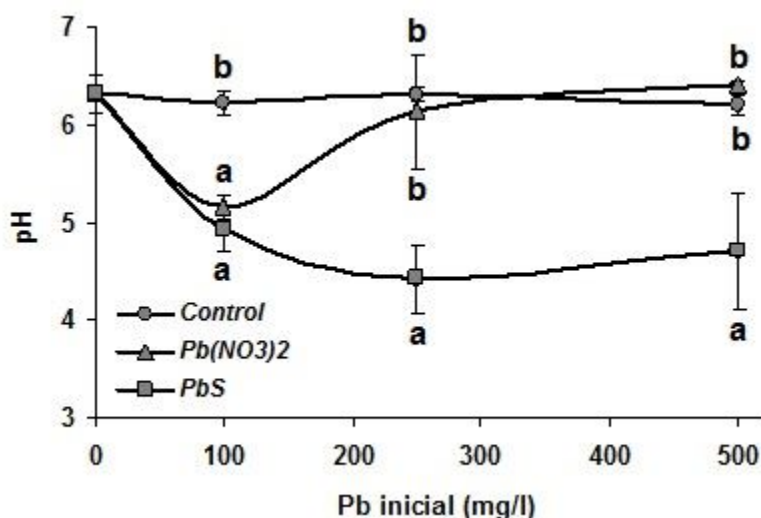


Figura 15. Efecto de la fuente y la concentración de Pb sobre el pH del medio MS líquido, después de 10 días de incubación con *Lewia* sp. El pH inicial del medio fue ajustado a 5.7. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey $\alpha = 0.05$)

En el suelo, la liberación de compuestos orgánicos por las raíces de plantas y por microorganismos puede influenciar la solubilidad de iones y la captación de los mismos, a través de efectos indirectos sobre la actividad microbiana, y la dinámica de crecimiento de las raíces, y por efectos directos a través de la acidificación, quelación, precipitación y reacciones de oxido-reducción. La producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular

son de particular importancia en la movilización de metales, debido a sus propiedades para quelarlos y acomplejarlos. Los iones hidrógeno liberados por los grupos carboxílicos juegan un papel principal en la disolución de metales (Yang *et al.* 2006).

Por ejemplo, Marschner (1991) observó que puede existir una fuerte acidificación en las raíces de plantas asociadas a hongos ectomicorrícicos durante la absorción de amonio; en donde la presencia de este tipo de hongos puede jugar un papel importante al modificar los patrones de translocación de cationes y aniones, incluyendo los metales, tanto en la rizósfera como en la micorrizósfera. Yang *et al.* (2006) estudiaron la desorción de plomo en dos suelos por efecto del pH y la adición de ácidos orgánicos. Ellos encontraron que los ácidos cítrico y acético (0.1 mM) mejoraron la desorción de Pb^{2+} , seguidos por el ácido málico y el oxálico. El pH fue un importante factor en el control de la desorción de Pb^{2+} ; un ambiente ácido (pH < 5) favoreció la desorción del metal.

6.2.3. Acumulación de plomo en biomasa (biosorción)

Muchos de los mecanismos por los cuales los hongos pueden acumular metales como el Pb en su biomasa aún no son totalmente claros, pero se sabe que puede ocurrir a través de mecanismos pasivos, por el secuestro en biomasa (incluso muerta), o activos, por la actividad metabólica del hongo (Valix y Loon, 2003; Bellion *et al.* 2006). A pesar de que existe un conocimiento limitado sobre estos mecanismos, estos pueden ocurrir por la combinación de factores como el intercambio iónico, complejación, coordinación, adsorción, interacciones electrostáticas, quelación y microprecipitación (Wang y Chen, 2008)

En el presente estudio se encontró que la forma en la que el plomo se encuentra en el medio (soluble o insoluble) tuvo un mínimo efecto en su acumulación en biomasa de *Lewia* sp. (Figura 16).

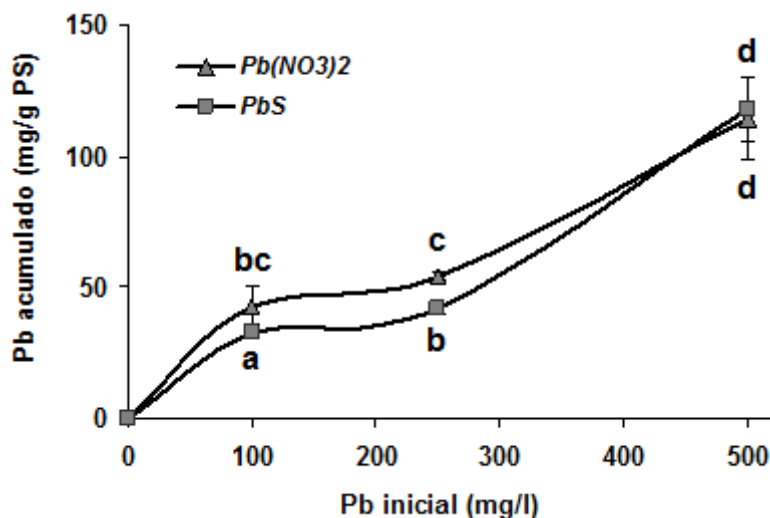


Figura 16. Acumulación de plomo en biomasa de *Lewia* sp. en función de la concentración inicial y de la fuente de Pb: soluble ($Pb(NO_3)_2$) e insoluble (PbS). La cepa se incubó por 10 días en medio MS líquido. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey $\alpha = 0.05$)

La acumulación de Pb en biomasa (biosorción) de *Lewia* sp. en medio líquido aumentó con la concentración de la fuente, alcanzando valores de 114 ± 16 y 118 ± 12 mg Pb/g de biomasa (peso seco) para el $Pb(NO_3)_2$ y el PbS , respectivamente. Con concentraciones de 100 y 250 mg Pb/l, la sorción de Pb a partir de la sal insoluble (PbS) disminuyó ligeramente con respecto a la acumulación con la fuente soluble ($Pb(NO_3)_2$). Este resultado puede atribuirse en cierto grado a la diferencia en la solubilidad entre las dos sales de plomo, lo cual afecta su biodisponibilidad y, por lo tanto, la capacidad para ser acumulado en biomasa. No obstante a pesar de las diferencias en solubilidad presentadas por estas dos fuentes de plomo es importante mencionar que en el presente estudio se observó que también la sal insoluble de plomo (PbS) fue acumulado de forma sobresaliente por el hongo, detectando que parte de este quedó atrapado en la biomasa (en su estado insoluble) como puede observarse en la figura 17.



Figura 17. Adsorción de plomo insoluble (PbS) en biomasa de *Lewia sp.*

Es importante resaltar que *Lewia sp.* tiene una alta capacidad de biosorción de Pb, llegando a valores superiores a 100 mg Pb/g biomasa (BM) seca. En varios reportes se ha comparado la capacidad de biosorción de diversos hongos (*A. bisporus*, 33.8 mg Pb/g BM; *S. cerevisiae*, 15.6 mg Pb/g BM, *Mucor rouxii*, 25.2 mg Pb/g BM; *Cephalosporium aphidicola*, 36.9 mg Pb/g BM), encontrando un rango de valores entre 15 (*Rhizopus arrhizus*) y 77 (*Phanerochaete chrysosporium*) mg Pb/g BM (Bahadir et al. 2007; Vimala y Das, 2009). Los valores de sorción más bajos obtenidos en nuestro trabajo fueron de 43.0 y 32.4 mg Pb/g BM, para una concentración inicial de 100 mg Pb/l, adicionado como $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y PbS respectivamente.

Como se mencionó, la acumulación en la biomasa de los hongos puede ocurrir de forma activa o pasiva; esta última a través de la adsorción del metal en biomasa muerta (por adhesión a ciertos compuestos de la quitina que compone la pared celular de muchos hongos); sin embargo en el caso de *Lewia sp.* se comprobó que el principal mecanismo de sorción de plomo empleado es activo. En un estudio realizado por López-Pérez (2009) para evaluar la sorción de plomo soluble e insoluble con biomasa muerta de *Lewia sp.* se demostró que la biomasa muerta del hongo acumuló tanto el plomo soluble (12 mg/g PS) como el insoluble (11 mg/g PS) presente en el medio (concentración inicial de 100 mg Pb/l) después de 4 días de contacto (Figura 18). Estos valores representan sólo 18 y 28 % de plomo acumulado en biomasa viva para ambas fuentes de plomo empleadas, lo que sugiere que el mecanismo principal de acumulación en esta cepa, es activo.

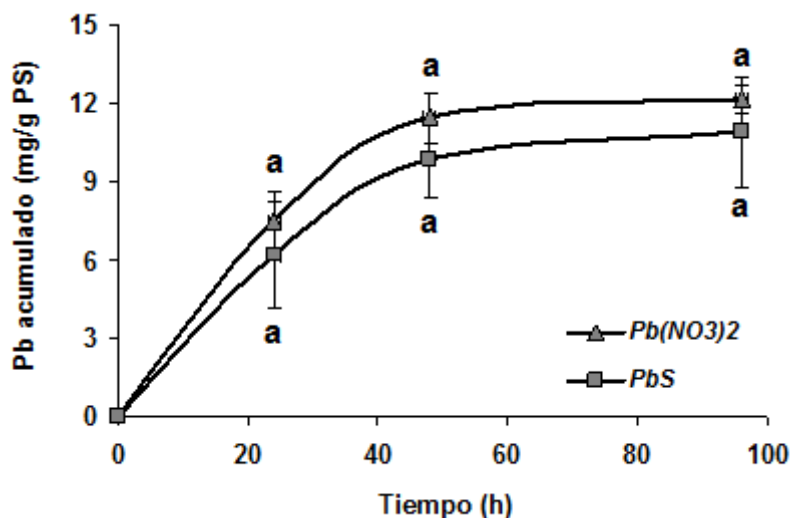


Figura 18. Biosorción de plomo en biomasa muerta de *Lewia* sp. en función del tiempo de contacto del hongo con el metal y de la fuente de Pb: soluble ($Pb(NO_3)_2$) e insoluble (PbS). La concentración inicial del metal en el medio fue de 100 mg Pb/l. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (t-student $\alpha = 0.05$). (López-Pérez, 2009).

Si bien los periodos de contacto empleados en ambos experimentos son diferentes (4 días para la biomasa muerta y 10 días en la biomasa viva), está demostrado que la sorción de los metales pesados en biomasa de hongos se realiza durante las primeras 48 h de contacto, por lo cual no se esperaría encontrar grandes diferencias después de dicho periodo.

Como puede observarse, en materia de biosorción falta mucha investigación que permita entender con mayor claridad cuales son los principales mecanismos que ocurren en los hongos para acumular metales pesados. Es por ello que en el capítulo 8 del presente trabajo se presentan algunas recomendaciones para realizar estudios posteriores de biosorción que puedan fortalecer y ayudar a explicar de mejor manera los resultados presentados aquí.

6.3. Estudios de fitorremediación de plomo en un suelo modelo

Dentro de la naturaleza, cerca del 90 % de las plantas vasculares se encuentra formando algún tipo de asociación con otros organismos presentes en el suelo. Esto es importante debido a que los hongos saprófitos se encuentran dentro de este grupo de organismos y, desde hace algunos años, se ha observado que este tipo de relación hongo-planta cumple

funciones interesantes en el establecimiento y supervivencia de las plantas que crecen sobre suelos contaminados.

Con el fin de determinar el efecto de un hongo saprófito, como lo es *Lewia* sp., sobre la acumulación de Pb y el crecimiento de *D. viscosa*, se utilizó un suelo modelo (agrolita) adicionado con medio MS líquido con sacarosa (10 g/l) y plomo (250 mg Pb/l) en forma soluble ($(\text{PbNO}_3)_2$) o insoluble (PbS). Para determinar el efecto de la asociación, se determinó también el crecimiento y acumulación de Pb por la planta en ausencia del hongo y por el hongo solo. A continuación se presentan los resultados obtenidos.

6.3.1. Crecimiento de *Lewia* sp.

La solubilidad de la fuente de plomo tuvo un efecto significativo en el peso de la biomasa fúngica, encontrándose un aumento (2.8 y 1.8 veces, respectivamente) en presencia de plomo soluble e insoluble, con respecto al medio sin metal (Figura 19).

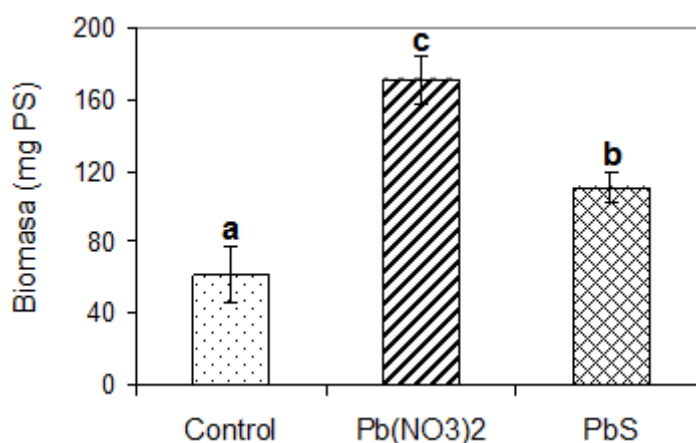


Figura 19. Producción de biomasa de *Lewia* sp. creciendo en un suelo modelo con medio MS en ausencia (control) y presencia de 250 mg Pb/l en forma soluble ($(\text{PbNO}_3)_2$) e insoluble (PbS). Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey $\alpha = 0.05$)

Es importante resaltar que aunque la concentración de Pb usada en este ensayo provocó una disminución en el crecimiento en medio líquido, el uso de un soporte sólido disminuye el efecto tóxico del metal, debido a su sorción en los poros de la agrolita, disminuyendo así su biodisponibilidad. Lo anterior se demostró a través de la cuantificación de la fracción soluble de plomo (Tabla 7). Se encontró que, por efecto del crecimiento de *Lewia* sp. durante 35 días, la fracción soluble de plomo (cuantificada de acuerdo a la NOM-147 SEMARNAT/SSA1-2004) en la agrolita aumentó, tanto para el $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ como para el PbS. Sin embargo, en ningún caso la fracción soluble fue mayor de 5%.

Si bien hasta ahora se desconoce cual es el mecanismo presente en los hongos que explica este mayor crecimiento de *Lewia sp.* en presencia de plomo, los resultados obtenidos en este trabajo indican que esta cepa puede tolerar y acumular e, incluso, solubilizar el plomo presente en el medio. Se ha reportado que muchos hongos pueden alterar la solubilidad de metales a través de la excreción de ácidos orgánicos, la cual se encuentra fuertemente influenciada por la presencia de minerales de metales tóxicos (Gadd, 2007), como es el caso del PbS. Este resultado puede estar relacionado con la disminución (>1 unidad) en el pH registrada particularmente en presencia de PbS (Figura 15). Los ácidos orgánicos pueden aumentar la movilidad de metales en el suelo a través de la reducción del pH y la formación de complejos con metales pesados (Schwab *et al.* 2008).

Tabla 7. Fracción soluble de plomo en la agrolita antes y después del crecimiento de *Lewia sp.* durante 35 días*.

Fuente de Pb	Fracción soluble (mg Pb/l)		Fracción soluble (%)	
	Abiótico	<i>Lewia sp.</i>	Abiótico	<i>Lewia sp.</i>
Pb(NO₃)₂	0.83 ± 0.10	3.39 ± 0.15	1.06 ± 0.13	4.31 ± 0.19
PbS	0.82 ± 0.06	1.88 ± 0.48	1.04 ± 0.08	2.40 ± 0.61

* La agrolita contenía una concentración inicial de 250 mg Pb/kg (PS), en forma soluble (Pb(NO₃)₂) e insoluble (PbS).

6.3.2. Crecimiento de *D. viscosa* en asociación con *Lewia sp.*

Se determinó el efecto de la asociación de *D. viscosa* y *Lewia sp.* sobre el crecimiento de la planta (biomasa y elongación de tallos y raíces) en un suelo modelo (agrolita) con 250 mg Pb/l de forma soluble (Pb(NO₃)₂) e insoluble (PbS) después de 35 días. En general, no se encontraron diferencias significativas en la producción de biomasa ni en la elongación de tallos y raíces de la planta por efecto del hongo ni por la presencia de plomo (Tabla 8). Sin embargo, la fuente insoluble de plomo (PbS) estimuló significativamente la elongación de tallos en la planta crecida sin el hongo con respecto al control (sin plomo).

Tabla 8. Efecto de la asociación de *D. viscosa* y *Lewia* sp. sobre el crecimiento de la planta en un suelo modelo (agrolita) con 250 mg Pb/l en forma soluble ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) e insoluble (PbS) después de 35 días de incubación (*).

Tratamiento	Biomasa total (mg PS)	Elongación (mm)		
		Tallos	Raíces	
<i>D. viscosa</i>	Control	30.5 ± 4.6 ^{ab}	79.5 ± 7.2 ^a	79.3 ± 7.9 ^{ab}
	$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	28.6 ± 4.7 ^a	80.7 ± 9.8 ^a	77.9 ± 12.2 ^{ab}
	PbS	25.2 ± 2.5 ^a	101.1 ± 9.6 ^b	97.9 ± 23.4 ^b
<i>D. viscosa</i> - <i>Lewia</i> sp.	Control	35 ± 5.8 ^b	78.1 ± 6.3 ^a	65.0 ± 12.6 ^a
	$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	26.2 ± 3.5 ^a	70.3 ± 14.5 ^a	57.4 ± 18.2 ^a
	PbS	26.4 ± 2.7 ^a	72.9 ± 7.0 ^a	77.9 ± 12.2 ^{ab}

*Medias con la misma letra en columnas no son significativamente diferentes (Tukey $\alpha=0.05$)

Una respuesta similar fue observada por Arriagada *et al.* (2007), quienes tampoco encontraron diferencias significativas en la producción de biomasa por *Eucalyptus globulus* por efecto de la inoculación con 2 cepas de hongos saprófitos (*Trichoderma koningii* y *Fusarium concolor*) en presencia o ausencia de aluminio (150 mg/kg), considerado un metal nocivo para las plantas.

Así mismo se calculó el índice de tolerancia presente en *D. viscosa* (Tabla 9) el cual es un indicador de la capacidad que tiene esta especie para crecer en lugares contaminados con metales. Este índice nos permitió observar cual fue la respuesta del crecimiento de las raíces de *D. viscosa* en el medio con plomo (medido a través de su elongación) respecto al crecimiento de las plantas en el medio de cultivo sin el metal. De acuerdo con Deng *et al.* (2004) un IT < 100 indica una disminución neta del crecimiento y sugiere estrés en la planta; un IT ~100 indica que no hay efecto en el crecimiento por la presencia del metal; mientras que un IT > 100 revela un aumento neto en el crecimiento y sugiere que la planta expresa un efecto de dilución por crecimiento. Dicho efecto ocurre cuando el crecimiento de la planta es más rápido en presencia del metal, lo que resulta en un aumento desproporcionado en la tasa neta de aumento de biomasa relativo a la absorción del contaminante.

Como resultado de estos experimentos no se observaron diferencias significativas en el índice de tolerancia por efecto de la fuente de plomo en las plantas de *D. viscosa* en presencia o ausencia de *Lewia* sp (Tabla 9). Si bien se observaron índices de tolerancia menores a 100 cuando *D. viscosa* se inoculó con la cepa de *Lewia* sp. en presencia o ausencia de una fuente de plomo soluble e insoluble, las diferencias no fueron

significativas con respecto al resto de los tratamientos empleados. Esta respuesta puede atribuirse a un aumento en la densidad aparente (relación peso/longitud) de las raíces por efecto de la acción del hongo (Tabla 9). Los resultados mostrados aquí nos sugieren que *Lewia sp.* es una cepa con características interesantes que podría ser utilizada con fines de fitorremediación debido a favorece el crecimiento de esta planta en particular bajo condiciones adversas .

Tabla 9. Índice de Tolerancia y densidad aparente (r) de raíces de *D. viscosa* en presencia o ausencia de *Lewia sp.* con y sin 250 mg/l de plomo soluble e insoluble.

Tratamiento	IT %		r (mg/cm)	
	P	P+H	P	P+H
Control	100.0 ± 9.9 ^a	85.1 ± 14.8 ^a	0.45 ± 0.08 ^a	0.70 ± 0.03 ^b
Pb(NO ₃) ₂	103.0 ± 9.5 ^a	77.8 ± 19.8 ^a	0.59 ± 0.11 ^a	0.58 ± 0.08 ^a
PbS	109.7 ± 21.7 ^a	98.2 ± 15.4 ^a	0.36 ± 0.03 ^a	0.57 ± 0.04 ^b

*Medias con la misma letra en filas no son significativamente diferentes (t-student $\alpha = 0.05$)

6.3.3. Acumulación de plomo por la asociación *D. viscosa* – *Lewia sp.*

Al evaluar el efecto de la asociación de *D. viscosa* con *Lewia sp.* sobre la capacidad de la planta para acumular plomo a partir de sales con diferente solubilidad, se encontró un aumento muy significativo (más del doble) en la fitoacumulación del metal por la asociación planta-hongo, en relación a la planta sola (Figura 20).

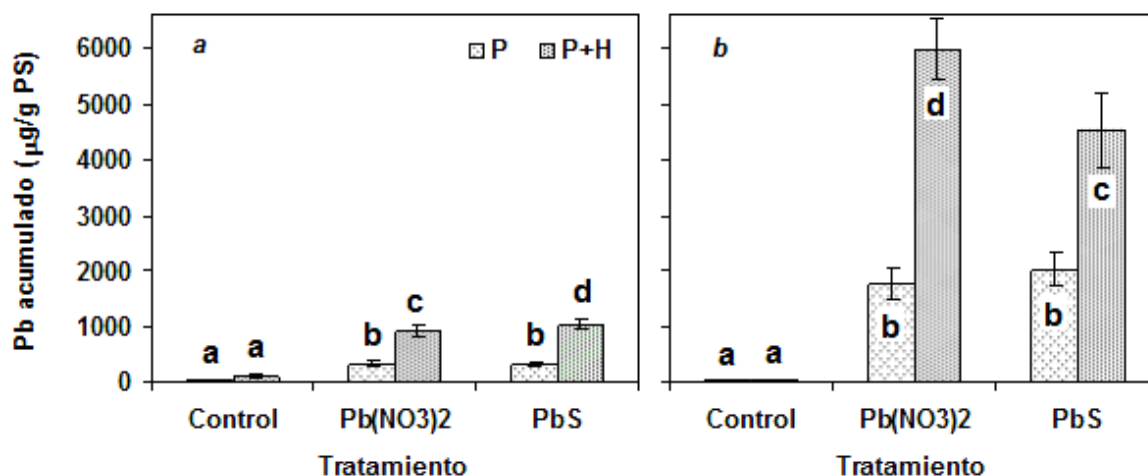


Figura 20. Acumulación de plomo en tallos (a) y raíces (b) de *D. viscosa* crecida sola (P) o en asociación con *Lewia sp.* (P+H) en un suelo modelo con medio MS con 250 mg Pb/l soluble ((PbNO₃)₂) o insoluble (PbS). Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey $\alpha = 0.05$).

Bajo las condiciones ensayadas, no hubo efectos significativos en la acumulación de Pb en tallos de *D. viscosa* por efecto de la fuente de plomo cuando la planta creció en ausencia de *Lewia* sp, encontrando un máximo de 328.4 ± 47.2 $\mu\text{g Pb/g PS}$ (para $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) (Figura 19a). Sin embargo, la acumulación de plomo en tallos aumentó cerca de tres veces por efecto de la interacción planta-hongo, alcanzando valores alrededor de 1000 $\mu\text{g Pb/g PS}$ independientemente de la solubilidad de la sal de Pb. Similar a lo observado en nuestro estudio, Arriagada *et al.* (2006), reportan que la interacción de un hongo micorrízico (*Glomus deserticola*) y uno no micorrízico (*Fusarium concolor*) con *Eucalyptus globulus* provocó un incremento de hasta 2.4 en la acumulación de plomo en el tallo de la planta.

Una respuesta similar se encontró en las raíces de *D. viscosa*, registrando concentraciones de 1748 ± 280 y 2018 ± 297 mg Pb/g PS para $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y PbS respectivamente, en las plantas crecidas sin el hongo. Nuevamente, por efecto de la asociación *D. viscosa* - *Lewia* sp. se alcanzaron concentraciones entre 2.2 y 3.4 veces mayores que las obtenidas con la planta sola, acumulando hasta 5985 ± 559 mg Pb/g PS con la fuente de plomo soluble. Muchas plantas retienen el Pb en sus raíces por sorción y precipitación, permitiendo un mínimo transporte hacia sus tejidos aéreos. La retención de Pb en las raíces se atribuye a la unión del Pb a sitios de intercambio iónico en la pared celular y a su precipitación extracelular, principalmente en forma de carbonatos. La translocación a brotes, puede favorecerse por la adición de agentes quelantes en combinación con un bajo pH, evitando así la retención de Pb en la pared celular (Blaylock *et al.*, 1997)

El aumento en la acumulación de Pb por efecto de la asociación *D. viscosa* - *Lewia* sp. podría deberse a la liberación de ciertos compuestos, como ácidos orgánicos, que favorecen la formación de complejos solubles de Pb y/o modifican las condiciones (como el pH) en el suelo modelo, beneficiando así la disolución y biodisponibilidad del metal. Wang *et al.* (2007) encontraron que los ácidos acético y málico mejoraron la captación de Pb por raíces de *Triticum aestivum* L. en condiciones de hidroponia. En nuestro estudio, se encontró que la planta sola incrementó significativamente (>20%) la fracción soluble de Pb (Figura 21), especialmente en el caso del PbS (28%), considerando que la concentración inicial de dicha fracción se encontraba alrededor de 1%. En el caso de los cultivos de *D. viscosa* con *Lewia* sp., la cantidad de Pb soluble al final del periodo de crecimiento fue menor (-9%), lo que podría atribuirse a una captación y acumulación más eficiente del Pb disponible por efecto de la asociación, lo cual se refleja en la mayor acumulación del metal en tejidos (-8%).

Hasta hoy, los mecanismos de captación y biodisponibilidad del Pb para los sistemas suelo-planta permanecen poco entendidos (Wang *et al.*, 2007). En la mayoría de los suelos que pueden sustentar el crecimiento vegetal, los niveles de Pb soluble son muy bajos y no permiten la captación por la planta, aún si ésta tiene la capacidad genética para acumularlo. En general, la acumulación de Pb en brotes de plantas hiperacumuladoras es proporcional a la concentración inicial del metal en forma soluble; si dicha fracción disminuye, la acumulación de Pb en tejidos aéreos es sustancialmente menor (Blaylock *et al.*, 1997). Blaylock *et al.* (1997) encontraron que *Brassica juncea* puede acumular y translocar Pb a sus brotes en concentraciones de hasta 1.5% (PS) cuando el metal se encuentra soluble; sin embargo, la translocación fue mínima cuando la disponibilidad del Pb disminuyó.

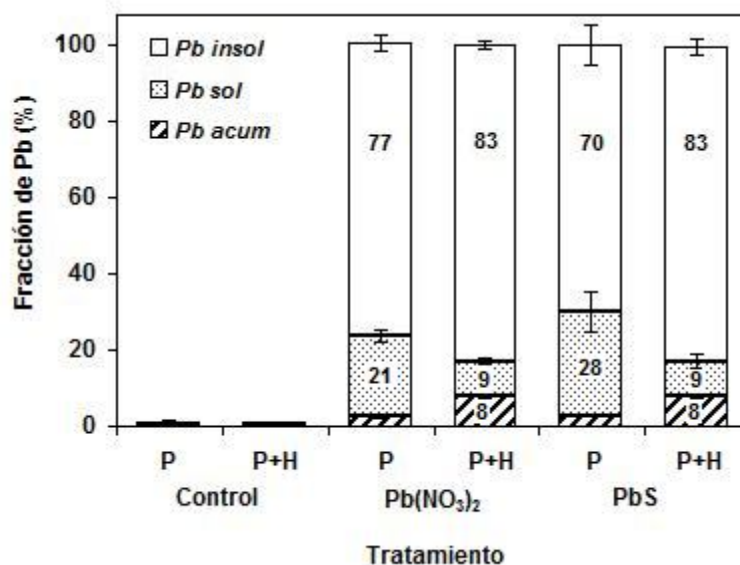


Figura 21. Balance del plomo total inicial (250 mg/kg) en el suelo modelo después de 35 días de crecimiento de *D. viscosa* (P) o *D. viscosa-Lewia* sp. (P+H). Control: agrolita sin Pb; (PbNO₃)₂: fuente soluble de Pb; PbS: fuente insoluble de Pb; Pb insol: fracción insoluble; Pb sol: fracción soluble; Pb acum: fracción acumulada en raíces y brotes de *D. viscosa* o *D. viscosa-Lewia* sp.

Muchos estudios han demostrado que la acumulación de Pb en la parte aérea de una planta puede mejorarse por la aplicación de agentes quelantes sintéticos, como el ácido etilen-diamino-tetra acético (EDTA), favoreciendo la captación y la acumulación en biomasa (Blaylock *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2007). No obstante, también se reconoce que los ácidos orgánicos, importantes componentes de exudados radiculares y metabolitos microbianos, aumentan la disolución de metales a partir de minerales altamente insolubles, mejorando así su movilidad alrededor de las raíces e incrementando su biodisponibilidad

para las plantas. Además, los ácidos orgánicos juegan un importante papel fisiológico en la tolerancia a metales así como en mecanismos que implican su translocación y/o acumulación (Wang *et al.*, 2007). En comparación con otros metales, existe poca información acerca de la interacción del Pb con ácidos orgánicos en o cerca de la interfase suelo-raíz, así como de la captación del metal por las raíces (Wang *et al.*, 2007). Blaylock *et al.* (1997) demostraron que la adición de ácido acético a un suelo alcalino en presencia de EDTA casi dobló la acumulación de Pb en brotes de *B. juncea*. Con tales resultados, este grupo confirmó que la acidificación estimuló el movimiento de Pb de las raíces a los brotes, por la reducción de la retención en raíces. Wang *et al.* (2007) encontraron que la captación de Pb mejorada por la adición de ácidos orgánicos en *Triticum aestivum* L., fue parcialmente mediada por canales de Ca^{2+} y K^+ y que ésta dependió de la función de una ATPasa tipo P en la membrana plasmática.

De acuerdo con nuestros resultados, la mayor acumulación de plomo se presentó a nivel de raíz, encontrando entre 4.4 - 6.5 veces más metal que en los tallos, independientemente de la presencia de *Lewia* sp. y de la solubilidad del plomo (Figura 20). Este resultado se relaciona con el transporte interno del metal en la planta, es decir, con su capacidad para translocar plomo desde las raíces hacia los tallos. Esta capacidad se estimó a través del factor de translocación (FT) (Tabla 10). Asimismo, la alta acumulación de plomo por la planta y por la interacción planta-hongo se refleja en un alto valor del factor de bioconcentración (FBC) (Tabla 10).

Tabla 10. Factor de translocación (FT) y factor de bioconcentración (FBC) de plomo para plantas de *D. viscosa* y *D. viscosa* en asociación con *Lewia* sp. crecidas durante 35 días en agrolita con 250 mg Pb/l de forma soluble ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) e insoluble (PbS).

Tratamiento		FT	FBC
<i>D. viscosa</i>	Control	-	-
	$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	0.18 ± 0.03	8.2 ± 1.3
	PbS	0.16 ± 0.02	9.3 ± 1.3
<i>D. viscosa</i> - <i>Lewia</i> sp.	Control	-	-
	$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	0.15 ± 0.03	28.0 ± 2.7
	PbS	0.21 ± 0.03	22.1 ± 3.0

De acuerdo con Deng *et al.* (2004) y con Audet y Charest (2007), un valor del FT mayor a 1 indica una eficiente translocación del metal a brotes, por lo que la planta puede usarse con fines de fitoextracción. Si por el contrario, dicho valor es menor a 1, la translocación

del metal es baja, por lo que éste es retenido principalmente en las raíces y puede usarse para fitoestabilización. El factor de bioconcentración (FBC), por otra parte, se utiliza para medir la capacidad de captación de un metal por una planta con relación a su concentración en el suelo. Para las plantas, el FBC se utiliza como una medida de la eficiencia de acumulación de metales en biomasa, donde valores > 1 indican que la especie es potencialmente hiperacumuladora (Audet y Charest, 2007). Los valores de FT y FBC obtenidos en el presente estudio, indican que *D. viscosa* y sobretodo, en asociación con *Lewia* sp., podrían usarse de manera efectiva para la fitoestabilización de un sustrato contaminado con plomo y, por consiguiente, para la revegetación de sitios contaminados.

A través de este trabajo también se corroboró la importancia de la selección de un soporte adecuado para la realización de estudios de fitorremediación de metales pesados mediante cultivos *in vitro*. En este trabajo se utilizó agrolita como soporte modelo para simular ciertas condiciones presentes en el suelo (como aireación y sorción), pero evitando las complejas interacciones que ocurren en él. La agrolita es un sustrato con alta porosidad ($>85\%$) que permite un adecuado recambio gaseoso, favoreciendo el crecimiento fúngico alrededor de las raíces de la planta.

Los resultados obtenidos en el presente estudio permitieron demostrar que la asociación entre *D. viscosa* y *Lewia* sp. favoreció una alta fitoacumulación de plomo, a partir de fuentes con solubilidades distintas. Este resultado puede estar relacionado con la capacidad de muchos hongos filamentosos para acumular altas concentraciones de metales pesados en su biomasa, así como para favorecer el crecimiento de ciertas especies vegetales bajo condiciones de estrés abiótico por la presencia de metales tóxicos como el Pb.

Es importante resaltar que hasta ahora, la mayoría de los estudios (Arriagada *et al.* 2006; Sudová *et al.* 2007; Lixiang *et al.* 2008), reconocen el importante papel que desempeñan las micorrizas en la tolerancia y fitoacumulación de plomo. Sin embargo, este trabajo es uno de los primeros estudios que demuestra que la interacción de un hongo no micorrízico, como *Lewia* sp., con una planta tolerante a plomo mejora significativamente la fitoestabilización del metal en las raíces. Esto resulta de gran relevancia debido a que especies como *Lewia* sp. son componentes comunes e importantes en la rizósfera, que pueden propagarse fácilmente y que podrían utilizarse como herramienta para obtener mejores rendimientos en la acumulación de plomo en plantas fitorremediadoras.

7. CONCLUSIONES

Las seis cepas fúngicas evaluadas (*T. harzianum*, *B. theobromae*, *Fusarium* spp. y *Lewia* sp.) toleraron 100 mg/l de plomo soluble ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$), ya que no presentaron efectos negativos significativos en el crecimiento. De forma general, los géneros *Fusarium* y *Lewia* presentaron mayor capacidad para tolerar y acumular plomo.

La cepa de *Lewia* sp. favoreció de manera cualitativa y cuantitativa el crecimiento de *D. viscosa*, por lo que se seleccionó para los ensayos de fitorremediación.

La fuente y concentración inicial de Pb en medio líquido provocaron efectos significativos en el crecimiento de *Lewia* sp. El aumento en la concentración de la sal soluble ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) produjo una disminución (hasta 39%) en la producción de biomasa con respecto al control sin Pb; la fuente insoluble (PbS) provocó un aumento (hasta 16%) en el peso de la biomasa del hongo, independientemente de la concentración inicial de metal.

La acumulación de Pb en la biomasa de *Lewia* sp. dependió de la concentración inicial del metal en el medio y fue independiente de su solubilidad, observándose una mayor biosorción a mayor concentración inicial. La capacidad de acumulación de Pb por esta cepa fue sobresaliente, ya que se alcanzaron valores superiores a 100 mg Pb/g PS para concentraciones iniciales de 500 mg Pb/l. Los resultados sugieren que el principal mecanismo de biosorción de Pb por *Lewia* sp. fue activo, ya que obtuvo una mayor acumulación en biomasa viva con respecto a la registrada en biomasa muerta.

D. viscosa es una planta con potencial para fitoestabilizar plomo, ya que acumula entre 5 y 6 veces más plomo en las raíces que en la parte aérea, obteniéndose concentraciones cercanas a 2000 μg Pb/g de raíz (peso seco). La inoculación con *Lewia* sp. favoreció significativamente (2.2 - 3.4 veces) la acumulación de plomo tanto en tallos como en raíces de *D. viscosa*, encontrando concentraciones de 5985 ± 559 y 4534 ± 660 μg Pb/g de raíz, para el $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y el PbS, respectivamente.

El presente trabajo es uno de los primeros estudios que demuestra que la interacción de un hongo no micorrícico, como *Lewia* sp., con una planta potencialmente fitoestabilizadora de Pb, como *D. viscosa*, mejora significativamente la fitoestabilización del metal por su alta acumulación en las raíces.

8. RECOMENDACIONES

Con base en los resultados obtenidos en este proyecto, se proponen las siguientes recomendaciones para la realización de estudios posteriores:

- ü Estudiar los mecanismos de tolerancia y acumulación de plomo presentes en *Lewia sp.* y *D. viscosa*. Se propone evaluar la capacidad de producción de ácidos orgánicos como el ácido cítrico, oxálico y málico por ambos organismos y establecer su efecto sobre la precipitación y/o disolución de los metales pesados presentes en el medio.
- ü Evaluar la producción de compuestos tiólicos como metalotioneínas, fitoquelatinas y glutatión, los cuales desempeñan un papel importante en la tolerancia y acumulación de metales tanto en plantas como en hongos. Estos compuestos permiten la acumulación o secuestro de metales en la vacuola a través de la formación de conjugados metálicos que reducen la toxicidad de los metales en el citosol (Bellion *et al.*, 2006; Gadd, 1993).
- ü Estudiar la actividad de enzimas como la glutatión-S-transferasa, que cataliza reacciones de conjugación entre metales tóxicos y compuestos tiólicos como el glutatión y las metalotioneínas.
- ü Establecer relaciones entre la producción de ácidos orgánicos y de compuestos tiólicos sobre la capacidad para acumular metales tóxicos como el plomo en la asociación de *D. viscosa* con *Lewia sp.*
- ü Conocer la localización y distribución de complejos metálicos dentro de distintas fracciones celulares, además de realizar estudios histoquímicos en *D. viscosa* que permitan conocer el destino final de los metales pesados y su distribución a lo largo de los componentes que conforman el tejido vegetal

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, I.; Moctezuma-Zárate, M.G.; Cárdenas, J.F. y Gutiérrez, C. 2007. Bioadsorción de cadmio (II) en solución acuosa por biomasas fúngicas. *Información Tecnológica*, 18: 9-14.
- Adriano, D. C. 1986. Trace elements in the terrestrial environment. *Springer*, New York, 533 pp.
- Albany, N.; Vilchez, J.; Leon de Sierralta, S.; Molina, M. y Chacín, P. 2006. Una metodología para la propagación in vitro de *Aloe vera* L. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 23: 213-222.
- Al-Kadeeb A. S. 2007. Effect of lead and copper on the growth of heavy metal resistance fungi isolated from second industrial city in Riyadh, Saudi Arabia. *Journal of Applied Sciences*, 7: 1019-1024.
- Alloway, B. J. 1990. Soil processes and behaviour of metals. En: Alloway, B. J (Ed.), *Heavy Metals in Soils*. Editorial *Blackie Academic and Professional*, Glasgow. 105-121 pp.
- Alloway, B.J. 1995. *Heavy Metals in Soils*. *Blackie Academic and Professional*. Londres. 370 pp.
- Alloway, B.J. 1995a. Chapter 2: Soil process and the behavior of the heavy metals. En: Alloway, B.J. (Ed.). *Heavy metals in soils*. *Blackie Academic and Professional*. London, 2nd edition: 11-37 pp.
- Arriagada, C. A.; Herrera, M. A.; García-Romera, I. y Ocampo, J. A. 2004. Tolerance to Cd of soybean (*Glycine max*) and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) inoculated with arbuscular mycorrhizal and saprobe fungi. *Symbiosis*, 36: 285–299.
- Arriagada, C. A.; Herrera, M.A. y Ocampo, J. A. 2007. Beneficial effect of saprobe and arbuscular mycorrhizal fungi on growth of *Eucalyptus globulus* co-cultured with *Glycine max* in soil contaminated with heavy metals. *Journal of Environmental Management*, 84: 93-99.
- Audet, P. y C. Charest. 2007. Heavy metal phytoremediation from a meta-analytical perspective. *Environmental Pollution*, 147: 231-237.
- Audet, P. y C. Charest. 2007. Heavy metal phytoremediation from a meta-analytical perspective. *Environmental Pollution*, 147: 231-237.
- Bahadir, T. G. Bakan, L. Altas y H Buyukgungor. 2007. The investigation of lead removal by biosorption: An application at storage battery industry wastewaters. *Enzyme and Microbial Technology*, 41: 98-102.
- Baker, A. J. M.; McGrath, S. P.; Sidoli, C. M. D. y Reeves, R. D. 1994. The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plant. *Resources, Conversation and Recycling*, 11: 41-49
- Baker, D. E. y Senef, J. P. 1995. Chapter 8: Copper. En: Alloway, B. J. (Ed.). *Heavy metals in soils*. *Blackie Academic and Professional*. London, 2nd edition: 179-205 pp.
- Barea J. M.; Gryndler, M.; Lemanceau, Ph.; Schüepp, H. y Azcón, R. 2002. The rhizosphere of mycorrhizal plants. En: Gianinazzi S., Schüepp H., Barea J.M., Haselwandter K. (Eds.) *Mycorrhiza technology in agriculture: from genes to bioproducts*: 1–18 pp.

- Barea, J.M.; Pozo, M. J.; Azcón, R. y Azcón-Aguilar, C. 2005. Microbial co-operation in the rizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56: 1761-1778.
- Basta, N.T. 2004. Heavy metal and trace element chemistry in residual-treated soil: Implications on metal bioavailability and sustainable land application. En: *Sustainable Land Application Conference*, January, 4-8, Florida; University of Florida.
- Basta, N.T. y Tabatabai, M. A. 1992. Effect of cropping systems on adsorption of metals by soils: II. Effect of pH. *Soil Science*, 153: 195–204.
- Bellion, M.; Courbout, M.; Jacob, C.; Blaudez, D. y Chalot, M. 2006. Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letters*. 254: 173-181.
- Bhanoori, M. y Venkateswerlu, G. 2000. In vivo chitin-cadmium complexation in cell wall of *Neurospora crassa*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1523: 21–28.
- Blaudez, D.; Botton, B. y Chalot, M. 2000. Cadmium uptake and subcellular compartmentation in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Microbiology*, 146: 1109–1117.
- Blaylock, M.J., Salt, D.E., Dushenkov, S., Zakohrova, O., Gussman, C., Kapulnik, Y., Ensley, B.D., Raskin, I., 1997. Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil applied chelating agents. *Environmental Science and Technology*, 31: 860–865.
- Brambila C. E. y Lozano, Z. P. 1999 Metalotioneinas bioquímica y funciones propuestas. *Boletín de Educación Bioquímica* 18 (1): 21-27
- Buendía-González, L.; Orozco-Villafuerte, J.; Estrada-Zúñiga, M. E.; Barrera Díaz, C. E.; Vernon-Carter, E. J. y Cruz-Sosa, F. 2010. In vitro lead and nickel accumulation in mesquite (*Prosopis laevigata*) seedlings. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 9 (2).
- Cabrera, F.; Murillo, J. M. y López, R. 1999. Accumulation of heavy metals in sunflower and sorghum plants affected by the Guadamar spill. *The Science of the Total Environment*, 242: 281-292.
- Camacho, F., V. Gonzáles y A. Olivera. 1992. Germinación y Manejo en vivero del Chapulixtle (*Dodonea Viscosa* (L.) Jacq.). Memorias de la Reunión Científica Forestal y Agropecuaria. Centro de Investigación de la Región del Centro, Campo Experimental Coyoacán, México, D.F.: 1-6.
- Carlin, J. F.; Smith, G. R. Y Xiaoyu, B. 2006. Minerals Yearbook: Lead. *U. S. Geological Survey Minerals Yearbook*. (42) 1-21
- Celestino, C.; Hernández, I.; Carneros, E.; López-Vela, D. y Toribio, M. 2005. La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales*, 14: 345-357
- Chaney, R. L.; Malik, M.; Li, Y. M.; Brown, S. L.; Brewer, E. P.; Angle, J. S. y Baker, A. JM. 1997. Phytoremediation of soils metals. *Current Opinion in Biotechnology*, 8:279-284.

- Clemens, S.; Palmgren, M. G. y Kramer, U. 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science*, 7: 309-315.
- Cortinas de Nava C. 1998. Manejo ambiental de los relaves o jales mineros. *Gaceta Ecológica*, México, 49 pp.
- Cruz, H.A. 2008. Remoción de hidrocarburos por la interacción planta-hongo filamentoso bajo condiciones *in vitro*. Tesis de Maestría, Posgrado en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa. 41 pp.
- Debarati, P.; Pandey, G.; Pandey J. y Jain, R. K. 2005. Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration. *TRENDS in Biotechnology*, 23: 135-142.
- Deng, H.; Z.H. Ye y M.H. Wong. 2004. Accumulation of lead, zinc, copper and cadmium by 12 wetland plant species thriving in metal-contaminated sites in China. *Environmental Pollution*, 132: 29-40
- Duponnois, R. Garbaye J. 1990. Some mechanisms involved in growth stimulation of ectomycorrhizal fungi by bacteria. *Canadian Journal of Botany*, 6: 2148-2152.
- Eng, F.; Gutiérrez, R. M. y Favela, T. E. 2003. Efecto de la temperatura y el pH en el crecimiento superficial de *Botryodiplodia theobromae* RC1. *Revista iberoamericana de Micología*, 20: 172-175
- EPA. United States Environmental Protection Agency. 2000. Introduction to Phytoremediation. Washington, DC. 72 p. Disponible en: <http://www.clu-in.org/download/remed/introphyto.pdf>
- Espíndola, D. C. 2004. Prácticas de biología de organismos multicelulares. Ed. Universidad Javeriana, 92 pp.
- Esquivel, C. R. 2008. La otra cara de los microbios: microorganismos que alimentan y protegen a las plantas. Disponible en: <http://www.correodelmaestro.com/anteriores/2008/febrero/2antealua%20141.htm>
- Ezzouhri, L.; Castro, E.; Moya, M.; Espinola, F. y Lairini, K. 2009. Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco. *African Journal of Microbiology Research*, 3: 35-48.
- Fawcett, D. W. 1995 Tratado de Histología Bloom-Fawcett. 12ª ed. Interamericana/McGraw-Hill. México. 1044 pp.
- Ferrera-Cerrato, R. y Alarcón, A. 2001. La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. *ErgoSum*, 18: 175-183.
- Flathman, P.E.; Jerger, D.E. y Exner, J.H. 1994. Bioremediation Field Experiences. CRC Press, Boca Raton, Florida, 548 p
- Fomina, M.A.; Alexander, I.J.; Colpaert, J.V. y Gadd, G.M. 2005. Solubilization of toxic metal minerals and metal tolerance of mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*. 37: 851-866.

- Fracchia, S.; Garcia-Romera, I.; Godeas A. y Ocampo, J.A.. 2000. Effect of the saprophytic fungus *Fusarium oxysporum* on arbuscular mycorrhizal colonization and growth of plants in greenhouse and field trials. *Plant and Soil*, 223: 175–184.
- Freitas, H.; Prasad, M. N. V. y Pratas, J. 2004. Heavy metals in the plant community of Sao Domingo an abandoned mine in south east of Portugal: Possible applications in mine remediation. *Environmental International*, 30: 65-72.
- Fuentes-Dávila, G y Ferrera-Cerrato, R. 2007. Ecología de la raíz. *Sociedad Mexicana de Fitopatología*, A. C.: 1-26.
- Gadd, G.M. 2007. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research*, 111: 3-49.
- Gadd, G.M. 1990. Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. *Experientia*. 46: 834–840.
- Gadd, G.M. 1993. Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytologist*. 124: 25-60.
- Garbaye, J. 1994. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, 128: 197-210.
- Garbisu, C. y Alkorta, I. 1997. Bioremediation: principles and future. *Journal of Clean Technology, Environmental Toxicology, and Occupational Medicine*, 6: 351-366.
- Geebelen W., D.C. Adriano, D. van der Lelie, M. Mench, R. Carleer, H. Clijsters, J. Vangronsveld. 2003. Selected bioavailability assays to test the efficacy of amendment-induced immobilization of lead in soils. *Plant and Soil*, 249: 217-228.
- Glick, B. R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41: 109–117.
- González, M. S. 1993. Reducción de la toxicidad del cobre y cadmio en alfalfa mediante el uso de abonos orgánicos. *Agricultura Técnica*, 57: 245-249.
- González, M. S. 1995. Chapter 17: Copper upper critical levels for plants on copper- polluted soils and the effect of organic additions. En: Adriano, D.C.; Z.E. Chen, S.S. Yang, (Eds.) *Biochemistry of trace elements. Science and Technology Letters*: 195-203.
- González-Chávez, M.C. 2005. Recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismos rizosféricos. *Terra Latinoamericana*, 23: 29-37.
- Greger, A. 2004. Metal availability, uptake, transport and accumulation in plants. En: Prasad, M.N.V. (Ed.). *Heavy metal stress in plants*. 2nd Edition. Springer-Verlag, Berlin. 1-27 pp.
- Greger, A. 2004. Metal availability, uptake, transport and accumulation in plants. En: Prasad, M.N.V. (Ed.). *Heavy metal stress in plants*. 2nd Edition. Springer-Verlag, Berlin. 1-27 pp.

- Gutiérrez-Rojas, M. 2008. Informe de avance técnico del proyecto (GTO-2005-C04-18600): Selección de plantas del estado de Guanajuato con capacidad para fitorremediar suelos contaminados con metales. Fondo Mixto CONACyT-Gobierno del Estado de Guanajuato. 12 pp.
- Hursthouse, A.S. 2001. The relevance of speciation in the remediation of soils and sediments contaminated by metallic elements - an overview and examples from Central Scotland, UK. *Journal of Environmental Monitoring*, 3: 49-60.
- Ibañez, J. J. 2007. El complejo de cambio o complejo adsorbente en los suelos. Disponible desde internet en: <http://weblogs.madrimasd.org/universo/archive/2007/05/30/66696.aspx>
- INEGI. 2005. Minería en México. Disponible en: <http://cuentame.inegi.gob.mx/impresion/economia/mineria.asp>
- Jentschke, G.; Winter, S. y Godbold, D. L. 1999. Ectomycorrhizas and cadmium toxicity in Norway spruce seedlings. *Tree Physiology*, 19: 23-30.
- Kabata-Pendias, A. 1995. Agricultural problems related to extensive trace metal contents of soil. En: Salomons, W.V. Forstner C.P. Mader (Eds.) Heavy metals, problems and solutions. *Springer-Verlag*: 3-18 pp.
- Kabata-Pendias, A. 2004. Soil-plant transfer of trace elements – an environmental issue. *Geoderma*, 122: 143–149.
- Kabata-Pendias, A.S. y Pendias, H. 2000. Trace elements in soils and plants. *CRC Press*, 432 pp.
- Karthikeyan, R. y Kulakow, P. A. 2003. Soil plant microbe interactions in phytoremediation. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 78: 53-74.
- Kennedy, A. C. 1998. The rhizosphere and spermosphere. En: Sylvia D.M., Fuhrmann J.J., Hartel P.G., Zuberer D.A. (Eds.). Principles and applications of soil microbiology. *Upper Saddle River*. 389–407 pp.
- Khan, A. G. 2006. Micorrhizoremediation: an enhanced form of phytoremediation. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 7: 503-514.
- Khan, A. G. y Chaudhry, T. M.; Hayes, W. J.; Khoo, C. S.; Hill, L.; Fernández, R. y Gallardo, P. 1997. Growth responses of endomycorrhizal onions in unsterilized coal waste. *New Phytologist*, 87: 363-370.
- Khan, A. G.; Kuek, C.; Chaudhry, T. M.; Khoo, C. S. y Hayes, W. J. 2000. Role of plants, micorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere*, 41: 197-207.
- Kramer, U. 2005. Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Current Opinion in Biotechnology*, 16: 133-141

- Kumar, P.B.A.N.; Dushenkov, V.; Motto, H. y Raskin, I. 1995. Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental Science & Technology*, 29: 1232-1238.
- Lesmana, S. O.; Febriana, N.; Soetaredjo, F. E.; Sunarso, J. e Ismadji, S. 2009. Studies on potential applications of biomass for the separation of heavy metals from water and wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, 44: 19-41.
- Leyval, C.; Weissenhorn, I.; Glashoff, A. y Berthelin, J. 1994. Influence des metaux lourds sur la germination des spores de champignons endomycorrhizien a arbuscules dans les sols. Société Botanique de France. *Acta Botanica Gallica*, 141: 523 - 528
- Liley, P.E., G.H. Thomson, D.G. Friend, T.E. Daubert, E. Buck. 1997. Physical and Chemical Data. En: Perry, R.H., D.W. Green, J.O. Maloney (Eds.). Perry's Chemical Engineers' Handbook. 7 th Ed. McGraw-Hill, 204 pp.
- Linderman, R. G. 1992. Vesicular–arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. En: Bethlenfalvay G.J., Linderman R.G. (Eds.) Mycorrhizae in sustainable agriculture. Editorial Amer Society of Agronomy, 45–70 pp.
- Lloyd, J. R. y Lovley, D.R. 2000. Microbial detoxification of metals and radionuclides. *Current Opinion in Biotechnology*, 12: 248- 253.
- Lomelí, R. M. G. y Tamayo, O. R. 2004. El pH y los elementos en el crecimiento de las plantas. Disponible desde internet en: <http://www.sagan-gea.org/hojared/CSuelo.html>
- López, B. J.; Nieto, J. M.; Ramírez, R. V. y Herrera, E. L. 2000. Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant Science*, 160: 1-13.
- Lopez-Pérez, D. E. 2009. Trabajo de servicio social. UAM-I.
- Lors, C.; Tiffreau, C.; Laboudigue, A. 2004. Effects of bacterial activities on the release of heavy metals from contaminated dredged sediments. *Chemosphere*, 56: 619–630.
- Lovley, D. R. 1993. Dissimilatory metal reduction. *Annual Review of Microbiology*, 47: 263-290.
- Lovley, D. R. 2000. Environmental microbe-metal interactions. *American Society for Microbiology*, Washington, D.C. 395 pp.
- Lovley, D. R. y Coates, J. D. 1997. Bioremediation of metal contamination. *Current Opinion in Biotechnology*, 8: 285-289.
- Marschner, H. 1991. Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. *Plant soil*, 134: 1 -20.
- Martin, F.; Rubini, P.; Cote, R. y Kottke, I. 1994. Aluminium polyphosphate complexes in the mycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*: a ²⁷Al nuclear magnetic resonant study. *Planta*, 194: 241-246.
- Mattina, M.I.; Lannucci-Berger, W.; Musante, C. y White, J.C. 2003. Concurrent plant uptake of heavy metals and persistent organic pollutants from soil. *Environmental Pollution*, 124: 375-378.

- McBride, M.; Sauve, S. y Hendershot, W. 1997. Solubility control of Cu, Zn, Cd and Pb in contaminated soils. *European Journal of Soil Science*, 48: 337-346.
- Meeussen, J.C.L.; Keizer, M.G.; Van Riemsdijk, W.H. y DeHaan, F.A.M. 1994. Dissolution behavior of iron cyanide (Prussian blue) in contaminated soil. *Journal of Environmental Quality*, 23: 785-792.
- Meharg, A. A.; y Cairney, J. W. G. 2000. Co-evolution of mycorrhizal symbionts and their hosts to metal-contaminated environments. *Advances in Ecological Research*, 30:69-112
- Morales, V. y Rodriguez M. 2006. Hongos endófitos en plantaciones de mango 'Haden' de la planicie de Maracaibo, Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 23: 273-284.
- Morikawa, H. y Erkin, O. C. 2003. Basic processes in phytoremediation and some applications to air pollution control. *Chemosphere*, 52: 1553–1558
- Mosse, B. 1962. The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. *Journal of General Microbiology*, 27: 509-520.
- Muller, C. B. y Krauss, J. 2005. Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*, 8: 450-456.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*, 15: 473-497
- Navarro-Blaya S. y Navarro-García G. 2003. Química agrícola: el suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal. Mundi-Prensa Libros. 487 pp.
- Nies, D.H. 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51: 730-750.
- Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004. Diario Oficial de la Federación. 2 de marzo de 2007.
- Oburger, E; Kirk, G. J.; Wenzel, W. W.; Puschenreiter, M. y Jones, D. L. 2009. Interactive effects of organic acids in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 41: 449–457
- Ott, T.; Fritz, E.; Polle, A. y Shutzendubel A. 2002. Characterization of antioxidative systems in the ectomychorrhiza-building basidiomycete *Paxillus involutus* (Bartsch) Fr. and its reaction to cadmium. *FEMS Microbiology Ecology*, 42: 359-366.
- Pawlowska, T. E.; Chaney, R. L.; Chin, M. y Charvat, I. 2000. Effects of metal phytoextraction practices on the indigenous community of arbuscular mycorrhizal fungi at a metal contaminated landfill. *Applied and Environmental Microbiology*, 6: 2526-2530.
- Pilon-Smits, E. 2005. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, 56: 15-39.
- Pócsi, I.; Prade, R. A. y Penninckx. 2004. Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Advances in Microbial Physiology*, 49: 1-76.

- Prasad, M.N.V. y H.M. Freitas. 2003. Metal hyperaccumulation in plants biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6: 285-321.
- Rao, P.S.C.; Davis, G.B. y Johnston, C.D. 1996. Technologies for enhanced remediation of contaminated soil and aquifers: an overview, analysis and case studies. En Naidu, R. *et al.* (Eds.). *Contaminants and the Soil Environment in the Australasia-Pacific Region*. 189-210 pp.
- Raskin, I.; Kumar, P.B.A.N.; Dushenkov, S. y Salt, D.E. 1994. Bioconcentration of heavy metals by plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 5: 285-290.
- Raskin, I.; Smith, R. D. y Salt, D. E. 1997. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology*, 8: 221-226.
- Reeslev, M. y Kjoller. 1995. Comparison of biomass dry weights and radial growth rates of fungal colonies on media solidified with different gelling compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 4236-4239.
- Requena, N; Jimenez, I.; Toro, M y Barea, J. M.1997. Interactions between plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR), arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium* spp. in the rhizosphere of *Anthyllis cytisoides*, a model legume for revegetation in Mediterranean semi-arid ecosystems. *New Phytologist*, 136: 667-677
- Reyes, E. M.; Abarca, H. G. y Gamboa, A. M. M. 2008. Perfil biológico de hongos anamórficos del sureste de México. *Revista Mexicana de Micología*, 28: 49-56
- Ritz, K.1995. Growth responses of some soil fungi to spatially heterogenous nutrients. *FEMS Microbiology Ecology*, 16: 269–280.
- Salisbury, F. B. 1968 .Las plantas vasculares: forma y función. México. Ed. Herrero Hermanos, 198 pp
- Salt, D. E.; Smith, R. D. y Raskin, I. 1998. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 643-668.
- Schmit, H. W. y Sticher, H. 1991. Heavy metals compounds in the soil. En: Marina, E. (Ed): Metals and their compounds in the Environment. *VCH Verlagsgessellschaft*. 312-331.
- Schwab, A.; Zhu, D. S y Banks, M.K. 2008. Influence of organic acids on the transport of heavy metals in soil. *Chemosphere*, 72: 986-994.
- Sell, J.; Kayser, A.; Schulin, R. y Brunner I. 2005. Contribution of ectomycorrhizal fungi to cadmium uptake of poplars and willows from a heavily polluted soil. *Plant and Soil*, 277: 245-253.
- Singh, O.V.; Labana, S.; Pandey, G.; Budhiraja, R. y Jain, R. K. 2003. Pytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61: 405-412.
- Sudová, R. y Vosátka M. 2007. Differences in the effects of three arbuscular mycorrhizal fungal strains on P and Pb accumulation by maize plants. *Plant Soil*, 296: 77-83.

- Suresh, C. K. y Bagyaraj, D.J. 2002. Mycorrhiza-microbe Interface: effect on rhizosphere. En: Sharma, A. K., Jhori, B. N. (Eds.), *Arbuscular Mycorrhizae*. Scientific Publishers, Enfield, New Hampshire, USA: 7-28 pp.
- Taboski, M. A. S.; Rand, T. G. y Piorkó A. 2005. Lead and cadmium uptake in the marine fungi *Corollospora lacera* and *Monodictys pelagica*. *FEMS Microbiology Ecology*, 53: 445–453.
- Templeton D. M.; Ariese, F.; Cornelius, R.; Danielsson, G.; Muntau, H.; Van-Leeuwen, H. P. y Lobinsky, R. 2000. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations). *Pure and Applied Chemistry*, 72: 1453–1470.
- Tobin, J.M.; Cooper, D.G. y Neufeld R.J. 1984. Uptake of metal ions by *Rhizopus arrhizus* biomass. *Applied and Environmental Microbiology*, 7: 821-824.
- Tobin, J.M.; White C. y Gadd, G. M. 1994. Metal accumulation by fungi: applications in environmental biotechnology. *Journal of Industrial Microbiology*, 13: 126-130
- Valdés, P. F. y Cabrera, M. V. M. 1999. La contaminación por metales pesados en Torreón, Coahuila, México. *Texas Center for Policy Studies*. 46 pp.
- Valix, M. y Loon, L.O. 2003. Adaptive tolerance behavior of fungi in heavy metals. *Minerals Engineering*, 16: 193-198.
- Villaseñor Ríos, J. L. y F. J. Espinosa García, 1998. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México, Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario y Fondo de Cultura Económica, México, D.F.
- Vimala, R. y N. Das. 2009. Biosorption of cadmium (II) and lead (II) from aqueous solutions using mushrooms: A comparative study. *Journal of Hazardous Materials*, 168: 376-382.
- Vinale, F.; Sivasithamparam, K.; Ghisalberti, E. L.; Marra, R.; Woo, S. L.; Lorito M. 2008. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry*, 40: 1–10
- Volke-Sepúlveda, T.; Velasco, T. J. y De la Rosa, P. D. 2005. Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. 1ª. Edición. *Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología*, México. 141 pp.
- Von Carlowitz, P.; Wolf, G. y Kemperman, R. 1991. The multipurpose and shrub database. an information and decision-support system. User's manual, Version 1.0. ICRAF. Nairobi Kenya.
- Wang, H., X. Shan, T. Liu, Y. Xie, B. Wen, S. Zhang, F. Han, M.T. van Genuchten. 2007. Organic acids enhance the uptake of lead by wheat roots. *Planta*, 225: 1483–1494
- Wang, J. y Chen, Can. 2008. Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances*, 27: 195-226
- Yang J.Y. X.E. Yang, Z.L. He, T.Q. Li, J.L. Shentu, P.J. Stoffella. 2006. Effects of pH, organic acids, and inorganic ions on lead desorption from soils. *Environmental Pollution*, 143: 9-15.

- Yang, X.; Feng, Y.; He, Z. y Stofella, P. J. 2005. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*,18:339–353
- Yin, A.; H. E.; Li, Y.; Huang, C. P. y Sanders, P. F. 1996. Adsorption of mercury (II) by soil: effects of pH, chloride and organic matter. *Journal of Environmental Quality*, 25: 837-844.
- Zafar, S.; Aqil, F. y Ahmad, I. 2007. Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. *Bioresource Technology*, 98: 2557-2561.
- Zhang, Q.; Davis, L.C. y Erickson, L.E. 2000. An experimental study of phytoremediation of methyl-tert-butyl-ether (MTBE) in groundwater. *Journal of Hazardous Substance Research*. 2 (4): 1-19
- Zhu, Y. G. y Rosen, B. P. 2009. Perspectives for genetic engineering for the phytoremediation of arsenic-contaminated environments: from imagination to reality?. *Current Opinion in Biotechnology*,20:220–224

10.CONSTANCIAS Y CURSOS



Sociedad Mexicana de
Biotecnología y Bioingeniería, A.C.



17 de Abril de 2009

CARTA DE ACEPTACIÓN

Estimados

César Rojas Loria , Daniel Lopez Pérez, Leticia Buendía González, Tania Volke Sepúlveda

Su trabajo: **"SELECCIÓN DE CEPAS DE HONGOS FILAMENTOSOS PARA SU USO EN FITORREMEDIACIÓN"**, del área de **Biotecnología Ambiental** fue **ACEPTADO** en la modalidad de **Oral** para el XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras. El cual se llevará a cabo en Acapulco Guerrero, México, del 21 al 26 de junio de 2009.

Su clave es la: **OIV-24**

Su presentación está programada para el día **25-Jun-09**

Por favor consulten las instrucciones, el lugar y hora de su presentación en la página de la SMBB:
www.smbb.com.mx/congreso.php

Saludos cordiales

Comité Organizador
XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y
VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras

Dr. Alfredo Martínez Jiménez
Presidente del Comité Organizador

Dr. Maricarmen Quirasco Baruch
Presidente del Comité Científico

Km. 23.5 Carretera Federal México-Cuernavaca, Av. Cipreses s/n, col. San Andrés Totoltepec, C.P. 14400, México, D.F.
Teléfono (55) 5849 58 59 -- Fax: (55) 5849 68 62 -- Email: smbiotec@yahoo.com.mx www.smbb.com.mx



DM-24

Otorga la presente

CONSTANCIA

a

**César Rojas Loria, Daniel Lopez Pérez,
Leticia Buendía González, Tania Volke Sepúlveda**

Por la presentación de su trabajo **SELECCIÓN DE CEPAS DE HONGOS FILAMENTOSOS PARA SU USO EN FITORREMEDIACIÓN** del área de Biotecnología Ambiental como Trabajo Libre en el XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y el VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras (SIPAL).

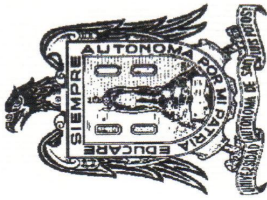


21 a 26 de junio, 2009 · Acapulco, Guerrero

[Signature]
Dr. Mario Luis Villarreal
Presidente de la SEMB

[Signature]
Dr. Alfredo Martínez Jiménez
Presidente del Comité Organizador

[Signature]
Dr. Sebastián Quintero Sánchez
Presidente del Comité Científico



La Universidad Autónoma de San Luis Potosí
a través de la Facultad de Agronomía

Otorga la presente

Constancia

A: **BIÓL. César Cuahutémoc Rojas Loria**

Como asistente al Curso-Taller


Análisis de Metales Pesados por Espectrofotometría de Absorción Atómica


Realizado del 10 al 13 de Agosto de 2009, con duración de 30 horas.

“SIEMPRE AUTÓNOMA, POR MI PATRIA EDUCARÉ”

San Luis Potosí, S.L.P., Agosto de 2009


Lic. Mario García Valdez
Rector


Arq. Manuel Fermín Villar Rubio
Secretario General


M.C. Luz María Nieto Caraveo
Secretaria Académica



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

extiende la presente constancia a:

César Cuauhtémoc Rojas Loria

Por su participación en el

CURSO

BIOQUÍMICA TISULAR DE LA RAÍZ:

FACTORES QUE GENERAN SU DIFERENCIACIÓN Y DESARROLLO

Del 9, 10, 11, 17 y 18 de septiembre de 2009, con un total de 20 horas.

México D.F., a 18 de septiembre de 2009.


Dr. Francisco F. Pedroche
Director de la División de
Ciencias Biológicas y de la Salud


Dr. Rubén Román Ramos
Jefe del Departamento de
Ciencias de la Salud


Dra. Leticia Bucio Ortiz
Coordinadora del Curso


Dr. Fernando Díaz de León S.
Coordinador del Curso



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Efecto de la interacción hongo- *Dodonaea viscosa* L. Jacq en la fitorremediación de plomo en un sistema *in vitro*

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Biól. César Cuahutémoc Rojas Loria

DIRECTORA:

Dra. Tania Volke Sepúlveda

MÉXICO, D.F.

ENERO 2010